

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 Activités
Biologiques

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat
En Biologie Option: Microbiologie

THEME

**Etude multicentrique de la résistance aux
antibiotiques chez *Enterobacter cloacae***

Présentée et soutenue le 28 Avril 2015 à Tlemcen, Algérie

Mme BOUDJEMAA Djahida Née SOUNA

Composition du Jury

Pr HASSAINE H.	Université de Tlemcen, Algérie	Président du Jury
Dr KHELIL N.	Université de Tlemcen, Algérie	Examineur
Pr TOUATI A.	Université de Bejaia, Algérie	Examineur
Dr SEBAIHIA M.	Université de Chlef, Algérie	Examineur
Pr BELHANDOUZ L.	Chef de service de chirurgie au C.H.U de Sidi Bel Abbes, Algérie	Examineur
Pr DRISSI M.	Université de Tlemcen, Algérie	Directeur de thèse

Année Universitaire : 2014-2015

«سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا إنك
أنت العليم الحكيم»

سورة البقرة: الآية 31

اللهم إنا نسألك علما نافعا و قلبا خاشعا وشفاء
من كل داء و سقم

Remerciements

Une thèse est le résultat d'un travail de longue haleine. Ce travail réalisé au laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques » de la faculté SNV-STU de l'université Abou Bekr Belkaid, n'aurait pu être réalisé sans un cadre de travail matériel et intellectuel favorable et sans soutien. Que soient donc ici remerciés tous ceux qui m'ont transmis l'énergie et la confiance nécessaires au déroulement de cette étape scientifique particulière qu'est la thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier Mr DRISSI M., Professeur à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses conseils, son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'il m'a témoigné tout au long de cette étude.

Je tiens également à remercier :

Mm HASSAINE H., professeur à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, pour avoir accepté de présider le jury.

Mm Khelil N., professeur à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.

Mr Touati A., professeur à l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mr SEBAIHA M., maitre de conférences A à l'université Hassiba Benbouali de Chlef, pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.

Mr BELHANDOUZ L., Professeur Chef de service de chirurgie au C.H.U de Sidi Bel Abbès pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.

J'aimerais remercier tous le personnel du C.H.U de Tlemcen, de Sidi Bel Abbès et d'Oran pour m'avoir facilité l'accès, ainsi pour son aide de près ou de loin, par leur expertise et leur bonne humeur intarissable.

Je tiens à remercier aussi les Ingénieurs et Technicien au laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activités Biologiques » et les membres de mon équipe de laboratoire « Résistance aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif »

Merci.....!

Dédicaces

Je dédie cette thèse

*À mon père et ma mère Mostefa et Nacira qui
m'ont toujours aidé et soutenu, vous m'avez transmis
l'amour de la science et le savoir*

*À mon époux Hadj Abdelkader pour tous ses
encouragements et son soutien, avec tout mon amour, merci
pour tout*

*À mon adorable bébé Mohamed Islam, tu es un cadeau du
Bon Dieu*

À mon beau père, avec toute mon affection

*À mes sœurs et belles sœurs : Amel, Ibtissem, Chaimaa
Khadidja, Fatiha et Zahira*

*À mon frère et mes beaux frères : Redouane, Mohamed et
Abdellah*

À mes neveux : Issam, Yasser et Maria

*À toute la famille SOUNA
La famille BOUKHARI
La famille BOUDJEMAA*

Djahida

Sommaire

<i>Introduction</i>	1
<i>Synthèse Bibliographique</i>	4
1. Résistance aux β -lactamines	5
1.1. Définition des β -lactamines	5
1.2. Mécanisme d'action	5
1.3. Différents mécanismes de résistances aux β -lactamines	6
1.3.1. Imperméabilité	7
1.3.2. Systèmes d'efflux	7
1.3.3. Modification de PLP	7
1.3.4. Production de β -lactamases	8
2. Résistance aux aminosides	12
2.1. Définition et modes d'action des aminosides	12
2.2. Mécanismes de résistance	13
3. Résistance aux quinolones	13
3.1. Définition et modes d'action des quinolones	13
3.2. Mécanisme de résistance	14
4. Support génétique de la résistance aux antibiotiques	16
4.1. Résistance par mutation chromosomique	16
4.2. Résistance par acquisition de matériel génétique exogène	17
4.2.1. Plasmides	17
4.2.2. Transposons	17
4.2.3. Intégron	20
4.2.3.1. Structure des intégrons	20
4.2.3.2. Classification des intégrons	21
4.2.3.3. Structure des cassettes	21
5. Mécanismes de transfert du matériel génétique	22
5.1. Transformation	22
5.2. Transduction	23
5.3. Conjugaison	23
6. <i>Enterobacter cloacae</i>	24
6.1. Classification phylogénique	24
6.2. Ecologie-habitat	24

6.3.	Morphologie et principaux caractères biochimiques	25
6.4.	Caractères cultureux	25
6.5.	Pouvoir pathogène	25
6.6.	Résistance aux β -lactamines	25
6.6.1.	Résistance naturelle	26
6.6.2.	Résistance acquise	28
6.6.2.1.	Phénotype « céphalosporinase de haut niveau »	28
6.6.2.2.	Phénotype « β -lactamase à spectre étendu : BLSE »	31
6.6.2.3.	Phénotype « pénicillinase de haut niveau » ou « pénicillinase acquise »	35
6.6.3.	Résistance aux carbapénèmes	35
6.7.	Résistance d' <i>Enterobacter cloacae</i> aux aminosides	38
6.8.	Résistance d' <i>Enterobacter cloacae</i> aux quinolones	40
7.	Epidémiologie des BLSE à <i>Enterobacter cloacae</i> :	42
7.1.	Notions générales	42
7.2.	Facteur de risque	43
7.3.	Réservoirs	44
7.4.	Modes de transmission	44
	<i>Matériel et Méthodes</i>	45
1.	Matériel	46
1.1.	Souches de références	46
1.2.	Milieux de culture	46
1.2.1.	Milieux de culture liquides	46
1.2.2.	Milieux de culture solides	46
1.3.	Tests biochimiques	46
1.4.	Solutions, Enzymes et Tampons	46
1.5.	Antibiotiques	47
1.5.1.	En disque	47
1.5.2.	En poudre	47
2.	Méthodes	48
2.1.	Prélèvements	48
2.1.1.	Lieu d'étude (hôpitaux et services)	48
2.1.2.	Type de prélèvements	48
2.2.	Isolement et purification	48

2.3.	Identification	49
2.4.	Antibiogramme	49
2.5.	Détermination de la CMI en milieu solide	51
2.6.	Détermination de la CMI par E-test (Epsillométer-test)	52
2.7.	Test de synergie	54
2.8.	Test à la cloxacilline	55
2.9.	Test de Hodge	56
2.10.	Test de l'EDTA	57
2.11.	Etude des plasmides extraits des souches et leurs transconjugants	58
2.11.1.	Extraction de Kieser	58
2.11.2.	Electrophorèse sur gel d'agarose	58
2.11.3.	Transfert des plasmides par conjugaison	60
2.11.4.	Electroporation	60
2.12.	Etude de l'ADN par PCR	61
2.12.1.	Extraction et purification de l'ADN génomique	61
2.12.1.1.	Choc thermique	61
2.12.1.2.	QIA-amp DNA mini kit	61
2.12.2.	Amplification de l'ADN par PCR	63
2.13.	Séquençage de l'ADN	63
2.14.	Typage des souches par électrophorèse en champ pulsé (ECP)	64

Résultats 67

1.	Prélèvements	68
2.	Souches identifiées	69
3.	Répartition selon les unités fonctionnelles et les prélèvements	71
3.1.	A l'hôpital de Tlemcen	71
3.2.	A l'hôpital de Sidi Bel Abbes	72
3.3.	A l'hôpital d'Oran	73
3.	Résistance aux antibiotiques	74
4.	Phénotypes de résistance	76
5.	Résistances associées	81
6.	Conjugaison bactérienne	83
7.	L'extraction de l'ADN plasmidique	84
8.	Typage moléculaire par électrophorèse en champ pulsé (PFGE)	85
9.	PCR et séquençage	86

<i>Discussion</i>	90
<i>Conclusion</i>	99
<i>Références bibliographiques</i>	102
<i>Annexes</i>	137

Liste des figures

Figure 1.	Structure générale des β -lactamines	5
Figure 2.	Mode d'action des β -lactamines	6
Figure 3.	Principaux mécanismes de résistance aux β -lactamines	6
Figure 4.	Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase	8
Figure 5.	Description des mécanismes de résistance aux fluoroquinolones (cibles, pompes à efflux, porines) d'une bactérie à Gram négatif	14
Figure 6.	Structure générale des éléments bactériens IS	18
Figure 7.	Un transposon composite. Les modules IS peuvent être disposés selon une orientation relative directe (a) ou inversée (b)	18
Figure 8.	Structure de quelques transposons non composites	19
Figure 9.	Structure des intégrons	21
Figure 10.	Synthèse de céphalosporinase AmpC chez une entérobactérie en présence d'inducteur	27
Figure 11.	Mutation du gène <i>ampC</i> chez d' <i>E.cloacae</i> GC1	29
Figure 12.	Dendrogramme de la famille CTX-M	33
Figure 13.	Schéma de Vedel (1998)	50
Figure 14.	Les approches phénotypiques pour le dépistage et la confirmation des classes β -lactamase	53
Figure 15.	Lecture du test de Hodge	56
Figure 16.	Carte de l'ouest algérien	68
Figure 17.	Répartition selon les hôpitaux	69
Figure 18.	Fréquence d'isolement en fonction des années et des hôpitaux	70
Figure 19.	Résultat d'identification par galerie API 20E	70
Figure 20.	Répartition selon les services	71
Figure 21.	Répartition selon la source de prélèvement	71
Figure 22.	Répartition selon les services	72
Figure 23.	Répartition selon la source de prélèvement	72
Figure 24.	Répartition selon les services	73
Figure 25.	Répartition selon la source de prélèvement	73
Figure 26.	Taux de résistance aux antibiotiques	74
Figure 27.	Taux de résistance aux β -lactamines au niveau des 3 hôpitaux	75

Figure 28.	Taux de résistance aux autres antibiotiques au niveau des 3 hôpitaux	75
Figure 29.	Phénotypes de résistance aux β -lactamines	76
Figure 30.	Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines selon les hôpitaux	76
Figure 31.	Phénotype BLSE	78
Figure 32.	Phénotype BLSE+ céphalosporinase hyperproduite	78
Figure 33.	Phénotype céphalosporinase hyperproduite	79
Figure 34.	Phénotype sauvage	79
Figure 35.	E-Test	80
Figure 36.	Test de Hodge pour la souche S.Ec.14	80
Figure 37.	Test de l'EDTA pour la VIM (A) et la souche S.Ec.14(B)	81
Figure 38.	E-Test pour les antibiotiques TM, AK, NA et CIP	81
Figure 39.	Transfert de phénotype BLSE vers la souche réceptrice K12 Rif R	83
Figure 40.	Profil plasmidique des souches <i>d'E.cloacae</i> ainsi que leurs transformants	84
Figure 41.	L'analyse des profils PFGE	85
Figure 42.	Résultat de la PCR <i>bla</i> _{TEM}	86
Figure 43.	Résultat de la PCR <i>bla</i> _{SHV}	87
Figure 44.	Résultat de la PCR <i>bla</i> _{CTX-M}	87
Figure 45.	Résultat de la PCR <i>bla</i> _{ECB}	87
Figure 46.	Résultat de la PCR <i>bla</i> _{CMY-2}	88
Figure 47.	Résultat de la PCR <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{IMP} et <i>bla</i> _{NDM}	88

Liste des tableaux

Tableau 1.	Classification des β -lactamases des bacilles à Gram négatif, selon Ambler	10
Tableau 2.	Classification fonctionnelle de β -lactamases	11
Tableau 3.	Chronologie et homologie des β -lactamases de type AmpC plasmidique	30
Tableau 4.	AmpC à médiation plasmidique détectés chez <i>E.cloacae</i> en Algérie	31
Tableau 5.	Les BLSE identifiées chez <i>E.cloacae</i> en Algérie	34
Tableau 6.	Les carbapénèmases en position chromosomique	36
Tableau 7.	Émergence mondiale de métallob- β -lactamases chez <i>E.cloacae</i>	37
Tableau 8.	Les enzymes-modifiant les aminosides (AME) chez <i>E.cloacae</i>	39
Tableau 9.	Les méthylases de l'ARN 16S et profils de résistance aux aminosides chez <i>E.cloacae</i>	40
Tableau 10.	Les PMQR identifiées chez <i>E.cloacae</i> en Algérie	41
Tableau 11.	Répartition des prélèvements selon les hôpitaux et la période de prélèvement	68
Tableau 12.	Fréquence d'isolement des souches d' <i>E.cloacae</i>	69
Tableau 13.	Répartition selon l'hôpital et la source de prélèvement	70
Tableau 14.	Intervalles de CMI ($\mu\text{g/ml}$) observés en fonction des phénotypes de résistance aux β -lactamines	77
Tableau 15.	Résistances associées en fonction des phénotypes de résistance aux β -lactamines	82
Tableau 16.	Intervalles de CMI ($\mu\text{g/ml}$) observés en fonction des phénotypes de résistance	82
Tableau 17.	Les caractéristiques des souches d' <i>E.cloacae</i> productrices de β -lactamases à spectre étendu	89

Liste des abréviations

- ACC : Ambler class C
- ACT : AmpC type
- ADN : acide désoxyribonucléique
- AmpC : céphalosporinase
- ArmA : aminoside résistance méthylation
- ATCC : American Type Culture Collection
- BES : Brazilian extended-spectrum β -lactamase
- BET : bromure d'éthidium
- BGN : bacilles à Gram négatif
- BHIB: brain-heart infusion broth
- BIL : Belgium extended-spectrum β -lactamase
- BMR : bactérie multirésistante
- BSA : bovine Serum Albumin
- C1G, C2G, C3G et C4G: céphalosporine de 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} génération
- Case : céphalosporinase hyperproduite
- CASFM : Comité d'Antibiogramme- Société Française de Microbiologie
- CFE : cell-free extract
- CMI : concentration minimale inhibitrice
- CMY: cephamycinase
- CTX-M : cefotaximase-Munich
- Da : dalton
- DHA : Dharhan hospital
- DNase : désoxyribonucléase
- dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate
- *Ec* : *Enterobacter cloacae*
- ECP: électrophorèse en champ pulsé
- EDS : eau distillée stérile
- EDTA : ethylene diamintetraacetic acid
- GES : Guyana extended-spectrum β -lactamase
- GIM : German imipenemase
- IBC : integron-associated β -lactamase
- IMI : imipenemase
- IntI : intégrase
- KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
- Na₂HPO₄ : hydrogénophosphate de sodium
- NDM: New Delhi metallo- β -lactamase
- NMC-A : non-métallo-carbapenemase-A
- NpmA : novel plasmid-mediated aminoglycoside-resistance rRNA methyltransferase A
- Omp : outer membrane protein
- OXA : oxacillinase
- PASE: pénicillinase
- Pc : promoteur de cassette
- PER : *Pseudomonas* extended resistance
- PFGE: pulsed field electrophoresis gel
- PK : protéinase K
- qepA : quinoloneefflux pump
- QRDR : quinolone resistance determining region

- Rmt family : rRNA methyltransferase
- rpm : rotation par minute
- SDS : sodium dodécyl sulfate
- SFO : *Serratia fonticola*
- SHV : sulfhydryl variable
- SME : *Serratia marcescens*
- SPM : São Paulo metallo- β -lactamase
- subsp. : sous-espèce
- TC : transconjugant
- TEM : TEMoneira- nom du patient
- TLA : Tlahuicas - tribu indienne
- UMC : urgence médicale et chirurgicale
- USI : unité de soin intensif
- VEB : Vietnam extended-spectrum β -lactamase
- VIM : Verona integron-encoded metallo- β -lactamase
- Xba1 : *Xanthomonas badrii* (enzyme de restriction ou endonucléase)

Introduction

La résistance croissante des entérobactéries aux antibiotiques devient une préoccupation de plus en plus grande dans le monde médical. Ces bactéries sont fréquemment impliquées dans les infections tant communautaires, qu'acquises dans les milieux de soins. L'identification d'un nombre croissant d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération et l'émergence d'entérobactéries également productrices de carbapénèmases représentent une menace importante puisque l'arsenal thérapeutique pour traiter les infections liées à ces agents pathogènes devient très restreint, pouvant se limiter à la tigecycline ou à la colistine (C.I.N.Q., 2010).

Si les résistances bactériennes font aujourd'hui l'objet d'une prise de conscience générale, elles sont décrites depuis le début de « l'ère des antibiotiques », et le corollaire de l'introduction d'une nouvelle molécule a été l'émergence dans un délai généralement très court de mécanismes de résistance à cette molécule. La prescription souvent non régulée d'antibiotiques a rapidement entraîné l'accroissement des résistances et, si la découverte de nouveaux antibiotiques au cours des dernières décennies a pu laisser croire qu'il persisterait toujours des molécules efficaces, l'heure est à la désillusion, et le spectre de l'impasse thérapeutique menace dans certaines situations de multirésistance (Schoindre et Bernard, 2005).

Enterobacter cloacae est une espèce qui appartient à la famille des entérobactéries. Il a pris ces dernières années une importance croissante du fait de son implication dans les infections nosocomiales et de sa capacité à acquérir des mécanismes de résistance (Lakhal *et al.*, 2010). C'est une bactérie pathogène opportuniste responsable en milieu hospitalier d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses. Sa pathogénicité est exacerbée par sa résistance aux antibiotiques, notamment acquise, par les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) et les céphalosporinases plasmidiques (pAmpC), souvent associées à la résistance aux aminosides et fluoroquinolones (Iabadene *et al.*, 2010).

Le fait le plus inquiétant de ces dernières années est le signalement de plus en plus fréquent de souches d'*E.cloacae* résistantes à un nombre croissant d'antibiotiques et même dans certains cas de souches totalement résistantes à l'ensemble des molécules disponibles, mis à part les carbapénèmes et la colistine. Ces bactéries constituent, ainsi, un problème majeur de

santé publique, d'autant plus que très peu de nouvelles molécules sont mises sur le marché par l'industrie pharmaceutique. Ainsi, plusieurs auteurs ont tiré la sonnette d'alarme face à l'imminence de l'ère « post-antibiotique» (**Lakhal *et al.*, 2010**).

Le problème des résistances aux antibiotiques est et sera encore d'actualité ces prochaines années. Face à cette préoccupation mondiale qui est l'émergence des BMR pathogènes résultant d'une part de l'utilisation abusive des antibiotiques et de la mobilisation des gènes de résistance et d'autre part de la capacité des bactéries à échanger du matériel génétique dans des conditions de pressions antibiotiques, une étude multicentrique a été menée. Dans ce cadre, nous proposons d'étudier la résistance aux antibiotiques des souches d'*E.cloacae*, isolées à partir de trois hôpitaux de l'ouest algérien : Tlemcen, Sidi Bel Abbes et Oran, sur une période de 3 ans (2009 -2012). Ainsi, nos principaux objectifs sont :

- Evaluation de la fréquence d'isolement des souches d'*E.cloacae* isolées des trois hôpitaux ;
- Etude des niveaux de résistance aux antibiotiques ;
- Détection des phénotypes de résistances associées ;
- Etude du support génétique et du transfert de l'antibiorésistance ;
- Vérification de la clonalité des souches par électrophorèse en champ pulsé.

Synthèse

Bibliographique

1. Résistance aux β -lactamines

1.1. Définition des β -lactamines

Les β -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés dans la pratique clinique courante (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006) surtout dans le traitement des infections dues aux entérobactéries (Zogheib et Dupont, 2005). La famille des β -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle β -lactame indispensable à l'activité antibiotique (figure 1), une faible toxicité, associées à un mode d'action fort complexe sur des protéines de la membrane cytoplasmique, dénommées protéines liant la pénicilline (PLP) ou penicillin binding proteins (Cavallo *et al.*, 2004).

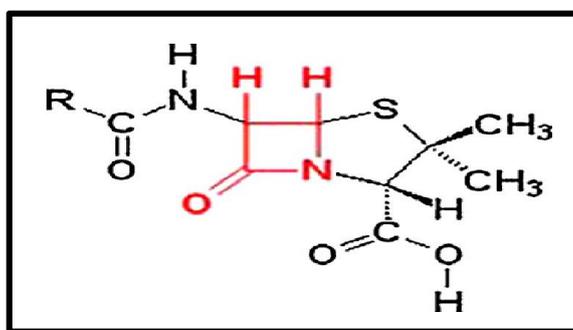


Figure 1. Structure générale des β -lactamines (Ruppé, 2010)

1.2. Mécanisme d'action

Les β -lactamines sont des antibiotiques bactéricides principalement temps-dépendant (Aubert et Carricajo, 2004) qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne. Les transpeptidases et carboxypeptidases, enzymes associées à la membrane cytoplasmique, fixent de façon covalente ces antibiotiques. Cette liaison est due à une analogie structurale entre le substrat naturel de ces enzymes, l'acyl-D - alanyl- D- alanine (acyl-D-ala-D-ala) et le cycle β -lactame. Ces enzymes qui lient les pénicillines et les céphalosporines, sont également dénommées PLP. La nature de ces PLP est relativement spécifique d'espèce et leur nombre varie d'une espèce bactérienne à une autre. Chacune a une fonction bien définie, mais certaines jouent un rôle prépondérant dans la synthèse du peptidoglycane, c'est-à-dire l'étape de polymérisation à partir de sous unités faites d'un disaccharide peptide. L'activité enzymatique des PLP est inhibée par leur liaison avec les β -lactamines (Nauciel, 2000) (figure 2).

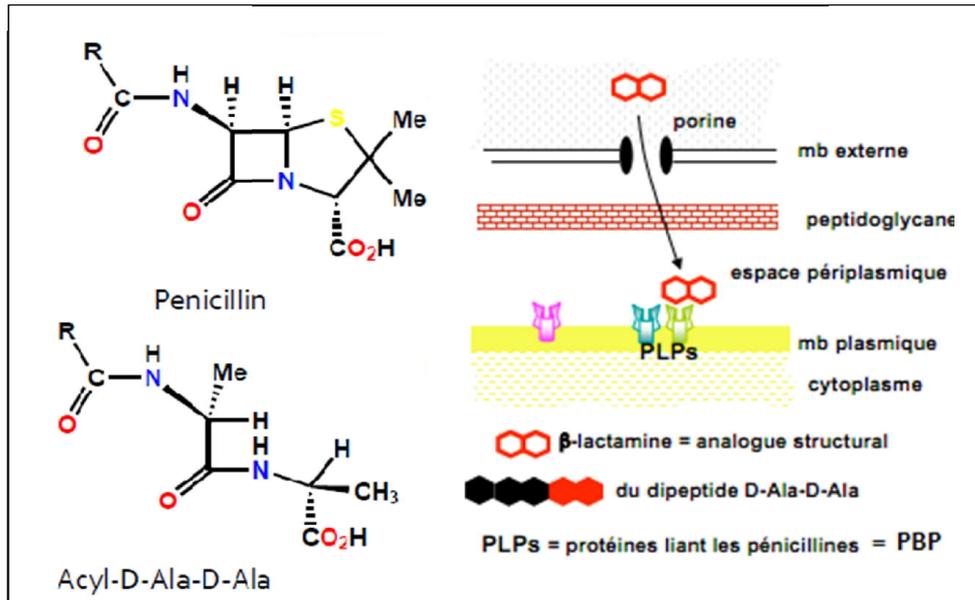


Figure 2. Mode d'action des β -lactamines (Verdet, 2011)

1.3. Différents mécanismes de résistances aux β -lactamines

Les β -lactamines peuvent perdre leur efficacité du fait de l'apparition d'une résistance des bactéries. Celle-ci est en constante augmentation et la situation devient préoccupante. La relation entre la sur-prescription et la progression des résistances est établie (Gould, 1999). Il y a trois mécanismes principaux (figure 3):

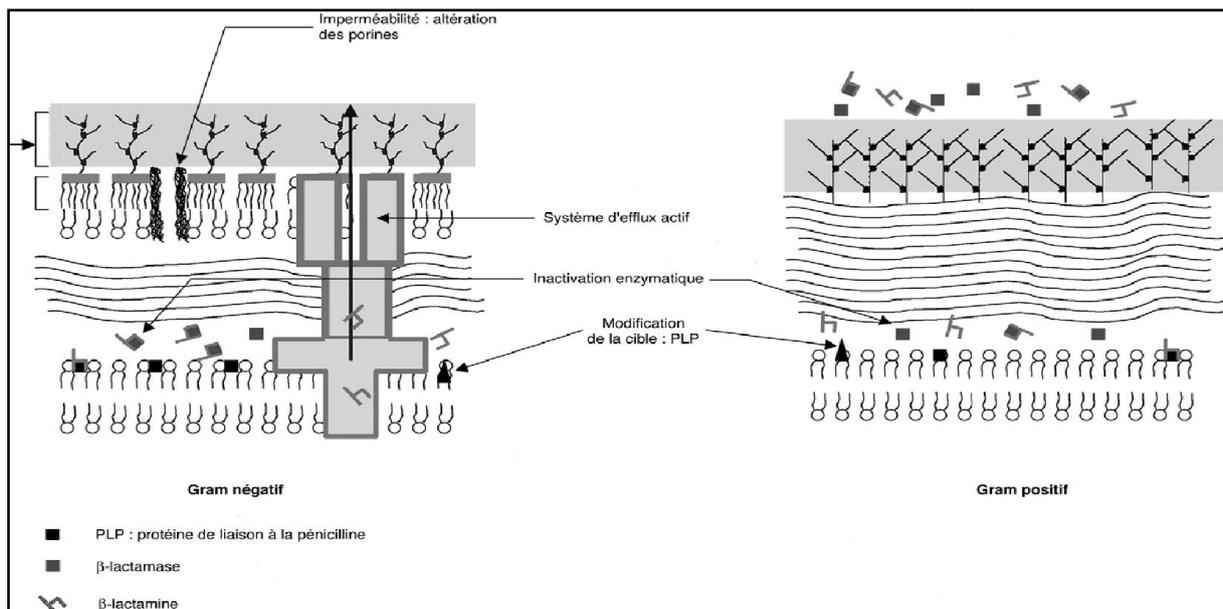


Figure 3. Principaux mécanismes de résistance aux β -lactamines (Cavallo *et al.*, 2004)

1.3.1. Imperméabilité

Pour atteindre leurs cibles situées à la surface de la membrane cytoplasmique, les β -lactamines doivent diffuser aux travers de canaux spécialisés appelés porines. La diffusion est en fonction de la charge, de la masse moléculaire et de la polarité des molécules. Les β -lactamines touchées diffèrent selon la porine absente. La disparition de porine provoque l'augmentation des concentrations minimales inhibitrices de certaines β -lactamines comme cela a été mis en évidence chez *Pseudomonas aeruginosa* et chez certaines entérobactéries (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*) (Nikaido, 2000).

1.3.2. Systèmes d'efflux

L'hyper-expression des systèmes d'efflux représente un mécanisme de résistance aux antibiotiques très répandu et a été décrite chez de nombreuses espèces bactériennes à Gram positif ou à Gram négatif d'intérêt médical comme les staphylocoques, les streptocoques, les entérobactéries ou *P. aeruginosa*. Cependant, les résistances acquises aux β -lactamines liées à l'hyper-expression de ces systèmes d'efflux n'ont été décrites que chez des bactéries à Gram négatif. Cette hyper-expression fait souvent suite à des mutations survenant dans les gènes répresseurs qui régulent la transcription de tous ces systèmes transporteurs (Veal *et al.*, 2002; Masuda *et al.*, 2000).

1.3.3. Modification de PLP

L'efficacité des β -lactamines est liée à leur capacité de se fixer aux PLP. La liaison (antibiotique/ cible) est liée à la structure de cible. Diverses mutations peuvent entraîner des modifications diminuant l'efficacité de l'antibiotique. Le peptidoglycane est formé de longues molécules de polysaccharides (glycanes) qui sont réticulées par de courtes chaînes peptidiques. Lorsque le peptidoglycane n'est pas réticulé, les PLP ne sont pas affectées par les antibiotiques β -lactames (De Wals, 2007). C'est le principal mécanisme pour les staphylocoques résistants à la méthicilline et pour les pneumocoques résistants à la pénicilline (Nefel *et al.*, 2000). Cependant, ce type de mécanisme de résistance reste très rare chez les entérobactéries (Belmeddah et Bentassa, 2012).

1.3.4. Production de β -lactamases

La résistance bactérienne aux β -lactamines est due principalement à la production d'enzymes (β -lactamases) capables d'hydrolyser l'anneau β -lactame commun à cette classe d'antibiotiques (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**) (figure 4). Les β -lactamases sont des enzymes d'inactivation, appartenant à la grande famille des hydrolases d'amides cycliques (**Philippon, 2005 ; De Wals, 2007**).

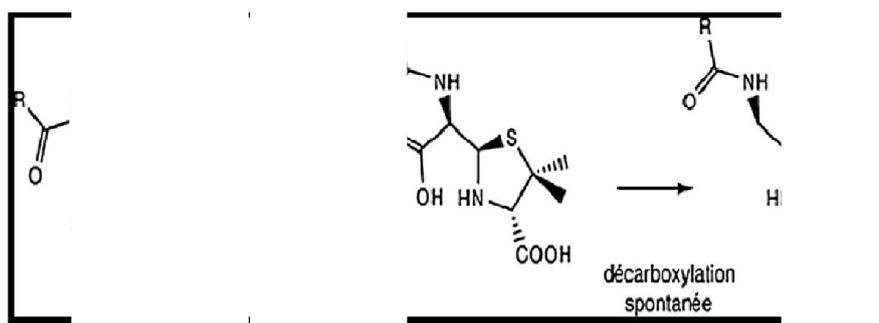


Figure 4. Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase (**Ruppé, 2010**)

Sur la base du mécanisme catalytique, on distingue:

- ✚ les enzymes à sérine active réparties en classes A, C et D ont en commun un résidu sérine dans le site actif ;
- ✚ Les métallo-enzymes: les enzymes de classes B ont besoin d'un ion métallique Zn^{2+} catalysant leurs activités (**Materon *et al.*, 2004**).

Les β -lactamases sont des enzymes d'une extrême diversité. De nombreuses classifications existent, qui prennent comme critères: le phénotype, la nature du site actif, la séquence d'acides aminés, les caractéristiques physiques et l'origine (**Vidon et Bourdin, 2005**). Les deux schémas les plus utilisés, sont celui d'Amblar qui est fondé sur l'homologie de séquence des acides aminés et celui de Bush-Jacoby-Medeiros fondé sur les propriétés fonctionnelles des enzymes (**Nordmann et Poirel, 2002**).

A ce jour, les β -lactamases sont réparties en 4 classes (A-D) selon la classification d'Amblar. Cette classification est la plus utilisée en pratique médicale. Elle tient compte des analogies de séquence peptidique, en particulier celle du site enzymatique, ainsi que du profil d'inhibition (**tableau 1**).

- **Classe A** : Les enzymes de classe A sont dérivés de β -lactamases de large spectre les plus anciens (par exemple, TEM-1, TEM-2, SHV-1) et elles ont un profil de substrat étendu qui permet l'hydrolyse de toutes les céphalosporines, les pénicillines et l'aztréonam (**Rayamajhi et al., 2008**). Elles sont caractérisées par une sérine dans le site actif, une masse moléculaire d'environ 29 000Da (**Shah et al., 2004**) et une sensibilité à l'action de l'acide clavulanique, du sulbactam et du tazobactam (**Ruppé, 2010**).
- **Classe B** : Elle est composée par des metallo-enzymes qui contiennent du zinc (**Samaha-Kfoury et Araj, 2003**) et qui sont divisées en trois sous-classes: B1, B2 et B3 (**Hall, 2004**). Ces métallo- β -lactamases sont généralement actives contre les carbapénèmes et contre d'autres β -lactamines. Elles ne sont pas inhibées par les inhibiteurs des β -lactamases commercialisés (**Matthew, 2004**).
- **Classe C** : Elle est constituée de céphalosporinases (AmpC) chromosomiques ou plasmidiques, résistantes à l'acide clavulanique. Ces enzymes confèrent aux bactéries productrices une forte résistance aux céphalosporines de première génération et à un degré variable aux céphalosporines de deuxième génération. La biosynthèse de céphalosporinase est habituellement inductible. Néanmoins le phénomène de dérégulation de leur biosynthèse conduit à une production constitutive, qui confère une résistance à la grande majorité des β -lactamines (**Bryskier, 1999**).
- **Classe D** : Les enzymes de classe D sont les pénicillinases de type oxacillinases (OXA) peu sensibles aux inhibiteurs et pouvant être inhibées par le NaCl. Ces enzymes confèrent la résistance à l'ampicilline et la céfalotine et sont caractérisés par leur forte activité hydrolytique contre l'oxacilline et la cloxacilline. Beaucoup des nouveaux membres de la famille OXA ont été retrouvés dans des isolats originaires de bactérie en Turquie et en France (**Varsha, 2007**).

Tableau 1. Classification des β -lactamases des bacilles à Gram négatif, selon Ambler (**Paterson, 2006**)

<i>β-lactamases</i>	<i>Exemple</i>	<i>Substrat</i>	<i>Inhibition par l'acide clavulanique</i>	<i>Classe moléculaire</i>
Large spectre	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Penicilline G, aminopenicillines, carboxypenicillines, piperacilline, cephalosporines à spectre étroit	+++	A
	Famille des OXA	Substrats de groupe à large spectre, cloxacilline, la méthicilline, et oxacilline	+	D
Spectre étendu	Famille des TEM, SHV	Substrats de groupe à large spectre, oximino-cephalosporines, aztréonam	++++	A
	Famille des CTX-M	Substrats du groupe à spectre élargi ainsi que pour certaines enzymes, céfépime	++++	A
	Famille des OXA	Même chose que pour la famille des CTX-M	+	D
AmpC	Autres (PER-1, PER-2, BES-1, BES-1, famille de GES/IBC, SFO-1, TLA-1, VEB-1, VEB-2)	Même chose que pour la famille des TEM et SHV	++++	A
	ACC-1, ACT-1, CFE-1, famille de CMY, DHA-2, famille de FOX, famille de LAT, MIR-1, MOX-1, MOX-2	Substrats du groupe à spectre élargi ainsi cephamycines	0	C
Carbapénémase	Famille d'IMP, famille de VIM, GIM-1, SPM-1 (metallo- β -enzymes)	Substrats du groupe à spectre élargi ainsi cephamycines et carbapénèmes	0	B
	KPC-1, KPC-2, KPC-3	Même chose que la famille d'IMP, famille de VIM, GIM-1, SPM-1	+++	A
	OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-48	Même chose que la famille d'IMP, famille de VIM, GIM-1, SPM-1	+	D

En 1995, Bush-Jacoby-Medeiros a présenté un système de classification qui repose sur quatre groupes (1-4) et sous-groupes (A à F) (Shah *et al.*, 2004). Elle est fondée sur les caractéristiques physicochimiques des enzymes comme leur point isoélectrique, poids moléculaire, substrat et profil d'inhibition (Nordmann et Poirel, 2002). En 2009, Bush a publié la dernière mise à jour de cette classification qui rapporte toutes les β -lactamases connues selon leurs structures et leurs fonctions (tableau 2) (Bush et Jacoby, 2010).

Tableau 2. Classification fonctionnelle de β -lactamases (Bush et Jacoby, 2010)

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxyimino- β -lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxyimino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxyimino- β -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftiprome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxyimino- β -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxyimino- β -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^b NI, not included.

2. Résistance aux aminosides

2.1. Définition et modes d'action des aminosides

Les aminosides, également appelés aminoglycosides, oligosaccharides ou amino-cyclitols sont constitués de sucres aminés dérivés du noyau 2 désoxystreptamine et élaborés par des Actinomycètes (Amikacine, Tobramycine) ou des Micromonospora (Gentamicine) (**Ezaitouni et al., 1999**). Après fixation à des sites chargés négativement sur la paroi bactérienne, en raison de leur caractère polycationique, ils diffusent dans les bactéries à travers les porines jusqu'à l'espace périplasmique (**Faure, 2009**). Leur pénétration à travers la membrane cytoplasmique est active et nécessite un apport d'énergie et la présence d'oxygène. Les aminosides perturbent la synthèse protéique bactérienne en se liant au site aminoacyl de l'ARN ribosomal 16S (ARNr), dans la sous-unité 30S du ribosome (**Durante-Mangoni et al., 2009**). Cette liaison de l'antibiotique permet :

- l'inhibition de l'étape d'élongation (en empêchant le transfert du peptidyl-ARNt depuis le site A vers le site P) conduisant à un arrêt de la synthèse protéique ;
- l'introduction d'erreurs dans la lecture des codons de l'ARNm, engendrant la production de protéines aberrantes.

C'est l'accumulation des protéines erronées synthétisées qui est responsable de la létalité induite par les aminosides (**Faure, 2009**).

Ce sont des antibiotiques bactéricides concentration-dépendante (**Aubert et Carricajo, 2004**). Ils sont réservés au traitement des infections sévères à bactéries à Gram négatif et à staphylocoques notamment dans leurs manifestations pulmonaires, endocardites, rénales et bactériémiques. Ils sont souvent employés dans le traitement probabiliste de ces infections en association avec une β -lactamine ou une fluoroquinolone (**Martin, 2008**).

2.2. Mécanismes de résistance

Ces dernières années, l'utilisation des aminosides comme des antibiotiques à large spectre importante en clinique a diminué considérablement en raison de l'émergence des souches bactériennes résistantes (**Thuresson et al., 2007**). La résistance à ces médicaments est devenue un grave problème de santé publique. Le mécanisme de résistance principal aux aminoglycosides est l'acquisition d'enzymes bactériennes qui modifient les antibiotiques par acétyltransférase (AAC), adényltransférase (ANT) ou phosphotransférase (APH). Chaque classe de ces enzymes effectue une réaction régio-spécifique soit sur le groupe amine (AAC) ou un groupe hydroxyle (ANT et APH) et les produits de ces réactions sont dépourvus d'activité antibactérienne (**Chen et al., 2008**).

La diminution de l'accumulation de l'antibiotique est un autre mécanisme majeur de résistance. Les bactéries peuvent exprimer des systèmes d'efflux qui résultent d'une accumulation réduite des aminosides à l'intérieur de la cellule (**Durante-Mangoni et al., 2009**).

La méthylation de l'ARNr 16S au sein de la sous-unité 30S des espèces comme *E. coli* et *Klebsiella* altère la fixation des aminosides, ce qui bloque leurs activités antimicrobiennes (**Doi et Arakawa, 2007**).

3. Résistance aux quinolones

3.1. Définition et modes d'action des quinolones

Les quinolones, découvertes en 1962 par Leshner, sont des antibiotiques synthétiques. Du fait de leur bonne diffusion tissulaire, ces antibiotiques sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, notamment dans le cas d'infections urinaires et respiratoires (**Meradi et al., 2009**).

Les quinolones agissent en se fixant au niveau de l'hélice α 4 topoisomérase II, la topoisomérase IV et de l'ADN gyrase. Le complexe ternaire ainsi formé (molécule d'antibiotique, enzyme et ADN), empêche la progression de la fourche de réplication (**Guillard et al., 2008**).

Les quinolones de 1^{ère} génération, dont le chef de file est l'acide nalidixique, n'agissent que sur les bacilles à Gram négatif et ne sont utilisées que dans le traitement des infections urinaires. Les quinolones de 2^{ème} génération ou fluoroquinolones, utilisées depuis les années 80, comprennent principalement la pefloxacilline, l'ofloxacin, la ciprofloxacilline. Elles sont beaucoup plus actives que les quinolones de 1^{ère} génération (Nseir *et al.*, 2005; Nauciel, 2000).

3.2. Mécanisme de résistance

La résistance acquise à ces antibiotiques est le résultat de la combinaison de plusieurs mécanismes (**figure 5**). Pendant plus de 30 ans, les seuls mécanismes de résistance aux quinolones connus avaient un support chromosomique (Skurnik et Andreumont, 2006).

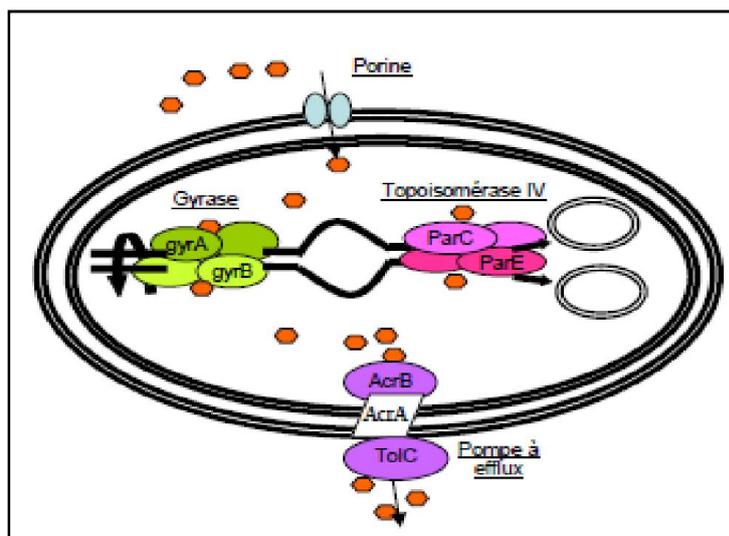


Figure 5. Description des mécanismes de résistance aux fluoroquinolones (cibles, pompes à efflux, porines) d'une bactérie à Gram négatif (Ferran, 2009)

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

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

Le support de la résistance aux quinolones était supposé être uniquement chromosomique jusqu'en 1998 où, **Martinez- Martinez *et al.*** ont décrit la première souche (*K. pneumoniae* UAB1) dont le support de la résistance est un plasmide transférable (pMG252). Trois types de déterminants de la résistance aux quinolones à médiation plasmidique (plasmid-mediated quinolones resistance : PMQR), *qnr*, AAC (6')-Ib-cr, et *qepA*, ont été identifiés à travers le monde dans des isolats cliniques d'entérobactéries (**Liu *et al.*, 2008; Périchon *et al.*, 2007; Yamane *et al.*, 2007; Robicsek *et al.*, 2006a; Robicsek *et al.*, 2006b**).

Le déterminant génétique de la résistance par le gène *qnr* est porté par différents types d'intégrons. L'importance de ce support est sa transférabilité et sa capacité à accélérer la diffusion de la résistance aux quinolones. Trois types de gènes *qnr* sont connus : les gènes *qnr A, B* et *S* (**Guessennd *et al.*, 2008**). Toutes les protéines associées (*qnrA*, *qnrB* et *qnrS*) sont capables de se fixer sur les topoisomérases II et IV en compétition avec l'ADN. La réduction du nombre de complexes binaires topoisomérases-ADN diminue la fixation ultérieure des quinolones sur les topoisomérases (**Guillard *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2005**). Les souches porteuses du gène *qnr* appartenaient le plus souvent aux espèces *E. coli*, *K.pneumoniae* et récemment *E.cloacae*, et sont toutes multirésistantes, en particulier résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération par production de BLSE ou de céphalosporinase plasmidique (**Honoré *et al.*, 2006**).

En 2005, un second mécanisme de résistance plasmidique a été identifié. Il s'agit d'un variant de l'acétylase en 6-isoforme Ib dénommé AAC (6')-Ib-cr (pour ciprofloxacine resistance) et qui confère une résistance de bas niveau à la ciprofloxacine et à la norfloxacine par acétylation enzymatique (**Robicsek *et al.*, 2006b**).

Parmi ces mécanismes de résistance, le nouveau gène à médiation plasmidique de pompe à efflux *qepA*, a été récemment détecté dans les isolats cliniques d'*E.coli* provenant de la Belgique (**Périchon *et al.*, 2007**), du Japon (**Yamane *et al.*, 2008; Yamane *et al.*, 2007**) et de la Chine (**Liu *et al.*, 2008**). La protéine excrète majoritairement les quinolones par un système d'efflux proton-dépendant (**Ma *et al.*, 2009**). Le progéniteur de ce gène semblerait appartenir à la famille des actinomycètes (**Guillard et Cambau, 2012**). Il reste associé à de faibles niveaux de résistance mais peut cependant être combiné à d'autres mécanismes de

résistance. Il a été montré une co-existence entre *qepA*, *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* et même *rmtB* (responsable de hauts niveaux de résistance aux aminoglycosides) chez des isolats d'*E.coli* (Liu *et al.*, 2008).

4. Support génétique de la résistance aux antibiotiques

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques :

- La résistance intrinsèque (ou naturelle): est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce, dont les gènes de résistances font partie du patrimoine génétique de la bactérie (Carle, 2009) ;
- La résistance acquise : les bactéries peuvent développer de la résistance à un antibiotique préalablement sensible, ce qui implique des changements génétiques. Cette résistance est souvent instable (Yamashita *et al.*, 2000) et n'est présente que chez certaines souches de la même espèce ou du même genre (Courvalin, 2008).

Sur le plan génétique, la résistance peut être acquise par deux voies totalement distinctes, soit des mutations affectant des gènes présents sur le chromosome, soit l'acquisition de gènes étrangers.

4.1. Résistance par mutation chromosomique

Dans ce cas, la résistance dépend d'une mutation au niveau du chromosome bactérien, responsable de la modification ou de la perte d'un gène. Elle présente les caractères spécifiques de toute mutation chromosomique :

- C'est une variation génétique, héréditaire (transmissible à la descendance) et stable ;
- C'est un phénomène rare: dans toute population bactérienne sensible, il existe un mutant résistant pour 10^6 à 10^9 bactéries ;
- C'est un phénomène spontané: indépendant de l'antibiotique administré ;
- C'est un phénomène spécifique ne touchant qu'une seule famille d'antibiotiques à l'intérieur de laquelle il va exister une résistance croisée pour tous les produits (Vaubourdolle, 2007).

4.2. Résistance par acquisition de matériel génétique exogène

Ces gènes peuvent provenir du chromosome d'espèces différentes ou être véhiculés par des éléments génétiques mobiles pouvant être transférés d'une bactérie à l'autre, on parle alors de transmission horizontale (**Galimand *et al.*, 2005**). L'ADN exogène peut provenir de cellules bactériennes appartenant à une autre souche de la même espèce ou même d'une espèce, voire d'un genre différent (**Fauchère et Avril, 2002**). Le transfert horizontal est le principal mécanisme responsable de la dissémination des gènes de résistance au sein du monde bactérien et concerne 80 % des cas de résistances aux antibiotiques rencontrés en médecine humaine. Le plus souvent, lors de ce transfert, les gènes sont véhiculés par des éléments génétiques mobiles, plasmides ou transposons (**Ploy *et al.*, 2005**).

4.2.1. Plasmides

Un plasmide est une petite molécule d'ADN bicaténaire (de 3 à 10 kb) circulaire extra-chromosomique capable de se répliquer (indépendamment du chromosome bactérien) dans une cellule bactérienne et d'être transférée dans une autre (**Tagu et Moussard, 2003**). Les plasmides peuvent porter des gènes codant pour des toxines, rendre la bactérie plus apte à s'établir dans l'organisme ou contribuer à sa résistance aux défenses de l'hôte. Ils confèrent souvent la résistance aux antibiotiques chez les bactéries qui les contiennent. Les facteurs ou plasmides R ont des gènes codant pour des enzymes capables d'inactiver ou modifier les antibiotiques (**Prescott *et al.*, 2003**).

4.2.2. Transposons

Séquence désoxyribonucléique ayant la propriété de se déplacer sur l'ADN, soit en bloc (excision puis insertion ailleurs), soit après avoir subi une répllication (une copie reste en place, l'autre s'installe ailleurs). Les séquences mobiles sont appelées IS, renferment les gènes d'une ou plusieurs enzymes nécessaires à la transposition, ou transposases, et sont bordées aux extrémités par 2 courtes séquences répétées et inversées (15 à 25 pb). Un transposon peut loger des gènes étrangers dans un élément IS (transposon simple) ou avec deux IS de même orientation ou orientés en sens opposés (**Pelmont, 2005**).

3 types de transposons les plus fréquents :

- **Les éléments IS** : les transposons les plus simples et les premiers à avoir été caractérisés, ont été appelés séquences d'insertion. Ils sont des constituants normaux des chromosomes bactériens et des plasmides. Les éléments IS ont moins de 2000 pb. Ils contiennent un gène pour une transposase et dans certains cas, un gène régulateur, bordé par deux courtes répétitions inversées (Voet et Voet, 2005) (figure 6).

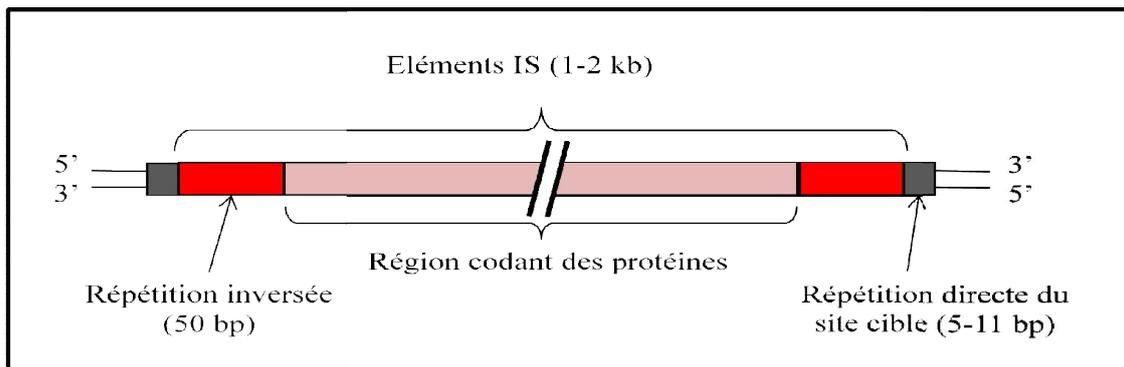


Figure 6. Structure générale des éléments bactériens IS (Lodish *et al.*, 2005)

- **Les transposons composés** : possèdent une région centrale contenant des gènes, encadrée par deux modules de type IS identiques ou presque, qui sont dans la même orientation, soit dans une orientation inverse (figure 7) (Voet et Voet, 2005).

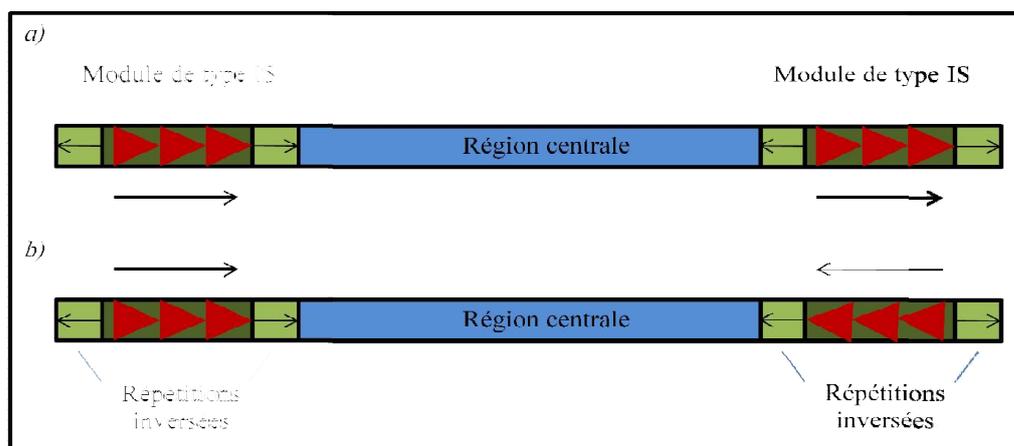


Figure 7. Un transposon composite. Les modules IS peuvent être disposés selon une orientation relative directe (a) ou inversée (b) (Voet et Voet, 2005)

- **Les transposons non composés** : sont des transposons complexes qui ne sont pas composés de modules plus petits. Ils codent des protéines de transposition, mais n'ont pas les éléments IS à leurs extrémités. Les transposons non composites en général portent des gènes de résistance aux antibiotiques, des facteurs de virulence, et des enzymes cataboliques. Ces éléments aussi utilisent un ensemble plus complexe de l'ADN de rupture et de rejoindre pour assurer les mouvements. Des exemples bien étudiés de non-composites transposons sont les Tn3 et Tn7 (**Trun et Trempy, 2004**) (**figure 8**).

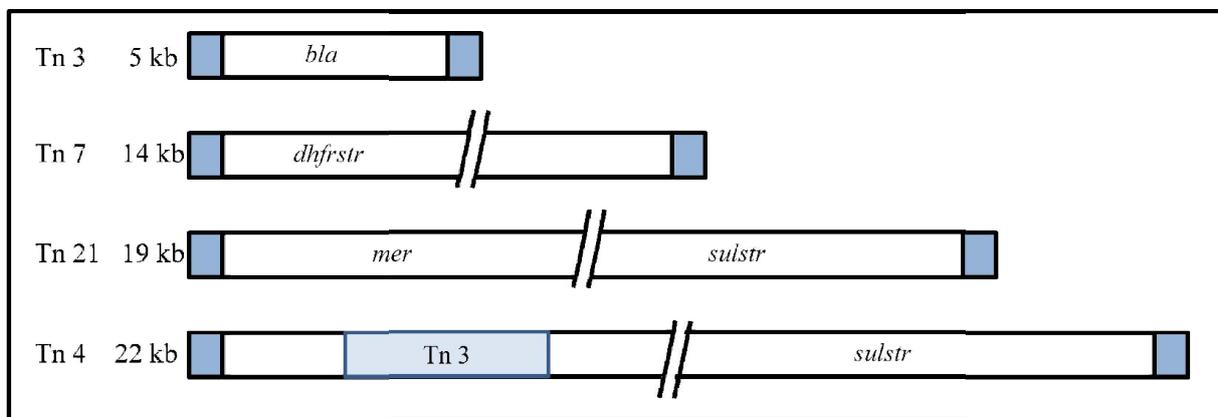


Figure 8. Structure de quelques transposons non composites (**Dale et Park, 2004**)

bla : β -lactamase (résistance à l'ampicilline), *dhfr* : dihydrofolate reductase (résistance au triméthoprime), *str* (résistance à la streptomycine), *mer* (résistance au mercure), *sul* (résistance au sulfonamide).

La transposition nécessite la présence d'enzyme :

- **La transposase** : enzyme permettant le transport d'un transposon. Au niveau de l'ADN donneur, la transposase effectue la coupure de l'ADN aux extrémités du transposon et au niveau de l'ADN receveur, et relie le transposon à l'ADN receveur (**Michel-Briand, 2009**).
- **L'intégrase** : est une enzyme nécessaire à la catalyse de l'étape d'insertion et de transfert de transposon dans le génome (**Girard et al., 2007**).

Pour les gènes de résistance, trois catégories de transposons ont été décrites, sur des bases structurales et fonctionnelles :

- **Les transposons de la famille Tn3 :** (BGN, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*). Il comporte, en dehors des éléments d'insertion et du gène de résistance à l'ampicilline (*TEM-1*), une séquence codant pour une transposase et un gène répresseur assurant la régulation du système (Meyer *et al.*, 2004).
- **Les transposons composites :** (BGN, *Bacillus*) (Pourriat et Martin, 2005).
- **Les transposons conjugatifs :** sont des éléments génétiques auto-transmissibles, dont la taille varie de 18 à 500 kb (Rajeev, 2007). Découverts plus récemment, les transposons conjugatifs sont d'importants vecteurs de dissémination de gènes de résistance puisqu'ils peuvent, comme leur nom l'indique, se propager par conjugaison (ils doivent passer par un intermédiaire circulaire).

4.2.3. Intégron

Au cours des années 1980, de nouveaux éléments génétiques susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques ont été décrits par Stokes et Hall et désignés sous le nom d'intégrons (Miriagou *et al.*, 2006; Ploy *et al.*, 2005). Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes contenus dans des cassettes. Les intégrons ne sont pas mobiles par eux-mêmes; ils sont incapables d'autoréplication et sont généralement portés par des plasmides ou des transposons (Fluit *et al.*, 2004).

4.2.3.1. Structure des intégrons

De petits fragments d'ADN bicaténaire circulaires qui ne contiennent qu'un gène de résistance (et ne peuvent donc répliquer de manière autonome), flottent dans le cytoplasme des bactéries. Ils peuvent s'intégrer de façon réversible et spécifique de site, grâce à l'activité d'une intégrase (IntI), en aval d'un promoteur fort P_c , par recombinaison entre les séquences *attC* et *attI*, respectivement les sites d'attachement des cassettes et de l'intégron (Courvalin, 2008) (figure 9).

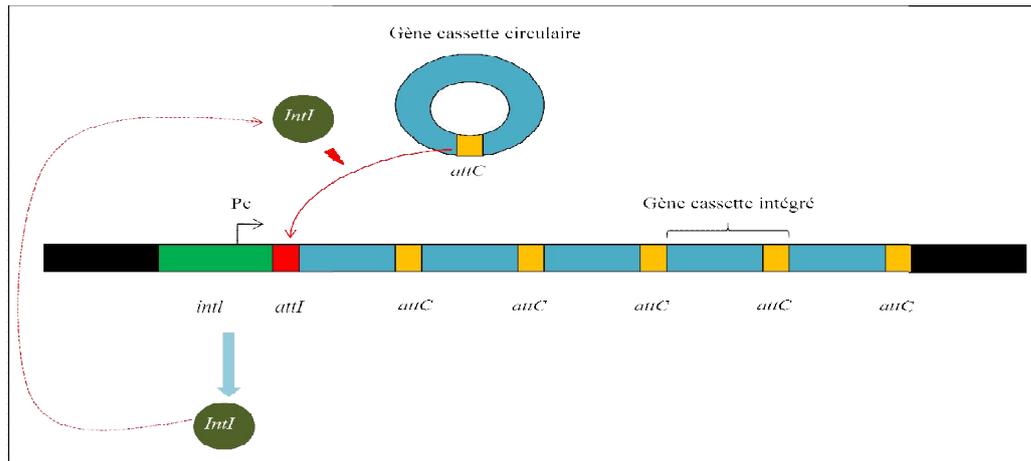


Figure 9. Structure des intégrons (Frans de Bruijn, 2011)

4.2.3.2. Classification des intégrons

On distingue deux grands types d'intégrons:

- Les intégrons de multirésistance (IM) sont portés par des plasmides et/ou des transposons ; ils sont connus pour leur rôle majeur dans la dissémination des gènes de résistances aux antibiotiques ;
- Les super-intégrons (SI) sont strictement chromosomiques et jouent un rôle plus large en tant que réservoir de gènes à haute valeur adaptative.

Des dizaines de classes d'intégrons ont été définies sur la base de la séquence de leurs intégrases IntI (Holmes *et al.*, 2003; Collis *et al.*, 2002). La majorité des classes correspondent à des super-intégrons et cinq à des intégrons de multirésistance (IM 1 à 5). Les IM 1 à 3 sont les classes d'intégrons les plus prévalentes en microbiologie clinique et les mieux caractérisées (Hansson *et al.*, 2002).

4.2.3.3. Structure des cassettes

Les cassettes forment un groupe varié de petits éléments mobiles non répliatifs. Ce sont des unités fonctionnelles indépendantes qui peuvent être mobilisées de manière individuelle. Les cassettes existent sous forme circularisée ou intégrée (Ploy *et al.*, 2005).

Le nombre de cassettes varie de 0 à 8 au sein des IM (Naas *et al.*, 2001) et de 40 à plus de 200 au sein des SI (Mazel, 2006). De plus, une même cassette peut être présente en deux, voire trois copies dans un même réseau de cassettes. D'autre part, les réseaux de cassettes peuvent être interrompus par des IS insérées au niveau des sites *attC* (Post et Hall, 2009). Plus de 130 cassettes différentes portant des gènes de résistance aux antibiotiques ont été identifiées dans les IM, la quasi-totalité des familles d'antibiotiques étant représentés (Partridge *et al.*, 2009). D'autres cassettes sont impliquées dans la résistance à des antiseptiques de type ammonium quaternaires ou à des espèces oxygénées réactives (*msrA*, *msrB*) (Gillings *et al.*, 2009).

5. Mécanismes de transfert du matériel génétique

Un transfert génétique se fait d'une bactérie donatrice de matériel génétique (exogénote) à une bactérie réceptrice dont le génome constitue l'endogénote. La bactérie réceptrice peut acquérir des caractères nouveaux ce qui suppose que l'exogénote soit exprimé par la bactérie réceptrice et qu'il soit transmis à la descendance. Les bactéries ne restent pas indifférentes à la pénétration d'un ADN étranger et elles mettent en œuvre des mécanismes de protection connus sous le nom de phénomène de restriction-modification. Les échanges d'ADN entre bactéries donatrices et bactéries réceptrices s'effectuent selon trois grandes modalités.

5.1. Transformation

Elle résulte de l'incorporation d'ADN nu du milieu extérieur avec, pour conséquence, l'acquisition définitive, par la bactérie réceptrice, de caractères héréditaires de la bactérie donatrice d'ADN. Pour qu'un ADN étranger pénètre dans une bactérie, celle-ci doit être dans un état physiologique particulier, appelé état de compétence, caractérisé par la présence, à la surface de la bactérie, de récepteurs d'ADN et de diverses protéines (protéines membranaires fixant l'ADN, autolysines de la paroi, nucléases...). Cet état particulier et transitoire de la paroi permet le passage trans-pariétal d'ADN. Après pénétration, l'ADN étranger s'intègre dans le chromosome bactérien par recombinaison. Dans le cas de plasmides, ceux-ci demeurent extra-chromosomiques et se répliquent de façon autonome (Beaune, 2004).

5.2. Transduction

Le vecteur est un bactériophage (virus) qui, est en répliquant, intègre son ADN à celui de la bactérie, il peut amener des gènes bactériens dont celui de la résistance à l'antibiotique. Il pourra ensuite transférer ces gènes de résistance aux nouvelles bactéries qu'il contaminera **(Baudry et Brézellec, 2006)**.

5.3. Conjugaison

Durant la conjugaison entre deux cellules bactérienne, un ADN simple brin est généré, puis transféré d'une cellule donatrice à une cellule réceptrice. Puis le simple brin est répliqué pour généré un plasmide circulaire **(Samouelian *et al.*, 2009)**.

La conjugaison entre bactéries est possible si les cellules contiennent un plasmide particulier, appelé le facteur F (F pour fertilité). Les cellules F⁺ ou *donneurs*, possèdent à leur surface de longs filaments tubulaires (les filaments sexuels, ou pili). Un ou plusieurs pili peuvent se lier à des récepteurs spécifiques de la surface des cellules qui ne contiennent pas le facteur F (cellules F⁻, ou cellules *réceptrices*). Le pilus forme alors un tunnel reliant les deux cellules. Lors de la conjugaison, un des brins du facteur F passe dans la cellule F⁻ où son brin complémentaire sera synthétisé. La cellule F⁻ devient ainsi une cellule F⁺ puisqu'elle contient à présent le facteur F normal bicaténaire. Il arrive parfois que le facteur F s'intègre dans le chromosome de l'hôte.

Les cellules contenant un facteur F intégré dans le chromosome (dites *Hfr* pour *Haute fréquence de recombinaison*) ont une fréquence de recombinaison des gènes chromosomiques beaucoup plus élevée lors de leur conjugaison avec des cellules F⁻ **(Garrett et Grisham, 2000)**.

6. *Enterobacter cloacae*

Les *E.cloacae* sont des bacilles à Gram négatif appartenant à la famille des entérobactéries qui constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par **Rahn en 1937** qu'il dénomma *Enterobacteriaceae* (**Joly et Reynaud, 2007**).

6.1. Classification phylogénique

44 genres d'entérobactérie sont regroupés en cinq tribus, d'après leurs propriétés fermentatives: *Escherichiae*, *Klebsielleae*, *Proteae*, *Yersiniae* et *Erwiniae* (**Larpent, 2000**). Les genres les plus communément isolés en bactériologie clinique sont: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* et *Yersinia* (**Morice, 2003**). Différentes espèces constituent le genre *Enterobacter* dont *E.cloacae* qui représente l'espèce le plus souvent isolée (**Fraser et al., 2010**). Actuellement, les *E.cloacae* sont classées sur la base du séquençage des ARN 5S et 16S dans :

- Domaine : *Eubacteria* ;
- Phylum : *Proteobacteria* ;
- Classe : *Gammaproteobacteria* ;
- Ordre : Enterobacterales ;
- Famille : *Enterobacteriaceae* ;
- Genre : *Enterobacter* ;
- Espèce : *Enterobacter cloacae* (**Delarras, 2007**).

6.2. Ecologie-habitat

Bactéries telluriques, elles sont fréquemment retrouvées dans les eaux de surface, le sol et les végétaux. Elles sont susceptibles de se développer à basse température et d'acquiescer, en particulier l'espèce *cloacae*, une résistance importante aux agents antibactériens (**Lefrère, 2000**).

6.3. Morphologie et principaux caractères biochimiques

Les *Enterobacter* sont des bacilles à Gram négatif généralement mobiles, fermentent ou non le lactose et ils ont une β -galactosidase (**Fauchère et Avril, 2002**). Les membres de l'espèce *E.cloacae* donnent des réactions positives avec les tests de Voges-Proskauer, d'ornithine décarboxylase et d'arginine dihydrolase mais des résultats négatifs pour les tests de lysine décarboxylase, d'indole, d'ADNase et de lipase (**Bergan, 1984**).

6.4. Caractères cultureux

Sur gélose nutritive, *E. cloacae* forme des colonies rondes avec un diamètre de 2 à 3 mm et légèrement plates avec des bords irréguliers (**Grimont et Grimont, 2006**).

6.5. Pouvoir pathogène

E.cloacae est fréquemment impliquée dans les infections nosocomiales et colonise généralement la flore intestinale endogène des patients hospitalisés, mais peut également se trouver comme source d'épidémie ou de diffusion de patient à patient. Les infections surviennent principalement chez des patients ayant reçu un traitement antibiotique ainsi que ceux en unités de soins intensifs (USI) (**Qureshi et al., 2011**). *Enterobacter* est une bactérie pathogène opportuniste responsable en milieu hospitalier d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses (**Iabadene et al., 2010**).

6.6. Résistance aux β -lactamines

Différents types de β -lactamases ont été décrits chez *E.cloacae*. La céphalosporinase chromosomique est commune pour toutes les souches d'*E.cloacae*. En plus de la céphalosporinase de classe C, d'autres β -lactamases ont été signalés chez cette espèce, y compris les β -lactamases de type TEM, SHV et CTX-M (**Hoffmann et al., 2006**). Une carbapénèmase spécifique a également été décrit (**Thomson et al., 1993**).

6.6.1. Résistance naturelle

Concernant le comportement à l'égard des β -lactamines, *E.cloacae* est classée au sein du groupe 3 des entérobactéries dont le phénotype, souvent appelé phénotype « *céphalosporinase de bas niveau* », se caractérise par la production naturelle, inductible et à bas niveau, d'une céphalosporinase chromosomique AmpC, leur conférant une résistance aux amino-pénicillines, aux céphalosporines de 1^{ère} génération et à l'action de l'acide clavulanique (**Philippon et Arlet, 2006**).

La présence de céphalosporinase chromosomique dans les bacilles à Gram négatif, fut identifiée dès 1963 par P.C. Fleming, chez *E.cloacae*. **Sykes et Matthew** rapportèrent en **1976** que certaines céphalosporinases étaient inductibles (celles d'*Enterobacter spp.*, de *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas spp.* entre autres), alors que d'autres (*E.coli*) étaient constitutives. Mais seules les céphalosporinases chromosomiques inductibles sont à l'origine de résistance clinique, leur synthèse étant induite par les β -lactamines. Par contre les β -lactamases naturellement constitutives d'*E.coli* ont un rôle négligeable dans l'apparition des résistances (**Yvon, 2009**).

Ce caractère inductible est détecté dans l'antibiogramme en milieu gélosé par un antagonisme ("écrasement" du diamètre d'inhibition) entre une β -lactamine inductrice (imipénème, céfoxitine) et une céphalosporine de 3^{ème} génération. Ce type d'expression est le fait d'un mécanisme complexe faisant intervenir plusieurs gènes régulateurs (*ampR*, *ampD*, et *ampG*) (**Philippon et Arlet, 2006**).

Un gène inductible ne s'exprime pleinement que s'il reçoit une information d'un inducteur. La synthèse de la céphalosporinase AmpC dépendant du gène *ampC*, est soumise à une régulation. A l'état normal, en l'absence de β -lactamine, la bactérie produit de faibles quantités de céphalosporinases AmpC du fait de la présence d'un régulateur /répresseur AmpR. En présence d'une β -lactamine inductrice, des fragments de peptides (aD-peptides...) formés à partir de la paroi altérée, modifient le régulateur AmpR en un activateur du gène *ampC*, ce qui libère la synthèse de la céphalosporinase (**figure 10**).

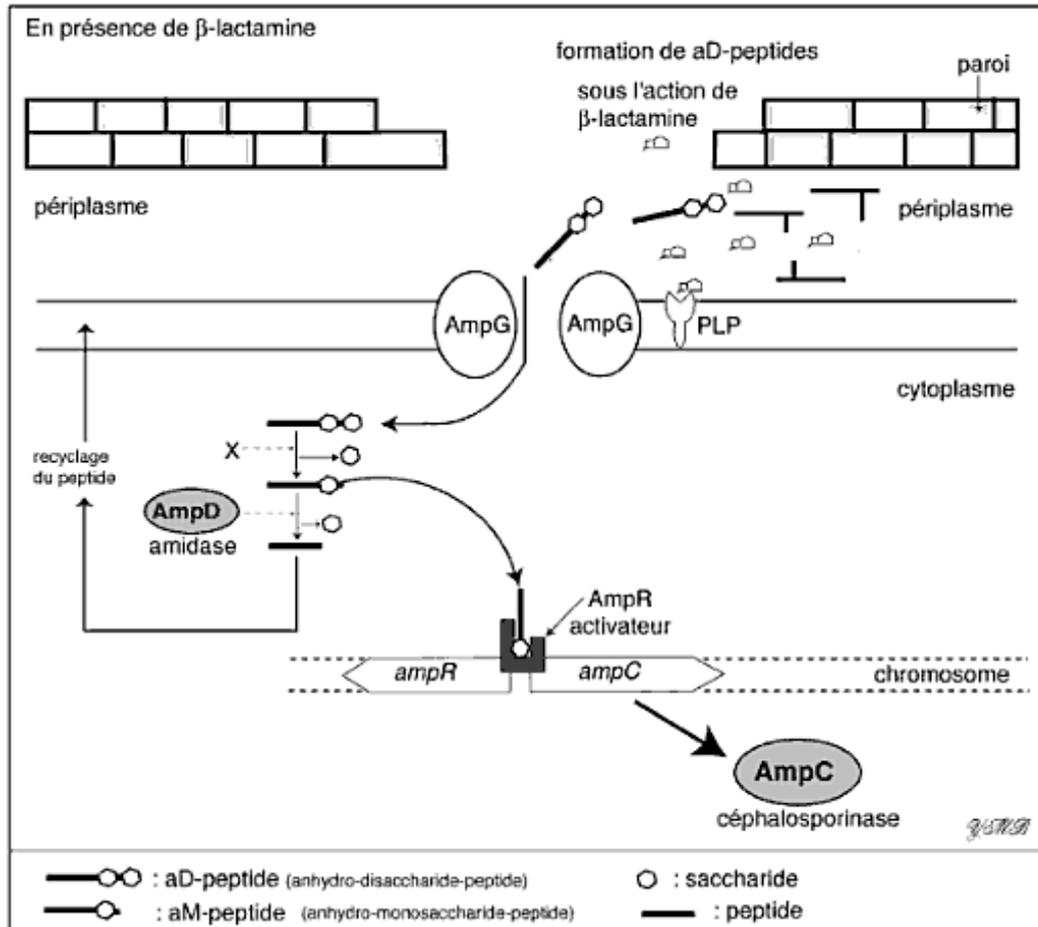


Figure 10. Synthèse de céphalosporinase AmpC chez une entérobactérie en présence d'inducteur (Yvon, 2009)

La synthèse de la β -lactamase AmpC dépend du régulateur transcriptionnel AmpR. Suivant la liaison contractée par AmpR, ce dernier réprime la transcription de l'*ampC* ou l'active.

6.6.1.1. En l'absence de β -lactamine :

À chaque division bactérienne, une entérobactérie perd des constituants de la paroi et en particulier des anhydro-mucopeptides qui s'accumulent dans le périplasm. Ces produits atteignent l'espace cytoplasmique grâce à une perméase (AmpG) qui permet leur passage. A ce niveau les anhydro-muropeptides sont hydrolysés par une enzyme (amidase) AmpD ce qui permet leur recyclage pour fabriquer la paroi. Par ailleurs le gène *ampR* est réprimé par précurseur de la muréine, l'UDP-MurNAc-pentapeptide (non figuré dans la figure).

6.6.1.2. En présence de β -lactamine (la céfoxitine en particulier) :

De nombreux produits de la dégradation de la muréine (dont les N-acétylglucosamine 1.6-anhydromuramylpeptides, aD-peptides) s'entassent dans le périplasme du fait de l'action de l'antibiotique sur la paroi. La perméase AmpG permet le transport de ces produits vers le cytoplasme ou une enzyme X... libère le N-acétylglucosamine pour donner le aM-peptide qui en se fixant sur le régulateur AmpR, active la synthèse de la céphalosporinase AmpC. Mais l'enzyme AmpD hydrolyse le aM-peptide, donc limite l'effet inducteur et permet le recyclage du peptide pour la synthèse de la paroi.

6.6.1.3. Mutation du gène *ampD* :

Si le gène *ampD* est muté les aM-peptides s'accumulent et se lient en permanence avec AmpR et la synthèse de la céphalosporinase est permanente (constitutive) (Yvon, 2009).

6.6.2. Résistance acquise

Toutes les entérobactéries, quel que soit leur groupe, sont capables d'intégrer des gènes de résistance codant pour une β -lactamase (Zogheib et Dupont, 2005).

6.6.2.1. Phénotype « céphalosporinase de haut niveau »

A. Chromosomique

Certaines bactéries possédant une céphalosporinase inductible peuvent subir une mutation génétique (au niveau des gènes codant pour le répresseur qui devient inactif), entraînant une synthèse accrue de céphalosporinase indépendamment de la présence d'un inducteur. La céphalosporinase est dite alors dérèprimée et ce, irréversiblement (Vaubourdolle, 2007). Le phénotype de résistance céphalosporinase de haut niveau se traduit par une résistance à l'ensemble des β -lactamines excepté les carbapénèmes (Eyquem et Montagnier, 2000). Il peut subsister une activité des céphalosporines à large spectre (céfépime, cefpirome). 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* et autres entérobactéries du même groupe) (Gueudet *et al.*, 2010).

i. De façon définitive après mutation des gènes *ampC* ou *ampD* (dépression définitive) :

- La synthèse devient constitutive quand le gène *ampC* est activé en permanence par le régulateur AmpR par suite de la mutation du gène *ampD* (**figure 10**). Cette mutation portant sur l'amidase AmpD permet à tous les fragments de peptidoglycane (aM-peptides, il en existe en l'absence d'antibiotique) d'activer AmpR. La probabilité de mutation d'*ampD* est assez élevée (10^{-5} à 10^{-7}).
- Un autre mécanisme de production de céphalosporinase constitutive chez *Enterobacter* provient d'une mutation du gène *ampC* lui-même (qui échappe à la régulation par AmpR). L'enzyme a une activité hydrolysante élevée, alors que dans le cas précédent cette activité était due à une augmentation de la quantité d'enzyme produite. Dans le cas d'*E.cloacae* GC1 (duplication de trois acides aminés) le spectre est élargi à la ceftazidime et l'aztréonam (**figure 11**).

Acide aminé n°	208
AmpC	WGYRDGKAVRVSPGWLDA
AmpC de GC1	WGYRDGKAVR <u>AVR</u> VSPGWLDA

Figure 11. Mutation du gène *ampC* chez d'*E.cloacae* GC1

C'est une réponse génotypique adaptative à un environnement défavorable et ces mutants peuvent très bien être sélectionnés par l'antibiothérapie qui élimine les souches restées sensibles. Ce phénomène est définitif et transmissible à la descendance (**Yvon, 2009; Pourriat et Martin, 2005**).

- ii. De façon temporaire par induction (dépression temporaire) :** Les β -lactamines inductrices se fixent sur un récepteur protéique (AmpE) qui inactive AmpD. L'inactivation du répresseur permet à AmpC de s'exprimer et de synthétiser l'enzyme. Ce phénomène, très différent du précédent, survient dès 30 min après la mise en présence avec l'inducteur et disparaît quelques heures après son retrait. Il s'agit d'une réponse phénotypique adaptative, liée à la présence de l'inducteur. Le gène répresseur est temporairement inhibé mais n'a pas subi de mutation. Il n'y a pas de transmission à la descendance (**Pourriat et Martin, 2005**).

B. Plasmidique

Depuis 1990, des céphalosporinases codées par des gènes plasmidiques ont été décrites. Ces enzymes à médiation plasmidique dérivent des céphalosporinases chromosomiques d'*Enterobacter* (ACT-1 et MIR-1), de *Citrobacter* (CMY), de *Morganella* (DHA), d'*Hafnia* (ACC-1) et d'autres entérobactéries (MOX, FOX...) (Philippon et Arlet, 2006). Plus de 20 β -lactamases différentes de type AmpC à médiation plasmidique ont été retrouvées (Jacoby et Munoz-Price, 2005). Des différences mineures dans les séquences d'acides aminés ont donné lieu aux familles. Comme indiqué dans le **tableau 3**, parmi les enzymes à médiation plasmidique, certaines présentent une forte similarité par rapport aux β -lactamases de type AmpC chromosomique. Ils confèrent une résistance aux β -lactamines à large spectre, y compris les pénicillines, oxyimino-céphalosporines, céphamycines, et (variable) aztréonam. La sensibilité au céfépime, ceftirome et carbapénèmes n'est peu, voire pas du tout touchée (Jacoby, 2009). Les gènes céphalosporinases les plus souvent rapportés chez *E.cloacae* sont CMY-2, DHA et FOX (Arlet, 2009). Seul, le gène DHA-1 a été détecté en Algérie (**tableau 4**).

Tableau 3. Chronologie et homologie des β -lactamases de type AmpC plasmidique (Jacoby, 2009)

β -lactamases AmpC	Lieu	Année	Espèce de 1 ^{ère} isolation	Source de gène AmpC	Similarité
CMY-1	Corée du Sud	1989	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. hydrophila</i>	82
CMY-2	Grèce	1996	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. freundii</i>	96
MIR-1	États-Unis	1990	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	99
MOX-1	Japon	1993	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. hydrophila</i>	80
LAT-1	Grèce	1993	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. freundii</i>	95
FOX-1	Argentine	1994	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. caviae</i>	99
DHA-1	Arabie saoudite	1997	<i>S. enteritidis</i>	<i>M. morgani</i>	99
ACT-1	États-Unis	1997	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. asburiae</i>	98
ACC-1	Allemagne	1999	<i>K. pneumoniae</i>	<i>H. alvei</i>	99
CFE-1	Japon	2004	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	99

Tableau 4. AmpC à médiation plasmidique détectés chez *E.cloacae* en Algérie

Enzymes	Nombre de souches	Gène BLSE associé	Lieu	Année	Références
DHA-1	2	SHV-12	Alger	2009	Iabadene <i>et al.</i>
DHA-1	4	CTX-M-1	Annaba	2012	Nedjai <i>et al.</i>

Des plasmides portant les gènes β - lactamases de type AmpC (*bla ampC*) sont souvent porteurs de plusieurs autres résistances, y compris des gènes de résistance aux aminoglycosides, chloramphénicol, quinolones, sulfamides, tétracycline, et triméthoprime. Le gène *ampC* fait généralement partie d'un intégron, mais il n'est pas incorporé dans un gène de cassette avec l'élément 59- de base affiliée (**Recchia et Hall, 1995**). A noter que le même gène *bla ampC* peut être incorporé dans différents backbones sur des plasmides différents (**Carattoli *et al.*, 2002**).

Une variété d'éléments génétiques ont été impliqués dans la mobilisation des gènes *ampC* sur les plasmides. La séquence d'insertion *ISEcp1* joue double rôle. Elle est impliqué dans la transposition des gènes voisins et capable de mobiliser le gène *bla* chromosomique sur un plasmide, et elle peut également fournir un promoteur efficace pour l'expression de haut niveau des gènes (**Hossain *et al.*, 2004 ; Lartigue *et al.*, 2006 ; Poirel *et al.*, 2005**).

6.6.2.2. Phénotype « β -lactamase à spectre étendu : BLSE »

Classiquement, les BLSE sont définies comme des enzymes, appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**), capables d'hydrolyser et causer une résistance aux oxymino-céphalosporines (céfotaxime, ceftazidime, céftriaxone, céfuroxime et céfépime) et les monobactames (aztréonam), mais pas aux céphamycines (céfoxitine et céfotetan) ou carbapénèmes (imipénème, méropénème, doripénème et ertapénème). Ces enzymes sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases telle que l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam (**Peirano et Pitout, 2010**).

La majorité des BLSE sont dérivées de mutations ponctuelles dans la séquence génétique codant pour le site actif des premières β -lactamases connues (TEM-1, TEM-2 et SHV-1) (**Paterson et Bonomo, 2005**). Plus de 200 BLSE naturelles ont été décrites; elles ont été classées en 11 familles différentes sur la base de leur séquence d'acides aminés: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA (**Vidon et Bourdin, 2005**). Les 4 familles majeures sont représentées par les enzymes de type TEM, SHV, OXA et CTX-M (**Gniadkowski, 2001**).

Récemment, les BLSE de type CTX-M ont émergé comme le type le plus courant de BLSE, avec une répartition mondiale (**Seonghan et al., 2007**). Découvertes pour la première fois au milieu des années 1980, elles montrent un niveau de dissémination dans les bactéries et partout dans le monde qui augmente dramatiquement depuis 1995 (**Bonnet, 2004**). Les enzymes de la famille CTX-M comprennent aujourd'hui plus de 90 enzymes isolées de nombreuses espèces d'entérobactéries et qui, sur la base de leurs séquences protéiques, sont divisés en 5 groupes (**figure 12**) (**Bonnet, 2004 ; Ruppé, 2010**). Elles sont similaires aux autres β -lactamases à spectre étendu dans la mesure où elles hydrolysent à large spectre les céphalosporines et l'aztréonam mais agissant comme des cefotaximases.

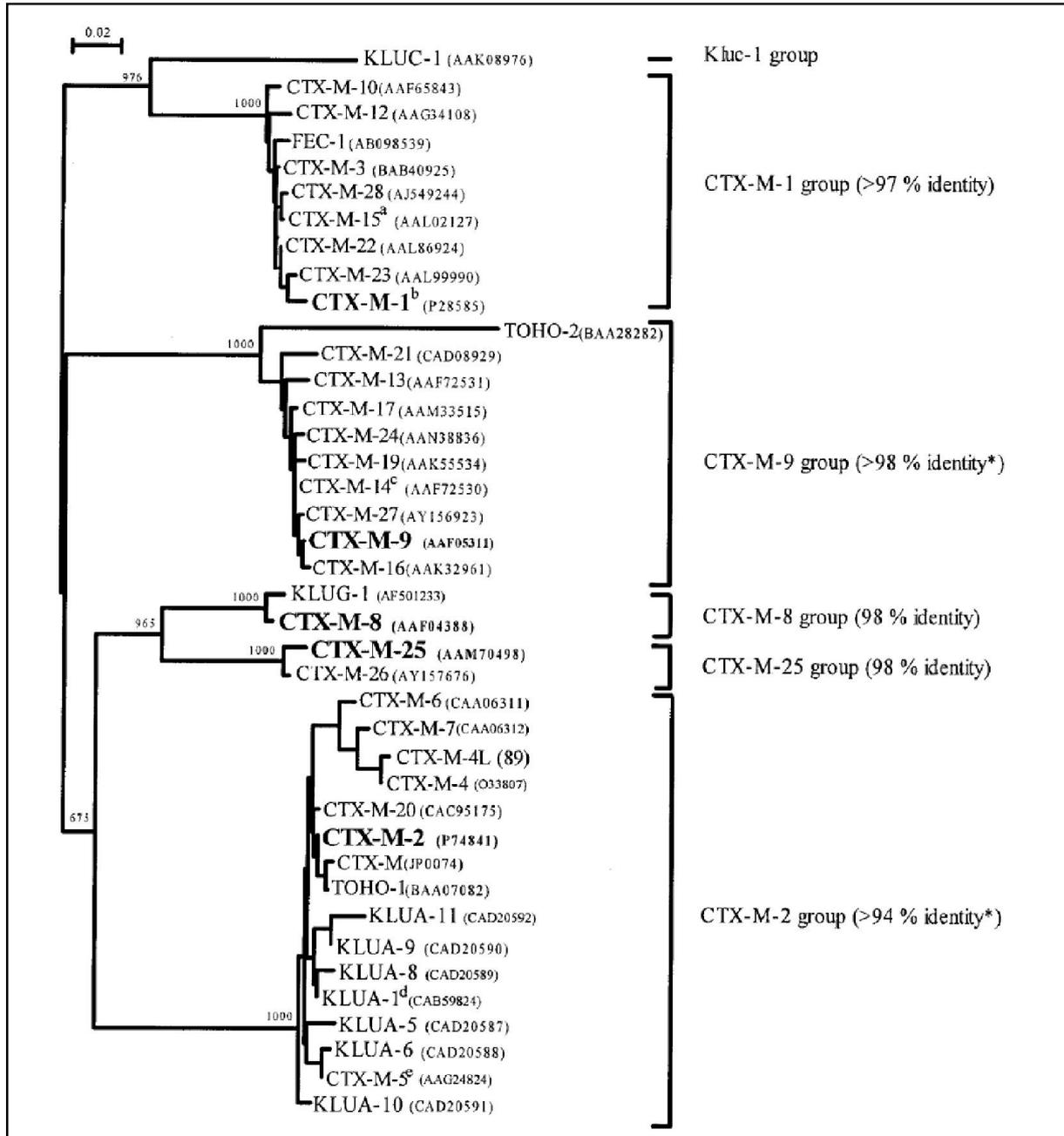


Figure 12. Dendrogramme de la famille CTX-M (Bonnet, 2004)

Les branches sont adaptées en fonction des changements d'acides aminés. Les numéros à des points de branchement principaux portent sur le nombre de fois qu'un nœud particulier a été trouvé en 1000 répliques bootstrap.

a : désigné UOE-1 et CTX-M-11 dans GenBank (numéros d'accèsion AY013478 et AJ310929, respectivement);

b : désigné MEN-1 (numéro d'accèsion GenBank AAB22638);

c : désigné CTX-M-18, UOE-2, et Toho-3 (numéros d'accèsion GenBank AF325133, AF311345, et AB038771, respectivement);

d : codée par les gènes *bla_{KLUA-1}*, *bla_{KLUA-3}*, *bla_{KLUA-4}*, et *bla_{KLUA-12}*;

e : désigné KLUA-2 (numéro d'accèsion GenBank AJ251722);

* : la séquence Toho-2 a été incluse dans le groupe CTX-M-9.

Il existe maintenant de nombreux rapports de souches d'*E.cloacae* productrices de BLSE (Ho *et al.*, 2005 ; Park *et al.*, 2005), y compris plusieurs études en Amérique (Levison *et al.*, 2002 ; Bonnet *et al.*, 2000), en Europe (Biendo *et al.*, 2008 ; Canton *et al.*, 2002), en Asie (Ko *et al.*, 2008 ; Park *et al.*, 2005), en Afrique (Hammami *et al.*, 2012 ; Lahlaoui *et al.*, 2012) et aussi en Algérie (tableau 5).

Initialement, les BLSE des espèces d'*E.cloacae* étaient typiquement de type TEM ou SHV (Paterson, 2001), mais les enzymes de la classe CTX-M ont été décrites plus récemment (Canton *et al.*, 2002). Les BLSE de type VEB-1 ont été trouvées chez *Enterobacter spp.* de la Thaïlande (Girlich *et al.*, 2001), le type IBC-1 en Grèce (Kartali *et al.*, 2002), et le type de l'OFS au Japon (Matsumoto et Inoue, 1999).

Tableau 5. Les BLSE identifiées chez *E.cloacae* en Algérie

Enzymes	Lieu	Année	Références
CTX-M-3	Béjaia	2006	Touati <i>et al.</i>
CTX-M-15	Non précisé	2008a	Touati <i>et al.</i>
CTX-M-15	Béjaia	2008b	Touati <i>et al.</i>
CTX-M-15, CTX-M-3, SHV-12, VEB-1	Alger, Tizi-ouzou, Tlemcen	2008	Iabadene <i>et al.</i>
SHV-12	Alger	2009	Iabadene <i>et al.</i>
CTX-M-15	Non précisé	2010	Touati <i>et al.</i>
CTX-M-15	Alger	2012	Touati <i>et al.</i>
CTX-M group1	Annaba	2012	Nedjai <i>et al.</i>
CTX-M-15	Béjaia	2012	Gharout Sait <i>et al.</i>
CTX-M-15	Tlemcen	2012	Baba Ahmed <i>et al.</i>
CTX-M-15, CTX-M-3	Tlemcen	2013	Baba Ahmed <i>et al.</i>
CTX-M group1, blaTEM, blaSHV	Annaba	2013	Nedjai <i>et al.</i>
CTX-M-15, TEM-136, SHV-12	Annaba	2014	Labid <i>et al.</i>

6.6.2.3. Phénotype « pénicillinase de haut niveau ou acquise »

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

6.6.3. Résistance aux carbapénèmes

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

- i. L'association entre la diminution de la perméabilité membranaire avec la production d'une céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique) ou d'une BLSE (Patel *et al.*, 2009): chez les entérobactéries, une surproduction de céphalosporinase ou d'une BLSE associée à une perte de porine de la membrane externe et/ou une surexpression de pompes à efflux (Castanheira *et al.*, 2008) est la cause la plus fréquente de résistance à l'imipénème (Bonnet, 2006) ;
- ii. Acquisition des métallo- β -lactamases (VIM, IMP): ces enzymes, appartenant à la classe B d'ambler, hydrolysent toutes les β -lactamases à l'exception de l'aztréonam (Trigoso, 2010) ;
- iii. Acquisition de non métallo- β -lactamases: ces enzymes sont soit les oxacillinases (la famille des OXA de classe D), soit les carbapénémases (classe A), inhibées par l'acide clavulanique, qui peuvent être codées par des gènes chromosomiques, décrits pour des souches de *Serratia marcescens* (SME1) et *E. cloacae* (IMI et NMC-A), ou plasmidiques

comme certains variants de GES et *Klebsiella pneumoniae carbapénèmase* (KPC) (Nordmann *et al.*, 2009; Pourriat et Martin, 2005).

Actuellement, les carbapénèmases qui sont les plus répandues chez les entérobactéries sont les enzymes de type KPC. Ces enzymes ont principalement été décrites chez *Klebsiella pneumoniae* avec un support plasmidique. Elles possèdent un pouvoir de dissémination important et sont émergentes dans de nombreux pays (Lautenbach *et al.*, 2010 ; Walsh, 2010).

Chez *E.cloacae*, Deux mécanismes « anciens », au moins, sont connus depuis les années 1980. L'un combine l'hyperproduction d'une céphalosporinase à celle de la perte d'une porine. L'autre mécanisme de résistance se caractérise par un haut niveau de résistance à l'aztréonam et une sensibilité presque normale aux C3G. Il s'agit de la production d'une carbapénèmase en position chromosomique de classe A (Philippon et Arlet, 2006). Parmi eux, les enzymes IMI et NMC-A (imipenemase/non-metallo-carbapenemase-A) ont été rapportées dans de rares isolats cliniques d'*E.cloacae* aux États-Unis, en France et en Argentine (Pottumarthy *et al.*, 2003 ; Rasmussen *et al.*, 1996), de façon sporadique ou lors de petites épidémies (Walther-Rasmussen et Hoiby, 2007). Ces gènes de carbapénèmases n'ont été que rarement décrits, probablement du fait de leur localisation chromosomique, sans association évidente avec un élément génétique mobile. Cependant, le gène codant pour IMI-2 a été retrouvé après sur un plasmide dans une souche d'*Enterobacter asburiae* aux États-Unis, et dans une souche d'*E.cloacae* en Chine (Bratu *et al.*, 2005b ; Yigit *et al.*, 2001) (tableau 6).

Tableau 6. Les carbapénèmases en position chromosomique (Walther-Rasmussen et Hoiby, 2007)

Enzyme	Localisation	Espèce	Lieu	Année	Références
IMI-1	Chromosome	<i>E.cloacae</i>	USA	1984	Rasmussen <i>et al.</i> , 1996
IMI-2	Plasmide	<i>E.asburiae</i>	USA	1999-2001	Aubron <i>et al.</i> , 2005
IMI-2	Plasmide	<i>E.cloacae</i>	Chine	2001	Yu <i>et al.</i> , 2006
NMC-A	Chromosome	<i>E.cloacae</i>	France	1990	Naas et Nordmann, 1994 ; Nordmann <i>et al.</i> , 1993
NMC-A	Chromosome	<i>E.cloacae</i>	Argentine	2000	Radice <i>et al.</i> , 2004
NMC-A	Chromosome	<i>E.cloacae</i>	USA	2003	Pottumarthy <i>et al.</i> , 2003

Jusqu'à 1994, les 2 enzymes carbapénémases de classe A signalés chez *Enterobacter cloacae* étaient NMC-A et IMI (Walther-Rasmussen et Hoiby, 2007 ; Naas et Nordmann, 1994). De puis, des enzymes de type KPC et GES à support plasmidique ont été découvertes. Les enzymes de type GES sont initialement des BLSE dont seuls quelques variants touchent les carbapénèmes (Grall *et al.*, 2011). Ces carbapénémases de type GES ont été identifiées en Grèce (GES-7) (Giakkoupi *et al.*, 2000) et au Canada (GES-5) (Poirel *et al.*, 2009).

La dernière évolution identifiée est beaucoup plus inquiétante, car elle est liée à la découverte de carbapénémases plasmidiques, majoritairement de type KPC (Bratu *et al.*, 2005a ; Yigit *et al.*, 2001). Phénotypiquement, KPC-1, KPC-2, KPC-3 confèrent un haut niveau de résistance aux C3G. De plus, pour le groupe KPC, la résistance est croisée entre les carbapénèmes (imipénème, méropénème, ertapénème, doripénème) et la transmission des gènes est facile par conjugaison (Philippon et Arlet, 2006). Chez *E.cloacae*, ces enzymes ont été identifiées en Chine (KPC-2) (Wu, 2010), aux états unis (KPC-2) (Bratu *et al.*, 2005b), (KPC-3) (Dortet, 2008 ; Deshpande *et al.*, 2005) et au Royaume-Uni (KPC- 4) (Woodford, 2008).

Enfin certaines carbapénémases de classe B de type VIM et IMP ont été aussi identifiées chez cette espèce dans plusieurs pays du monde (Corée du Sud, Italie, Australie, Grèce, Turquie, Japon et Taiwan) (tableau 7) (Queenan et Bush, 2007).

Tableau 7. Émergence mondiale de métallo- β -lactamases chez *E.cloacae* (Queenan et Bush, 2007)

Lieu	Année	Enzyme	Localisation	Références
Australie	2005	IMP-4	Plasmide	Espedido <i>et al.</i> , 2005
Grèce	2005	VIM-1	Chromosome	Galani <i>et al.</i> , 2005
Italie	2004	VIM-4	Plasmide	Luzzaro <i>et al.</i> , 2004
Japan	2003	IMP-1-like	Non testé	Shibata <i>et al.</i> , 2003
Corée du Sud	2003	VIM-2	Chromosome	Jeong <i>et al.</i> , 2003
Corée du Sud	2006	VIM-2-like	Non testé	Yum <i>et al.</i> , 2002
Taiwan	2002	IMP-8	Plasmide	Yan <i>et al.</i> , 2002
Turquie	2005	VIM-5	Plasmide	Gacar <i>et al.</i> , 2005

Actuellement, une attention particulière est portée sur la nouvelle carbapénèmase, la New Delhi métallo- β -lactamase-1 (NDM-1), découverte en Décembre 2009 en Suède, à partir d'une souche clinique de *Klebsiella pneumoniae* responsable d'une infection urinaire chez un patient auparavant hospitalisé à New Delhi, Inde (**Yong et al., 2009**). Depuis cette découverte, plus de 52 publications ont été rapportées signalant la diffusion spectaculaire et inquiétante de ce gène chez *E.cloacae* dans plusieurs pays à travers le monde (**Berrazeg, 2013**). D'autres variants de gène NDM ont été aussi identifiés, NDM-4 au Sri Lanka (**Papagiannitsis et al., 2013**).

Récemment, une expression des gènes *ompC* et *ompF* ont amenée à une restauration aux concentrations minimales inhibitrices de l'ertapénème. Une étude suggère qu'une surproduction des β -lactamases de type BLSE et AmpC et une diminution de l'expression de l'Omp (Outer Membrane Proteins) combiné avec une pompe à efflux actif contribue à la résistance d'*E.cloacae* à l'ertapénème (**Yang et al., 2012**).

6.7. Résistance d'*Enterobacter cloacae* aux aminosides

En 1970, toutes les souches d'*E.cloacae* étaient sensibles à la gentamicine. Au milieu des années 1970, la résistance aux aminosides véhiculés par des plasmides a diffusé entre les bacilles à Gram négatif dans le monde entier, et la résistance à la gentamicine, la tobramycine, et (dans une moindre mesure) à l'amikacine est devenue une préoccupation (**Grimont et Grimont, 2006**).

Le mécanisme de loin le plus fréquent réside dans la production d'enzymes stéréospécifiques capables de modifier des fonctions -NH₂ ou -OH bien précises sur les molécules d'aminoside, empêchant ces dernières de se fixer sur le ribosome. Trois classes d'enzymes ont été décrites, à savoir les aminosides-N-amino-acétyl transférases (AAC), les aminosides-o-nucléotidyl transférases (ANT) et les aminosides-o-phosphotransférases (APH). Produites le plus souvent de manière constitutive, les enzymes modificatrices confèrent une résistance de haut niveau à un ou plusieurs aminosides. Leurs gènes étant fréquemment portés par des transposons et/ou des intégrons (**Magnet et Blanchard, 2005**), elles sont régulièrement co-produites avec des β -lactamases. Les enzymes ANT(3'')-Ia, AAC(6')-If, AAC(6')Ib, AAC(3)-Via, AAC(3)-IIa sont les plus répandues parmi les isolats

cliniques d'*E.cloacae* (**tableau 8**), avec le gène aac(3')-II détectés en Algérie (**Baba Ahmed et al., 2013**). Elles génèrent une résistance élevée à la spectinomycine et la streptomycine pour ANT(3'')-1, à la gentamicine, la sisomicine et la fortimicine (astromicine) pour AAC(3)-I, à la tobramycine et l'amikacine pour AAC(6')-Ib (**Ramirez et Tolmasky, 2010**).

Tableau 8. Les enzymes-modifiant les aminosides (AME) chez *E.cloacae* (**Ramirez et Tolmasky, 2010**)

AME	Gènes	Localisation	Numéro d'accèsion	Références
AAC(3)-IIa	aac(3)-IIa, aaC3,aacC5, aacC2, aac(3)-Va	Plasmide	X13543	Allmansberger <i>et al.</i> , 1985
AAC(3)-VIa	aac(3)-VIa	Plasmide	M88012, NC009140, NC009838	Rather <i>et al.</i> , 1993
AAC(6')-Ib C	aac(6')-Ib, aac(6')-4, aacA4	Plasmide	M21682, M23634, AF479774	Nobuta <i>et al.</i> , 1988 ; Tran van Nhieu et Collatz, 1987 ; Soler Bistue <i>et al.</i> , 2006
AAC(6')-If	aac(6') -If	Plasmide	X55353	Teran <i>et al.</i> , 1991
AAC(6')-Ib7	aac(6')-Ib7	Plasmide	Y11946	Casin <i>et al.</i> , 1998
AAC(6')-Ib8	aac(6')-Ib8	Plasmide	Y11947	Casin <i>et al.</i> , 1998
AAC(6')-Ib-Suzhou	aac(6')-Ib-Suzhou		EF37562, EU085533	Huang <i>et al.</i> , 2008
AAC(6')-IIc	aac(6')-IIc	Plasmide, intégron	NC 012555	Chen <i>et al.</i> , 2009 ; Galani <i>et al.</i> , 2005 ;
ANT(3'')-Ia	aadA5	Plasmide	AF137361	Sandvang, 1999

Cette dernière décennie a été marquée par l'émergence d'un nouveau mécanisme de résistance chez les bacilles à Gram négatif, capable de modifier non pas l'aminoside mais la structure ribosomale sur lequel il se fixe, l'ARN 16S se sont les méthylases de l'ARN 16S. Huit déterminants de méthylases ARNr 16S à médiation plasmidique (RMTases 16S) (ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF et NpmA) ont été identifiés en Asie orientale, en Europe et en Amérique du Sud (**Galimand et al., 2012 ; Yamane et al., 2007**). Les méthylases de l'ARN 16S sont décrites de plus en plus souvent chez les entérobactéries

dont *E.cloacae*, dans plusieurs pays dont l'Algérie avec uniquement le gène ArmA (Bogaerts *et al.*, 2007 ; Wachino *et al.*, 2006). Ces enzymes représentent donc un risque épidémiologique majeur qui doit inciter à la vigilance. La production des méthylases de type ArmA, RmtB et RmtD a été rapportée chez des isolats cliniques d'*E.cloacae* au Chili, Mexique, Pologne et au Etats-Unis (tableau 9) (Fritsche *et al.*, 2008). La méthylation de l'ARN 16S par ces enzymes entraîne une résistance aux 2-déoxystreptamines bisubstituées en 4,6 telles que la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine, l'isépamycine et l'arbékacine.

Tableau 9. Les méthylases de l'ARN 16S et profils de résistance aux aminosides chez *E.cloacae* (Fritsche *et al.*, 2008)

Study Yr	Country	MIC value (µg/ml)									Resistance
		Amikacin	Apramycin	Arbekacin	Fortimicin	Gentamicin	Kanamycin	Neomycin	Netilmicin	Tobramycin	Gene
2006	Chile	>128	4	>128	>128	>128	>128	16	>128	>128	RmtD
2005	Mexico	>128	4	>128	>128	>128	>128	4	>128	>128	RmtB
2005	Mexico	>128	2	>128	>128	>128	>128	128	>128	>128	RmtB
2006	Mexico	>128	4	>128	>128	>128	>128	4	>128	>128	RmtB
2006	Poland	>128	4	>128	>128	>128	>128	≤1	>128	>128	ArmA
2005	United State	>128	4	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ArmA

6.8. Résistance d'*Enterobacter cloacae* aux quinolones

Multirésistance des entérobactéries, y compris la résistance aux quinolones, est en augmentation. Bien que la résistance aux quinolones est principalement due à des mutations chromosomiques (Martínez-Martínez *et al.*, 1998), elle peut également résulter de l'expression des déterminants à médiation plasmidique (PMQR) tels que aac(6')-Ib-cr codant pour une acétyltransférase des aminoglycoside qui est également responsable d'acétylation des fluoroquinolones, qepA codant pour une pompe d'efflux et les gènes *qnr* (Cavaco *et al.*, 2009).

Les β-lactamases de types BLSE et AmpC à médiation plasmidique sont de plus en plus signalés en association avec PMQR (Chmelnitsky *et al.*, 2008 ; Robicsek *et al.*, 2006a). Chez *E.cloacae* plusieurs gènes de type PMQR ont été découverts à travers le monde : *qnrA*

en Australie (**Rodriguez-Martinez et al., 2006**), *qnrA* en Brésil (**Minarini et al., 2007**), *qnrA1*, *qnrB4*, *qnrS1*, *qnrB10*, *qnrB6*, *qnrS2* et *aac(6')-Ib-cr* en Chine, (**Zhao, 2010 ; Zizhong et al., 2008**), *qnrA* en Irlande (**Mac Aogáin et al., 2010**), *qnrA1*, *qnrS* et *aac(6')-Ib* en Corée (**Kim et al., 2009**), *qnrA* et *aac(6')-Ib* aux États-Unis (**Robicsek et al., 2006b ; Park et al., 2006**), *qnrB2*, *qnrB5*, *qnrS1* et *aac(6')* en Espagne (**Cano et al., 2009**) *qnrA1* à Netherlands (**Paauw et al., 2006**), *qnrB1* *qnrA1* en Côte d'Ivoire (**Guessennd et al., 2008**) et *qnrS1*, *qnrB4*, *qnrB1*, *qnrB2* et *aac(6')-Ib-cr* en Algérie (**tableau 10**).

Le gène *qepA* a été aussi découvert chez *E.cloacae* isolées en Chine à partir des animaux, c'est un fait important qui constitue un problème de santé publique. L'utilisation prudente des agents antimicrobiens est donc nécessaire en médecine vétérinaire ainsi que dans la médecine humaine pour réduire la propagation de ces gènes de résistance (**Ma et al., 2009**). En Algérie, ce gène *qepA* n'a pas encore été rapporté.

Tableau 10. Les PMQR identifiées chez *E.cloacae* en Algérie

PMQR	Nombre de souches	Gènes associés	Lieu	Année	Références
QnrS1, QnrB1 QnrB4	5	CTX-M-15, SHV-12	Alger	2008	Iabadene et al.
QnrB	2	CTX-M-15	Béjaia	2008a	Touati et al.
<i>aac(6')</i> lb-cr, <i>qnrB1</i>	3	CTX-M-28, TEM-1	Annaba	2011	Meradi et al.
<i>aac(6')</i> lb-cr, <i>qnrB1</i>	5	CTX-M-15, TEM-1, OXA-1	Béjaia	2012	Gharout-Sait et al.
<i>aac(6')</i> -Ib-cr <i>qnrB2</i>	3	CTX-M-15	Tlemcen	2013	Baba Ahmed et al.

Les différents niveaux de résistance à la ciprofloxacine dans les isolats étudiés anticipe que d'autres mécanismes de résistance (telles que des mutations à l'extérieur du QRDR de *gyrA/parC*, des mutations dans *gyrB/parE*, un efflux actif, ou diminution de la perméabilité) ou des différences dans l'expression génique peuvent être impliqués dans des isolats individuels (**Cano et al., 2009**).

Enfin, *EmmDR* de *E.cloacae* est un nouveau membre de la famille MATE des transporteurs des antimicrobiens. C'est un mécanisme de multirésistance important chez *E.cloacae* qui

expulse les quinolones. EmmdR est constituée de douze segments transmembranaires et présente une certaine identité commune avec les membres de la famille des transporteurs (MATE), responsable d'extrusion des antimicrobiennes et des composés toxiques (**He et al., 2011**). Le rôle de la pompe à efflux de type AcrAB-TolC a été aussi décrit précédemment chez cette espèce comme un mécanisme majeur de la résistance aux quinolones (**Linde et al., 2002**).

7. Epidémiologie des BLSE à *Enterobacter cloacae*

7.1. Notions générales

Depuis les années 1980, les céphalosporines de troisième génération font partie des molécules pivot pour le traitement de plusieurs infections sévères. Rapidement, un groupe hétérogène d'enzymes à transmission plasmidique, responsable des résistances aux pénicillines, aux céphalosporines, et autres monobactames s'est développé chez plusieurs bactéries dont la majorité sont des entérobactéries: les β -lactamases à spectre étendu (**Colodner, 2005**). Les premières observations de BLSE sont décrites en Europe et, rapidement après, aux États-Unis à partir de 1988 où une nouvelle résistance à la ceftazidime et à l'aztréonam a permis de retrouver une nouvelle β -lactamase à transmission plasmidique chez une *K. pneumoniae* (**Quinn et al., 1989**). Cette enzyme est transmise rapidement et facilement aux autres BGN dont *E. cloacae*. Ces espèces productrices de BLSE ont été décrites dans plusieurs pays à travers le monde (**Canton et al., 2002 ; Chanawong et al., 2002**). Les données publiées ont démontré une large gamme de taux de production de BLSE parmi des isolats cliniques d'*E. cloacae*: Taiwan (63,3%) (**Kao, et al., 2010**), Grèce (25%) (**Ho et al., 2009**), États-Unis (7,3% et 4,3%) (**Sanders et al., 2002; D'Agata et al., 1998**), la Corée du Sud (16.2%) (**Ko et al., 2008**), Royaume-Uni (33%) (**Crowley et Ratcliffe, 2003**).

L'espèce d'*E. cloacae* produisant une BLSE est aussi présente en Algérie : 17.7% au centre et à l'est de l'Algérie (**Iabadene et al., 2008**) ; 47.6% à Annaba (**Nedjai et al., 2013**) ; 21% à Tlemcen (**Baba Ahmed, 2013**) et 57,7% à Sidi Bel Abbas (**Souna, 2010**).

Initialement, les BLSE des espèces d'*Enterobacter* étaient typiquement des enzymes de type TEM ou SHV (**Mammeri et al., 2001**), mais les enzymes de la classe CTX-M ont été décrites plus récemment (**Canton et al., 2002**). Les BLSE de type VEB-1 ont été trouvées

chez *Enterobacter spp.* au Thaïlande (**Girlich et al., 2001**), le type IBC-1 en Grèce (**Kartali et al., 2002**), et le type de l'OFS au Japon (**Matsumoto et Inoue, 1999**).

Leur impact est très important, surtout dans les services de réanimation avec de véritables épidémies puis un passage à l'endémie (**Paterson, 2001**). Les résistances de type BLSE se retrouvent souvent associées à des corésistances aux aminoglycosides, aux tétracyclines, au triméthoprim-sulfaméthoxazole et à la ciprofloxacine (**Winokur et al., 2001**).

7.2. Facteur de risque

Des études cas témoins et/ou des études d'observation de petite envergure dans un contexte hospitalier (**Bisson et al., 2002; Gardam et al., 2002**) ont identifié un séjour prolongé, l'admission en soins intensifs, la durée du séjour en soins intensifs, la ventilation mécanique, la trachéostomie, la présence d'un cathéter artériel, d'un cathéter veineux central, d'un cathéter urinaire ou de sondes d'alimentation et l'utilisation antérieure d'antibiotiques comme des facteurs de risque de colonisation par des BLSE et d'infection par des organismes produisant des BLSE (**Sandoval et al., 2004; Lautenbach et al., 2001**). Il est actuellement prouvé que l'utilisation des antibiotiques est le facteur de risque le plus important dans le développement de résistances bactériennes (**Rubin et Samore, 2002**). De nombreuses études ont été effectuées ces dernières années sur le sujet et ont souvent montré le rôle prépondérant des antibiotiques dans l'émergence des BLSE (**De Champs et al., 1989**). En effet, les antibiotiques agissent à plusieurs niveaux : ils peuvent transformer la flore habituelle des patients, favoriser la colonisation par des bactéries résistantes et faciliter leur dissémination. 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 (**Follath et al., 1987**). De plus, on peut constater que la restriction de l'utilisation des antibiotiques a permis la diminution du nombre des souches produisant une BLSE (**Meyer et al., 1993; Chow et al., 1991**). L'administration d'une céphalosporine pour traiter les infections à *Enterobacter* a été rapportée comme un risque de sélection dans le développement des *Enterobacter spp.* multirésistants. La résistance à la céphalosporine est un facteur de risque accru pour une mortalité de 30 jours chez les patients atteints de

bactériémie due à *Enterobacter spp.*, suggérant que c'était un raison de retards dans le traitement initial approprié (**Denton, 2007**).

7.3. Réservoirs

Lorsqu'on parle d'infections associées aux soins, on est tenu d'identifier les différents réservoirs potentiels des bactéries, à savoir les patients eux-mêmes, le personnel soignant, le matériel médical et l'environnement. Dans le cadre des infections à entérobactéries, il a souvent été démontré que le réservoir prépondérant est le patient lui-même (**Goldstein, 1995**).

7.4. Modes de transmission

La transmission peut produire des épidémies locales au niveau d'une unité de soins intensifs, d'un hôpital ou un centre de soins. Elle peut s'étendre au niveau inter hospitalier par le transfert de patients colonisés ou infectés.

Dans la majorité des cas, la transmission nosocomiale des BLSE est liée au contact avec les mains du personnel soignant. Des sources de contamination ponctuelles à partir de l'environnement ont été impliquées occasionnellement comme les stéthoscopes, thermomètres, endoscopes et appareils d'échographie, baignoires, gels de bains, shampoings, ongles artificiels chez les infirmières, ainsi que les insectes comme les blattes (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**).

Matériel et Méthodes

1. Matériel

1.1. Souches de référence

- ATCC 27853: *Pseudomonas aeruginosa* de phénotype sauvage ;
- ATCC 25922: *Escherichia coli* ;
- VIM: *Pseudomonas aeruginosa* productrice de métallob- β -lactamase VIM ;
- K 12: *Escherichia coli* résistante à la rifampicine ;
- VP 517: *Escherichia coli* ;
- *Escherichia coli* 50192 ;
- Bactéries électrocompétentes DH 10 B.

1.2. Milieux de culture

1.2.1. Milieux de culture liquides

- BN : Bouillon nutritif (Institut Pasteur d'Algérie) ;
- BHIB : Bouillon cœur cerveau (Fluka) ;
- MHL : Mueller Hinton liquide (Fluka) ;
- LB : Bouillon Luria (Sigma).

1.2.2. Milieux de culture solides

- Gélose nutritive (Fluka) ;
- Mac Conkey (Fluka) ;
- Mueller Hinton (Fluka) ;
- TSI : Triple Sugar Iron.

1.3. Tests biochimiques

- Galerie API 20 E (Bio Mérieux).

1.4. Solutions, Enzymes et Tampons

- **Solutions** : Solution d'EDTA 0,5 M pH 8, Solution de lyse, Solution de BET (Sigma), Ethanol, Phénol-Chloroform-Isoamylalcool (24 :25 :1) (Sigma), Réactif de Kieser, Solution de lavage et phénol-chloroforme acide ;
- **Tampons** : Tampon TE, Tampon de charge, Tampon TBE 1X, Tampon ATL, AL, AW1, AW2 et AE (Kit QIAamp DNA Mini), Tampon de suspension, Tampon de lyse et Tampon de restriction ;
- **Enzymes** : Protéinase K, RNase A, lysozyme et enzyme de restriction (XbaI).

1.5. Antibiotiques

1.5.1. En disque

- **β -lactamines:** Amoxicilline/acide clavulanique (20/10 μg), Ticarcilline (75 μg), Ticarcilline/acide clavulanique (75/10 μg), Pipéracilline (75 μg), Pipéracilline/tazobactam (75/10 μg), Imipénème (10 μg), Aztréonam (30 μg), Céfalogtine (30 μg), Céfoxitine (30 μg), Céfotaxime (30 μg), Ceftriaxone (30 μg), Ceftazidime (30 μg), Céfépime (30 μg);
- **Aminosides:** Tobramycine (30 μg), Amikacine (30 μg) et Gentamicine (15 μg) ;
- **Quinolones:** Acide nalidixique (30 μg), Ofloxacine (5 μg) et Ciprofloxacine (5 μg) ;
- **Autres antibiotiques:** Colistine (50 μg), Triméthoprime/Sulfaméthoxazole (75 μg) et Rifampicine (30 μg).

1.5.2. En poudre

- **β -lactamines:** Pipéracilline (Dakota^R Pharm.), Pipéracilline/tazobactam (Wyeth Pharmaceuticals), Imipénème (MSD), Céfoxitine (Panpharma), Aztréonam (Sanofi- synthelabo), Céfotaxime (Aventis), Ceftazidime (Glaxo Smith Kline), Céfépime (Bristol-Myers Squibb) et Orbénine (Astellas) ;
- **Aminosides :** Tobramycine (Merck), Amikacine (Bristol-Myers Squibb) et Gentamicine (Panpharma) ;
- **Quinolones :** Ciprofloxacine (Bayer Pharma) ;
- **Autre antibiotique:** Rifampicine (Saidal).

2. Méthodes

2.1. Prélèvements

2.1.1. Lieu d'étude (hôpitaux et services)

L'étude multicentrique a été réalisée sur trois centres hôpitalo-universitaires situés dans l'ouest du pays :

- L'hôpital de Tlemcen comprend 800 lits distribués sur 25 services de médecine et de chirurgie ;
- L'hôpital d'Oran contient 2142 lits et dispose de 54 services ;
- l'hôpital de Sidi Bel Abbes est composé de 639 lits avec 23 services d'hospitalisation.

Les services choisis sont la réanimation, la traumatologie, la chirurgie générale et infantile (CCI), la neurochirurgie, la néonatalogie, la médecine interne et l'endocrinologie.

2.1.2. Type de prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés par écouvillonnage sur des plaies suppurées, d'escarres de malade et de l'environnement hospitalier ainsi que par la récupération directe des sondes trachéales et vésicales, puis acheminés au laboratoire (les écouvillons et les sondes sont introduits dans un tube contenant du bouillon nutritif afin d'assurer la survie des souches) pour être incubés dans l'étuve à $37^{\circ}\pm 1$ pendant 18 à 24H.

2.2. Isolement et purification

On procède directement à une recherche des souches d'*Enterobacter cloacae* et pour cela on réalise un ensemencement en strie sur toute la surface d'une gélose Mac Conkey pour l'isolement des bactéries à Gram négatif grâce à l'action de deux inhibiteurs présent dans le milieu, le cristal violet pour l'inhibition de la flore Gram positive et les sels biliaires pour la sélection des entérobactéries. Ce milieuensemencé, est incubé à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 H. Après observation de l'aspect macroscopique des colonies, on réalise des purifications par ensemencements successifs en alternant bouillon nutritif et gélose Mac Conkey.

2.3. Identification

L'identification a été réalisée par les galeries d'identification AP 20E. Le système API® Bio Mérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries.

Elle est prise à partir des cultures pures représentées par des colonies que l'on peut différencier par leur aspect, forme, taille, bord, surface et chromogénèse. Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la micro-galerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.

Ces plaques permettent l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif et comprennent 20 tests biochimiques.

La lecture de ces réactions est réalisée à l'aide du tableau de lecture (**annexe 1**) et l'identification obtenue à l'aide du tableau d'identification du catalogue analytique (**annexe 2**).

2.4. Antibiogramme

2.4.1. Principe

L'antibiogramme ou les méthodes par diffusion sont les plus utilisés par les laboratoires cliniques. Ils consistent à disposer des disques de papier buvard imprégnés de concentration déterminée d'antibiotiques à la surface d'un milieu gélosé. Dès l'application des disques, l'antibiotique diffuse à partir du disque de manière uniforme dans la gélose. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture.

2.4.2. Technique (CASFM, 2011; Vedel, 1998)

Préparation de l'inoculum

- Ensemencer 5 ml de bouillon BHIB avec 3 à 4 colonies de la souche à tester;
- Incuber 3 à 5 H sous agitation à $37 \pm 1^\circ\text{C}$. La culture doit être de 10^8 UFC/ml soit de densité optique 0.08-0.1 à une longueur d'onde de 625nm.

Ensemencement

- Diluer la suspension inoculum au 1/100 ($\approx 10^6$ UFC/ml) dans de l'eau physiologique ;
- Ensemencer par inondation les boîtes de Pétri coulées par 20 ml de milieu Mueller-Hinton ;
- Après l'aspiration de surplus, faire sécher les boîtes de Pétri 20 à 30 mn à l'étuve.

Application des disques

- Déposer les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile;
- Pour ce qui concerne les β -lactamines, placer les disques suivant le schéma de Vedel (**figure 13**).

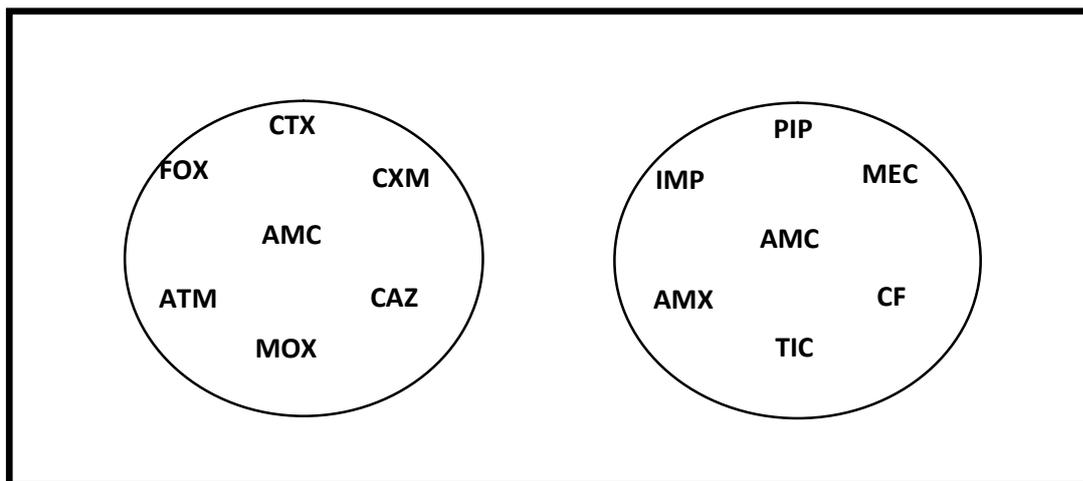


Figure 13. Schéma de Vedel (1998)

On laisse les boîtes 20 mn à la température ambiante pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique, puis on incube pendant 18-24 H à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.4.3. Lecture

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition, et comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans **l'annexe 3** ;
- Classer les bactéries dans l'une des catégories: Sensible, Intermédiaire ou Résistance ;
- Interpréter les phénotypes de résistance aux β -lactamines.

2.5. Détermination de la CMI en milieu solide

2.5.1. Principe

La méthode de dilution successive en milieu solide est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Elle consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques.

2.5.2. Technique (CASFM, 2011)

Préparation des solutions d'antibiotiques

Pour chacun des antibiotiques, préparer une solution mère à 5120 mg/l puis réaliser des dilutions séries de progression géométrique de raison 1/2 (**annexe 4**).

Préparation des boîtes

- Distribuer 2 ml de chaque dilution d'antibiotique dans une série de boîte de Pétri ainsi que 2 ml d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri témoin ;
- Ajouter 18 ml de milieu Mueller Hinton glosé maintenu en surfusion ;
- Bien mélanger et laisser solidifier ;
- Sécher les boîtes 30 mn à l'étuve à 37°C .

Préparation de l'inoculum

- Préparer des suspensions de 10^8 UFC/ml pour chacune des souches à tester.

Ensemencement

- Diluer la suspension d'inoculum au 1/10 ;

- Ensemencer par spot 1 à 2 μl de la suspension bactérienne, soit un inoculum de 10^4 UFC/spot.

Incubation

- Incuber 18 à 24 H à 37°C .

2.5.3. Lecture

- S'assurer de la croissance des souches au niveau de la boîte témoin ;
- La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la plus faible concentration où il n'y a pas de croissance visible. La présence d'une ou de deux colonies ou d'un fin film n'est pas prise en considération.

2.6. Détermination de la CMI par E-test (Epsillométer-test)

2.6.1. Principe

La détermination précise de la CMI par la méthode de référence est difficilement utilisable en pratique quotidienne. La commercialisation d'une technique rapide et simple, l'E-test (AB Biodisk), permet à un laboratoire de diagnostic de mesurer la CMI.

Le E-test permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester. Ce gradient couvre une zone qui, en fonction des molécules, va de 0.016 à 256 mg/l ou de 0.002 à 32 mg/l. L'E-test associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide. Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes, de 5 mm de largeur et de 50 mm de longueur.

2.6.2. Technique (Rahal *et al.*, 2011)

- Préparer des suspensions de 10^8 UFC/ml pour chacune des souches à tester ;
- Diluer la suspension d'inoculum au 1/100 ($\approx 10^6$ UFC/ml) dans de l'eau physiologique ;
- Ensemencer par inondation les boîtes de Pétri coulées par 20 ml de milieu Mueller-Hinton ;
- Après l'aspiration de surplus, faire sécher les boîtes de Pétri 20 à 30 mn à l'étuve ;
- Appliquer les bandelettes E-test sur la surface de la gélose Mueller-Hinton.

2.6.3. Lecture

Après incubation (18 à 24 H à 37°C), l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI. Une échelle de lecture imprimée à la face supérieure de la bandelette, permet une interprétation rapide (lecture directe de la valeur de la CMI).

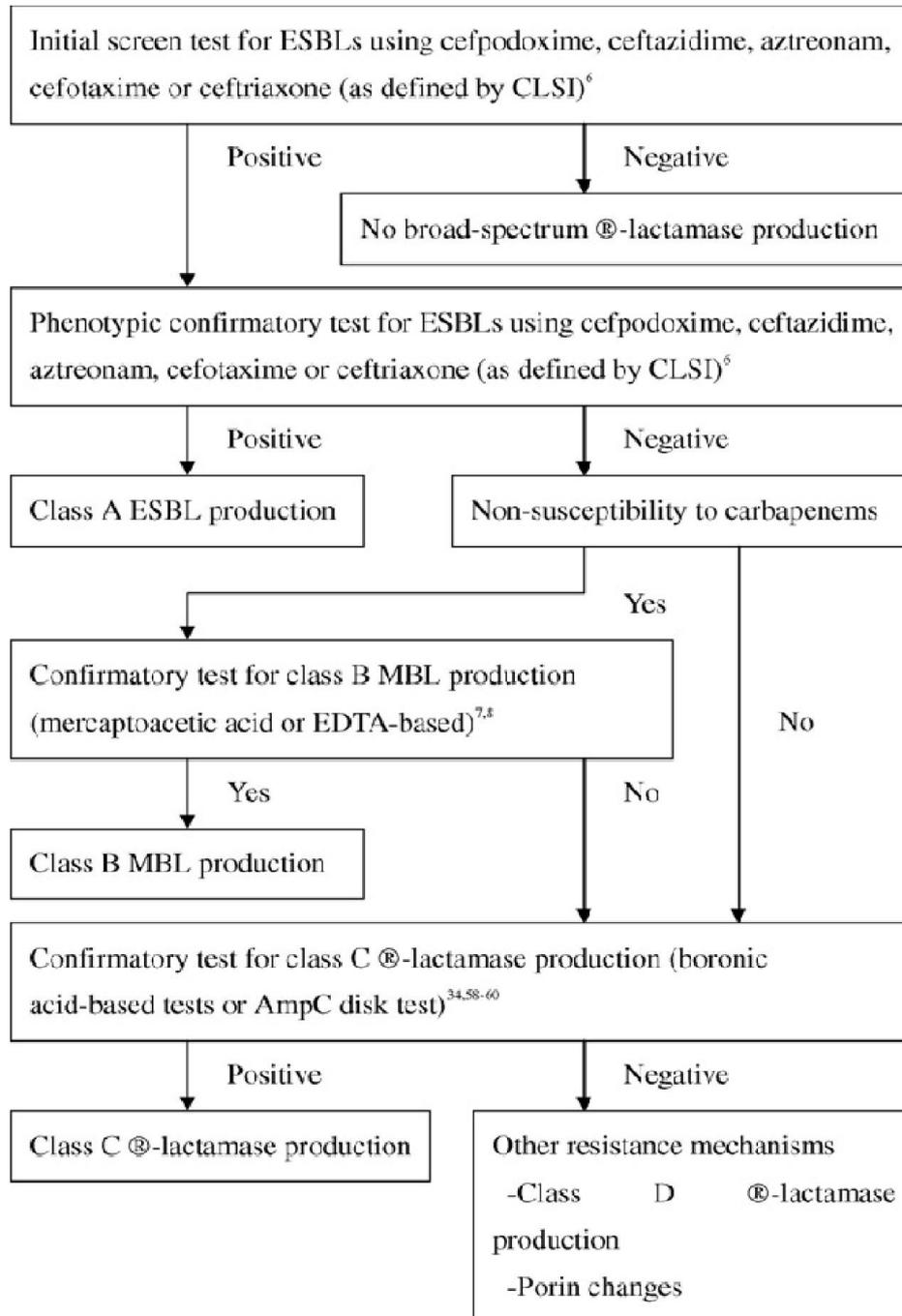


Figure 14. Les approches phénotypiques pour le dépistage et la confirmation des classes β -lactamases (Doi et Paterson, 2007)

2.7. Test de synergie

2.7.1. Principe

Cette technique, sur gélose dite des « bouchons de champagne » recommandée par le CASFM, reste la plus utilisée. Elle consiste à rechercher une synergie sur gélose de Mueller-Hinton entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamases (d'amoxicilline + acide clavulanique) et des disques (placés à 2 ou 3 cm du disque central) de C3G (ceftazidime, de céfotaxime et de céfépime) et/ou d'aztréonam. Elle permet de différencier une bactérie hyperproductrice de céphalosporinases d'une bactérie produisant une BLSE dans la famille des entérobactéries.

2.7.2. Technique (Rahal et al., 2011)

- La recherche de la β -lactamase à spectre étendu se fait dans les conditions standard de l'antibiogramme en disposant un disque d'amoxicilline/acide clavulanique (AMC) à 30 mm (centre à centre) d'un disque de C3G ;
- La détection des BLSE chez les souches également hyperproductrices de céphalosporinase (*Enterobacter...*) est facilitée par la recherche d'une synergie entre un disque d'amoxicilline/acide clavulanique et le céfépime ou cefpirome (C4G).

2.7.3. Lecture

Il y a présence d'une BLSE ou un test de synergie positif quand il y a une image caractéristique, en « bouchon de Champagne ». Un résultat positif est basé sur l'inhibition des BLSE par l'acide clavulanique, et par conséquent l'augmentation de l'activité des céphalosporines de troisième et quatrième génération en présence d'acide clavulanique.

2.8. Test à la cloxacilline

2.8.1. Principe

Pour certaines souches de bacille à Gram négatif, il est parfois difficile de distinguer sur l'antibiogramme habituel les hyperproductions de céphalosporinases des β -lactamases à spectre élargi (BLSE). En cas d'hyperproduction, les diamètres autour des disques de C3G très diminués peuvent masquer les images de synergies évocatrices de BLSE entre des disques de C3G et d'acide clavulanique. La cloxacilline (Orbénine®), ajoutée au milieu pour l'antibiogramme (Mueller-Hinton), inhibe in vitro les céphalosporinases de la classe C d'Ambler chromosomiques ou plasmidiques et reste inefficace sur les pénicillinases des bacilles à Gram négatif.

2.8.2. Technique (Rahal *et al.*, 2011)

- Réaliser un antibiogramme par diffusion sur gélose Mueller Hinton contenant de la cloxacilline à une concentration finale de 300 $\mu\text{g/ml}$;
- Dans ce cas il faut dissoudre 0.3 g de Cloxacilline dans 30 ml d'eau distillée pour préparer une concentration de 10000 $\mu\text{g/ml}$ puis procéder à une dilution à 3000 $\mu\text{g/ml}$;
- Pour une boîte ronde (90mm), mettre 2 ml de cette concentration et 18 ml de Mueller-Hinton.

2.8.3. Lecture

L'interprétation des résultats peut se traduire, en comparant les boîtes de Pétri contenant une gélose Mueller-Hinton simple et celles contenant les géloses supplémentées de la cloxacilline.

Un résultat positif est noté lorsque une augmentation des diamètres d'inhibition, d'au moins 8 mm autour des disques de céfotaxime CTX et ceftazidime CAZ, est observée.

2.9. Test de Hodge

2.9.1. Principe

Un disque d'imipénème est appliqué au centre d'une boîte de Mueller Hinton (MH) préalablementensemencée avec une souche d'*Escherichia coli* sauvage (ATCC 25922) sensible aux carbapénèmes afin d'obtenir une culture confluyente et un diamètre dans la zone de sensibilité autour de l'imipénème.

2.9.2. Technique (Cuzon *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2007)

- Préparer une suspension d'*E.coli* ATCC 25922 de 10^8 UFC/ml ;
- Ensemencer par écouvillonnage une gélose Mac Conkey ;
- Faire une lourde strie de la souche à tester à partir d'un prélèvement de quelques colonies d'une culture sur milieu Mueller Hinton gélosé du centre de la boîte vers la périphérie ;
- Sécher les boîtes 15 mn ;
- Déposer un disque d'imipénème au centre (à l'extrémité de la strie) ;
- Incuber 18 H à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.9.3. Lecture

L'hydrolyse de l'imipénème par la souche à tester se traduit par l'échancrure de la zone d'inhibition de la souche d'*E.coli* ATCC 25922 (**figure 15**).

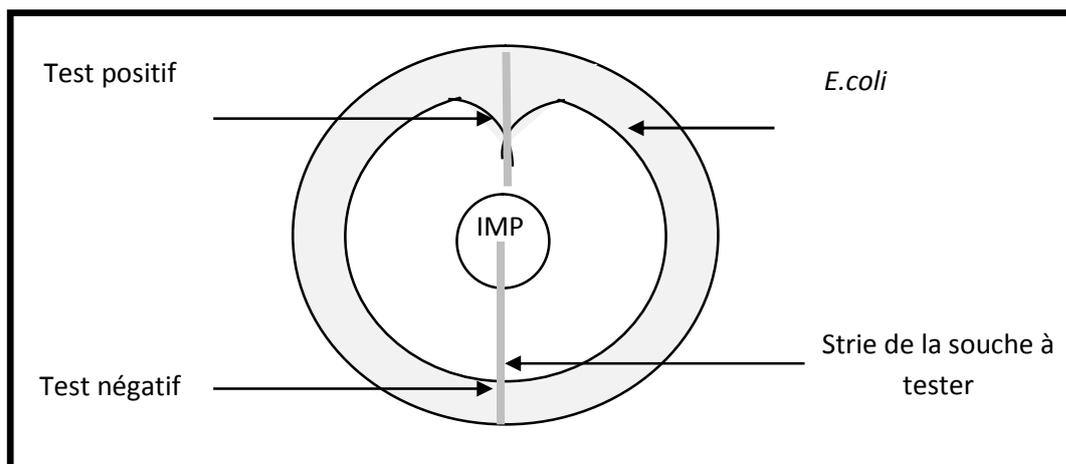


Figure 15. Lecture du test de Hodge (Anderson *et al.*, 2007).

2.10. Test de l'EDTA

2.10.1. Principe

La recherche de la métallo- β -lactamases a été effectuée sur les souches en mettant à profit la faculté de l'éthylène diamintetraacetic acid (EDTA), chélateur bivalent à restaurer l'activité de l'imipénème en chélatant les ions Zn^{2+} indispensables à l'activité de la métallo- β -lactamases en la rendant inactive. Il permet de différencier entre les métallo- β -lactamases et les autres carbapénèmases de classe A ou D.

2.10.2. Technique de DDST (Double-disc synergy tests) (Aggoune-Khinache *et al.*, 2009; Galani *et al.*, 2008)

- Préparer des suspensions de la souche à tester à une densité équivalente à 0.5 Mc Farland et inoculer une boîte de Mueller Hinton ;
- Placer un disque d'imipénème (10 μ g) ou un disque de ceftazidime (30 μ g) et un disque blanc de papier filtre à distance de 10, 15 et 20 mm (centre à centre) ;
- Ajouter 10 μ l de solution d'EDTA 0.5 M au disque blanc ;
- Incuber 18 H à $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.10.3. Lecture

Après l'incubation, la présence d'une zone d'inhibition synergétique est interprétée positive.

2.10.4. Technique de CDT (The combination disc test) (Aggoune-Khinache *et al.*, 2009; Galani *et al.*, 2008)

- Placer 2 disques d'imipénème (10 μ g) et 2 disques de ceftazidime (30 μ g) sur une boîte de Mueller Hinton inoculée par la souche à tester (0.5 Mc Farland) ;
- Ajouter 4 μ l de solution d'EDTA (0.5 M) à un disque de chaque antibiotique.

2.10.5. Lecture

Après une incubation pendant 18 H à $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, un résultat est interprété positivement si on constate une différence de plus 7 mm de diamètre des zones d'inhibition entre les disques d'imipénème / imipénème + l'EDTA ou de ceftazidime / ceftazidime + l'EDTA.

2.11. Etude des plasmides extraits des souches et leurs transconjugants

2.11.1. Extraction de Kieser

2.11.1.1. Principe

Les bactéries obtenues par culture sur milieu solide sont mises en suspension dans le tampon de Kieser puis lysées par ajout de solution de lyse. Après incubation, les protéines sont précipitées par l'ajout du phénol-chloroforme saturé en eau. Après une centrifugation, la phase supérieure est prélevée puis déposée dans un gel d'agarose afin de visualiser l'ADN plasmidique.

2.11.1.2. Technique (Kieser, 1984)

- Encemencer les souches la veille de l'extraction et la souche témoin *Escherichia coli* 50192 ;
- Préparer des tubes avec 500µl de réactif de Kieser : sucrose 300 mM, Tris 25 Mm pH 8, EDTA 25 Mm pH 8, vert de bromocrésol 0.02% (p/v) ;
- Racler les colonies à l'aide d'une oëse puis les ajouter aux tubes des réactifs de Kieser ;
- Bien écraser les colonies et mélanger de façon à obtenir une suspension homogène ;
- Ajouter 250µl de solution de lyse préparée extemporanément (SDS 2% p/v, NaOH 200 mM), mélanger par retournement ;
- Incuber 30min au bain marie 55°C ;
- Laisser refroidir 5min sur paillasse ;
- Ajouter 250µl de phénol-chloroforme acide, mélanger par retournements ;
- Centrifuger 15min à 4°C à 12000 rpm ;
- Recueillir le surnageant (maximum 300µl) dans un tube propre.

2.11.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

2.11.2.1. Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose est la méthode de choix pour la séparation, la purification et l'identification des fragments d'ADN et d'ARN. Sous l'influence d'un courant électrique, les acides nucléiques chargés négativement se déplacent à travers le gel d'agarose vers la borne positive (l'anode). Les molécules seront séparées dans le gel dû au fait qu'elles ne migrent pas toutes à la même vitesse.

2.11.2.2. Technique (Sambrook et Russel, 2001)

Préparation du gel d'agarose

- Pour un gel de 0,8%, dissoudre par chauffage jusqu'à ébullition, 1,6 g d'agarose (Sigma) dans 200 ml de tampon TBE 1 X ;
- Refroidir la solution à 55°C dans un bain marie, puis couler le gel dans un moule dont les 2 extrémités ont été préalablement fermées par du ruban adhésif ;
- Déposer un peigne dans le gel afin de réaliser des puits ;
- Laisser solidifier ;
- Retirer le peigne du gel et le ruban adhésif du moule ;
- Placer le moule avec le gel dans la cuve d'électrophorèse ;
- Ajouter un volume de tampon TBE 1X dans la cuve préalablement remplie jusqu'à ce que le gel soit immergé (environ 1 mm au dessus).

Ensemencement

- Répartir dans des tubes Eppendorf 40 µl de chaque solution d'ADN ;
- Ajouter 10 µl de tampon de charge ;
- Mélanger à l'aide d'une micropipette puis transférer les 25 µl des mélanges dans les puits du gel.

Migration

- Brancher le générateur après avoir raccordé la cuve ;
- Appliquer un voltage de 90 volts pendant 4 H.

Révélation

- Colorer le gel en l'immergeant dans une solution de TBE 1X contenant du BET à une concentration de 0.5 µg/ml pendant 30 à 45 mn à température ambiante ;
- Placer le gel dans un transilluminateur.

2.11.3. Transfert des plasmides par conjugaison

2.11.3.1. Principe

La conjugaison représente le phénomène de contact physique par lequel les plasmides peuvent passer d'une cellule donatrice à une autre réceptrice (K 12). La sélection des transconjugants s'effectue en présence de 2 antibiotiques: l'un correspond à l'une des résistances transférées, l'autre à la résistance non transférable de la souche réceptrice.

2.11.3.2. Technique (Touati, 2006)

- Ensemencer la souche réceptrice la K12 et les souches donatrices en bouillon BHIB et incubé 18 à 24 H à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Réaliser un mélange donatrice réceptrice dans un rapport 1 : 10 ;
- Mélanger par inversion ;
- Incuber 18 à 24 H à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Ensemencer par strie le mélange sur un milieu de sélection ;
- Vérifier la sélectivité des milieux de sélection en ensemençant la souche donatrice et la souche réceptrice sur la même boîte ;
- Incuber 24 H à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.11.3.3. Préparation de boîtes de sélection

La sélection a été faite sur Mac Conkey (18 ml) additionné de 1 ml de céfotaxime et 1 ml de rifampicine à des concentrations finales de 16 $\mu\text{g/ml}$ et de 256 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

2.11.3.4. Lecture

Analyser les transconjugants en réalisant des antibiogrammes et/ou des CMI.

2.11.4. Électroporation

2.11.4.1. Principe

Les transformations des bactéries DH 10B, par des vecteurs navettes, ont été réalisées par électroporation. Au préalable, les cellules sont rendues compétentes après leur culture dans du milieu LB. L'application de champ électrique de forte intensité à une culture bactérienne, déstabilise les membranes cellulaires et permet la pénétration d'ADN exogène dans les cellules.

2.11.4.2. Technique

- L'électroporation se fait dans des cuves BioRad en mettant en présence un aliquot de bactéries électrocompétentes (souche de référence DH 10 B) et 1µl de l'ADN plasmidique à transformer ;
- Le choc électrique est produit par un appareil BioRad Gene Pulser II configuré pour les valeurs suivantes : 2500V/25µF/200Ω pendant une durée de 4,6 s ;
- Les cellules sont reprise dans 1ml de soc medium ;
- Incuber 1H à 37°C dans la roue ;
- Etaler les cellules sur des boîtes de sélection ;
- La sélection a été faite sur Mueller Hinton (18 ml) additionné de la ticarcilline, la céfoxitine et le ceftazidime à des concentrations finales de 100µg/ml, de 10µg/ml et de 1µg/ml respectivement.

2.12. Etude de l'ADN par PCR

2.12.1. Extraction et purification de l'ADN génomique

L'ADN est extrait selon les 2 méthodes suivantes :

2.12.1.1. Choc thermique (Perez-Hernandez *et al.*, 2002)

- Mélanger 100µl de l'eau distillé avec une colonie ;
- Incuber au bain marie à 100°C pendant 10min ;
- Mettre au congélateur à -90°C pendant 10min ;
- Re-incuber au bain marie à 100°C pendant 5min ;
- Centrifuger le mélange 5min à 12000rpm ;
- Récupérer le surnageant dans un nouveau eppendorf.

2.12.1.2. QIA-amp DNA mini kit

- Lancer les souches dans des bouillons la veille de l'extraction ;
- Centrifuger 1.5 ml de bouillon pendant 10 min à 5000 g (7500 rpm) ;
- Jeter le surnageant et suspendre le culot dans 180µl de tampon ATL (fourni dans le Kit QIAamp DNA Mini) en agitant vigoureusement ;
- Ajouter 20 µl de Protéinase K, mélanger en vortexant puis incuber à 56°C jusqu'à ce que tous le tissu soit entièrement lysé. Vortexer de temps à autre pendant l'incubation

afin de dissoudre les agrégats dans l'échantillon. Centrifuger brièvement le tube de 1,5 ml pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon ;

- Ajouter 4 µl RNase A (100 mg/ml), vortexer pendant 15 s et incubé pendant 2min à température ambiante. Centrifuger brièvement le tube de 1.5 ml pour récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon ;
- Ajouter 200 µl de tampon AL à l'échantillon, mélanger 15 s en vortexant puis incubé 10 min à 70°C. Centrifuger brièvement le tube de 1.5 ml pour récupérer les accumulées dans le capuchon ;
- Ajouter 200 µl d'éthanol (96 à 100%) à l'échantillon et mélanger 15 s en vortexant. Après homogénéisation, centrifuger brièvement le tube de 1.5 ml afin de récupérer les gouttelettes accumulées dans le capuchon ;
- Déposer le mélange obtenu (y compris le précipité) dans la colonne QIAamp (placée dans le tube collecteur de 2 ml) sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger 1 min à 6000 g (8000 rpm). Transférer la colonne QIAamp dans un tube collecteur de 2 ml (fourni) et jeter le tube contenant l'effluent ;
- Ouvrir la colonne QIAamp avec précaution et déposer 500 µl de tampon AW1. Fermer le capuchon et centrifuger 1 min à 6000 g (8000 rpm). Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2ml (fourni) et jeter le tube contenant l'effluent ;
- Ouvrir la colonne QIAamp et ajouter 500 µl de tampon AW2 sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger 3 min à vitesse maximale (20000 g : 14000 rpm) ;
- Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2 ml (non fourni), et jeter l'ancien tube collecteur contenant l'effluent. Centrifuger 1min à (20000 g : 14000 rpm) ;
- Transférer la colonne QIAamp dans un tube propre de 1.5ml (non fourni). Jeter l'ancien tube collecteur contenant l'effluent. Ouvrir délicatement la colonne QIAamp et déposer 200 µl de tampon AE ou d'eau distillée. Incuber 1 min à température ambiante et centrifuger ensuite 1 min à 6000 g (8000 rpm) ;
- Répéter la dernière étape et récupérer l'éluat ;

- Pour une conservation de l'ADN de longue durée, il est recommandé de l'éluer dans du tampon AE et de le conserver à -20°C.

2.12.2. Amplification de l'ADN par PCR

Le mélange réactionnel (50 µL) se compose de 1 µl de dNTP (10 mM), de 5 µl de tampon 10X (MgCl₂ 20mM), de 0.25 µl de Taq (5µg/µl), de 37 µl de l'eau, de 2.5 µl de chaque amorce (10 µM) (**annexe 7**) et de 2 µl d'ADN. Les réactions d'amplification sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur : Applied Biosystems Gene Amp, PCR système 2700. Les différentes étapes sont reprises ci-dessous pendant 35 cycles :

- 95°C pendant 10 min
- 95°C pendant 45 s
- 53°C pendant 45 s
- 72°C pendant 1 min
- 72°C pendant 10 min

Après leur séparation sur gel, les extrais positives sont purifiés à l'aide du kit proposé par la marque Quiagen : QIAquick Gel Purification Kit.

2.13. Séquençage de l'ADN

Les ADN polymérases sont capables de synthétiser un brin complémentaire d'ADN, à partir d'un brin matrice. Pour le séquençage des nucléotides légèrement différents sont utilisés: les didésoxyribonucléotides (**ddNTP**) au lieu des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP). Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. Ainsi lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.

Le séquençage d'ADN est réalisé par plateforme technique « séquençage, analyse de fragments » de l'IFR 133, à l'aide de l'appareil 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Les réactions de séquençage sont effectuées par la méthode des didéoxynucléotides de Sanger (**Sanger et al., 1977**) à l'aide du kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Les séquences d'alignement des nucléotides sont analysées sur le site web du centre national de biotechnologie (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.14. Typage des souches par électrophorèse en champ pulsé (ECP)

2.14.1. Principe

Ce type d'électrophorèse a été développé par **Schwartz et Cantor** en **1984** afin de séparer les grandes molécules d'ADN (> 50 kb) que l'électrophorèse classique en gel d'agarose ne permet pas de résoudre, même en diminuant au maximum la concentration d'agarose (en dessous de 0.4% les gels sont impossibles à manipuler).

La porosité d'un gel d'agarose classique est inférieure au micron alors que la longueur d'une molécule d'ADN de 50 kb complètement étirée est d'environ 18 microns. La vitesse de migration des molécules d'ADN dont la taille est supérieure à 20 kb n'est plus affectée par l'effet de filtration, elle est constante quelle que soit la taille de la molécule.

Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel augmentant ainsi la probabilité que la molécule d'ADN soit orientée de façon à passer à travers les mailles du gel. Cette probabilité dépend de la taille de la molécule et la vitesse de migration d'un fragment d'ADN dans le gel varie dans le sens inverse de sa taille. L'électrophorèse en champ pulsé permet ainsi de séparer des fragments d'ADN d'une taille allant de moins de 1 kb à une dizaine de méga-bases. Pour ce type d'électrophorèse, il n'est pas possible d'utiliser des ADN purifiés par les techniques classiques car ces techniques les cassent en fragments d'une taille inférieure à 100 kb. Pour éviter la cassure mécanique des molécules d'ADN les cellules sont incluses dans des blocs d'agarose (plugs).

Différentes techniques de champ pulsé ont été développées : OFAGE, CHEF, FIGE, TAFE, etc. Les conditions d'électrophorèse dépendent de la zone de taille à résoudre.

Le marqueur de tailles que nous utilisons le plus fréquemment, servant de référence pour la taille des fragments, est l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.13.2. Technique (Colak *et al.*, 2002)

- Culture en bouillon d'une colonie dans 10 ml pendant 24 H ;
- Dilution au 1/10 dans un bouillon neuf, culture 2-3 H sur la roue jusqu'à une DO 600 nm=0.8-1 ;
- Centrifuger 1,8 ml de cette culture à 10000 rpm/min pendant 5 min. Idéalement 5.10^8 bactérie/ml ;
- Laver le culot dans 750 µl d'eau stérile (500-1000 selon le culot) ;
- Recentrifuger et éliminer le surnageant ;
- Pendant ce temps, faire fondre l'agarose LMP 2% en eau stérile 20 ml et équilibrer à 50°C. Stocker l'excès à 40°C ;
- Reprendre le culot dans 200 µl de Tampon de suspension (EDTA-Tris-NaCl) ;
- Ajouter 200 µl (vol/vol) d'agarose LMP, bien resuspendre et déposer dans des puits;
- Placer 30 min à 4°C ;
- Préparer 10 ml de tampon de lyse + 200 µl de lysozyme 50 mg/ml (concentration finale de lysozyme : 1 mg/ml) ;
- Pousser les plugs dans un tube de 2 ml contenant 1 ml de Tampon de lyse et incubé 2 H à 37°C ;
- Bien aspirer la solution en inclinant le tube pour ne pas abîmer les plugs ;
- Ajouter la solution de Protéinase K et incubé pendant 24 H à 56°C (plusieurs bactéries ont été incubées ainsi jusqu'à 4 jours sans problème) ;
- Retirer le surnageant et laver les plugs 4 fois avec 1 ml de solution de lavage pendant 30 min. On peut laisser les plugs overnight dans le dernier lavage ;
- Tapoter les plugs sur du parafilm pour les faire tomber, couper ces derniers sur 3 ;
- Mettre le 1/3 de plug dans de tampon de lavage dilué au 1/10, incubé 30 min à température ambiante, conserver les 2/3 de plugs dans de tampon de lavage à 4°C ;
- Remplacer le tampon de lavage par 300 µl du tampon de restriction. Incuber 30 min à température ambiante en agitant de temps en temps ;
- Aspirer le tampon et remplacer par 100 µl de tampon + enzyme de restriction (XbaI) à raison de 40 UI/100 µl de plugs. Incuber 24 h à la température optimale : 37°C pour XbaI ;

- Retirer tampon et incuber 30 min avec 1 ml de tampon de lavage ;
- Préparer TBE 0.5X à partir du TBE 10X ;
- Faire fondre l'Agarose Pulse Field 1% en TBE 0.5X et équilibré à 50°C ;
- Monter le support de gel et déposer les plugs sur le peigne, aspirer tous le liquide pour qu'ils s'adhèrent bien aux dents (ne pas oublier le ladder) ;
- Couler le gel avec la peigne en place ;
- Retirer le peigne et remplacer les puits avec de l'agarose fondu (gardé à 50°C) ;
- Allumer les interrupteur de l'appareil à champ pulsé en commençant par les deux de gauche, pompe allumée en dernier ;
- Faire un cycle avec 2 l d'eau stérile ;
- Programmer 14°C bien avant de descendre avec le gel : Set temps 14°C. Il faut environ 1 min pour que le support de refroidissement se mette en marche. Vérifier que la pompe fonctionne toujours ;
- Vider la cuve dans l'évier et remplacer par 1.9 l de TBE 0.5X pour qu'il s'équilibre à 14°C ;
- Immerger le gel dans la cuve d'électrophorèse ;
- Programmer la migration selon les conditions suivantes :
 - ✓ Temps de pulse initial 2 s
 - ✓ Temps de pulse final 32 s
 - ✓ Temps de migration 24 H
 - ✓ 6 Volt/cm
 - ✓ Température 14°C
- Arrêter l'appareil à champ pulsé, sortir le gel et le déposer dans un bac contenant une solution de TBE 1X contenant du BET à une concentration finale de 0.01 µg/ml. Colorer le gel pendant 30 min ;
- Pour observer les fragments d'acides nucléiques, utiliser les UV $\lambda = 254$.

Résultats

1. Prélèvements

Durant la période d'étude allant de septembre 2009 à mai 2012, 1196 prélèvements (patients et environnement) ont été effectués à partir de différents services de trois grands hôpitaux de l'ouest algérien (**tableau 11; figure 16**) :

-  A : Centre hospitalier universitaire de Tlemcen: Tidjani Damerdji ;
-  B : Centre hospitalier universitaire de Sidi Bel Abbes: Hassani Abdelkader ;
-  C : Centre hospitalier universitaire d'Oran: Ben Zerjeb.



Figure 16. Carte de l'ouest algérien (<https://www.google.fr/maps>)

Tableau 11. Répartition des prélèvements selon les hôpitaux et la période de prélèvement

Hôpital	Tlemcen	Sidi Bel Abbes	Oran	Total
Année				
2009/2010	282	243	46	571
2010/2011	173	71	188	432
2011/2012	65	74	54	193
Total	520	388	288	1196

2. Souches identifiées

Au cours de la période d'étude, 158 souches d'*Enterobacter cloacae* ont été identifiées, à partir de 1196 prélèvements, avec une fréquence d'isolement de 13.2% (158/1196). 54 souches à partir de 388 prélèvements à l'hôpital de Sidi Bel Abbes, 53 à partir de 288 prélèvements à Oran et 51 à partir de 520 prélèvements à Tlemcen (figure 17).

La figure 18 et le tableau 12 montrent la fréquence d'isolement d'*E.cloacae* par année et par hôpital sur l'ensemble des prélèvements effectués. Cette espèce est donc plus isolée en particulier à l'hôpital d'Oran et aussi durant la période 2010/2011 soit 18.4% et 16.7% respectivement.

Sur le total des souches, 117 ont été isolées à partir de patients et 41 souches à partir de l'environnement hospitalier soit des fréquences d'isolement de 12.3% (117/952) et 16.8% (41/244) respectivement (tableau 13).

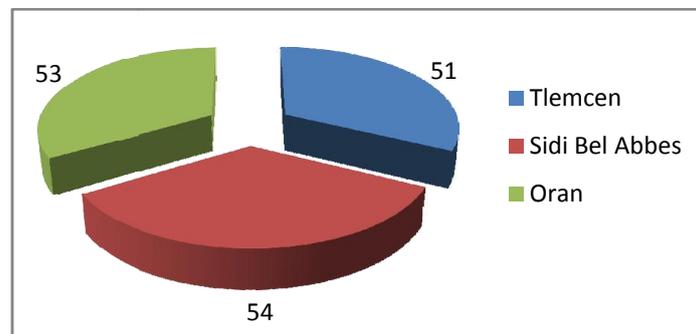


Figure 17. Répartition selon les hôpitaux

Tableau 12. Fréquence d'isolement des souches d'*E.cloacae*

CHU \ Année	Tlemcen	Sidi Bel Abbes	Oran	Total
2009/2010	21/282 (7.4%)	26/243 (10.7%)	11/46 (23.9%)	58/571 (10.1%)
2010/2011	27/173 (15.6%)	20/71 (28.2%)	25/188 (13.3%)	72/432 (16.7%)
2011/2012	3/65 (4.6%)	8/74 (10.8%)	17/54 (31.5%)	28/193 (14.5%)
Total	51/520 (9.8%)	54/388 (13.9%)	53/288 (18.4%)	158/1196 (13.2%)

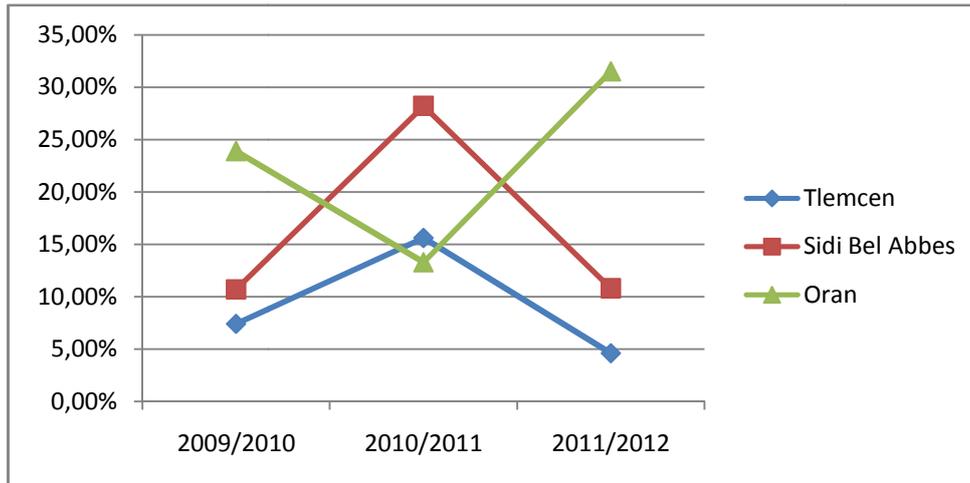


Figure 18. Fréquence d'isolement en fonction des années et des hôpitaux

Tableau 13. Répartition selon l'hôpital et la source de prélèvement

Prélèvement	Environnement	Patients	Total
Hôpital			
Tlemcen	15	36	51
Sidi Bel Abbès	16	38	54
Oran	10	43	53
Total	41	117	158

L'identification par galerie API 20E (figure 19) a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques liés à l'espèce *E.cloacae*.



Figure 19. Résultat d'identification par galerie API 20E

3. Répartition selon les unités fonctionnelles et les prélèvements

3.1. A l'hôpital de Tlemcen

70.6% de souches d'*E.cloacae* ont été isolées uniquement au niveau du service de réanimation. Les autres services hospitaliers dont la chirurgie, la maternité, la traumatologie, la neurochirurgie et la neonatologie sont moins représentés (**figure 20**).

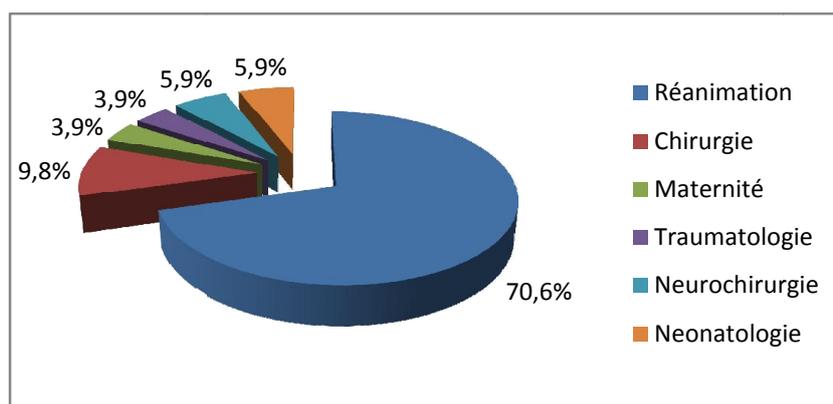


Figure 20. Répartition selon les services

Concernant l'origine des prélèvements, l'environnement et les sondes urinaires sont beaucoup plus colonisés par cette espèce avec un taux identique de 29.4% suivi par les sondes trachéales avec 25.5% (**figure 21**).

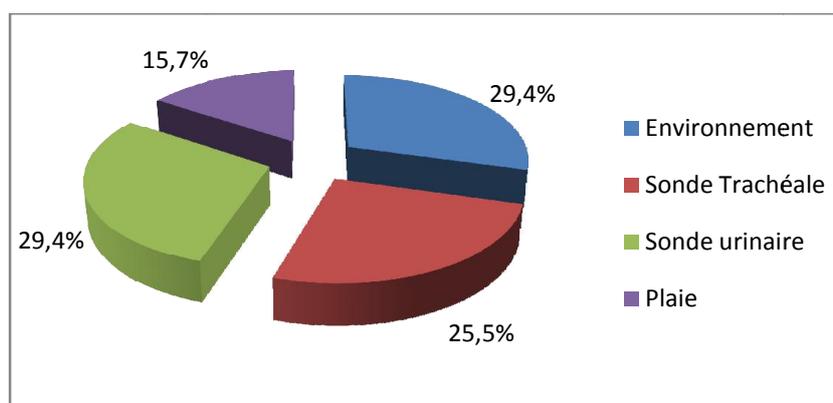


Figure 21. Répartition selon la source de prélèvement

3.2. A l'hôpital de Sidi Bel Abbas

Le service de réanimation enregistre le taux le plus important de souches d'*E.cloacae* avec 35.2%, suivi du service de chirurgie avec 27.8% (**figure 22**).

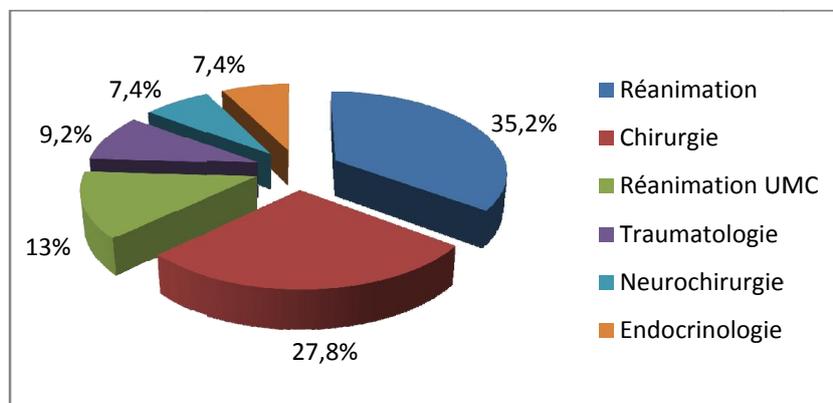


Figure 22. Répartition selon les services

Dans les différents sites de prélèvements, la majorité des souches ont été isolées à partir des plaies post-opératoires et de l'environnement, soit 37% et 29.6% respectivement (**figure 23**).

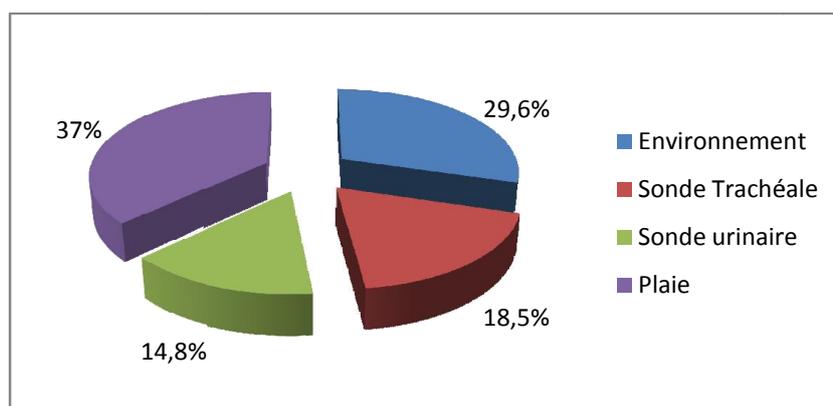


Figure 23. Répartition selon la source de prélèvement

3.3. A l'hôpital d'Oran

Les trois services de réanimation médicale, UMC et infantile représentent les principaux services d'isolement de souches avec 35.8%, 18.9% et 17% respectivement (figure 24).

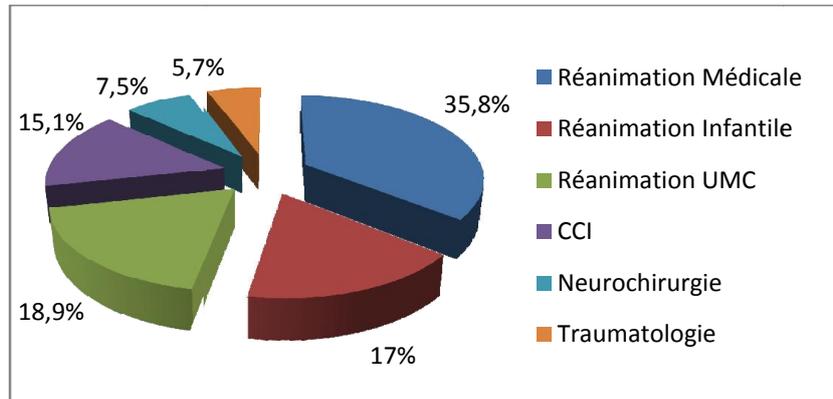


Figure 24. Répartition selon les services

Les souches d'*E. cloacae* prédominent aussi, dans les prélèvements de sondes trachéales (39.6%) suivi de l'environnement (22.6%) et les sondes urinaire (20.7%). En revanche, la plus basse distribution est enregistrée pour les plaies (17%) (figure 25).

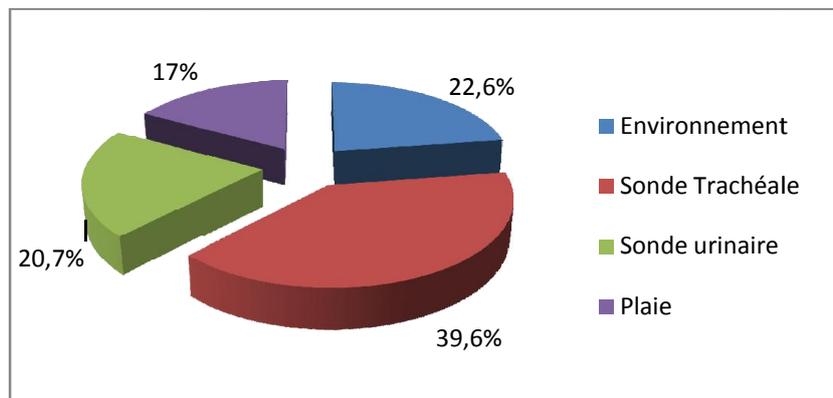
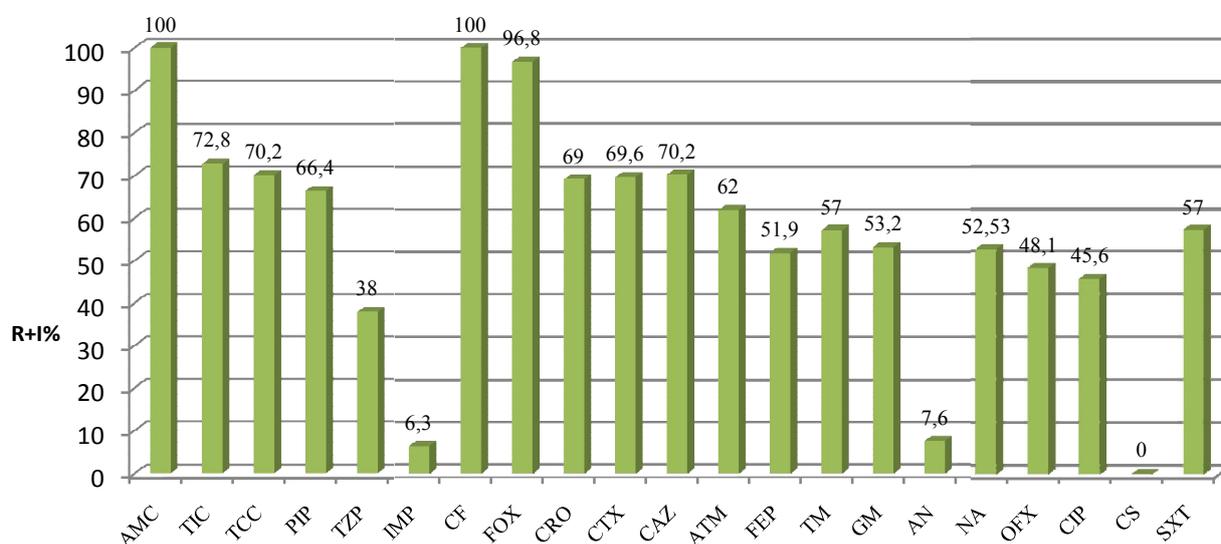


Figure 25. Répartition selon la source de prélèvement

4. Résistance aux antibiotiques

Sur la totalité des souches étudiées, les taux de résistance aux β -lactamines étaient les suivants : amoxicilline/acide clavulanique (100%), ticarcilline (72.8%), ticarcilline/acide clavulanique (70.2%), piperacilline (66.4%), piperacilline/tazobactam (38%), céfalotine (100%), céfoxitine (96.8%), céftriaxone (69%) céfotaxime (69.6%), ceftazidime (70.2%), aztreonam (62%) et céfépime (51.9%). Pour les aminosides, le taux de résistance le plus important a été observé pour la tobramycine (57%) suivi de la gentamicine (53.2%). En ce qui concerne les quinolones, les taux étaient de 52.5% pour l'acide nalidixique, 48.1% pour l'ofloxacine et 45.6% pour la ciprofloxacine. Pour les sulfamides, un taux moyen de résistance a été observé vis-à-vis du triméthoprime/sulfaméthoxazole (57%).

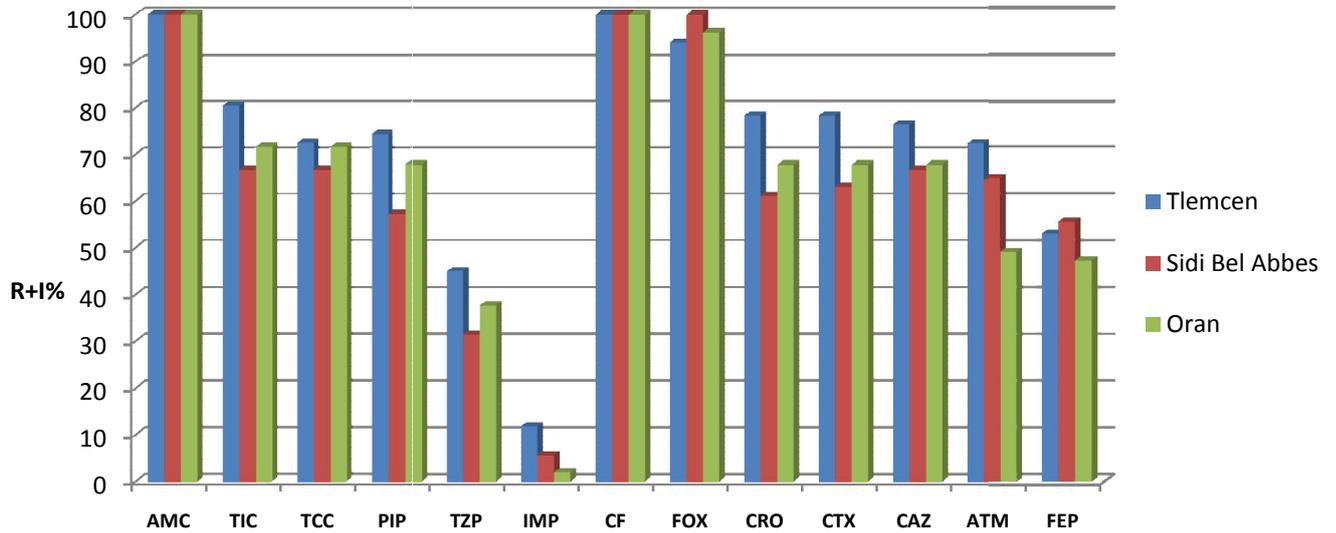
Enfin, les souches d'*E.coliace* présentent une faible résistance aux antibiotiques amikacine (7.6%) et imipénème (6.3%). Une sensibilité totale a été constatée vis-à-vis la colistine, pouvant être des alternatives thérapeutiques (**figure 26**).



Résistant (R), Intermédiaire (I), Amoxicilline/acide clavulanique (AMC), Ticarcilline (TIC), Ticarcilline/acide clavulanique (TCC), Piperacilline (PIP), Piperacilline/tazobactam (TZP), Imipénème (IMP), Céfalotine (CF), Céfoxitine (FOX), Céfotaxime (CTX), Ceftriaxone (CRO), Ceftazidime (CAZ), Aztréonam (ATM), Céfépime (FEP), Tobramycine (TM), Amikacine (AN), Gentamicine (GN), Acide nalidixique (NA), Ofloxacine (OFX), Ciprofloxacine (CIP), Colistine (CS), Triméthoprime/Sulfaméthoxazole (SXT).

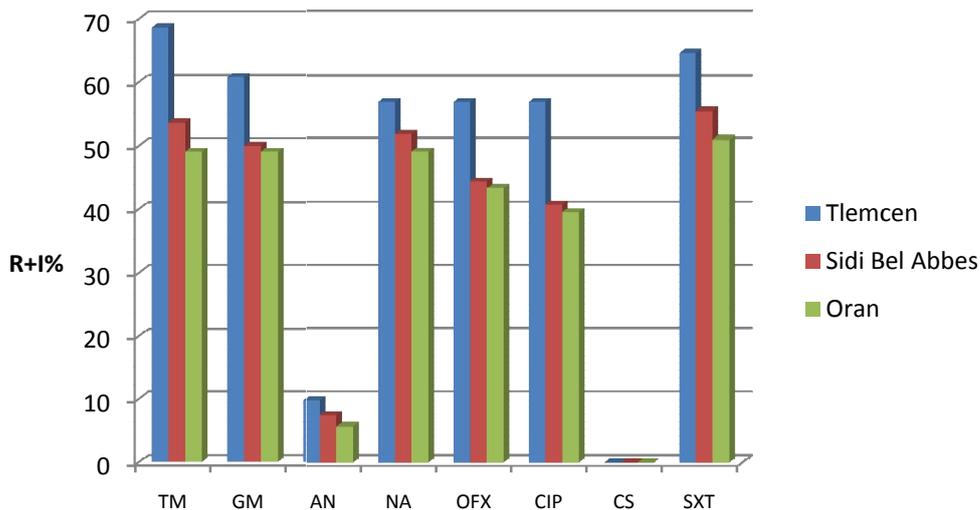
Figure 26. Taux de résistance aux antibiotiques

En fonction des 3 hôpitaux, le taux de résistance des souches est plus élevé à l'hôpital de Tlemcen par rapport aux autres hôpitaux (Oran et Sidi Bel Abbes) pour la majorité des antibiotiques testés (figure 27 et 28).



Résistant (R), Intermédiaire (I), Amoxicilline/acide clavulanique (AMC), Ticarcilline (TIC), Ticarcilline/acide clavulanique (TCC), Pipéracilline (PIP), Pipéracilline/tazobactam (TZP), Imipénème (IMP), Céfalotine (CF), Céfoxitine (FOX), Céfotaxime (CTX), Ceftriaxone (CRO), Ceftazidime (CAZ), Aztréonam (ATM), Céfépime (FEP).

Figure 27. Taux de résistance aux β-lactamines au niveau des 3 hôpitaux



Résistant (R), Intermédiaire (I), Tobramycine (TM), Amikacine (AN), Gentamicine (GN), Acide nalidixique (NA), Ofloxacine (OFX), Ciprofloxacine (CIP), Colistine (CS), Triméthoprim/Sulfaméthoxazole (SXT).

Figure 28. Taux de résistance aux autres antibiotiques au niveau des 3 hôpitaux

5. Phénotypes de résistance

Le comportement des *E.cloacae* vis-à-vis des β -lactamines nous a permis de les classer en fonction de leur phénotype de résistance (figure 29, 30 et tableau 14). L'expression phénotypique habituelle de cette espèce *E.cloacae* est individualisée au sein du groupe 3 des entérobactéries, soit productrice d'une céphalosporinase chromosomique inductible ou AmpC (souche sauvage).

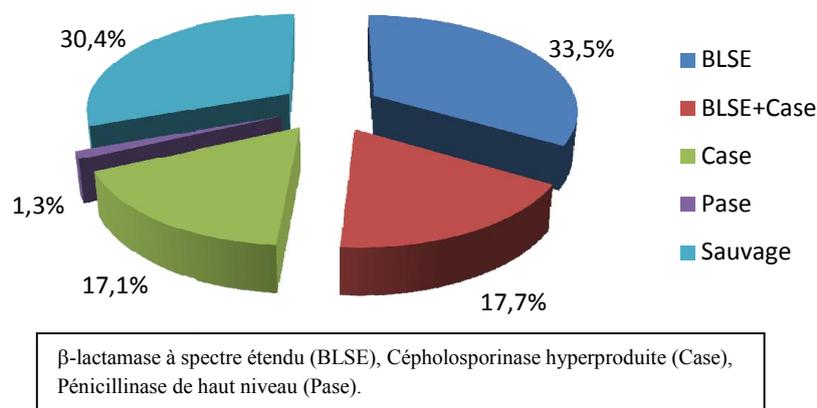


Figure 29. Phénotypes de résistance aux β -lactamines

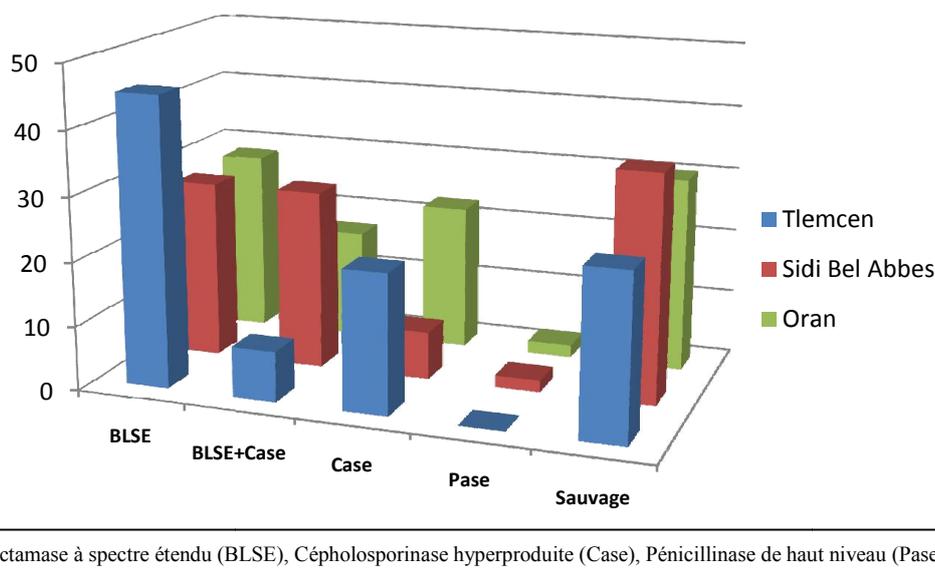


Figure 30. Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines selon les hôpitaux

Tableau 14. Intervalles de CMI ($\mu\text{g/ml}$) observés en fonction des phénotypes de résistance aux β -lactamines

Hôpital	Phénotype	Antibiotique en poudre							
		PIP	TZP	IMP	FOX	CTX	CAZ	ATM	FEP
		$\leq 8 \rightarrow 16$	$\leq 8 \rightarrow 16$	$\leq 2 \rightarrow 8$	$\leq 8 \rightarrow 32$	$\leq 1 \rightarrow 2$	$\leq 1 \rightarrow 8$	$\leq 1 \rightarrow 8$	$\leq 1 \rightarrow 8$
Tlemcen	BLSE	256->512	8-32	0.25-4	128->512	32->512	4-512	8-256	64->512
	BLSE+Case	256-512	16-64	0.125-0.5	32-512	64-128	4-16	8->512	32->512
	Case	128->512	8-256	1-2	256->512	32-512	<0.5->512	<0.5-256	1-512
Sidi Bel Abbes	BLSE	512->512	8-16	0.5-2	64-512	64-512	64-256	32-256	2->512
	BLSE+Case	512->512	16	0.5-4	16-512	64->512	16->512	2->512	2->512
	Case	2-4	1	0.5-1	512->512	16->512	2-8	2-8	<0.5-1
Oran	BLSE	256->512	8-32	0.5-1	64-512	>512	2->512	32->512	<0.5->512
	BLSE+Case	512->512	16-32	<0.5-1	32-512	1->512	<0.5->512	<0.5->512	<0.5->512
	Case	2-32	1-8	<0.5-0.5	512->512	1-128	<0.5-32	<0.5-32	< 0.5

β -lactamase à spectre étendu (BLSE), Céphalosporinase hyperproduite (Case)
 Pipéracilline (PIP), Pipéracilline/tazobactam (TZP), Imipénème (IMP), Céfoxitine (FOX), Céfotaxime (CTX), Ceftazidime (CAZ), Aztréonam (ATM), Céfépime (FEP).

L'analyse phénotypique des souches est en faveur d'une production de β -lactamase à spectre étendu (BLSE) soit (51.3%), dont 28 souches (17.7%) produisent également une céphalosporinase de haut niveau associée. Ce phénotype est exprimé plus à l'hôpital de Sidi Bel Abbes soit 55.5%, suivie de 52.9% à l'hôpital de Tlemcen et 45.3% à l'hôpital d'Oran. La présence de phénotype BLSE a été confirmée par des images de synergie caractéristiques entre l'acide clavulanique et les céphalosporines de 3^{eme} génération et/ou l'aztréonam (**figure 31**).

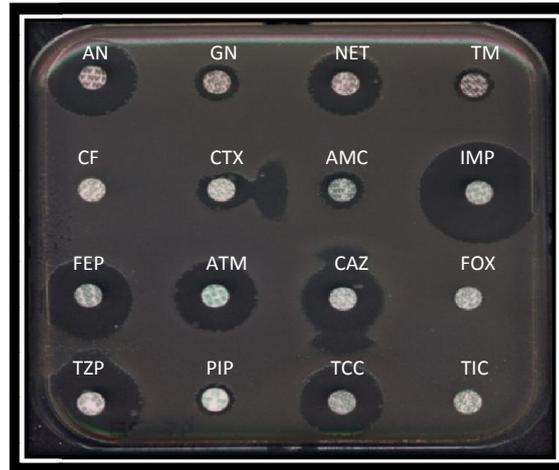
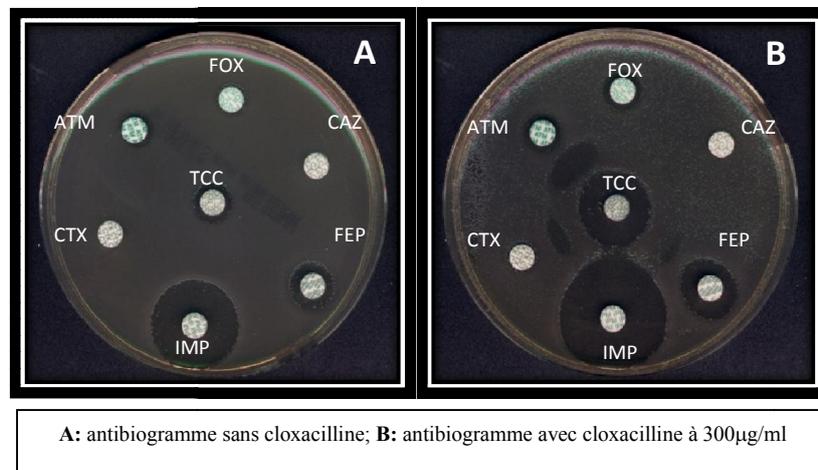


Figure 31. Phénotype BLSE

Dans certains cas, la forte résistance aux β -lactamines, due à l'hyperproduction de céphalosporinase, masque les images de synergie indicatrices de phénotype BLSE. Un antibiogramme en présence d'une concentration définie de cloxacilline est nécessaire pour vérifier l'association des 2 mécanismes (BLSE avec céphalosporinase hyperproduite) (**figure 32**).



A: antibiogramme sans cloxacilline; B: antibiogramme avec cloxacilline à 300 μ g/ml

Figure 32. Phénotype BLSE+ céphalosporinase hyperproduite

Le phénotype « céphalosporinase hyperproduite » seul est détecté chez 27 souches soit 17.1%. L'absence des images de synergie et la restauration de l'activité des céphalosporines de 3^{ème} génération, en présence de cloxacilline, est en faveur de ce phénotype (hyperproduction de céphalosporinase seule) (**figure 33**).

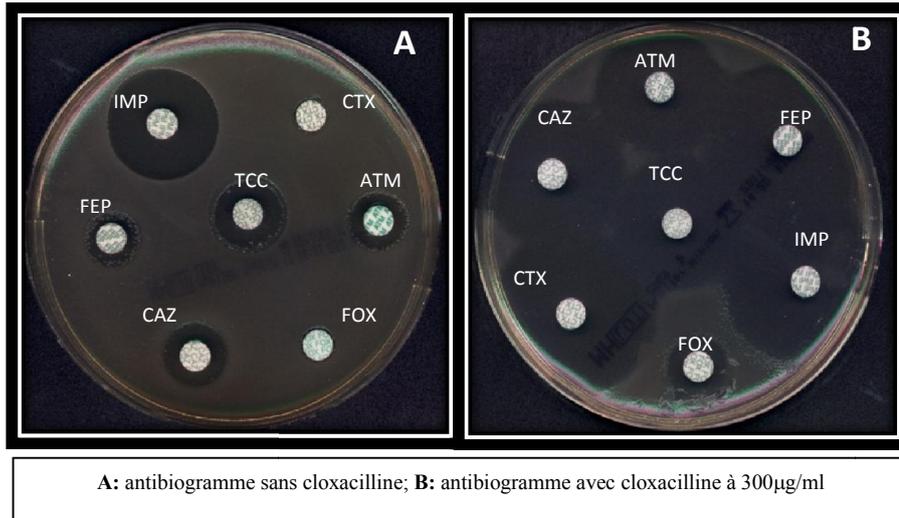


Figure 33. Phénotype céphalosporinase hyperproduite

La production de pénicillinase a été trouvée chez 2 souches (1.3%), observée uniquement aux hôpitaux de Sidi Bel Abbès et d'Oran.

Le reste des souches (30.4%) ont présenté le phénotype sauvage avec un pourcentage plus élevé à l'hôpital de Sidi Bel Abbès (35.2%) (**figure 34**).

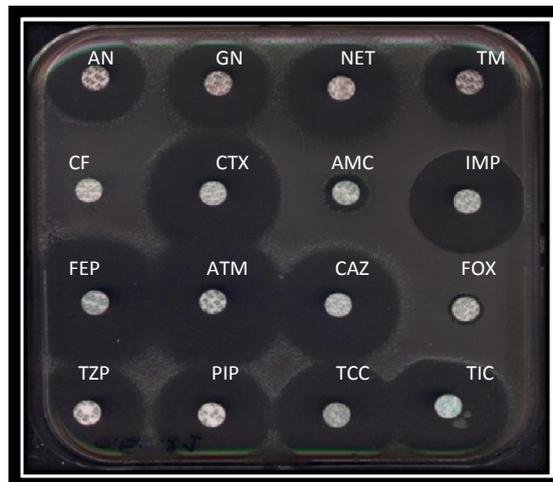


Figure 34. Phénotype sauvage

Dans cette étude, certaines souches ont présenté une résistance intermédiaire avec des valeurs de CMI de 4 µg/ml vis-à-vis de l'imipénème. Pour cela des tests de Hodge et de l'EDTA ont été réalisés afin de détecter d'éventuelle production de carbapénèmases. Le test de Hodge, bien que facile à réaliser, ne préjuge en rien de l'identification de la β-lactamase en cause. En outre, le test est parfois difficile à interpréter (Cuzon *et al.*, 2010). Alors que pour le test de l'EDTA, aucune image de synergie n'a été détectée (figure 35, 36 et 37).

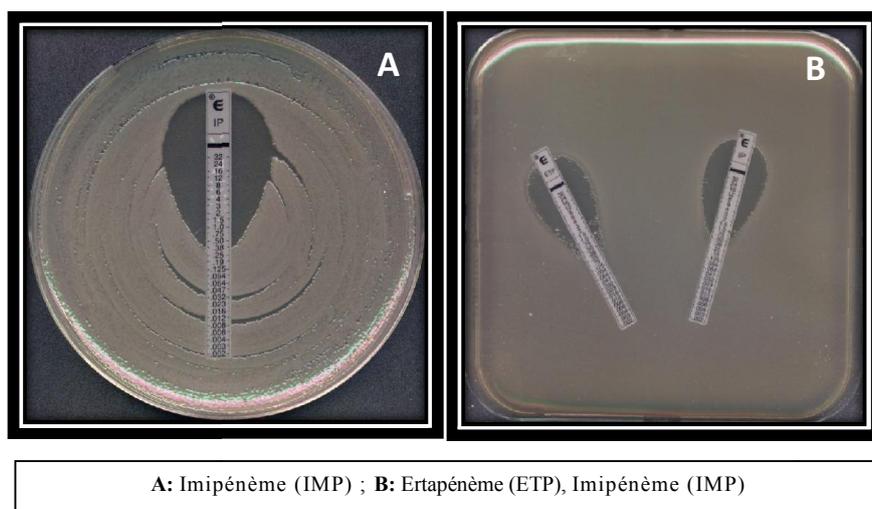


Figure 35. E-Test pour la souche S.Ec.14



Figure 36. Test de Hodge pour la souche S.Ec.14

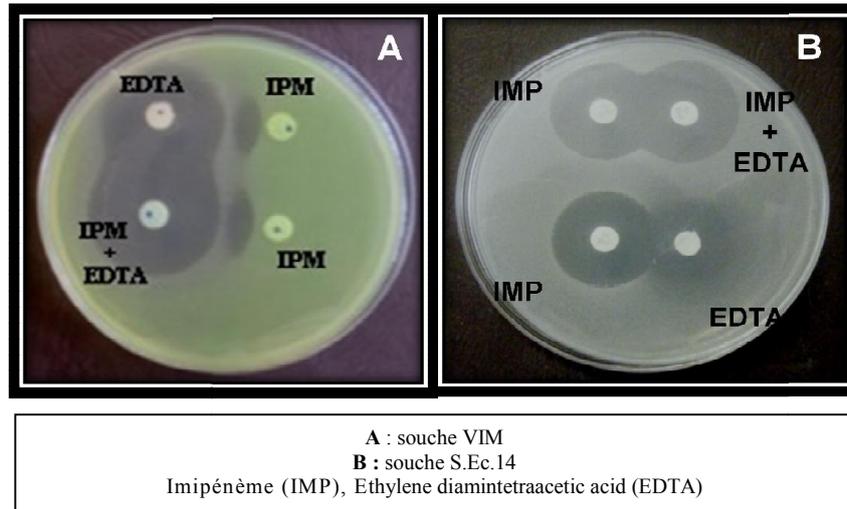


Figure 37. Test de l'EDTA

6. Résistances associées

Les résistances associées aux aminosides (tobramycine et gentamicine), quinolones (acide nalidixique, ofloxaciline et ciprofloxacine) et à triméthoprime/sulfaméthoxazole, étaient les plus fréquentes chez les souches productrices de BLSE et de BLSE+Case (**tableau 15 et 16; figure 38**). En revanche, pour les souches qui produisent une céphalosporinase de haut niveau, ces antibiotiques sont modérément affectés. L'amikacine et la colistine restent les deux molécules de référence, les plus actives.

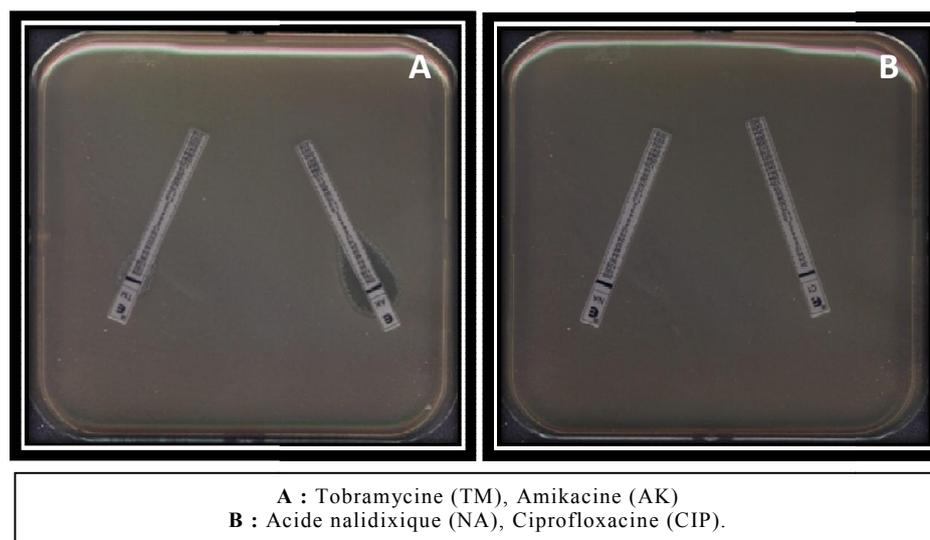


Figure 38. E-Test

Tableau 15. Résistances associées en fonction des phénotypes de résistance aux β -lactamines

Phénotype	Nombre (%)	Nombre de souches résistantes (%)							
		TM	GM	AN	NA	OFX	CIP	CS	SXT
BLSE	53 (33.5)	49 (92.4)	50 (94.3)	5 (9.4)	46 (86.8)	45 (84.9)	42 (79.2)	0 (0)	53 (100)
BLSE+Case	28 (17.7)	28 (100)	27 (96.4)	5 (17.8)	25 (89.3)	22 (78.6)	21 (75)	0 (0)	28 (100)
Case	27 (17.1)	10 (37)	6 (22.2)	2 (7.4)	7 (25.9)	5 (18.5)	5 (18.5)	0 (0)	6 (22.2)
Pase	2 (1.3)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sauvage	48 (30.4)	2 (4.2)	1 (2.1)	0 (0)	5 (10.4)	4 (8.3)	4 (8.3)	0 (0)	3 (6.2)

β -lactamase à spectre étendu (BLSE), Céphalosporinase hyperproduite (Case), Pénicillinase de haut niveau (Pase).
Tobramycine (TM), Gentamicine (GN), Amikacine (AN), Acide nalidixique (NA), Ofloxacin (OFX), Ciprofloxacine (CIP), Colistine (CS), Triméthoprim/Sulfaméthoxazole (SXT).

Tableau 16. Intervalles de CMI ($\mu\text{g/ml}$) observés en fonction des phénotypes de résistance

Hôpital	Phénotype	Antibiotique en poudre				
		TM	GN	AN	CIP	RIF
		≤ 2 - >4	≤ 2 - >4	≤ 8 - >16	≤ 0.5 - >1	≤ 4 - >16
Tlemcen	BLSE	16- 32	32- 128	2- 16	<0.125 - 16	16- 64
	BLSE+Case	32- 128	32- 128	<0.5 -4	4	64
	Case	0.5- 4	<0.5 - 32	1- 2	<0.125 - 0.5	16- 64
Sidi Bel Abbès	BLSE	4- 32	16- 64	<0.5 - 8	<0.125 - 8	16- 64
	BLSE+Case	4- 32	<0.5 - 64	<0.5 - 2	0.125-128	8- 32
	Case	<0.25 - 0.5	0.5	<0.5	<0.125	32
Oran	BLSE	4- 32	<0.5 - 64	<0.5 - 8	<0.125 - 2	8- 32
	BLSE+Case	4- 32	<0.5 - 64	<0.5 - 4	<0.125 -8	<0.5 - 32
	Case	<0.25 - 0.5	<0.5 - 4	<0.5 - 2	<0.125 - 1	<0.5 - 16

β -lactamase à spectre étendu (BLSE), Céphalosporinase hyperproduite (Case).
Tobramycine (TM), Gentamicine (GN), Amikacine (AN), Ciprofloxacine (CIP), Rifampicine (RIF).

7. Conjugaison bactérienne

Selon la littérature, la résistance aux β -lactamines et la production de BLSE sont dues à l'acquisition d'un plasmide par un transfert horizontal. Afin de mettre en évidence ce transfert, l'expérience de la conjugaison a été réalisée à l'aide d'une souche *Escherichia coli* K12 (souche réceptrice) sensible à tous les antibiotiques à l'exception de la rifampicine.

L'analyse des profils d'antibiorésistance des transconjugants par la méthode de diffusion en milieu solide a montré le transfert de la résistance aux β -lactamines, aux aminosides et au triméthoprime/sulfaméthoxazole pour la majorité des souches.

Pour toutes les souches présentant le phénotype BLSE, des images de synergie, indicatrice de ce phénotype, ont été observées chez leurs transconjugants qui confirment le support plasmidique de cette résistance (**figure 39**).

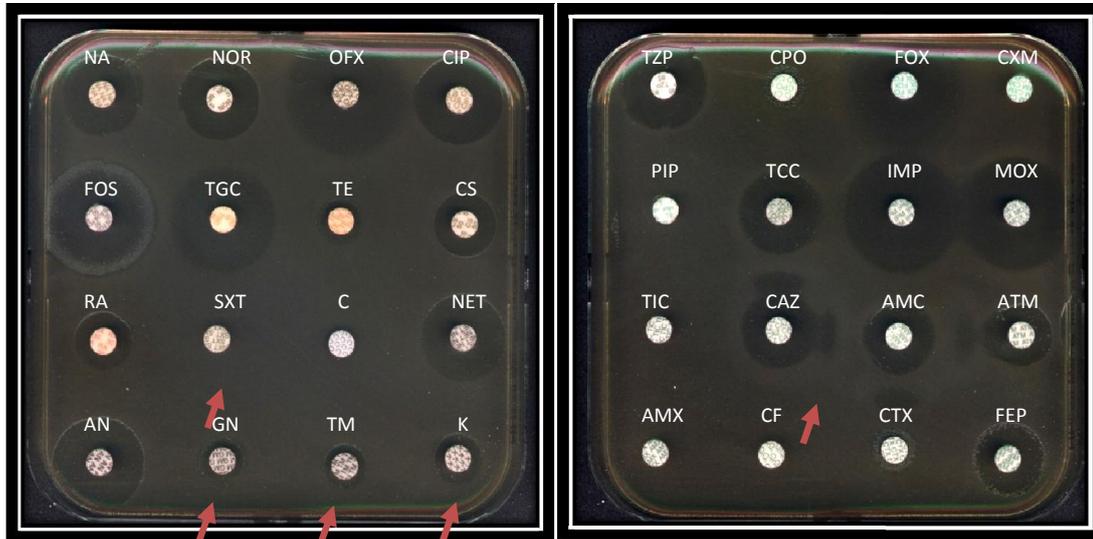


Figure 39. Transfert de phénotype BLSE vers la souche réceptrice K12

8. L'extraction de l'ADN plasmidiques

L'analyse du contenu plasmidique de 42 souches *d'E.cloacae*, ainsi que de leurs transformants respectifs issus de l'électroporation, a permis de visualiser la taille et le nombre de plasmides hébergés par ces souches. La taille des plasmides a été estimée par comparaison avec des plasmides de taille connue de la souche *Escherichia coli* 50192.

Les souches contiennent de 1 à 5 différents plasmides de poids moléculaire compris entre 140 b à 140 kb. Le profil plasmidique des souches analysées est représenté dans la **figure 40**.

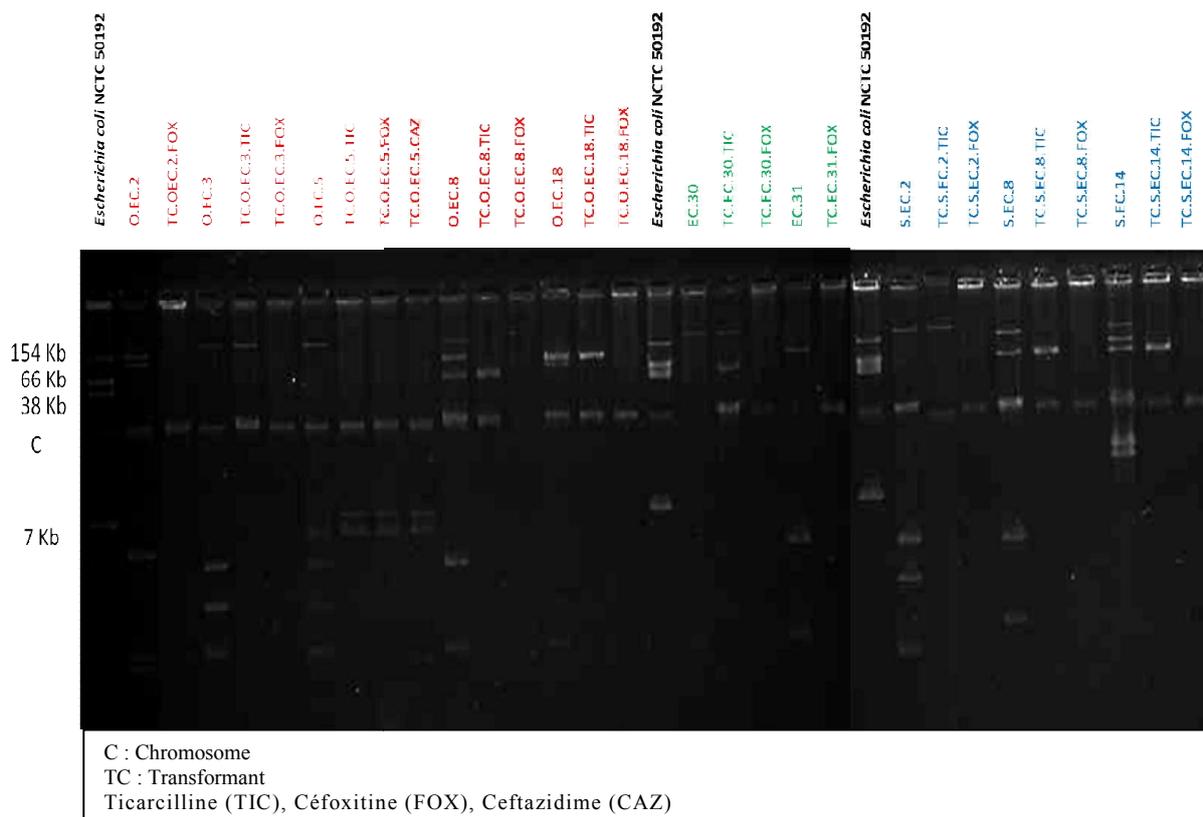


Figure 40. Profil plasmidique des souches d'*E.cloacae* ainsi que leurs transformants

9. Typage moléculaire par électrophorèse en champ pulsé (PFGE)

L'hétérogénéité génétique des souches d'*E.cloacae* a été évaluée par électrophorèse en champ pulsé (**figure 41**). 42 souches d'*E.cloacae* productrices de BLSE, isolées à partir de divers échantillons cliniques et environnementales provenant de trois CHU, ont été sélectionnées pour le typage moléculaire par électrophorèse en champ pulsé dans le but de rechercher une éventuelle dissémination entre les trois CHU.

Vingt et un pulsotypes (A-U) ont été déterminés selon les critères de Tenover (**Tenover *et al.*, 1995**). Les pulsotypes H, F, I, et K ont été détectés chez quatre souches (H), trois souches (F, I) et deux souches (K) respectivement. Tous ces pulsotypes sont distribués en deux sous-types entre les trois hôpitaux. Les pulsotypes B, O, R et S ont un indifférenciable PFGE profil, qui représente la même souche. Quatre souches (trois de l'hôpital de Sidi Bel Abbas et une de l'hôpital d'Oran) sont trouvées avec le même profil PFGE (pulsotype E). Ces souches portent aussi le même gène BLSE (*bla_{SHV}*). Le reste des souches (12 souches) ont montré des génotypes différents des autres souches (leurs profils PFGE sont considérablement différents des autres profils PFGE).

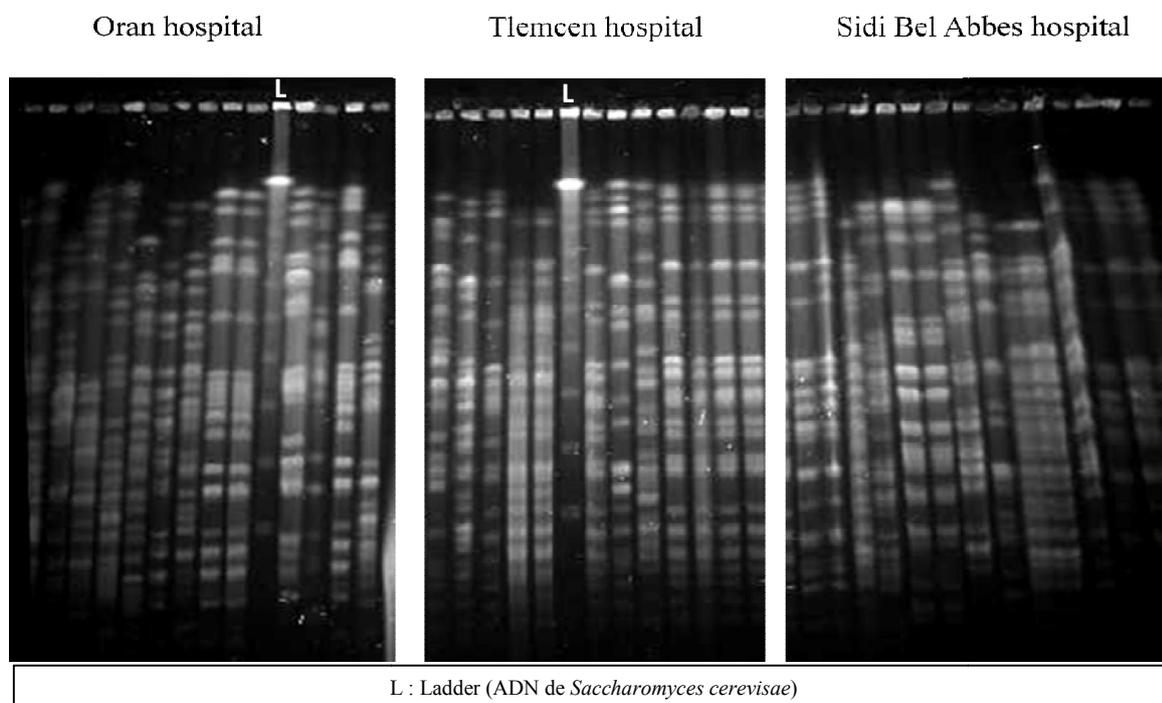
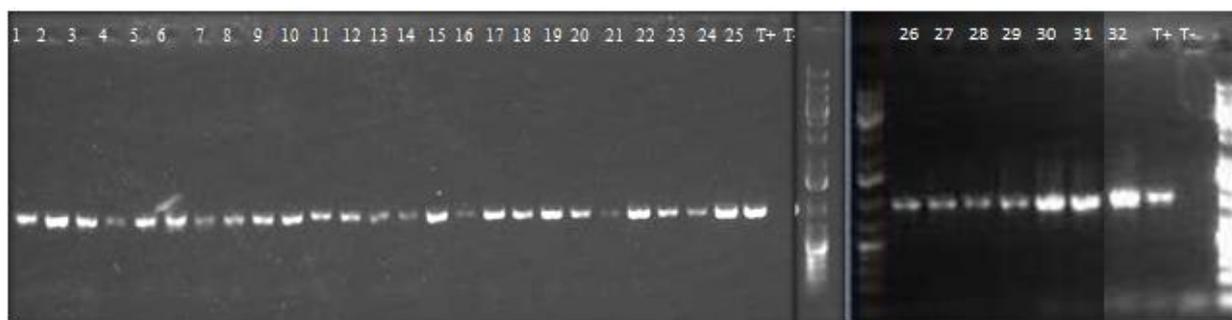


Figure 41. L'analyse des profils PFGE

10. PCR et séquençage

L'amplification par PCR suivi de séquençages ont été performé pour identifier les β -lactamases de types bla_{TEM} , bla_{SHV} , et bla_{CTX-M} chez 32 souches clinique non redondantes d'*E.cloacae* producteurs de BLSE. Ces souches ont été sélectionnées d'après les profils plasmidiques de Kieser et les pulsotypes de PFGE. 27 souches contenaient les deux gènes bla_{CTX-M} et bla_{TEM} , 3 souches étaient positives pour le gène bla_{SHV} et bla_{TEM} et 2 souches exprimaient les trois types de gènes.

Le gène bla_{TEM} a été identifié chez toutes les souches (100%), dont le gène ne possède aucune activité céfotaximase. Cet enzyme correspond au β -lactamases de types TEM-1 (**figure 42**). La majorité des BLSE identifiées dans l'ouest algérien sont de type bla_{CTX-M} (69%), incluant le gène CTX-M-15, et le gène CTX-M-3, avec 100% de souches à l'hôpital de Tlemcen (**figure 44**). La β -lactamase de type bla_{SHV} (SHV-12) a été détectée chez 5 souches (11.9%), uniquement à l'hôpital d'Oran et de Sidi Bel Abbas (**figure 43**). En plus des β -lactamases de classe A d'ambler, le gène bla_{ECB} qui code pour les céphalosporinases chromosomiques, à été identifié chez toutes les souches (**figure 45**). Une souche d'*E.cloacae*, isolée à l'hôpital d'Oran, exprime le gène de type céphalosporinase plasmidique bla_{CMY-2} (**figure 46**). Aucune souche n'exprimait les carbapénèmases de type IMP, VIM ou NDM (**figure 47**).



1(O.EC.1), 2(O.EC.2), 3(O.EC.3), 4(O.EC.5), 5(O.EC.6), 6(O.EC.7), 7(O.EC.9), 8(O.EC.15), 9(O.EC.18), 10(O.EC.19), 11(T.EC.29), 12(T.EC.30), 13(T.EC.31), 14(T.EC.33), 15(T.EC.34), 16(T.EC.38), 17(T.EC.39), 18(T.EC.44), 19(S.EC.2), 20(S.EC.3), 21(S.EC.5), 22(S.EC.6), 23(S.EC.14), 24(S.EC.26), 25(S.EC.30), T+ (témoin positif), T- (témoin négatif)
26 (O.EC.8), 27(S.EC.24), 28(S.EC.29), 29(T.EC.42), 30(S.EC.8), 31(O.EC.22), 32(T.EC.45), T+ (témoin positif), T- (témoin négatif)

Figure 42. Résultat de la PCR bla_{TEM}

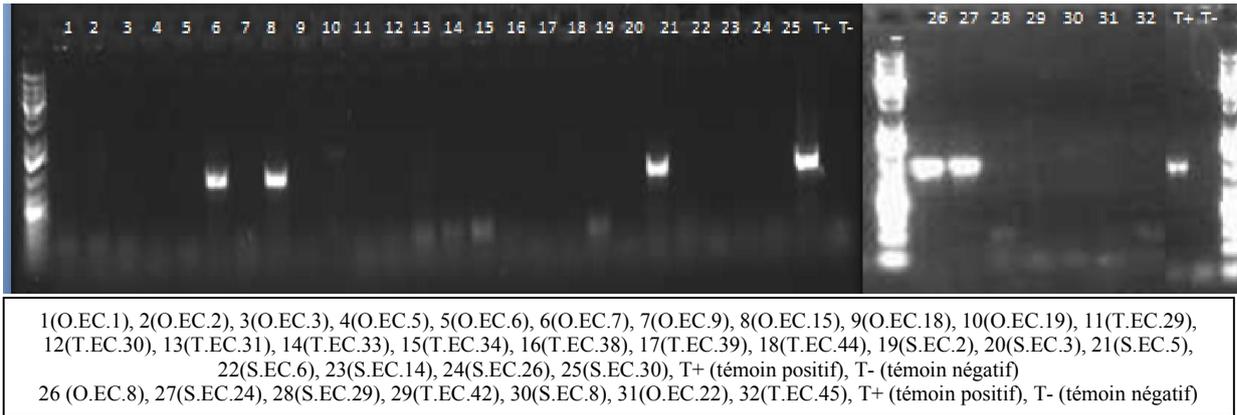


Figure 43. Résultat de la PCR *bla*_{SHV}

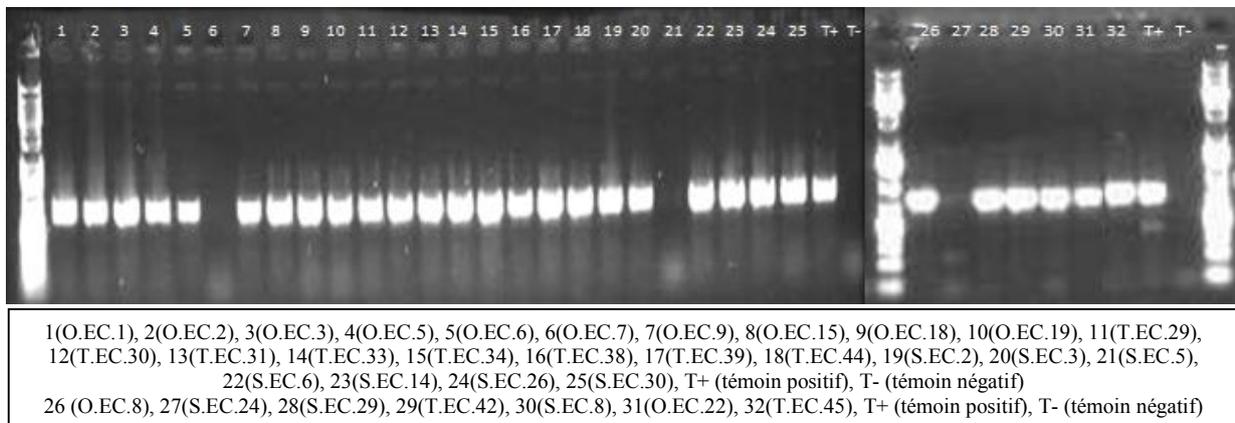


Figure 44. Résultat de la PCR *bla*_{CTX-M}

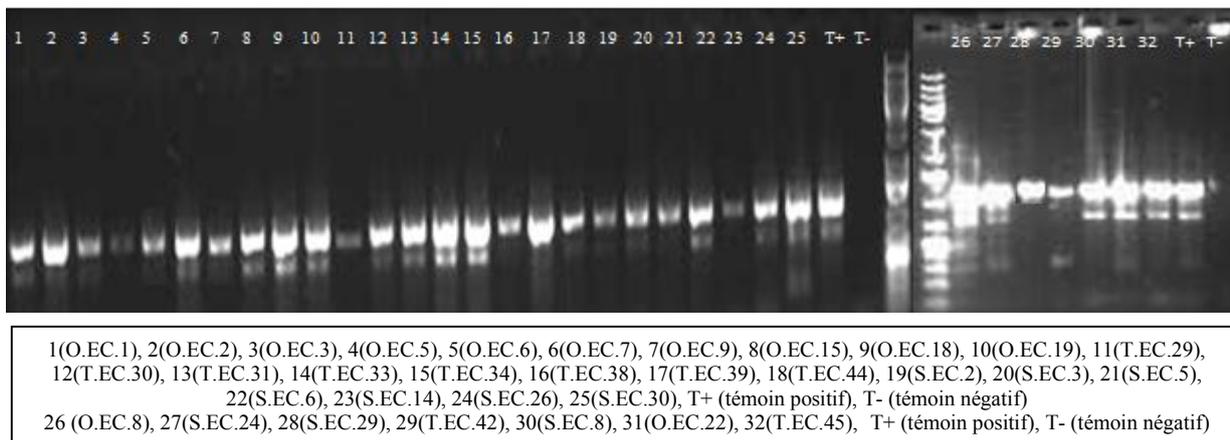
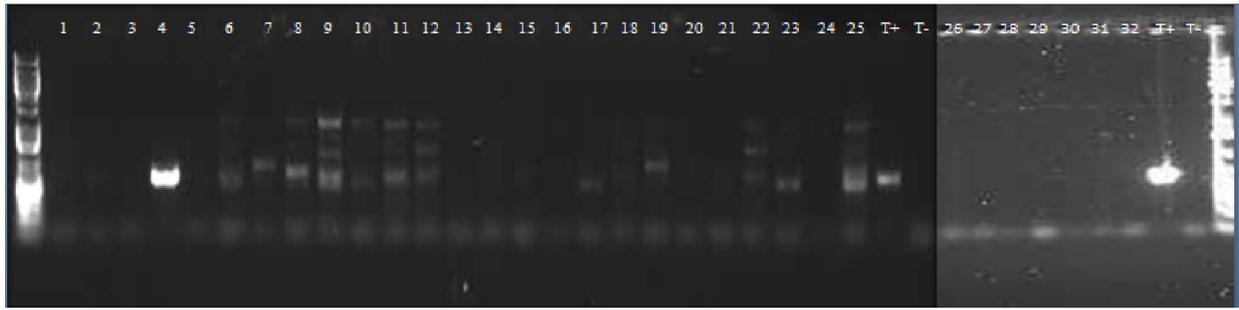


Figure 45. Résultat de la PCR *bla*_{ECB}



1(O.EC.1), 2(O.EC.2), 3(O.EC.3), 4(O.EC.5), 5(O.EC.6), 6(O.EC.7), 7(O.EC.9), 8(O.EC.15), 9(O.EC.18), 10(O.EC.19), 11(T.EC.29), 12(T.EC.30), 13(T.EC.31), 14(T.EC.33), 15(T.EC.34), 16(T.EC.38), 17(T.EC.39), 18(T.EC.44), 19(S.EC.2), 20(S.EC.3), 21(S.EC.5), 22(S.EC.6), 23(S.EC.14), 24(S.EC.26), 25(S.EC.30), T+ (témoin positif), T- (témoin négatif)
26 (O.EC.8), 27(S.EC.24), 28(S.EC.29), 29(T.EC.42), 30(S.EC.8), 31(O.EC.22), 32(T.EC.45), T+ (témoin positif), T- (témoin négatif)

Figure 46. Résultat de la PCR *bla*_{CMY-2}



Figure 47. Résultat de la PCR *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} et *bla*_{NDM}

Tableau 17. Les caractéristiques des souches d'*E.cloacae* productrices de β -lactamases à spectre étendu

Isolate	Date of isolation	Hospital	Resistance phenotype	PCR							MIC (mg/L)					
				TEM-1	SHV-12	Group 1 CTX-M	ACT-1	CMY-2	IMP	CTX	CAZ	FEP	AN	GN	CIP	
O,EC,2	01/2010	Oran	ESBL+Case	+		+	+			0.5	>512	256	256	4	32	2
O,EC,3	03/2010	Oran	ESBL	+		+	+			1	>512	32	256	4	32	2
O,EC,5	11/2010	Oran	ESBL+Case	+		+	+	+		1	>512	512	>512	4	32	2
O,EC,8	03/2010	Oran	ESBL	+	+	+	+			1	>512	>512	>512	2	<0,5	2
O,EC,18	02/2011	Oran	ESBL	+		+	+			0.5	>512	2	<0,5	<0,5	16	<0,125
T,EC,30	01/2011	Tlemcen	ESBL	+		+	+			0.5	512	64	256	4	64	32
T,EC,31	01/2011	Tlemcen	ESBL	+		+	+			1	512	128	512	4	64	2
S,EC,2	10/2009	Sidi Bel Abbes	ESBL	+		+	+			1	>512	16	256	4	16	2
S,EC,8	12/2009	Sidi Bel Abbes	ESBL+Case	+		+	+			1	>512	128	512	<0,5	64	0,125
S,EC,14	03/2010	Sidi Bel Abbes	ESBL+Case	+		+	+			2	>512	64	>512	2	32	32

Discussion

La résistance bactérienne aux antibiotiques est la résultante d'interactions complexes entre la bactérie et son environnement. Elle est liée essentiellement à l'usage excessif des antibiotiques contribuant ainsi à l'émergence et à la diffusion de certains bacilles à Gram négatif en particulier les souches d'entérobactéries, dont *Enterobacter cloacae*, résistantes à un grand nombre d'antibiotiques : les β -lactamines à large spectre, les aminosides et les quinolones.

Cette étude multicentrique a permis d'évaluer l'activité antibactérienne des antibiotiques vis-à-vis de l'espèce *E. cloacae*. Le choix de cette espèce est motivé par sa diversité biologique, son pouvoir métabolique important, son ubiquité, sa plasticité génétique mais aussi par son implication dans les infections nosocomiales de localisations variées. Entre septembre 2009 et mai 2012, 158 souches ont été identifiées à partir de 1196 prélèvements, avec une fréquence d'isolement de 13.2%, de différents services de trois grands hôpitaux de l'ouest algérien : Tlemcen, Sidi Bel Abbes et Oran. Cette fréquence d'isolement étant considérée plus élevée que celle observée au Nigeria avec 0.34% (**Ogbolua et al., 2011**).

Les *E.cloacae* ont été retrouvés dans tous les types de services des trois hôpitaux. Cependant, certaines spécialités sont apparues plus concernées dont les unités de soins intensifs où on note une prédominance de son isolement : 35.2% de souches ont été isolées au niveau de la réanimation du CHU de Sidi Bel Abbes, 70.6% au niveau de la réanimation de Tlemcen et 35.8%, 18.9% et 17% dans les trois services de réanimation médicale, UMC et infantile d'Oran. Ce résultat concorde avec les données de la littérature qui décrit l'importance de cette espèce surtout en unité de soins intensifs (**Rahal et al., 2012**). En plus, la circulation des patients entre unités différentes d'un même hôpital mais aussi entre hôpitaux, sur le plan national ou international, peut contribuer à la diffusion de cette résistance à travers le monde (**Mkaouar et al., 2008**).

41 souches ont été isolées uniquement à partir de l'environnement hospitalier soit 16.8% de fréquence d'isolement qui reste supérieur à celle rapportée au Maroc avec 5% (**Saouide et Echchelh, 2014**). L'identification des mécanismes de résistance impliqués et la recherche des souches cliniques dans l'environnement hospitalier ont permis d'émettre des hypothèses sur l'origine de la colonisation des patients et des modes de diffusion de la résistance, afin

de proposer des choix prioritaires parmi les mesures à mettre en œuvre pour la prévention des infections nosocomiales à *E. cloacae*.

La détermination de la source de contamination et du mode de transmission des souches épidémiques est un des soucis majeurs dans les investigations des épidémies d'infections nosocomiales. Dans les épidémies à *E. cloacae* rapportées dans la littérature, les sources de contamination étaient variées. Elle peut être endogène (par l'intermédiaire de la colonisation de la peau, le tractus gastro-intestinal, ou du tractus urinaire) ou exogène, résultant de la nature omniprésente des espèces *Enterobacter*. Plusieurs rapports ont mis en cause les mains du personnel, des endoscopes, des produits sanguins, des dispositifs de surveillance de la pression intra-artérielle, et stéthoscopes comme sources d'infection (**Fraser et al., 2010**).

L'encombrement du service ainsi que le défaut d'isolement des malades infectés pourraient expliquer la diffusion de la bactérie. La transmission manuportée par le personnel soignant reste un élément important dans la dissémination des souches, par le non respect des consignes d'hygiène, dues à une surcharge de travail, situation habituelle dans ce service de réanimation. Pour diminuer la transmission manuportée, le lavage des mains, ainsi que l'utilisation des solutions hydro-alcooliques sont indispensables comme mesures d'hygiène classiques. Ainsi il s'avère nécessaire d'insister sur l'importance des pratiques d'isolement et sur la prévention par l'application des règles d'hygiène classiques. Les protocoles thérapeutiques utilisés dans chaque service jouent aussi un rôle dans l'apparition des épidémies par pression de sélection. Il convient donc d'insister sur le respect des règles d'hygiène hospitalière pour prévenir et limiter la diffusion des bactéries multirésistantes.

Les niveaux des résistances bactériennes varient d'un pays à l'autre et d'une année à l'autre. Aussi, la connaissance de la situation locale et de son évolution sont nécessaires pour le choix de l'antibiothérapie de première intention (**El Bakkouri et al., 2009**). En effet, nos résultats montrent un taux de résistance considérable à la majorité des antibiotiques testés. Ces taux de résistance étaient plus importants à l'hôpital de Tlemcen par rapport aux autres hôpitaux (Oran et Sidi Bel Abbès). Cette différence peut être expliquée par la variabilité des facteurs épidémiologiques, la stratégie d'utilisation des antibiotiques et les mesures d'hygiène hospitalière, entre les différentes institutions (**Mkaouar et al., 2008**).

Les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) occupent une place importante dans les infections nosocomiales, notamment en milieu de réanimation. Ces bactéries deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques et commencent à franchir les limites de l'hôpital pour émerger dans la communauté. La dissémination de ces bactéries présente une menace grave qui met en cause la validité de l'arsenal antibiotique actuellement disponible, d'autant plus qu'aucune classe nouvelle d'antibiotique n'est attendue dans les prochaines années (**Mkaouar et al., 2008**). L'étude de la sensibilité d'*E. cloacae* aux C3G, montrait des taux élevés de résistance acquise soit 69.6%. Les mêmes résultats ont été constatés au CHU de Sidi Bel Abbes en Algérie (**Souna, 2010**) et à l'hôpital militaire d'instruction Mohamed V au Maroc (**Elouennass et al., 2008**).

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 élargi (BLSE) (**Belmonte et al., 2010**) dont l'espèce *E. cloacae*. Il existe maintenant de nombreux rapports d'*E. cloacae* productrices de BLSE à travers le monde (**Bell et al., 2003; Bouchillon et al., 2004; Giakkoupi et al., 2000; Ho et al., 2000; Kartali et al., 2002; Munday et al., 2004; Pai et al., 2004; Park et al., 2005**). 51.3% des souches collectées dans notre étude sont productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Cependant, on note que ce phénotype est plus exprimé à l'hôpital de Sidi Bel Abbes chez 55.5% des souches, suivi de l'hôpital de Tlemcen avec 52.9% et enfin l'hôpital d'Oran avec 45.3%. Au niveau national, cette valeur se rapproche de celles obtenues au CHU de Sidi Bel Abbes (57.7%) (**Souna, 2010**) et au CHU d'Annaba (47.6%) (**Nedjai et al., 2013**). En revanche, elle est nettement plus élevée que celles rapportées à Alger, Tizi Ouzou et Tlemcen (17.7%) (**Iabadene et al., 2008**) et à Bejaia (14.8%) (**Gharout-Sait et al., 2012**). Par ailleurs dans le monde, cette valeur est supérieure à celles retrouvées au Japon (1%) (**Yamasaki et al., 2003**), en Chine (6%) (**Wang et al., 2003**), en Argentine (14%) (**Quinteros et al., 2003**), à Taiwan (21.6% et 28%) (**Yang, 2009; Wu et al., 2007**), en France (31.4%) (**Honoré et al., 2006**), en Corée (35.4%) (**Park et al., 2005**) et en Grèce (43%) (**Tzelepi et al., 2000**).

Les BLSE sont généralement portées par de grands plasmides qui portent aussi des gènes de résistance aux classes d'antibiotiques non β -lactamines, tels que les aminoglycosides, les

quinolones et le triméthoprim/sulfaméthoxazole. Aussi, l'utilisation de ces antibiotiques contribue à la sélection de souches productrices de BLSE (**Paterson et Bonomo, 2005**).

L'incidence d'apparition des résistances aux aminosides a augmenté ces dernières années et particulièrement chez les souches productrices de BLSE (**Spanu et al., 2002**). Les niveaux de résistance de ces souches dans notre étude est plus important. L'amikacine reste la molécule la plus efficace avec 92.4% de souches sensibles comme cela été rapporté dans plusieurs études (**Wu et al., 2007**).

Les quinolones montrent une activité moyenne, la sensibilité globale des souches chutant considérablement dans le cas des souches productrices de BLSE. Pour la majorité des souches, la résistance acquise est la conséquence d'une mutation, ce qui limite sa diffusion (**Larabi et al., 2003**).

Une activité faible est détectée pour le triméthoprim/sulfaméthoxazole avec 57%. Ce taux reste supérieur à celui décrit dans la littérature par plusieurs études (**Ammari et al., 2001; Kahlmeter, 2003; Elouennass et al., 2008; Guneyssel et al., 2009**) dont l'évolution de la résistance à cette molécule a été marquée par une décroissance significative. Cela est vraisemblablement lié à une moindre utilisation de cet antibiotique en pratique courante (**Mahamat et al., 2006**).

La colistine conserve encore une bonne efficacité et reste parmi les antibiotiques les plus actifs sur cette espèce avec 100% de souches sensibles, qui correspond aux résultats obtenus par **Mezghani Maalej et al. en 2012**. En effet, c'est l'une des molécules gardant les taux de sensibilité les plus élevés sur les espèces naturellement sensibles (**Hamze et al., 2003**).

Les entérobactéries produisant une BLSE dont *E.cloacae* (E-BLSE+) sont toujours d'actualité dans les structures de soins, malgré les mesures de prévention de leur dissémination aujourd'hui bien codifiées. On observe plutôt une augmentation de leur nombre, en particulier, avec des BLSE de type CTX-M alors que les BLSE plus « anciennes » de la famille des TEM ou des SHV semblent diminuer (**Giraud-Morin et Fosse, 2008**). Dans l'ouest algérien, deux types de gènes BLSE de classe A d'Ambler (SHV et CTX) ont été identifiés. La sur-utilisation de C3G pourrait expliquer en partie le taux élevé de ces souches en Algérie. Les niveaux de CMI pour le céfotaxime chez la plupart des souches

présentant le phénotype BLSE sont plus importants par rapport à la ceftazidime, ce qui oriente vers des BLSE de type CTX-M. 69% des souches BLSE étaient de type CTX-M avec uniquement deux enzymes : CTX-M-15 et CTX-M-3. Ces résultats sont en corrélation avec les données nationales et internationales (**Mamlouk et al., 2006; Livemore et al., 2007**). En effet, CTX-M-1 est le seul groupe signalé en Algérie; CTX-M-15, CTX-M-28, et CTX-M-3 sont les plus fréquemment rapportés (**Iabdene et al., 2008; Touati et al., 2008a; Touati et al., 2008b; Meradi et al., 2011**). Les enzymes de ce type ont eu un fort succès épidémiologique et ont diffusé dans le monde entier (**Doit et al., 2010**). Elles ont d'abord été isolées à partir de souches en Europe et en Argentine à la fin des années 1980 et au début des années 1990 (**Bauernfeind et al., 1990; Radice et al., 2002**). Depuis, plusieurs auteurs de l'Europe de l'Est, en Asie et en Amérique du Sud ont identifié ces BLSE de Type CTX-M (**Tzouveleakis et al., 2000**). Au moins 106 β -lactamases de type CTX-M ont été rapportées (<http://www.lahev.org/studies/webt.htm>). Parmi elles, les CTX-M-15 semblant avoir une capacité particulière de dissémination (**Nicolas-Chanoine et al., 2008**). Dans les hôpitaux universitaires de l'ouest algérien, le taux de production β -lactamase de type SHV était de 11,9%, avec seulement SHV-12. Mais cette enzyme avait déjà été détectée en Algérie chez certaines souches d'*E.cloacae* (**Iabdene et al., 2008**). A travers le monde, SHV-12 était aussi le plus répandu chez *E.cloacae* (**Ko et al., 2008**). La détermination et la compréhension des mécanismes moléculaires du pouvoir pathogène et en particulier de l'émergence des caractères de résistance aux antibiotiques représentent un des buts essentiels de la bactériologie médicale pouvant faire évoluer les stratégies thérapeutiques.

La coexistence des différentes β -lactamases dans une même bactérie peut poser un problème de diagnostic et de thérapeutique. Ces associations conduisent à une co-sélection des gènes de résistance et au scénario de pandémie à l'hôpital et en communauté (**Chen et al., 2007; Meradi et al., 2011**). 17.7% des souches d'*E.cloacae* présentant le phénotype BLSE produisent également une céphalosporinase de haut niveau. Cette association confère une résistance aux céphalosporines de troisième et quatrième génération et dans certains cas, elle masque les images de synergie indicatrices de phénotype BLSE. Néanmoins, nous rapportons le premier isolement d'une β -lactamase de type CMY-2 à médiation plasmidique, chez une souche clinique d'*E.cloacae* isolée de l'hôpital d'Oran. La CMY

représente le type d'enzyme céphalosporinase à médiation plasmidique la plus répandue et la plus largement distribuée (**Fam et al., 2013**). De plus, l'enzyme de type CMY-2 est largement distribuée géographiquement. Elle a été signalée en Algérie, France, Allemagne, Grèce, Inde, Pakistan, Taiwan, Turquie, Royaume-Uni et aux États-Unis (**Yamasaki et al., 2010**).

Des gènes de résistance à différentes familles d'antibiotiques sont décrits comme ici sur un même plasmide, représentant ainsi un mode de diffusion efficace de plusieurs mécanismes associés (**Leotard et Negrin, 2010**). Cette dissémination de la multirésistance et cette diffusion des gènes de résistance sont liées à l'existence d'éléments génétiques mobiles entre bactéries d'une même espèce ou d'espèces différentes, ainsi qu'à l'existence de structures génétiques permettant de cumuler de nombreux gènes de résistance au sein d'une même souche (**Skurnik et Andremont, 2006**). Les résultats de la visualisation des plasmides sur gel d'agarose semblent révéler que les gènes codant pour cette résistance soient situés sur des plasmides de poids moléculaire compris entre 140 b à 140 kb chez les souches ayant transféré le phénotype BLSE et qui souvent, portent des déterminants de la résistance à d'autres familles d'antibiotiques, ce qui peut expliquer que les bactéries qui les hébergent deviennent multi-résistantes.

L'analyse moléculaire des clones détectés localement paraît indispensable à terme pour une compréhension et une réaction adaptées à l'émergence des entérobactéries multirésistantes (EMR) en Algérie. De plus, l'augmentation de la fréquence des *E. cloacae* producteurs de BLSE dans notre hôpital doit nous inciter à identifier leurs niches écologiques et à typer les BLSE produites afin de comprendre leur mode de transmission et de lutter efficacement contre leur diffusion. L'électrophorèse en champ pulsé, appliquée pour 42 souches (une souche par patient), a permis de distinguer 21 pulsotypes (A-U) selon les critères de Tenover. L'existence de souches de génotypes différents exclut la dissémination d'une seule souche épidémique dans nos hôpitaux. Néanmoins, sur la base de l'identité des profils concernant 4 souches (trois de l'hôpital de Sidi Bel Abbes et une de l'hôpital d'Oran), les résultats de la présente étude indiquent la diffusion d'un clone de souches qui portent aussi le même gène BLSE (*bla_{SHV}*). Cette nouvelle rassurante indique que la PFGE est un outil de typage beaucoup plus fiable. Cependant cette méthode reste difficile et coûteuse pour une

utilisation quotidienne et pour cette raison un test diagnostique bon-marché et nouveau est en développement (**Vancraeynest et al., 2005**). Toutefois, à la lumière des géotypes qui se chevauchent, tous les personnels cliniques impliqués doivent être conscients du potentiel des bactéries résistantes de se propager des patients vers l'environnement, ou entre des personnes agissant en tant que vecteurs potentiels.

Les carbapénèmes sont les traitements de choix des infections sévères causées par les entérobactéries productrices de BLSE (**Gülmez et al., 2008**). La résistance des entérobactéries à ces molécules reste encore un phénomène marginal comme en témoignent les données épidémiologiques obtenues pour un grand nombre de souches, avec des pourcentages de sensibilité de 99-100 % (**Wolff et al., 2008**). Dans notre étude, 6.3% des souches présentent une résistance intermédiaire à l'imipénème avec des CMI de 4 µg/ml, aucune d'elle n'exprimant les carbapénèmases de type IMP, VIM ou NDM. Cette baisse de la sensibilité pourrait être le résultat d'une modification des porines, associée à la production de β-lactamases de type BLSE ou AmpC, diminuant ainsi la perméabilité de la membrane externe (**Bennett et al., 2010**). Le plus inquiétant serait la production de carbapénèmases puisque l'activité des carbapénèmes peut être compromise par l'émergence de ces enzymes (**Pasteran et al., 2008; Sekhri-Arafa et al., 2010**). Dans l'édition de janvier 2008 du document CLSI M100 (**Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008**), un article a inclu une alerte aux laboratoires pour contrôler et chercher toute production de carbapénémase chez les entérobactéries avec des CMI de 2 ou 4 µg/ml (**Patel et al., 2009**). Les méthodes phénotypiques, qui peuvent être combinées entre elles, ont l'avantage d'être faciles à réaliser. Elles permettent de mettre en évidence une résistance aux carbapénèmes sans en identifier précisément le mécanisme. La confirmation de la présence de ces gènes ne peut se faire actuellement que par l'utilisation d'outils moléculaires (**Cuzon et al., 2010**). Le traitement des infections causées par les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes est difficile en effet, les choix thérapeutiques contre ce type de germes sont limités. Pour éviter ces épidémies, on doit procéder à des surveillances strictes de la résistance et de la consommation des antibiotiques à l'hôpital (**Wu et al., 2010**). L'imipénème, parmi les carbapénèmes, est indiqué lors des infections graves traitées en probabliste chez les malades à haut risque de bactéries résistantes d'où son utilisation importante en réanimation, premier service prescripteur. Sa prescription doit

se limiter aux situations de risque d'infections à BGN résistants. L'imipénème est une molécule précieuse dont il convient absolument de préserver son efficacité (**Eloumi *et al.*, 2010**).

Malgré la rareté des mécanismes de résistance à l'imipénème en Algérie, en particulier chez *E. cloacae*, les études de surveillance réalisées pendant ces dernières années dans les hôpitaux algériens ont montré une augmentation généralisée de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles Gram négatif souvent liée à la dissémination de certains gènes spécifiques ayant pris une proportion pandémique. La pression de sélection exercée par les antibiotiques assure la dissémination des clones multirésistants et des gènes de résistance. Souvent, l'utilisation inappropriée d'un seul antibiotique pourrait sélectionner différents mécanismes de résistance. La restriction de l'utilisation des antibiotiques est par conséquent à la clé d'un contrôle efficace de la résistance aux antibiotiques.

Face à l'émergence des souches multirésistantes aux antibiotiques, la priorité est évidemment de lutter contre la diffusion de ces microorganismes. Les laboratoires algériens doivent avoir les méthodes appropriées pour la détection des mécanismes de résistance (souvent difficiles à détecter) et des microorganismes multirésistants. Une collaboration entre les hôpitaux algériens doit être établie afin de mieux détecter et mieux contrôler la dissémination inter hospitalière des clones multirésistants.

Conclusion

Au cours de la dernière décennie, l'augmentation et la diffusion rapide de bactéries résistantes aux antibiotiques et l'émergence de bactéries multi-résistantes (BMR) est devenue une préoccupation mondiale majeure et concerne non seulement des bactéries responsables d'infections nosocomiales mais également des bactéries responsables d'infections communautaires (Arpin *et al.*, 2003). Parmi les menaces actuelles, la résistance aux β -lactamines chez les bactéries à Gram négatif et la propagation dans le monde entier des gènes de résistance constituent une préoccupation majeure de la communauté scientifique (Cornaglia *et al.*, 2011; Kempf et Rolain, 2012).

Cette étude effectuée pendant la période de septembre 2009 à mai 2012, sur un collectif de 158 souches d'*Enterobacter cloacae*, souligne la place importante occupée par cette espèce parmi les bacilles à Gram négatif au niveau des trois centres hospitaliers universitaires : Tlemcen, Sidi Bel Abbes et Oran.

La majorité des antibiotiques testés β -lactamines, quinolones, aminoglycosides et l'association triméthoprime/sulfaméthoxazole ont perdu leur place dans le traitement des infections à *E. cloacae*, notamment chez les souches productrices de BLSE et de « céphalosporinases hyperproduites ». Cela minimise le choix des associations d'antibiotiques indispensables pour le traitement des infections nosocomiales. Notons toutefois que l'amikacine, l'imipénème et la colistine restent les antibiotiques les plus actifs avec respectivement 92.4%, 93.7% et 100% de souches sensibles.

E. cloacae, dans les trois hôpitaux d'Algérie, présente toutes les variantes des mécanismes de résistance aux antibiotiques, avec prédominance de la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) soit 51.3%, 17.7% de ces souches exprimant également une céphalosporinase hyperproduite associée.

L'augmentation de la fréquence des *E. cloacae* producteurs de BLSE dans ces hôpitaux doit nous inciter à identifier leurs niches écologiques et à typer les BLSE produites afin de comprendre leur mode de transmission et de lutter efficacement contre leur diffusion. L'analyse moléculaire a montré que la plupart des isolats produisent une BLSE de type CTX-M (CTX-M-15 et CTX-M-3), alors que seulement 5 d'entre eux produisent une BLSE de type SHV (SHV-12). Le gène *bla_{TEM}* a été retrouvé chez toutes les souches. Une souche a

été productrice d'une β -lactamase de type *bla*_{CMY-2} à médiation plasmidique dont le gène a été transféré par électroporation.

Les gènes de résistance à différentes familles d'antibiotiques sont décrits comme présents sur un même plasmide, représentant ainsi un mode de diffusion efficace de plusieurs mécanismes simultanément. La diffusion de ces résistances pourrait aussi être le fait d'intégrons souvent décrits chez les CTX-M (**Leotard et Negrin, 2010**). Les tests de conjugaison et d'extraction de plasmide montrent la présence de 1 à 5 différents plasmides de poids moléculaire compris entre 140 b à 140 kb, dont les gènes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} et *bla*_{SHV} sont portés par des plasmides conjugatifs de haut poids moléculaire (≥ 70 kb).

L'électrophorèse en champ pulsé a montré différents pulsotypes et confirme le caractère épidémique des souches étudiées des trois centres hospitaliers.

Les *E. cloacae* productrices de BLSE sont en évolution constante en Algérie. La résistance des bactéries aux antibiotiques est une urgence de santé publique, résultat d'une gestion inconsiderée des ressources antibiotiques dans les populations humaine et animale. Elle nous impose de réduire de façon massive nos prescriptions d'antibiotiques, de mettre en place les outils de surveillance permettant de suivre les évolutions de ces résistances afin d'adapter au plus vite nos stratégies diagnostiques et thérapeutiques (**Cohen et al., 2011**). Enfin, les efforts soutenus en terme d'hygiène et de suivi épidémiologique seront nécessaires afin de pouvoir contrôler ce genre de dissémination de germes multirésistants qui représentent un problème préoccupant en terme de santé publique (**Nordmann, 2004; Denton et al., 2005**).

Références Bibliographiques

A

- Aggoune-Khinache N., Bensersa D., Henniche F.Z., Daoudi M., Abdouni M.A., Chabani A., Tiouit D. et Naim M. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* producteurs de métallo- β -lactamases en Algérie. *Médecine et maladies infectieuses*; 39: 413-414.
- Allmansberger R., Brau B., et Piepersberg W. 1985. Genes for gentamicin-(3)-N-acetyl-transferases III and IV. II. Nucleotide sequences of three AAC(3)-III genes and evolutionary aspects. *Mol. Gen. Genet*; 198: 514–520.
- Ammari H., Ramdani-Bougoussa N. et Bellouni R. 2001. Antibiothérapie dans les infections ORL. *Médecine du Maghreb*; 91 : 28-31.
- Anderson K., Lonsway D.R., Rasheed J.K. *et al.* 2007. Evaluation of Methods to Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol*; 45(8): 2723-2725.
- Arlet G. 2009. Céphalosporinases plasmidiques. Faculté de Médecine, UPMC-Paris VI. Hôpital Tenon, AP-HP. RICAI.
- Arpin C., Dubois V., Coulange L. *et al.* 2003. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother*; 47: 3506-3514.
- Aubert G. et Carricajo A. 2004. Place du laboratoire dans le choix et le suivi pharmacodynamique de l'antibiothérapie des infections sévères. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*; 23: 704–713.
- Aubron C., Poirel L., Ash R.J. et Nordmann P. 2005. Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg. Infect. Dis* ; 11 : 260–264.

B

- Baba Ahmed Z., Ayad A., Mesli E., Messai Y., Bakour R. et Drissi M. 2012. CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in the intensive care unit of Tlemcen Hospital, Algeria. *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale* ; 18(4) : 382-386.
- Baba Ahmed Z., Decré D., Genel N., Boucherit-Otmani Z., Arlet G. et Drissi M. 2013. Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010). *Microb Drug Resist* ; 19 : 185-90.

- Baudry C. et Brézellec H. 2006. Microbiologie, immunologie. Editions 2 Porphyre. P : 126.
- Beaune J.-C. 2004. La vie et la mort des monstres, Collection Milieux. Editions Champ Vallon ; 254.
- Bell J. M., Turnidge J. D., Jones R. N., et the Sentry Asia-Pacific Participants. 2003. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in the Asia-Pacific region: results from the Sentry Antimicrobial Surveillance Program, 1998 to 2001. Antimicrob. Agents Chemother ; 47: 3989–3993.
- Belmeddah K. et Bentassa A. 2012. Caractérisation des β -lactamases à spectre élargi sécrétées par les entérobactéries à l'Ehs Salim Zemirli ; université d'alger –Ibenyoucef Benkhedda faculté de médecine département de pharmacie.
- Belmonte O., Drouet D., Alba J. Moiton M.-P., Kuli B., Lugagne-Delpon N., Mourlan C. et Jaffar-Bandjee M.-C. 2010. Evolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion : émergence des β -lactamases à spectre élargi. Pathologie Biologie; 58: 18–24.
- Bennett J.W., Mende K., Monica L., Herrera, Yu X., Lewis J. S., Wickes B. L., Jorgensen J. H. et Murray C.K. 2010. Mechanisms of carbapenem resistance among a collection of *Enterobacteriaceae* clinical isolates in a Texas City. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease; 66: 445–448.
- Bergan T. 1984. Methods in Microbiology. Academic Press ; 14: 228 .
- Berrazeg M. 2013. Développement des nouveaux outils de surveillance de l'émergence des bactéries à Gram négatif multirésistantes. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen, Algérie et Université Aix-Marseille, France.
- Biendo M., Manoliu C., Laurans G., Castelain S., Canarelli B., Thomas D., Hamdad F., Rousseau F., et Eb F. 2008. Molecular typing and characterization of extended-spectrum TEM, SHV, and CTX-M β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. Res. Microbiol ; 159 : 590–594.
- Bisson G., Fishman N.O., Patel J.B., Edelstein P.H. et Lautenbach E. 2002. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella species*: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. Infect Control Hosp Epidemiol; 23 (5): 254-260.

- Bogaerts P., Galimand M., Bauraing C., Deplano A., Vanhoof R., De Mendonca R., Rodriguez-Villalobos H., Struelens M. et Glupczynski Y. 2007. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* ; 59(3): 459-464.
- Bonnet R. 2006. β -lactamines et entérobactéries. Chapitre 15. Livre antibiogramme. Paris. ESKA: 2^{ème} édition. p 143.
- Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*; 48 (1): 1-14.
- Bonnet R., Sampaio J. L., Labia R., De Champs C., Sirot D., Chanal C. et Sirot J. 2000. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother* ; 44: 1936–1942.
- Bouchillon S. K., Johnson B. M., Hoban D. J., Johnson J. L., Dowzicky M. J., Wu D. H., Visalli M. A., et Bradford P. A. 2004. Determining incidence of extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the Pearls study 2001–2002. *Int. J. Antimicrob. Agents* ; 24:119–124.
- Bratu S., Landman D., Alam M. *et al.* 2005b. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter spp.* from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother* ; 49: 776–8.
- Bratu S., Landman D., Haag R., *et al.* 2005a. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med*; 165 : 1430-5.
- Bryskier A. 1999. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses ; Paris. 436-445.
- Bush K. et Jacoby G.A. 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; 54 (3): 969-976.

C

- Cano M.E., Rodriguez-Martinez J.M., Agüero J., Pascual A., Calvo J., Garcia-Lobo J.M., Velasco C., Francia M.V. et Martinez-Martinez L. 2009. Detection of Plasmid-

Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Isolates of *Enterobacter spp.* in Spain. *J.Clin .Microbiol* ; 47 (7) : 2033.

- Canton R., Oliver A., Coque T. M., Del Carmen Varela M., Pe´rez-Díaz J.-C. et Baquero F. 2002. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J. Clin. Microbiol* ; 40 : 1237–1243.
- Carattoli A., Tosini F., Giles W.P., Rupp M.E., Hinrichs S.H. et Angulo F.J. 2002. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. *Antimicrobial agents and chemotherapy* ; 46 (5) : 1269-1272.
- Carle S. 2009. La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! *Pharmactuel* ; 42 (2) : 6-21.
- Casin I, Bordon F., Bertin P., Coutrot A., Podglajen I, Brasseur R. et Collatz E. 1998. Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase variants of the Ib type with altered substrate profile in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother* ; 42: 209–215.
- CA-SFM. 2011. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sur le lien : <http://www.sfm.asso.fr/>.
- Castanheira M., Sader H. S., Deshpande L.M., Fritsche T. R. et Jones R. N. 2008. Antimicrobial Activities of Tigecycline and Other Broad-Spectrum Antimicrobials Tested against Serine Carbapenemase and Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*: Report from the SENTRY Antimicrobial. Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 52: 570-3.
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S. et Aarestrup, F. 2009. M. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enteric* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother*; 53: 603–608.
- Cavallo J.-D., Fabre R., Jehl F., Rapp C. et Garrabé E. 2004. β -lactamines. *EMC-Maladies Infectieuses*; 1: 129-202.
- Chanawong, A., M'Zali F. H., Heritage J., Xiong J.-H., et Hawkey P. M. 2002. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob. Agents Chemother* ; 46 : 630-637.

- Chen L., Hainrichson D., Bourdetsky M., Mor A., Yaron S. et Baasov T. 2008. Structure–toxicity relationship of aminoglycosides: Correlation of 2'-amine basicity with acute toxicity in pseudo-disaccharide scaffolds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 16: 8940-8951.
- Chen Y.-T., Lauderdale T.-L., Liao T.-L., Shiao Y.-R., Shu H.-Y., Wu K.-M., Yan J.-J., I.-J. Su, et Tsai S.-F. 2007. Sequencing and Comparative Genomic Analysis of pK29, a 269-Kilobase Conjugative Plasmid Encoding CMY-8 and CTX-M-3 β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 51(8) : 3004-3007.
- Chen Y.T., Liao T.L., Liu Y.M., Lauderdale T.L., Yan J.J. et Tsai S.F. 2009. Mobilization of *qnrB2* and *ISCR1* in plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother*; 53: 1235–1237.
- Chmelnitsky I., Navon-Venezia S., Strahilevitz J. et Carmeli Y. 2008. Plasmid-mediated *qnrB2* and carbapenemase gene *blaKPC-2* carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*; 52: 2962–2965.
- Chow J.W., Fine M.J., Shlaes D.M., *et al.* 1991. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med*; 115: 585-90.
- C.I.N.Q (Comité sur les infections nosocomiales du Québec). 2010. Comité sur les infections nosocomiales du Québec. Prévention et contrôle de la transmission des entérobactéries productrices de carbapénèmases dans les milieux de soins aigus du Québec. Gouvernement du Québec, Institut national de santé publique du Québec.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. CLSI document M100-S18. CLSI, Wayne, PA.
- Cohen M.S., Chen Y.Q., McCauley M., *et al.* 2011. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med*; 365(6): 493-505.
- Colak, D., Naas T., Gunseren F. *et al.* 2002. First outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Turkey. *J. Antimicrob. Chemother* ; 50 : 397–401

- Collignon A., Beljean-Leymarie M., Farinotti R. et Doutremepuich C. 2007. Infectiologie. Volume de Collection Le Moniteur internat. Le Moniteur des Pharmacies ; 3 (3) : 354-355.
- Collis C. M., Kim M. J., Partridge S. R., Stokes H. W. et Hall R. M. 2002. «Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines». J Bacteriol; 184 (11): 3017-3026.
- Colodner R. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. Am J Infect Control; 33: 104-7.
- Cornaglia G., Giamarellou H. et Rossolini G.M. 2011. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams, Lancet Infect Dis; 11: 381-93.
- Courvalin P. 2008. La résistance des bactéries aux antibiotiques: combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. Bull. Acad. Vét. France; 161(1): 7-12.
- Courvalin P., Drugeon N., Flandrois J.P. et Goldstein F. 1991. Aspects théoriques et thérapeutiques. Bactéricidie. Ed Maloine. p113-26.
- Crowley B. et Ratcliffe G. 2003. Extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacter cloacae*: underestimated but clinically significant! J. Antimicrob. Chemother; 51 (5): 1316-1317.
- Cuzon G., Naas T. et Nordmann P. 2010. Carbapénèmases de type KPC: quel enjeu en microbiologie clinique ? Pathologie Biologie; 58 (1): 38-45.

D

- D'Agata, E., Venkataraman L., De Girolami P., Weigel L., Samore M., et Tenover F. 1998. The molecular and clinical epidemiology of enterobacteriaceae- producing extended-spectrum β -lactamase in a tertiary care hospital. J. Infect; 36: 279–285.
- Dale J. et Park S. 2004. Molecular genetics of bacteria Édition, 4 illustrée John Wiley and Sons. 346 pages.
- De Wals P.-Y. 2007. Analyses mutationnelles et cinétiques de la β -lactamase TEM-1 d'*Escherichia coli* vers une meilleure compréhension du phénomène de résistance aux antibiotiques. Département de biochimie. Faculté de médecine. Université de Montréal.
- Delarras C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Techniques et Documentation. Paris. p 248-296.

- Denton M. 2007. Enterobacteriaceae International Journal of Antimicrobial Agents; 29 (3): 9–22.
- Denton M., Wilcox M.-H., Parnell P., Green D., Keer V., Hawkey P.-M., *et al.* 2005. Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of *Acinetobacter baumannii* on a neurosurgical intensive care unit. Intensive Crit Care Nurs; 21: 94–8.
- Deshpande L.M., Rhomberg P.R., Sader H.S. *et al.* 2005. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program. Diagn Microbiol Infect Dis 1999–2005; 56: 367–72.
- Doi Y. *et* Arakawa Y. 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin Infect Dis; 45: 88–94.
- Doi Y. *et* Paterson D. L. 2007. Detection of plasmid-mediated class C β -lactamases. International Journal of Infectious Diseases ; 11(3) : 191-197.
- Doit C., Mariani-Kurkdjian P. *et* Bingen E. 2010. Entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu. Archives de Pédiatrie; 17: 140 -144.
- Dortet L., Radu I., Gautier V., Blot F., Chachaty E. *et* Arlet G. 2008. Intercontinental travels of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-3 associated with OXA-9 and TEM-1. J. Antimicrob. Chemother ; 61 (2): 455-457.
- Durante-Mangoni E., Grammatikos A., Utili R. *et* Falagas M.E. 2009. Do we still need the aminoglycosides? International Journal of Antimicrobial Agents; 33: 201-205.

E

- El Bakkouri J., Belabbes H., Zerouali K., Belaiche A., Messaouidi D., Gros Claude J. D. P. *et* El Mdaghri N. 2009. Résistance aux Antibiotiques d'*Escherichia coli* Uropathogène Communautaire et Consommation d'Antibiotiques à Casablanca (Maroc). European Journal of Scientific Research ISSN 1450-216X; 36 (1): 49-5.
- Elloumi A., Ghedira D., Bannour J., Golli R., Soua H. *et* Riba M. 2010. Pertinence de la prescription de l'imipénème. Service de pharmacie, CHU Sahloul, Sousse. Revue Tunisienne d'Infectiologie; 4 (1): 20.

- Elouennass M., Sahnoun I., Zrara A., Bajjou T. et Elhamzaoui S. 2008. Épidémiologie et profil de sensibilité des isolats d'hémoculture dans un service de réanimation (2002–2005). *Médecine et maladies infectieuses*; 38: 18–24.
- Espedido B., Iredell J., Thomas L., et Zelynski A. 2005. Wide dissemination of a carbapenemase plasmid among Gram-negative bacteria: implications of the variable phenotype. *J. Clin. Microbiol*; 43: 4918–4919.
- Eyquem A. et Montagnier L. 2000. *Traité de microbiologie clinique: deuxièmes mises à jour et compléments*. PICCIN. p 33-34.
- Ezaitouni F., Rhou H., Benamar L., Ouzeddoun N., Bayahya R. et Balafrej L. 1999. Rein et aminosides. *Médecine du Maghreb*; 77: 11-15.

F

- Fam N., Gamal D., El Said M., El Defrawy I., El Dadei E., El Attar S., Sorur A., Ahmed S. et Klena J. 2013. Prevalence of Plasmid-Mediated ampC Genes in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae from Cairo, Egypt. *British Microbiology Research Journal*; 3(4): 525-537.
- Fauchère J.L. et Avril J.L. 2002. *Bactériologie générale et médicale*. Ellipses Edition Marketing. Paris. p 250-260.
- Faure S. 2009. Les aminosides, *Pharmacothérapie pratique*. Actualité pharmaceutique ; 482 : 51-55.
- Ferran P. 2009. Impact de l'administration précoce d'une fluoroquinolone sur l'éradication bactérienne et sur la sélection de résistance : approche PK/PD in vitro et in vivo. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse.
- Fluit A.C., Nijssen S., Florijnb A., Bontena M.J.M., Schmitz F.J. et Verhoef J. 2004. β -lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European Enterobacteriaceae isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 24: 585-591.
- Follath F, Costa E, Thommen A, *et al.* 1987. Clinical consequences of development of resistance to third generation cephalosporins. *Eur J Clin Microbiol*; 6: 446-50.
- Frans de Bruijn J. 2011. *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*. John Wiley & Sons. p 800.

- Fraser S.L, Arnett M.et Sinave C.P. 2010. *Enterobacter* Infections. Contributor Information and Disclosures. *emedicine infectious diseases*. Editor, Cunha, B. A., State university of New York School of Medicine at Stony Brook . <http://www.medscape.com>.
- Fritsche T.R., Castanheira M., Miller G.H., Ronald N.J. et Armstrong S. 2008. Detection of Methyltransferases Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*; 52(5): 1843–1845.

G

- Gacar G. G., Midilli K., Kolayli F., Ergen K., Gundes S., Hosoglu S., Karadenizli A., et Vahaboglu H. 2005. Genetic and enzymatic properties of metallo- β -lactamase VIM-5 from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother*; 49: 4400–4403.
- Galani I., Rekatsina P. D., Hatzaki D., Plachouras D., Souli M. et Giamarellou H. 2008. Evaluation of different laboratory tests for the detection of Metallo- β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 6: 548-553.
- Galani, I., Souli M., Chryssouli Z., Orlandou K., et Giamarellou H. 2005. Characterization of a new integron containing blaVIM-1 and aac(6)-IIc in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from Greece. *J. Antimicrob. Chemother* ; 55: 634-638.
- Galimand M., Courvalin P., et Lambert T. 2012. RmtF, a New Member of the Aminoglycoside Resistance 16S rRNA N7 G1405 Methyltransferase Family. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 56 (7): 3960–3962.
- Galimand M., Sabtcheva, S., Courvalin, P. et Lambert, T. 2005. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother*; 49: 2949-2953.
- Gardam M.A., Burrows L.L., Kus J.V., *et al.* 2002. Is surveillance for multidrug-resistant Enterobacteriaceae an effective infection control strategy in the absence of an outbreak? *J Infect Dis*; 186 (12): 1754-1760.
- Garrett R.H. et Grisham C.M. 2000. *Biochimie. De Boeck Supérieur*. p 1254.

- Gharout Sait A., Touati A., Benallaoua S., Guillard Lucien Brasme T., Madoux J. et De champs C. 2012. CTX-M from Community-Acquired Urinary Tract Infections Inalgeria. *Africain Journal Of Microbiology Research*; 6 (25): 5306-5313.
- Giakkoupi P., Tzouveleki L. S., Tsakris A., Loukova V., Sofianou D., et Tzelepi E. 2000. IBC-1, a novel integron-associated class A β -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother*; 44: 2247–2253.
- Gillings M. R., Labbate M., Sajjad A., Giguere N. J., Holley M. P. et Stokes H. W. 2009. «Mobilization of a Tn402-like Class 1 integron with a novel cassette array via flanking MITE-like elements». *Appl Environ Microbiol*; 75: 6002-6004.
- Girard P.-M., Katlama Ch. et Pialoux G. 2007. VIH. Editions Doin. p 727.
- Giraud-Morin C. et Fosse T. 2008. Évolution récente et caractérisation des entérobactéries productrices de BLSE au CHU de Nice (2005–2007). *Pathologie Biologie*; 56: 417-423.
- Girlich D., Poirel L., Leelaporn A., Karim A., Tribuddharat C., Fennewald M. et Nordmann P. 2001. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol* ; 39(1): 175-82.
- Gniadkowski M. 2001. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect*; 7: 597-608.
- Goldstein F.W., Pean Y. et Gertner J. 1995. Resistance to ceftriaxone and other β -lactams in bacteria isolated in the community. The Vigil'Roc Study Group. *Antimicrob Agents Chemother*; 39 (11):2516-9.
- Gould IM. 1999. A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*; 43: 459-65.
- Grimont F. et Grimont P.A.D. 2006. The Genus *Enterobacter*. *Prokaryotes*; 6:197–214.
- Grall N., Andremont A. et Armand-Lefèvre L. 2011. Résistance aux carbapénèmes: vers une nouvelle impasse ? *Journal des Anti-infectieux*; 13 (2): 87–102.
- Guessennnd N., Bremont S., Gbonon V., Kacou- N'Douba A., Ekaza E., Lambert T., Dosso M. et Courvalin P. 2008. Résistance aux quinolones de type qnr chez les

entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire. *Pathologie Biologie*; 56: 439-446.

- Gueudet T., Richter S., Szulc M. et Jehl F. 2010. Les nouvelles formes de résistance des bactéries aux antibiotiques : deux cas de *Klebsiella pneumoniae* produisant une céphalosporinase plasmidique. *Médecine et maladies infectieuses* ; 40: 177-179.
- Guillard T., Cavallo J.-D., Cambau E., Duval V., Bajolet O. Brasme L., de Champs C. et Vernet-Garnier V. 2010. Mise au point d'une technique de PCR en temps réel pour la détection rapide des gènes qnr chez des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu. *Pathologie Biologie (Paris)*; 58 (6): 430–433.
- Guillard T. et Cambau E. 2012. Une brève histoire des résistances plasmidiques aux quinolones. *Journal des Anti-infectieux* ; 15 : 1-8.
- Guillard T., Heckel E. et Galimand M. 2008. Résistance plasmidique aux quinolones chez les bactéries à Gram négatif ; P 1-8.
- Gulmez D., Woodford N., Palepou M.-F.I., Mushtaq S., Metan G., Yakupogullari Y., Kocagoz S., Uzung O., Hascelik G. et Livermore D. M. 2008. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapénèmases and outer membrane protein loss. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 31: 523–526.
- Guneyssel O., Onur O., Erdede M., et Denizbasi A. 2009. Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in urinary tract infections. *The Journal of Emergency Medicine*; 36 (4): 338-341.

H

- Hall B.G. 2004. In vitro evolution predicts that the IMP-1 metallo- β -lactamase does not have the potential to evolve increased activity against imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother*; 48: 1032–1033.
- Hammami S., Boutiba-Ben Boubaker I., Saidani M. *et al.* 2012. Characterization and molecular epidemiology of extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacter cloacae* isolated from a Tunisian hospital. *Microb Drug Resist* ; 18: 59-65.

- Hamze M., Dabboussi F. et Izard D. 2003. Enterobacterial susceptibility to antibiotics in northern Lebanon (1998-2001). Cahiers d'études et de recherches francophones / Santé; 13(2): 107-12.
- Hansson K., Sundstrom L., Pelletier A. et Roy P. H. 2002. «IntI2 integron integrase in Tn7». J Bacteriol; 184 (6): 1712-1721.
- He G.-X., Thorpe C., Wash D., Crow R., Chen H.-Z., Kumar S., et Varela M. F.. 2011. EmmdR, a New Member of the MATE Family of Multidrug Transporters, Extrudes Quinolones from *Enterobacter cloacae*. Arch Microbiol; 193 (10): 759-765.
- Ho PL., Yam WC., Tsang KWT et Lai WM. 2009. Detection and characterisation of extended-spectrum β -lactamases among blood stream isolates of *Enterobacter species* in Hong Kong. Hong Kong Med J; 15(19) : 4-5.
- Ho P.L., Shek R.H., Chow K.H., Duan R.S., Mak G.C., Lai E.L., Yam W.C., Tsang K.W. et Lai W.M. 2005. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases among bloodstream isolates of *Enterobacter spp.* in Hong Kong, 2000–2002. J. Antimicrob. Chemother; 55: 326–332.
- Hoffmann H., Sturenburg E., Heesemann J. et Roggenkamp A. 2006. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in isolates of the *Enterobacter cloacae* complex from German Hospitals. Clin. Microbiol. Infect; 12: 322-330.
- Holmes A.J., Gillings M.R., Nield B.S., Mabbutt B.C., Nevalainen K.M. et Stokes H.W. 2003. «The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution». Environ Microbiol; 5 (5): 383-394.
- Honoré S., Lascols C., Malin D., Targaouchi R., Cattoir V., Legrand P., Soussy C.-J. et Cambau E. 2006. Émergence et diffusion chez les entérobactéries du nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones Qnr (résultats hôpital Henri-Mondor 2002–2005). Pathologie Biologie; 54: 270–279.
- Hossain A., Reisbig M.D., et Hanson N.D. 2004. Plasmid-encoded functions compensate for the biological cost of AmpC over-expression in a clinical isolate of *Salmonella typhimurium*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy ; 53: 964-970.
- Huang Z.M., Shan H., Mi Z.H., Yang H.Y., Wu L., Chu Q.J. et Qin L. 2008. Analysis on 168 rRNA methylase genes and aminoglycoside modifying enzymes genes in *Enterobacter cloacae* in China. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi; 29: 369–373.

I

- Iabadene H., Messai Y., Alouache S., Arlet G. et Bakour R. 2010. Mécanismes de résistance aux β -lactamines et aux quinolones d'*Enterobacter* dans les hôpitaux d'Alger. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*; 4 (1): 24.
- Iabadene H., Messai Y., Ammari H., Alouache S., Verdet C., Bakour R. et Arlet G. 2009. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 34(4): 340-342.
- Iabadene H., Messai Y., Ammari H., Ramdani-Bougoussa N., Lounes S., Bakour R. et Arlet G. 2008. Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother*; 62:133–136.

J

- Jacobson K.L., Cohen S.H., Inciardi J.F., *et al.* 1995. The relationship between antecedent antibiotic use and resistance to extended-spectrum cephalosporins in group I β -lactamase-producing organisms. *Clin Infect Dis*; 21: 1107-13.
- Jacoby G.A. 2009. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*; 22 (1): 161-82.
- Jacoby G.A. et Munoz-Price L.S. 2005. The new β -lactamases. *N Engl J Med*; 352: 380-91.
- Jeong S.H., Lee K., Chong Y., Yum J.H., Lee S.H., Choi H.J., Kim J.M., Park K.H., Han B.H., Lee S.W., et Jeong T.S. 2003. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- β -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J. Antimicrob. Chemother*; 51: 397–400.
- Joly B. et Reynaud A. 2007. Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. Edition Techniques et Documentation. Paris. p 3-182.

K

- Kahlmeter G. 2003. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECOSENS Project. *J Antimicrob Chemother*; 51: 69-76.

- Kao C.C., Liu M.F., Lin C.F., Huang Y.C., Liu P.Y., Chang C.W. et Shi Z.Y. 2010. Antimicrobial susceptibility and multiplex PCR screening of AmpC genes from isolates of *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*; 43: 180-187.
- Kartali G., Tzelepi E., Pournaras S., Kontopoulou C., Kontos F., Sofianou D., Maniatis A.N., et Tsakris A. 2002. Outbreak of infections caused by *Enterobacter cloacae* producing the integron-associated β -lactamase IBC-1 in a neonatal intensive care unit of a Greek hospital. *Antimicrob. Agents Chemother*; 46: 1577–1580.
- Kempf M. et Rolain J.M. 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents*; 39 (2): 105-14.
- Kieser T. 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*; 12: 19-36.
- Kim S.-Y., Park Y.-J., Yu J. K *et al.* 2009. Prevalence and characteristics of aac(6')-Ib-cr in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*: a multicenter study from Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 63: 314–318.
- Ko K.S., Lee M.Y., Song J.H. *et al.* 2008. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 61 : 453–459.

L

- Labid A., Gacemi-Kirane D., Timinouni M., Amoura K. et Rolain J.-M. 2014. High prevalence of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producers in fatal cases of pediatric septicemia among the Enterobacteriaceae in the pediatric hospital of Annaba, Algeria. *African Journal of Microbiology Research*; 8(9): 947-954.
- Lahlaoui H., Ben Haj Khalifa A., Kheder M. et Ben Moussa M. 2012. Emergence of SHV-12 extended spectrum β -lactamase among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in Tunisia; 53(2): 64-65.
- Lakhal E., Hammami S., Kammoun A., Ghozzi R., Saidani M., Miled D., Boutiba-Ben Boubaker I. et Slim A. 2010. Suivi des *Enterobacter cloacae* producteurs de β -

lactamases à spectre étendu à l'hôpital Charles Nicolle de Tunis (2000-2009). Revue Tunisienne d'Infectiologie; 4 (1): 23-24.

- Larabi K., Masmoudi A. et Fendri C. 2003. Étude bactériologique et phénotypes de résistance des germes responsables d'infections urinaires dans un CHU de Tunis : à propos de 1930 cas. Médecine et maladies infectieuses; 33: 348-352.
- Larpent J.P. 2000. Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens. Ed. TEC & DOC Paris; p 280.
- Lartigue M.F., Poirel L., Aubert D. et Nordmann P. 2006. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring β -lactamase gene *blaCTX-M* of *Kluyvera ascorbata*. Antimicrob Agents Chemother ; 50: 1282–1286.
- Lautenbach E., Weoltje K. et Malani P. 2010. Practical Healthcare Epidemiology. University of Chicago Press. Third Edition. p 212-213.
- Lautenbach E., Strom B.L., Bilker W.B., Patel J.B., Edelstein P.H. et Fishman N.O. 2001. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum β -lactamase- producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Clin Infect Dis; 33(8): 1288-1294.
- Lefrère J.-J. 2002. Transfusion sanguine: une approche sécuritaire. John Libbey Eurotext. p 450.
- Leotard S. et Negrin N. 2010. Epidémiologie des entérobactéries sécrétrices de β -lactamases à spectre étendu (E-BLSE) au centre hospitalier de Grasse (2005–2008). Pathologie Biologie; 58: 35-38.
- Levison, M. E., Mailapur Y. V., Pradhan S. K., Jacoby G. A., Adams P., Emery C. L., May P. L. et Pitsakis P. G. 2002. Regional occurrence of plasmidmediated SHV-7, an extended-spectrum β -lactamase, in *Enterobacter cloacae* in Philadelphia teaching hospitals. Clin. Infect. Dis; 35: 1551–1554.
- Li X-Z., Mehrotra M., Ghimire S. et Adewoye L. 2007. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. Veterinary Microbiology; 121: 197-214.
- Linde H. J., Notka F., Irtenkauf C., Decker J., Wild J., Niller H. H., Heisig P., et Lehn N. 2002. Increase in MICs of ciprofloxacin in vivo in two closely related clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. J. Antimicrob. Chemother; 49: 625–630.

- Liu J. H., Deng Y. T., Zeng Z. L., Gao J. H., Chen L., Arakawa Y. et Chen Z. L. 2008. Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (8): 2992–2993.
- Livemore D.M., Canton R., Gniadkowski M.P. et al. 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*; 59: 165–74.
- Livermore D.M. et Woodford N. 2006. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*; 14: 413-20.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A. et Darnell J. 2005. *Biologie moléculaire de la cellule : Biologie cellulaire et moléculaire. Édition 3 De Boeck Supérieur ; p 1096.*
- Luzzaro F., Docquier J.-D., Colimon C., Endimiani A., Lombardi G., Amicosante G., Rossolini G.M., et Toniolo A. 2004. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother*; 48: 648–650.

M

- Mac Aogáina M., Mooija M. J., Adamsa C., Clairb J. et O'Garaa F. 2010. Emergence of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes among Irish multidrug-resistant isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 67: 106–109.
- Ma J., Zeng Z., Chen Z., Xu X., Wang X., Deng Y., Lu D., Huang L., Zhang Y., Liu J., et Wang M. 2009. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6')-Ib-cr, and qepA among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob Agents Chemother*; 53: 519-24.
- Magnet S. et Blanchard J.S. 2005. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev*; 105: 477-98.
- Mahamat A., Lavigne J.-P., Bouziges N., Daurès J.-P. et Sottob A. 2006. Profils de résistance des souches urinaires de *Proteus mirabilis* de 1999 à 2005 au CHU de Nîmes. *Pathologie Biologie*; 54: 456-461.

- Mamlouk K., Boutiba-Ben Bakour I., Gautie V. et al. 2006. Emergence and outbreaks of CTX-M extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital). J Clin Microbiol; 44: 4049–59.
- Mammeri H., Laurans G., Eveillard M., Castelain S., et Eb F. 2001. Coexistence of SHV-4- and TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* strains before a large outbreak of TEM-24-producing strains in a French hospital. J. Clin. Microbiol ; 39 : 2184–2190.
- Martin C. 2008. Urgences et infections: Guide du bon usage des antibiotiques, antifongiques, antiviraux, antiseptiques. Editions Arnette. p : 41-42.
- Martinez-Martinez L, Pascual A. et Jacoby G.A. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet; 351: 797-9.
- Masuda N., Sakagawa E., Ohya S., Gotoh N., Tsujimoto H. et Nishino T. 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCDOprJ and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother; 44: 3322–3327.
- Materon I. C., Beharry Z., Huang W., Perez C. et Palzkill T. 2004. Analysis of the context dependent sequence requirements of active site residues in the metallo- β -lactamase IMP-1. J. Mol. Biol; 344: 653-663.
- Matsumoto Y., et Inoue M. 1999. Characterization of SFO-1, a plasmid mediated inducible class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother; 43: 307–313.
- Matthew Muller P. 2004. Résistance des bactéries Gram-négatif due aux β -lactamases. American Society for Microbiology 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Meeting. p 17-121.
- Mazel D. 2006. «Integrans: agents of bacterial evolution». Nat Rev Microbiol; 4 (8): 608-620.
- Meradi L., Djahoudi A., Abdi A., Bouchakour M., Perrier Gros Claude J.D. et Timinouni M. 2011. Qnr and aac (6)-Ib-cr types quinolone resistance among Enterobacteriaceae isolated in Annaba, Algeria. Pathol Biol (Paris); 59: 73–8.
- Meradi L., Djahoudi A., Abdi A., Bouchakour M., Perrier Gros Claude J.-D. et Timinouni M. 2009. Résistance aux quinolones de types qnr, aac (60)-Ib-cr chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. Pathologie Biologie (Paris). p 1-6.

- Meyer A., Deiana J. et Bernard A. 2004. Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés : Biosciences et techniques. Editions 2 Doin ; p 430.
- Meyer K.S., Urban C., Eagan J.A., et al. 1993. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann Intern Med*; 119: 353-8.
- Mezghani Maalej S., Rekik Meziou M., Mahjoubi F. et Hammami A. 2012. Epidemiological study of Enterobacteriaceae resistance to colistin in Sfax. *Médecine et maladies infectieuses*; 42: 256–263.
- Michel-Briand Y. 2009. Une histoire de la résistance aux antibiotiques: à propos de six bactéries. Editions L'Harmattan ; p 360.
- Minarini L. A. R., Ana C. Gales et Ana Lucia C. Darini. 2007. First Report of Plasmid-Mediated Resistance to Quinolones and Cefotaxime in an *Enterobacter cloacae* Strain Isolated from an Outpatient in Brazil. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*; 51 (1): 401–402.
- Miriagou V., Carattoli A. et Fanning S. 2006. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes and Infection*; 8: 1923-1930.
- Mkaouar D., Mahjoubi F., Mezghani S., Znazen A., Ktari S. et Hammami A. 2008. Étude de la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération dans les hôpitaux de Sfax, Tunisie (1999–2005). *Médecine et maladies infectieuses*; 38: 293–298.
- Morice V. 2003. Chapitre 7 - Entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif non exigeants. Sur le lien : <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.7.html>.
- Munday C.J., Whitehead G.M., Todd N.J., Campbell M. et Hawkey P.M. 2004. Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum β -lactamases in York, UK. *J. Antimicrob. Chemother*; 54: 628–633.

N

- Naas T. et Nordmann P. 1994. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 91:7693–7697.

- Naas T., Mikami Y., Imai T., Poirel L. et Nordmann P. 2001. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol*; 183(1): 235-249.
- Nauciel C. 2000. Bactériologie médicale: connaissance et pratique. Edition Masson. Paris. p 125-146.
- Nedjai S., Barguigua A., Djahmi N., Jamali L., Zerouali K., Dekhil M. et Timinouni M. 2013. Prevalence and characterization of extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* strains in Algeria. *J Infect Dev Ctries*; 7 (11): 804-811.
- Nedjai S., Barguigua A., Djahmi N., Jamali L., Zerouali K., Dekhil M. et Timinouni M. 2012. Prevalence and characterization of extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Médecine et maladies infectieuses*; 42(1): 20-29.
- Neftel K.A., Zoppi M., Creny A. et Fux C. 2000. Reactions typically shared by more than one class of β -lactam antibiotics. In: M.N.G. Dukes and J.K. Aronson, Meyler's Side Effects of drugs. 14e éd. Amsterdam Elsevier Science. p. 795-800.
- Nicolas-Chanoine M.H., Blanco J., Leflon-Guibout V. *et al.* 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25: H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*; 61(2):273-81.
- Nikaido H. 2000. "Crossing the envelope: how cephalosporin reach their targets." *Clin Microbiol Infect*; 6: 22-26.
- Nobuta K., Tolmasky M.E., Crosa L.M. et Crosa J.H. 1988. Sequencing and expression of the 6'-N-acetyltransferase gene of transposon Tn1331 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol*; 170: 3769–3773.
- Nordmann P. 2004. *Acinetobacter baumannii*, le pathogène nosocomial par excellence. *Pathol Biol*; 52: 301–3.
- Nordmann P. Cuzon G. et Naas T. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*; 9: 28-36.
- Nordmann P. et Mammeri H. 2007. Résistance plasmidique aux quinolones. *Antibiotiques*; 9: 246-53.

- Nordmann P., Mariotte S., Naas T., Labia R. et Nicolas M.-H. 1993. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase for *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*; 37: 939–946.
- Nordmann P. et Poirel L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*; 8(6): 321-31.
- Nseir S., Ader F., Marquette C.-H. et Durocher A. 2005. Impact de l'utilisation des fluoroquinolones sur l'émergence des bactéries multirésistantes. *Pathologie Biologie*; 53: 470-475.

O

- Ogbolua D.O., Daini O.A., Ogunledun A., Alli A.O. et Webber M.A. 2011. High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 37: 62–66.

P

- Paauw A., Fluit Ac., Verhoef J. et Ma L.-V.H. 2006. *Enterobacter cloacae* outbreak and emergence of quinolone resistance gene in dutch hospital. *Emerging infectious diseases*; 12 (5): 807-812.
- Pai H., Hong J.Y., Byeon J.H., Kim Y.K. et Lee H.J. 2004. High prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing strains among blood isolates of *Enterobacter spp.* collected in a tertiary hospital during an 8-year period and their antimicrobial susceptibility patterns. *Antimicrob Agents Chemother*; 48: 3159-3161.
- Papagiannitsis C.C., Studentova V., Chudackova E., Bergerova T., Hrabak J., Radej J. et Novak I. 2013. Identification of a New Delhi metallo- β -lactamase-4 (NDM-4)-producing *Enterobacter cloacae* from a Czech patient previously hospitalized in Sri Lanka. *Folia Microbiologica*; 58 (6): 547-549.
- Park C.H., Robicsek A., Jacoby G.A., Sahm D. et Hooper D.C. 2006. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*; 50: 3953–3955.
- Park Y.J., Park S.Y., Oh E.J., Park J.J., Lee K.Y., Woo G.J. et Lee K. 2005. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases among chromosomal AmpC-producing *Enterobacter*

- cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens* in Korea and investigation of screening criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 51: 265-269.
- Partridge S.R., Tsafnat G., Coiera E. et Iredell J.R. 2009. «Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons». *FEMS Microbiol Rev*; 33(4): 757- 784.
 - Pasteran F. G., Otaegui L., Guerriero L., Radice G., Maggiora R., Rapoport M., Faccione D., Di Martino A. et Galas M. 2008. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Aegentina. *EID Journal Home*; 14(7): 1178-80.
 - Patel J. B., Kamile Rasheed J. et Kitchel B. 2009. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. *Clinical Microbiology Newsletter*; 31 (8): 55–62.
 - Paterson D.L. 2006. Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med*; 119 (1): 20-8.
 - Paterson D.L. 2001. Extended-spectrum β -lactamases: the European experience. *Curr. Opin. Infect. Dis*; 14: 697–701.
 - Paterson D.L. et Bonomo R.A. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*; 18: 657-86.
 - Peirano G. et Pitout J.D.D. 2010. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25: H4. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 35: 316-321.
 - Pelmont J. 2005. Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement. L'Editeur : EDP Sciences. p 798.
 - Perez-Hernandez X., Mendez-Alvarez S., et Claverie-Martin F. 2002. A PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* ; 42: 273–277.
 - Périchon B., Courvalin P. et Galimand M. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*; 51: 2464–2469.
 - Philippon A. 2005. β -lactamases: généralités. Université Paris V - Faculté de Médecine Descartes, Service de Bactériologie - 75014 PARIS. Sur le lien : www.microbesedu.org/mecanisme/bla/generalites.html - 63k.

- Philippon A. et Arlet G. 2006. β -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! *Annales de Biologie Clinique*; 64 (1): 37-51.
- Ploy M.-C., Gassama A., Chainier D. et Denis F. 2005. Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*; 20: 343-352.
- Poirel L., Brinas L., Verlinde A., Ide L. et Nordmann P. 2005. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*; 49: 3743–3748.
- Poirel L., Carrer A., Pitout J.D., et Nordmann P. 2009. Integron Mobilization Unit as a Source of Mobility of Antibiotic Resistance Genes. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*; 53(6): 2492–2498.
- Post V. et Hall R.M. 2009. «Insertion sequences in the IS1111 family that target the attC recombination sites of integron-associated gene cassettes». *FEMS Microbiol Lett*; 290 (2): 182-187.
- Pottumarthy S., Moland E.S., Juretschko S. *et al.* 2003. Nmc Acarbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis*; 9: 999-1002.
- Pourriat J.-L. et Martin C. 2005. *Principes de réanimation chirurgicale*. Editions 2 Arnette. p 1430.
- Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A. 2003. *Microbiologie*. Édition 2 De Boeck Supérieur. p 1164.

Q

- Queenan A.M. et Bush K. 2007. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*; p 440–458.
- Quinn J.P., Miyashiro D., Sahm D. *et al.* 1989. Novel plasmid-mediated β -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 33: 1451-6.
- Quinteros M., Radice M., Gardella N. *et al.* 2003. Extended spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 47: 2864–7.

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

R

- Radice M., Power P., Gutkind G., Fernandez K., Vay C., Famiglietti A., Ricover N., et Ayala J. 2004. First class A carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother*; 48: 1068–1069.
- Rahal K., Benslimani A., Tali-Maamar H., Missoum M. F. K., Kechih- Bounar S. et Ammari H. 2011. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. République Algérienne démocratique et populaire ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière. 6^{eme} édition. p 192.
- Rahal K., Belouni R., Tali-Maamar H., Boudouane M. Missoum M.F.K. et Benslimani A. 2012. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 13^{eme} rapport d'évaluation.
- Rahn O. 1937. New principles for the classification of bacteria. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infek- tionskr. Hyg. Abt*; 2 96: 273-286.
- Rajeev L. 2007. Characterization of the integrase of the *Bacteroides* mobilizable transposon NBU1. ProQuest. p 122.
- Ramirez M.S. et Tolmasky M.E. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes Drug Resistance Updates; 13: 151–171.
- Rasmussen B.A., Bush K., Keeney D., Yang Y., Hare R., O’Gara C. et Medeiros A.A. 1996. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother*; 40: 2080–2086.
- Rather P.N., Mann P.A., Mierzwa R., Hare R.S., Miller G.H. et Shaw K.J. 1993. Analysis of the *aac(3)-VIa* gene encoding a novel 3-*N*-acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother*; 37: 2074–2079.
- Rayamajhi N., Gyun Kang S., Lee D.Y. *et al.* 2008. Characterization of TEM-, SHV- and AmpC-type β -lactamases from cephalosporin resistant *Enterobacteriaceae* isolated from swine. *International Journal of Food Microbiology*; 124: 183-187.

- Recchia G.D. et Hall R.M. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*; 141: 3015–3027.
- Robicsek A., Jacoby G.A. et Hooper D.C. 2006a. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis*; 6: 629–640.
- Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G.A., Macielag M., Abbanat D., Bush K. et Hooper D.C. 2006b. Fluoroquinolone modifying enzyme: a novel adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*; 12: 83–88.
- Rodriguez-Villalobos H. et Struelens M.-J. 2006. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu : implications pour le réanimateur. *Réanimation*; 15: 205-213.
- Rodríguez-Martínez J.M., Velasco C., Pascual A., García I. et Martínez-Martínez L. 2006. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three qnrA-containing plasmids; 12(5): 440-5.
- Rubin M.A. et Samore M.H. 2002. Antimicrobial Use and Resistance. *Curr Infect Dis Rep*; 4: 491-7.
- Ruppé E. 2010. Épidémiologie des β -lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques*; 12(1): 3–16.

S

- Samaha-Kfoury J.N. et Araj G.F. 2003. Recent developments in β -lactamases and extended spectrum β -lactamases. *BMJ. Bmj.com*; 327 (22): 1209-1213.
- Sambrook J. et Russel D.W. 2001. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Ed CSHL PRESS: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1: 2100.
- Samouelian F., Gaudin V. et Boccara M. 2009. *Génétique moléculaire des plantes. Synthèses (INRA) Collection Synthèses*. Editions Quae; p 230.
- Sanders C.C., Ehrhardt A.F., Moland E.S., Thomson K.S., Zimmer B. et Roe D.E. 2002. BlasEN: microdilution panel for identifying β -lactamases present in isolates of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*; 40: 123–7.
- Sandoval C., Walter S.D., McGeer A. *et al.* 2004. Nursing home residents and *Enterobacteriaceae* resistant to third-generation cephalosporins. *Emerg Infect Dis*; 10: 1050-1055.

- Sandvang D. 1999. Novel streptomycin and spectinomycin resistance gene as a gene cassette within a class 1 integron isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*; 43: 3036–3038.
- Sanger F., Nicklen S. et Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; 74(12) : 5463-5467.
- Saouide El ayne N. et Echchelh A. 2014. Role de l'environnement hospitalier dans la prévention des infections nosocomiales: surveillance de la flore des surfaces à l'hôpital El Idrissi de Kenitra–Maroc. *European Scientific Journal* ; 10 (9) : 238-247.
- Schoindre Y. et Bernard L. 2005. Avons-nous besoin de nouveaux antibiotiques ? *Journal de pédiatrie et de puériculture*; 18: 340–342.
- Schwartz D.C. et Cantor C.R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* ; 37: 67.
- Sekhri-Arafa N., Smati F., Scheftel J.M. et Meunier O. 2010. Marqueurs épidémiologiques de souches de *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae* isolées au CHU de Constantine (ALGERIE). *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*; 4(1): 82-98.
- Seonghan K., Jinxin H., Romesh G., Junyoung K., Bokkwon L. et Boyle D.S. 2007. CTX-M Extended-spectrum β -Lactamases. Washington State. Washington Department of Health, Shoreline, Washington, USA; and †Korea Centers for Disease Control and Prevention, Seoul, Republic of Korea. *EID Journal Home*; 13(3): 513-514.
- Shah A.A., Hasan F., Ahmed S. et Hameed A. 2004. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Research in Microbiology*; 155: 409–421.
- Shibata N., Doi Y., Yamane K., Yagi T., Kurokawa H., Shibayama K., Kato H., Kai K. et Arakawa Y. 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by Gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol*; 41: 5407–5413.
- Skurnik D. et Andremont A. 2006. Antibiothérapie sélectionnante: de la théorie à la pratique. *Réanimation*; 15: 198–204.
- Soler Bistué A.J., Martin F.A., Petroni A., Faccone D., Galas M., Tolmasky M.E. et Zorreguieta A.Z. 2006. *Vibrio cholerae* InV117, a class 1 integron harboring *aac(6')-Ib*

and *bla*CTX-M-2, is linked to transposition genes. *Antimicrob. Agents Chemother*; 50: 1903–1907.

- Souna D. 2010. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbes. Département de Biologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen. Mémoire de Magister en Biologie.
- Spanu T., Luzzaro F., Perilli M., Amicosante G., Toniolo A. et Fadda G. 2002. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to β -lactams and other microbial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* ; 46: 196-202.
- Sykes R.B. et Matthew M. 1976. The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* ; 2(2): 115–157.

T

- Tagu D. et Moussard C. 2003. Techniques for molecular biology *Mieux comprendre*. Editions Quae2; p 176.
- Teran F.J., Suarez J.E. et Mendoza M.C. 1991. Cloning, sequencing, and use as a molecular probe of a gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of broad substrate profile. *Antimicrob. Agents Chemother* ; 35: 714–719.
- Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R.V. *et al.* 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal Of clinical microbiology* ; 33(9) : 2233–2239.
- Thomson K.S., Sanders C.C. et Chmel H. 1993. Imipenem resistance in *Enterobacter*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*; 12: 610-613.
- Thuresson A.-C., Kirsebom L.A. et Virtanen A. 2007. Inhibition of poly (A) polymerase by aminoglycosides. *Biochimie*; 89: 1221-1227.
- Touati A., Benallaoua S., Forte D., Madoux J., Brasme L. et De Champs C. 2006. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Béjaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents*; 27(5): 397-402.
- Touati A., Brasme L., Benallaoua S., Gharout A., Madoux J. et De Champs C. 2008a. First report of *qnrB*-producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA*-producing

Acinetobacter baumannii recovered from Algerian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 60: 287–90.

- Touati A., Brasme L., Benallaoua S., Madoux J., Gharout A. et De Champs C. 2008b. *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing CTX-M-15 recovered from hospital environmental surfaces from Algeria. *J Hosp Infect* ; 68(2): 183-5.
- Touati A., Medboua C., Touati D., Denine R., Brasme L. et De Champs C. 2012. CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algiers (Algeria). *International Research Journal of Microbiology* ; 3(5): 181-185.
- Touati A., Zenati K., Brasme L., Benallaoua S. et De Champs C. 2010. Extended-spectrum β -lactamase characterisation and heavy metal resistance of *Enterobacteriaceae* strains isolated from hospital environmental surfaces. *J Hosp Infect* ; 75(1): 78-9.
- Tran J.H., Jacoby G.A. et Hooper D.C. 2005. Interaction of the plasmid encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* ; 49: 118-25.
- Tran van Nhieu G. et Collatz E. 1987. Primary structure of an aminoglycoside 6'-*N*-acetyltransferase AAC (6')-4, fused *in vivo* with the signal peptide of the Tn3-encoded β -lactamase. *J. Bacteriol* ; 169: 5708–5714.
- Trigo C. 2010. Carbapenemases: A Brief Review for Pediatric Infectious Disease Specialists. *Pediatr Infect Dis J*; 29(1): 68-70.
- Trun N.J. et Trempy J.E. 2004. *Fundamental bacterial genetics*. John Wiley & Sons. p 287.

U

V

- Vancraeynest D., Hermans¹ K., Deplano A., Denis O., Meulemans L. et Haesebrouck F. 2005. L'électrophorèse en champ pulsé démontre la clonalité des souches de *Staphylococcus aureus* cunicoles de haute-virulence. 11èmes Journées de la Recherche Cunicole; 237-240.

- Varsha G. 2007. An update on newer β -lactamases. Department of Microbiology, Government Medical College & Hospital, Chandigarh, India. *Indian J Med Res*; 126: 417-427.
- Vaubourdolle M. 2007, *Infectiologie, Le Moniteur des Pharmacies*. Wolters Kluwer France ; 3: 1036.
- Veal W.L., Nicholas R.A. et Shafer W.M. 2002. Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump due to a mtrR mutation is required for chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* ; 184: 5619–5624.
- Vedel G. 1998. Lecture interprétative de l'antibiogramme (interprétation phénotypique). In *outil d'investigation microbiologique en réanimation*. Edition Arnette. p 183-188.
- Verdet C. 2011. Organisation génétique des céphalosporinases acquises [en ligne] Université ParisVI Pierre et Marie Curie. Sur le lien : <http://www.microbe.edu.org/mecanisme/conference/verdet2.pdf>.
- Vidon O. et Bourdin C. 2005. β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Intérêt porté aux CTX-M. Sur le lien : umr5558-mq1.univ-lyon1.fr/.../BétaLactamasesSpectreEtendu?...BétaLactamases...
- Voet D. et Voet J.G. 2005. *Biochimie*. Édition 2 De Boeck Supérieur. p 1600.

W

- Wachino J., Yamane K., Shibayama K. *et al.* 2006. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*; 50: 178-84.
- Walsh T.R. 2010. Emerging carbapenemases: a global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 36(3): 1-8.
- Walther- Rasmussen J. et Hoiby N. 2007. Class A carbapenemases. *J Anti- microb Chemother*; 60: 470 - 482.
- Wang H., Kelkar S., Wu W. *et al.* 2003. Clinical isolates of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases: prevalence of CTX-M-3 at a hospital in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 47: 790–3.

- Winokur P.L., Canton R., Casellas J.M. *et al.* 2001. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis*; 32(2): 94-103.
- Wolff M., Joly-Guillou M.-L. et Pajot O. 2008. Le point sur les carbapénèmes. *Réanimation*; 17: 242-250.
- Woodford N., Zhang J., Warner M. *et al.* 2008. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*; 62: 1261–4.
- Wu J.J., Ko W.C., Tsai S.H. et Yan J.J. 2007. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother*; 51: 1223-1227.
- Wu Q., Liu Q., Han L., Sun J. et Ni Y. 2010. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 and ArmA 16S rRNA methylase conferring high-level aminoglycoside resistance in carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 66: 326-328.

X

Y

- Yamane K., Wachino J.I., Suzuki S. et Arakawa Y. 2008. Plasmid-Mediated *qepA* Gene among *Escherichia coli* Clinical Isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother*; 52(4): 1564–1566.
- Yamane K., Wachino J.I., Suzuki S., Kimura K., Shibata N., Kato H., Shibayama K., Konda T. et Arakawa Y. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolones efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*; 51: 3354–3360.
- Yamasaki K., Komatsu M., Abe N. *et al.* 2010. Laboratory Surveillance for Prospective Plasmid-Mediated AmpC β -actamases in the Kinki Region of Japan. *J of Clin Microbiol*; 48 (9): 3267-3273.

Références bibliographiques

- Yamasaki K., Komatsu M., Yamashita T. *et al.* 2003. Production of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase and IMP-1 metallo β -lactamase by five Gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 51: 631–8.
- Yamashita S.K., Louie M., Simor A.E. et Rachlis A. 2000. Microbiological surveillance and parenteral antibiotic use in a critical care unit. *Can J Infect Dis*; 11: 107-11.
- Yan J.-J., Ko W.-C., Chuang C.-L. et Wu J.-J. 2002. Metallo- β -lactamase- producing *Enterobacteriaceae* isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *J. Antimicrob. Chemother*; 50: 503–511.
- Yang F.C., Yan J.J., Hung K.H. et Wu J.J. 2012. Characterization of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese university hospital. *J Clin Microbiol*; 50(2): 223-6.
- Yang J.L., Wang J.T., Lauderdale T.L. et Chang S.C. 2009. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacter cloacae* in Taiwan and comparison of 3 phenotypic confirmatory methods for detecting extended-spectrum β -lactamase production. *J Microbiol Immunol Infect*; 42 (4): 310-6.
- Yigit H., Queenan A.M., Anderson G.J. *et al.* 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 45: 1151-61.
- Yong D., Toleman M.A., Giske C. *et al.* 2009. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*; 53: 5046-54.
- Yu Y.-S., Du X.-X., Zhou Z.-H., Chen Y.-G. et Li L.-J. 2006. First isolation of *bla*IMI-2 in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from China. *Antimicrob. Agents Chemother*; 50: 1610–1611.
- Yum J.H., Yong D., Lee K., Kim H.-S. et Chong Y. 2002. A new integron carrying VIM-2 metallo- β -lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*; 42: 217–219.

- Yvon M.-B. 2009. Une histoire de la résistance aux antibiotiques: à propos de six bactéries. Editions L'Harmattan; p 229.

Z

- Zhao X., Xua X., Zhua D., Yea X. et Wanga M. 2010. Decreased quinolone susceptibility in high percentage of *Enterobacter cloacae* clinical isolates caused only by Qnr determinants. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease; 67: 110–113.
- Zizhong X., Wanga P., Weia Y., Wanga H., Caoa H., Huang H. et Li J. 2008. Investigation of qnr and aac(6')-Ib-cr in *Enterobacter cloacae* isolates from Anhui Province, China Diagnostic Microbiology and Infectious Disease; 62: 457–459.
- Zogheib E. et Dupont H. 2005. Entérobactéries multirésistantes. Elsevier SAS. p : 153-165. Sur le lien : http://www.sfar.org/sfar_actu/ca05/html/ca05_13/ca05_13.htm#94992.

Annexes

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

Tests	Réactions/enzymes	Résultats négatifs	Résultats positifs
ONPG	β -galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orange
LDC	Lysine decarboxylase	Jaune	Rouge/orange
ODC	Ornithine decarboxylase	Jaune	Rouge/orange
CIT	Citrate utilisation	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/bleu
H ₂ S	H ₂ S production	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urease	Jaune	Rouge/orange
TDA	Tryptophane deaminase	<u>TDA/immédiat</u>	
		Jaune	Marron-rougeâtre
IND	Indole production	<u>JAMES/immédiat</u>	
		Incolore Vert-pâle/jaune	Rose
VP	Acetoin production	<u>VP 1+ VP 2 / 10 min</u>	
		Incolore	Rose/rouge
GEL	Gelatinase	Aucune diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose fermentation/oxidation	Bleu / bleu-vert	Jaune/ jaune gris
MAN	Mannitol fermentation/oxidation	Bleu / bleu-vert	Jaune
INO	Inositol fermentation/oxidation		
SOR	Sorbitol fermentation/oxidation		
RHA	Rhamnose fermentation/oxidation		
SAC	Sucrose fermentation/oxidation		
MEL	Melibiose fermentation/oxidation		
AMY	Amygdalin fermentation/oxidation		
ARA	Arabinose fermentation/oxidation		

Annexe 2. Tableau d'identification du catalogue analytique API 20E

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIKATIONSTABELL / TABELLA IDENTIFIKACYJNA

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIKATIONSTABELL / TABELLA IDENTIFIKACYJNA

% de réactions positives après 18-24 / 48 h à 36°C ± 2°C / % of positive reactions after 18-24 / 48 hrs. at 36°C ± 2°C / % de positiver Reaktionen nach 18-24 / 48 Std bei 36°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 18-24 / 48 h a 36°C ± 2°C / % of reazioni positiva dopo 18-24 / 48 ore a 36°C ± 2°C / % de reações positivas após 18-24 / 48 h a 36°C ± 2°C / % of positive reactions after 18-24 / 48 hr in ved 36°C ± 2°C / % θετικών αντιδράσεων μ.τ.α. από 18-24 / 48 ώρες στους 36°C ± 2°C / % pozitivnych reakcji po 18-24 / 48 godzinach w 36°C ± 2°C

API 20E	W4.0	DN02	ADH	ILC	JUD	OT	H3S	UFE	TOA	IND	VP	GE	3LI	MAN	IND	SCR	RHA	SAC	ME	AMY	ARA	DC	NG2	N2	NOB	M3C	CF0
Agrobacterium agreste	100	0	0	85	25	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	50	0	92	99	100	0	100	0	100	100	
Agrobacterium ananatis	99	89	0	98	75	0	0	0	83	0	0	0	100	100	10	0	0	100	0	100	0	100	0	87	100	100	
Agrobacterium fabae	99	89	0	0	75	0	0	0	50	0	0	0	100	99	0	0	0	0	1	100	0	100	0	85	100	100	
Agrobacterium tumefaciens	90	24	0	99	75	81	0	1	0	0	0	0	100	99	25	99	99	38	40	93	0	100	0	95	100	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 84	98	75	0	100	75	0	1	0	59	0	0	0	100	100	25	99	99	1	1	98	99	0	100	0	95	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 85	98	75	0	100	75	0	1	0	59	0	0	0	100	100	25	99	99	38	40	93	0	100	0	95	100		
Agrobacterium tumefaciens strain 86	100	63	0	1	80	80	0	0	1	0	0	0	100	100	0	0	0	1	100	0	0	25	100	0	95	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 87	0	0	100	99	90	94	0	0	89	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	98	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 88	0	0	100	99	90	94	0	0	89	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	98	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 89	93	0	98	86	82	0	0	0	85	0	0	0	100	99	98	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	97	100
Agrobacterium tumefaciens strain 90	99	80	0	98	40	0	0	0	75	0	0	0	100	100	0	1	100	59	99	99	99	99	0	100	0	92	100
Agrobacterium tumefaciens strain 91	100	25	0	98	80	0	0	0	0	0	0	0	100	95	25	100	0	59	0	100	0	100	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 92	98	82	0	98	99	0	0	0	84	0	0	0	100	100	0	1	100	1	1	100	0	100	0	99	100		
Agrobacterium tumefaciens strain 93	98	82	0	92	90	0	0	0	85	0	0	0	100	99	12	92	85	56	50	99	99	0	100	0	96	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 94	99	0	32	100	75	0	0	0	83	0	0	0	100	99	22	1	100	59	100	98	100	0	100	0	98	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 95	100	96	0	91	94	0	0	0	2	0	0	0	100	97	0	33	99	40	100	99	99	0	100	0	98	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 96	30	1	74	70	0	1	3	2	85	0	0	0	99	98	0	1	91	82	36	75	3	99	0	100	0	95	100
Agrobacterium tumefaciens strain 97	96	1	45	20	0	1	2	55	0	0	0	0	99	98	0	1	42	30	3	1	73	0	100	0	93	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 98	100	0	1	98	100	0	0	0	87	0	0	0	100	99	1	0	100	59	99	99	99	0	100	0	96	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 99	100	31	59	0	1	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	93	25	3	95	95	99	0	100	0	99	100
Agrobacterium tumefaciens strain 100	98	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	93	7	55	95	99	0	100	0	100	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 101	75	0	0	0	0	0	0	0	95	1	0	0	99	98	0	0	1	99	0	1	0	1	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 102	50	0	93	59	1	0	1	0	10	0	0	0	99	98	0	1	1	99	0	3	25	99	0	100	0	95	100
Agrobacterium tumefaciens strain 103	100	0	93	89	88	0	0	0	85	0	0	0	100	99	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0	96	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 104	95	0	80	0	88	0	0	0	78	0	0	0	100	99	100	99	99	99	99	99	99	0	100	0	96	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 105	94	18	25	1	18	0	0	0	80	0	0	0	99	98	0	0	0	99	99	99	99	99	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 106	85	0	0	0	0	0	0	0	75	0	0	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 107	100	0	99	0	52	0	0	0	0	0	0	0	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 108	95	0	25	89	60	0	0	0	80	0	0	0	99	98	0	0	0	99	99	99	99	99	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 109	87	0	0	0	0	0	0	0	98	0	0	0	100	99	0	0	0	99	99	99	99	99	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 110	1	0	10	99	1	1	98	93	93	0	0	0	100	99	0	0	0	100	99	99	99	99	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 111	85	1	0	0	13	0	1	0	63	0	0	0	100	99	1	36	1	38	56	68	64	0	100	0	96	100	
Agrobacterium tumefaciens strain 112	99	1	0	0	0	0	0	0	63	0	0	0	100	99	34	32	90	38	33	99	99	99	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 113	99	1	0	0	0	0	0	0	61	0	0	0	100	99	34	32	90	38	33	99	99	99	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 114	98	1	0	0	0	0	0	0	63	1	0	0	100	99	10	33	60	72	83	99	99	99	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 115	1	0	0	99	50	75	95	39	1	1	1	1	100	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 116	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 117	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 118	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 119	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 120	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 121	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 122	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 123	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 124	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 125	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 126	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 127	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 128	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 129	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 130	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 131	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 132	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 133	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 134	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 135	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 136	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 137	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	100
Agrobacterium tumefaciens strain 138	1	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	100	99	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	96	

Annexe 3. Tableau des Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour les entérobactéries (CA-SFM, 2011).

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques testés	Signe	Charge des disques	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
				S	R	S	R
β-lactamines	Amoxicilline+ Ac.clavulanique	AMC	20/10µg	≤ 4/2	> 8/2	≥21	<16
	Ticarcilline	TIC	75 µg	≤ 8	16	≥24	<22
	Ticarcilline+ Ac.clavulanique	TCC	75/10 µg	≤ 8/2	>16/2	≥24	<22
	Pipéracilline	PIP	75µg	≤ 8	> 16	≥20	<16
	Pipéracilline+ tazobactam	TZP	75/10µg	≤ 8/4	> 16/4	≥ 21	< 17
	Imipénème	IPM	10 µg	≤ 2	> 8	≥24	<17
	Aztréonam	ATM	30 µg	≤ 1	> 8	≥27	<21
	Céfalotine	CF	30 µg	≤ 8	> 32	≥18	<12
	Céfoxitine	FOX	30 µg	≤ 8	> 32	≥22	<15
	Céfotaxime	CTX	30 µg	≤ 1	> 2	≥26	<23
	Céftriaxone	CRO	30 µg	≤ 1	> 2	≥26	<23
	Ceftazidime	CAZ	30 µg	≤ 1	> 8	≥26	<19
Céfépime	FEP	30 µg	≤ 1	> 8	≥24	<17	
Aminosides	Tobramycine	TM	30 µg	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16
	Amikacine	AN	30 µg	≤ 8	> 16	≥17	<15
	Gentamicine	GM	15 µg (10UI)	≤ 2	> 4	≥18	<16
Quinolones	Ac.nalidixique	NA	30 µg	≤ 8	> 16	≥20	<15
	Ofloxacine	OFX	5 µg	≤ 0.5	> 1	≥25	<22
	Ciprofloxacine	CIP	5 µg	≤ 0.5	> 1	≥25	<22
Divers	Colistine	CS	50 µg	≤ 2	> 2	≥15	<15
	Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole	SXT	1,25/23,75µg	≤ 2/38	>4/76	≥16	<13

Annexe 4. Préparation des solutions d'antibiotiques (Courvalin *et al.*, 1991)

Solution initiale (µg/ ml)	Solution mère (ml)	Eau distillée (ml)	Concentration obtenue (µg/ ml)	Concentration finale dans le milieu (µg/ ml)
5120	2	2	2560	256
5120	1	3	1280	128
5120	0,5	3,5	640	64
5120	0,5	7,5	320	32
320	2	2	160	16
320	1	3	80	8
320	0,5	3,5	40	4
320	0,5	7,5	20	2
20	2	2	10	1
20	1	3	5	0,5
20	0,5	3,5	2,5	0,25
20	0,5	7,5	1,25	0,125
1,25	2	2	0,6	0,06

Annexe 5. Solutions et tampons pour l'extraction de l'ADN plasmidique :
Extraction de Kieser (**Kieser, 1984**)

Solutions et tampons	Composition
Réactif de Kieser	sucrose 300 mM
	Tris 25 Mm pH 8
	EDTA 25 Mm pH 8
	vert de bromocrésol 0,02% (p/v)
Solution de lyse	SDS 2% p:v
	NaOH 200 mM
Phénol-chloroforme acide	250µl

**Annexe 6. Solutions et tampons pour l'électrophorèse de l'ADN plasmidique
(Sambrook et Russel, 2001).**

Solutions et tampons	Composition	
Tampon TBE 5 X	Tris base	54g
	Acide borique	27,5g
	EDTA	0,5 M 2ml
	Eau distillée	1 litre
Tampon de charge	Glycérol	3 ml
	Bleu de bromophénol	75 mg
	Eau distillée	7 ml

Annexe 7. Amorces utilisées en PCR

Cible	Amorces	Séquence des amorces	Taille de l'amplicon (pb)
<i>blaTEM</i>	PRETEM-1 PRETEM-2	5'-GTA TCC GCT CAT GAG ACA ATA-3' 5'-TCT AAA GTA TAT ATG AGT AAA CTT GGT CTG-3'	840
<i>blaSHV</i>	SHV A SHV B	5'-TCAGCGAAAAACACCTTG-3' 5'-TTTATGGCGTTACCTTTGACC-3'	1051
<i>blaCTX</i>	CTX-M-1A CTX-M-1B	5'-ACAGCGATAACGTGGCGATG-3' 5'-TCACCCAATGCTTTACCCAG-3'	544
<i>blaECB</i>	ACT-1 F ACT-1 R	5'-TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG-3' 5'-CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT-3'	302
<i>blaCMY-2</i>	CMY-2 F CMY-2 R	5'-TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA-3' 5'-TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC-3'	462
<i>blaIMP</i>	IMP-U IMP-L	CATGGTTTGGTGGTTCTTGT ATAATTTGGCGGACTTTGGC	448
<i>blaVIM</i>	VIM-U VIM-L	ATTGGTCTATTGACCGCGTC TGCTACTCAACGACTGCGCG	780
<i>blaNDM-1</i>	NDM1-F NDM1-R	GCGCAACACAGCCTGACTTT CAGCCACCAAAAAGCGATGTC	155

Annexe 8. Solution et tampon pour électrophorèse en champ pulsé (ECP)

Solution et tampon	Composition	
Tampon de suspension	Tris	10mM
	EDTA	100mM pH=8
	NaCl	20mM
Tampon de lyse	Tris	6mM pH= 7.5
	NaCl	1M
	EDTA	100mM pH=8
	Brij-58 0.5%	0.5%
	Sodium deoxycholate	0.2%
Tampon de la protéinase K	EDTA	0.1% pH=8
	Sarkosyl	1%
	PK	1mg/ml
Tampon de lavage	Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	10 mM
	EDTA	1 mM pH=8
Tampon de restriction	TE buffer	10X 2ml
	BSA	100X 200 µl
	EDS	17.8 ml

ملخص

تعتبر البكتيريا المعوية المدرقية *Enterobacter cloacae* من المسببات الرئيسية للعدوى على مستوى المستشفيات ، و تكمن خطورته في كونه مقاوم للمضادات الحيوية ، خاصة عند إكتسابه نمط بيتالاكتاماز ذو المدى الواسع (BLSE) ونمط سيفالوسبوريناز (AmpC)، و غالبا ما يرتبط مع المقاومة للأمينوكليكوزيد و الكينولون. لقد أجريت هذه الدراسة المتعددة المراكز ذات الأثر الرجعي بغرب الجزائر، لتحديد خصائص مقاومة المضادات الحيوية في السلالات السريرية و البيئية للبكتيريا محل الدراسة .

تم عزل 158 سلالة من هذه البكتيريا المعوية المدرقية خلال الفترة الممتدة من سبتمبر 2009 إلى غاية ماي 2012 من عدة مصالح بالمستشفيات الجامعية لكل من ولاية تلمسان ، سيدي بلعباس و وهران. عند تحليل أنماط المقاومة للبيتالاكتامين تم اكتشاف تنوع مذهري لهذه المقاومة ، مع هيمنة السلالات المنتجة لبيتالاكتاماز (BLSE) ذو المدى الواسع بنسبة مئوية مقدرة بـ: 51.3%. تم تحديد واحد وعشرين مظهر بواسطة الإليكتوفوراز ذو الحقل النابض مؤكدا وجود العديد من المستقرات الطبيعية المستنسخة. معظم سلالات البيكتيريا المدروسة أنتجت نمط بيتالاكتاماز (BLSE) ذو المدى الواسع من نوع CTX-M، فيما أنتجت 5 سلالات أخرى نمط بيتالاكتاماز (BLSE) ذو المدى الواسع من نوع SHV . تم العثور على الجينات bla_{TEM} في جميع السلالات، فيما وجد الجينات bla_{CMY-2} في سلالة واحدة فقط و التي تم إنتقالها عن طريق إلكتروبوراسيون. التجارب المقترنة بالجينات التالية: bla_{TEM} و bla_{SHV} و bla_{CTX-M} ، أظهرت أنها محمولة في بلازميدات عالية الوزن الجزئي أكثر من 70 Kb.

هذه النتائج تظهر أن مؤشر التردد لهذه البيكتيريا المتعددة المقاومة في تزايد مقلق على مستوى مستشفياتنا، أو بعبارة أخرى فإن إنتشارها يمثل خطرا وبائيا حقيقيا، و يعقد عملية العلاج ، مما يتوجب علينا مراقبة محيط البكتيريا في المستشفى و تطبيق الصارم للتدابير النظافة.

الكلمات المفتاحية. *Enterobacter cloacae* ؛ بيتالاكتاماز ذو المدى الواسع ؛ المضادات الحيوية ؛ المقاومة ؛ الغرب الجزائري.

Résumé

Enterobacter cloacae est un pathogène majeur impliquée dans les infections nosocomiales. Sa pathogénicité est exacerbée par sa résistance aux antibiotiques, notamment acquise, par les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) et les céphalosporinases plasmidiques (pAmpC), souvent associées à la résistance aux aminosides et quinolones. Une étude multicentrique rétrospective, dans trois hôpitaux de l'ouest algérien, a été menée pour caractériser la résistance aux antibiotiques chez les souches cliniques et environnementales d'*E.cloacae*.

158 souches ont été isolées pendant la période de septembre 2009 à mai 2012 dans divers services des centres hospitalo-universitaires de Tlemcen, Sidi Bel Abbes et Oran. L'analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines a permis de détecter une diversité avec dominance des souches productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) soit 51.3%. Vingt et un pulsotypes ont été déterminés par électrophorèse en champ pulsé qui confirme la présence de divers clones. La plupart des isolats produisent une BLSE de type CTX-M, alors que seulement 5 produisent une BLSE de type SHV. Le gène *bla*_{TEM} a été retrouvé chez toutes les souches d'*E.cloacae*. Les produits PCR ont montré qu'une souche était productrice d'une β -lactamase de type *bla*_{CMY-2} à médiation plasmidique dont le gène a été transféré par électroporation. Les expériences de conjugaisons montrent que les gènes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, les *bla*_{SHV} sont portés par des plasmides conjugatifs de haut poids moléculaire (≥ 70 kb).

Ces résultats montrent que la fréquence de ces bactéries multirésistantes augmente de façon inquiétante dans nos établissements de soin et leur émergence représente un sérieux problème thérapeutique et épidémiologique, d'où la nécessité de la mise en place d'un système de surveillance de l'environnement microbien de l'hôpital et l'application stricte des mesures d'hygiène.

Mots clés. *Enterobacter cloacae* ; β -lactamase à spectre étendu ; Antibiotique ; Résistance ; Ouest algérien.

Summary

Enterobacter cloacae is a major pathogen responsible of nosocomial infections. Pathogenicité is exacerbated by its resistance to antibiotics, acquired by extended spectrum β -lactamases (ESBL) and plasmid AmpC (pAmpC), often associated with resistance to aminoglycosides and quinolones. A multicenter retrospective cohort study was carried out to gain baseline information on antibiotics resistance of *E.cloacae* in tree hospitals in the west of Algeria.

158 strains were isolated between September 2009 and May 2012 from various units in the hospitals of Tlemcen, Sidi Bel Abbes and Oran. The analysis of resistance phenotypes to β -lactam has detected diversity phenotypic with dominance of strain producing extended spectrum β -lactamase (ESBL) or 51.3%. Twenty-one pulsotypes were determined by pulsed field gel electrophoresis confirming the presence of various clones. The most isolates produced ESBL CTX-M type, whereas only 5 produced SHV-type ESBLs. The *bla*_{TEM} gene was found in all strains of *E.cloacae*. One isolate was found to produce plasmid-mediated AmpC β -lactamases (CMY-2), this gene was transferred from *E.cloacae* by eletroporation. Conjugation experiments showed that *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{SHV} were carried by conjugative plasmids of high molecular weight (≥ 70 kb).

These results show that the frequency of these multiresistant bacteria increasing dramatically in our hospitals and their emergence represents a serious therapeutic and epidemiological problem, hence the need for the establishment of a monitoring system of the microbial environment and strict application of hygiene measures.

Keywords. *Enterobacter cloacae* ; Extended-spectrum β -lactamase ; Antibiotic ; Resistance ; West of Algeria.

ملخص

تعتبر البكتيريا المعوية المدرقية *Enterobacter cloacae* من المسببات الرئيسية للعدوى على مستوى المستشفيات ، و تكمن خطورته في كونه مقاوم للمضادات الحيوية ، خاصة عند إكتسابه نمط بيتالاكتاماز ذو المدى الواسع (BLSE) ونمط سيفالوسبوريناز (AmpC)، و غالبا ما يرتبط مع المقاومة للأمينوكليكوزيد و الكينولون. لقد أجريت هذه الدراسة المتعددة المراكز ذات الأثر الرجعي بغرب الجزائر، لتحديد خصائص مقاومة المضادات الحيوية في السلالات السريرية و البيئية للبكتيريا محل الدراسة. تم عزل 158 سلالة من هذه البكتيريا المعوية المدرقية خلال الفترة الممتدة من سبتمبر 2009 إلى غاية ماي 2012 من عدة مصالح بالمستشفيات الجامعية لكل من ولاية تلمسان ، سيدي بلعباس و وهران. عند تحليل أنماط المقاومة للبيتالاكتامين تم اكتشاف تنوع مذهري لهذه المقاومة ، مع هيمنة السلالات المنتجة للبيتالاكتاماز (BLSE) ذو المدى الواسع بنسبة مئوية مقدرة بـ: 51.3%. تم تحديد واحد وعشرين مظهر بواسطة الإليكتروفوراز ذو الحقل النابض مؤكدا وجود العديد من المستفردات الطبيعية المستنسخة. معظم سلالات البيكتيريا المدروسة أنتجت نمط بيتالاكتاماز (BLSE) ذو المدى الواسع من نوع CTX-M، فيما أنتجت 5 سلالات أخرى نمط بيتالاكتاماز (BLSE) ذو المدى الواسع من نوع SHV. تم العثور على الجينات bla_{TEM} في جميع السلالات، فيما وجد الجينات bla_{CMY-2} في سلالة واحدة فقط و التي تم إنتقالها عن طريق إلكتروبوراسيون. التجارب المقترنة بالجينات التالية: bla_{CTX-M} و bla_{SHV} و bla_{TEM} ، أظهرت أنها محمولة في بلازميدات عالية الوزن الجزيئي أكثر من 70 Kb. هذه النتائج تظهر أن مؤشر التردد لهذه البيكتيريا المتعددة المقاومة في تزايد مقلق على مستوى مستشفياتنا، أو بعبارة أخرى فإن إنتشارها يمثل خطرا وبائيا حقيقيا، و يعقد عملية العلاج ، مما يتوجب علينا مراقبة محيط البكتيريا في المستشفى و تطبيق الصارم للتدابير النظافة.

الكلمات المفتاحية: *Enterobacter cloacae* ؛ بيتالاكتاماز ذو المدى الواسع ؛ المضادات الحيوية ؛ المقاومة ؛ الغرب الجزائري.

Résumé

Enterobacter cloacae est un pathogène majeur impliquée dans les infections nosocomiales. Sa pathogénicité est exacerbée par sa résistance aux antibiotiques, notamment acquise, par les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) et les céphalosporinases plasmidiques (pAmpC), souvent associées à la résistance aux aminosides et quinolones. Une étude multicentrique rétrospective, dans trois hôpitaux de l'ouest algérien, a été menée pour caractériser la résistance aux antibiotiques chez les souches cliniques et environnementales d'*E. cloacae*. 158 souches ont été isolées pendant la période de septembre 2009 à mai 2012 dans divers services des centres hospitalo-universitaires de Tlemcen, Sidi Bel Abbes et Oran. L'analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines a permis de détecter une diversité avec dominance des souches productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) soit 51.3%. Vingt et un pulsotypes ont été déterminés par électrophorèse en champ pulsé qui confirme la présence de divers clones. La plupart des isolats produisent une BLSE de type CTX-M, alors que seulement 5 produisent une BLSE de type SHV. Le gène bla_{TEM} a été retrouvé chez toutes les souches d'*E. cloacae*. Les produits PCR ont montré qu'une souche était productrice d'une β -lactamase de type bla_{CMY-2} à médiation plasmidique dont le gène a été transféré par électroporation. Les expériences de conjugaisons montrent que les gènes bla_{CTX-M} , bla_{TEM} , les bla_{SHV} sont portés par des plasmides conjugatifs de haut poids moléculaire (≥ 70 kb). Ces résultats montrent que la fréquence de ces bactéries multirésistantes augmente de façon inquiétante dans nos établissements de soin et leur émergence représente un sérieux problème thérapeutique et épidémiologique, d'où la nécessité de la mise en place d'un système de surveillance de l'environnement microbien de l'hôpital et l'application stricte des mesures d'hygiène.

Mots clés. *Enterobacter cloacae* ; β -lactamase à spectre étendu ; Antibiotique ; Résistance ; Ouest algérien.

Summary

Enterobacter cloacae is a major pathogen responsible of nosocomial infections. Pathogenicity is exacerbated by its resistance to antibiotics, acquired by extended spectrum β -lactamases (ESBL) and plasmid AmpC (pAmpC), often associated with resistance to aminoglycosides and quinolones. A multicenter retrospective cohort study was carried out to gain baseline information on antibiotics resistance of *E. cloacae* in tree hospitals in the west of Algeria. 158 strains were isolated between September 2009 and May 2012 from various units in the hospitals of Tlemcen, Sidi Bel Abbes and Oran. The analysis of resistance phenotypes to β -lactam has detected diversity phenotypic with dominance of strain producing extended spectrum β -lactamase (ESBL) or 51.3%. Twenty-one pulsotypes were determined by pulsed field gel electrophoresis confirming the presence of various clones. The most isolates produced ESBL CTX-M type, whereas only 5 produced SHV-type ESBLs. The bla_{TEM} gene was found in all strains of *E. cloacae*. One isolate was found to produce plasmid-mediated AmpC β -lactamases (CMY-2), this gene was transferred from *E. cloacae* by eletroporation. Conjugation experiments showed that bla_{CTX-M} , bla_{TEM} , and bla_{SHV} were carried by conjugative plasmids of high molecular weight (≥ 70 kb). These results show that the frequency of these multiresistant bacteria increasing dramatically in our hospitals and their emergence represents a serious therapeutic and epidemiological problem, hence the need for the establishment of a monitoring system of the microbial environment and strict application of hygiene measures.

Keywords. *Enterobacter cloacae* ; Extended-spectrum β -lactamase ; Antibiotic ; Resistance ; West of Algeria.