

N° d'Ordre : الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

# Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

**Domaine** : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

**Filière** : Biotechnologies

**Spécialité** : Biotechnologie microbienne

Intitulé du thème :

**Etude de l'antibiorésistance des  
Entérobactéries aux quinolones par PCR  
multiplexe chez les patients atteints d'une  
infection urinaire**

*Présenté par : Melle RABA Manel, Melle Neggaz Chaimaâ*

*Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :*

Président de jury : **Mr Benine Mohamed Lamine** (Docteur/UDL/SBA)

Examineur : **Mme Kanoun Khadidja** (Docteur/UDL/SBA)

Promoteur : **Mr Tifrit Abd el Karime** (Docteur/UDL/SBA)

*Année universitaire 2019– 2020*

**N° d'Ordre :**

**Session : « Septembre »**

**الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية**  
**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES**

**FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE**

# **Mémoire**

**De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)**

**Filière : Biotechnologies**

**Spécialité : Biotechnologie microbienne**

**Intitulé du thème**

**Etude de l'antibiorésistance des  
Entérobactéries aux quinolones par PCR  
multiplexe chez les patients atteints d'une  
infection urinaire**

Présenté par : **Melle. RABA Manel, Melle Neggaz Chaimaâ**

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury : **Mr Benine Mohamed Lmine (Docteur/UDL/SBA)**

Examineur : **Mme Kanoun Khadidja (Docteur/UDL/SBA)**

Promoteur : **Mr Tifrit Abd El Karime (Docteur/UDL/SBA)**

**Année universitaire 2019 – 2020**

**Session : « Septembre »**

## **REMERCIEMENTS**

*A Monsieur le professeur **Abbouni Bouziane**, et Monsieur le Professeur **Abd El Karim Tifrit**, qui ont accepté de consacrer de leur temps à la lecture et à l'appréciation de ce manuscrit, qu'ils trouvent ici le témoignage de notre respectueuse gratitude.*

*Nous tenons à remercier sincèrement les membres du jury:*

*Le Monsieur **Benine Mohamed Lamine**, Professeur à l'université de Djilali Liabes de Sidi Bel Abbès qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.*

*À Madame **Kanoun Khadidja**, Professeur à l'université de Djilali Liabes de Sidi Bel Abbès pour sa disponibilité à juger ce présent travail.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail à  
... L'ETERNEL, DIEU tout puissant...*

*Je dédie fruit à ceux  
Qui m'ont nourri d'amour, enveloppé de confort  
Mes parents*

*Rien de tout cela n'aurait été possible sans vous. Merci pour votre  
soutien sans faille, votre patience infinie et les encouragements  
tout au long de mes études.*

*A Mes chères sœurs*

*Lamisse, Hadil, Rania  
Qu'Allah les garde*

*A mes très chères amis*

*Chaimaâ, Naima, Loubna, Karine, Suzan, Amine, Youssef,  
Ibrahim,  
SAfia, Hanane.*

*qui n'ont jamais cessé de prier pour moi, qui ont toujours été à  
mes côtés et m'ont tendu la main dans les moments les plus  
difficiles. Acceptez donc ici l'hommage de ma gratitude et mon  
grand merci.*

*A ma chère copine et binôme  
Chaimaâ*

*A toute la promotion de Biotechnologie microbienne.  
A toutes les personnes m'ayant consacré un moment pour  
m'aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire.  
A tous mes professeurs dans tous les cycles de ma scolarité qui  
mon éclairé la voie du savoir.*

*Manel Raba*

# *Dédicace*

*Pour la propriétaire du nom qui n'a pas été repris par ma langue,  
et le soleil du suret é qui était absent du ciel de ma vie, à l'âme du  
mon cher père que dieu Pitie de lui*

*A ma chère mère*

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

*A mes chers frères :  
Hocine ; Ouahid, Mohamed Said .*

*A mes sœurs :  
Noor-Imane, Zahia .*

*pour toute l'affection qu'ils m'ont donné et pour leurs  
encouragements. Avec mon grand amour et toute ma tendresse, je  
vous souhaite un avenir plein de joie, de réussite et surtout de  
santé.*

*A ma très chère grand-mère, Puisse dieu vous accorde santé,  
longue vie et prospérité.*

*A mes chères tantes : Faiza, Hacina, Khadidja, Fatima-zohra.  
Pour mes très chères amies : Manel, Imane, Cherifa, Aya, Malek,  
Fatima.*

*Aussi beaucoup d'autres personnes que je n'ai pas eu l'occasion  
de les mentionner.*

*Neggaz chaimaa*

## Résumé

L'émergence et la dissémination des bactéries uropathogènes multirésistantes constituent un véritable problème de santé humaine et animale. Dans ce contexte, notre travail portait sur l'étude de la résistance aux Quinolones des souches « *Entérobactéries* » provenant de patients atteints d'une infections urinaire par PCR Multiplexe.

Cette étude moléculaire indique une présence de plasmides de résistance aux antibiotiques et des plasmides conjugatifs en concentrations différentes. L'expérience de transformation réalisée a bien montré que ce transfert est inversement proportionnel à la taille moléculaire de l'insert par l'acquis du plasmide de la petite taille.

Les taux de résistance aux quinolone indique que les quinolones gardent toujours leurs efficacités, mais le faite que cette résistance soit presque toujours associée à une résistance aux  $\beta$  lactamine et /ou aux aminosides (souches multirésistantes) et en plus le caractère transférable de cette résistance; nous mène à conclure qu'il faut être plus attentifs dans l'utilisation thérapeutique de ces molécules : Ainsi, on préconise de ne jamais prescrire les quinolones en monothérapie et en première intension ce qui présente un grand risque de sélection des souches multirésistantes, et leurs utilisations en seconde intension doit être prescrit seulement après un test de sensibilité aux antibiotiques et toujours en association. L'expérience de transformation réalisée à partir des espèces d'*E.coli* multirésistantes dans la souche compétente *E.coli* a bien montré que ce transfert est inversement proportionnel à la taille moléculaire de l'insert par l'acquis du plasmide de la petite taille.

### Mots clé :

Antibiorésistance, entérobactéries, , antibiotique, quinolones, plasmide , transformation.

## ملخص

إن ظهور البكتيريا المسببة للأمراض البولية المقاومة للأدوية وانتشارها يمثل مشكلة حقيقية تتعلق بصحة الإنسان والحيوان. في هذا السياق ، ركز عملنا على دراسة مقاومة الكينولون " مضاد حيوي " لسلاسل "Enterobacteriaceae" المستخلصة من عينات لمرضى التهابات المسالك البولية بواسطة تقنية Multiplex PCR. تشير هذه الدراسة الجزيئية إلى وجود بلازميدات مقاومة للمضادات الحيوية وبلازميدات مقترنة بتركيزات مختلفة. أظهرت تجربة التحويل التي أجريت أن هذا النقل يتناسب عكسياً مع الحجم الجزيئي للإدخال من خلال الحصول على البلازميد الصغير الحجم.

تشير معدلات مقاومة الكينولونات إلى أن الكينولون لا تزال تحتفظ بفعاليتها ، ولكن حقيقة أن هذه المقاومة ترتبط دائماً تقريباً بمقاومة  $\beta$ -lactam و / أو aminoglycosides (سلاسل متعددة المقاومة) بالإضافة إلى الطبيعة القابلة للتحويل لهذه المقاومة ؛ يقودنا إلى استنتاج أنه يجب علينا أن نكون أكثر حرصاً في الاستخدام العلاجي لهذه الجزيئات: وبالتالي ، فإننا نوصي أبداً بعدم وصف الكينولون في العلاج الأحادي والشدة الأولى مما يمثل خطراً كبيراً في اختيار السلالات متعددة المقاومة ، واستخداماتها في الشد الثاني يجب ألا يوصف إلا بعد اختبار الحساسية للمضادات الحيوية ودائماً في توليفة تجربة التحويل التي أجريت من أنواع E. coli متعددة المقاومة في سلالة E. coli المختصة أظهرت بوضوح أن هذا النقل يتناسب عكسياً مع الحجم الجزيئي للإدخال من خلال الحصول على البلازميد صغير الحجم. .

## الكلمات المفتاحية

مقاومة المضادات الحيوية ، المعوية ، المضادات الحيوية ، كينولون ، البلازميد ، التحويل.

## ***Abstract***

The emergence and dissemination of multidrug-resistant uropathogenic bacteria is a real human and animal health problem. In this context, our work focused on the study of the resistance to Quinolones of "Enterobacteriaceae" strains from patients with urinary tract infections by Multiplex PCR.

This molecular study indicates the presence of antibiotic resistance plasmids and conjugative plasmids in different concentrations. The transformation experiment performed clearly showed that this transfer is inversely proportional to the molecular size of the insert by the acquisition of the small plasmid.

The rates of resistance to quinolones indicate that quinolones still retain their efficacy, but the fact that this resistance is almost always associated with resistance to  $\beta$ -lactam and / or aminoglycosides (multiresistant strains) and in addition the transferable nature of this resistance; leads us to conclude that we must be more careful in the therapeutic use of these molecules: Thus, we recommend never prescribing quinolones in monotherapy and in first intension which presents a great risk of selection of multiresistant strains, and their uses in second intension should only be prescribed after a sensitivity test to antibiotics and always in combination. The transformation experiment carried out from multiresistant E. coli species in the competent E. coli strain clearly showed that this transfer is inversely proportional to the molecular size of the insert by the acquisition of the small-sized plasmid.

### **Key words:**

Antibiotic resistance , Enterobacteriaceae, antibiotic, quinolones, plasmid, transformation.



## Liste des abréviations

- **μL** : Microlitre
- **aac(6')-Ib** : Amorce d'ADN
- **ADH** : Arginine dihydrolase
- **AMC**: *AmoxicillineClavulanate*
- **AML** : *Amoxicilline*
- **AN** : *Amikacine*
- **API 20<sup>e</sup>**: Appareillage et procédé d'identification
- **ATB** :Les antibiotiques
- **BCP** : Bromo Crésol Pourpre (milieu de culture non sélectif, lactosé utilisé pour l'identification de bactéries).
- **bla** : Gène codant une β-lactamase
- **bla CTXM-Groupe1** : Amorce d'ADN
- **bla CTXM-Groupe2** : Amorce d'ADN
- **bla CTXM-Groupe9** : Amorce d'ADN
- **bla SHV** : Amorce d'ADN
- **bla TEM** : Amorce d'ADN
- **C1** : cassette n° 1
- **C1G** :céphalosporine de 1ère génération
- **C2** : cassette n°2-
- **C2G** :céphalosporine de 2ème génération
- **C3G** :céphalosporine de 3ème génération
- **C4G** :céphalosporine de 4ème génération
- **CASFM** :Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
- **CA-SFM** : comité français de l'antibiogramme de la société française de microbiologie
- **CIP** : *Ciprofloxacin*
- **CIT** :Citrate
- **CMI** :concentration minimale inhibitrice
- **CMY 2** : Amorce d'ADN
- **CMY** :Céphamycinase
- **CPO** : Céfpirume
- **CR** : **région commune**
- **CT** : Colistine
- **CTX M** :Cefotaximase Munich
- **CTX**: *Cefotaxime*
- **Dha** : DHArhanhospital
- **EDTA** :acide éthylènediaminetétraacétique
- **Gln** : glutamine
- **FEP** : Céfèpime

- **FOX** : *Cefoxitine*
- **FT** : nitrifurane
- **GAZ** : Céftazidime
- **GEL** :Gélatine
- **GM** : *Gentamicine*
- **H2S** :Thiosulfate de sodium
- **IMP**: *Imipenem*
- **IND** :Indole
- **IR** : intégrons de résistance
- **IS** : séquence d'insertion
- **ISCR1** :Intégrons and insertion sequencecommonregion 1
- **LDC** :Lysine décarboxylase.
- **NA**: *Acide nalidixique*
- **NI** : *Nitroxoline*
- **NOR** : Norfloxacin
- **ODC** :Omithine décarboxylase
- **OFX** : Ofloxacin
- **Pc** : promoteur des cassettes
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **PH** : Potentiel d'hydrogène
- **QNR** :quinolone resistance
- **RA** : Rifampicine
- **RIP** : Pipéraciline
- **SHV** : Sulfhydrylreagent Variable
- **SXT** : *Cotrimoxazole*
- **Taq** : Thermusaquaticus
- **TCA** : Trypticase soya Agar
- **TDA** :Tryptophane désaminase
- **TEM** :Temoneira : nom du patient
- **TET**: *Tetracycline*
- **TIC** : *Ticarcilline*
- **UFC** :Unités formant colonies.
- **URE** :Urée
- **URIS ELECTE4** :
- **Veb** : Amorçe d'ADN
- **VEB** : Vietnam Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase
- **VP** :Pyruvate de sodium
- **Pb** : **Paire de bas**

# Table des matières

Liste des abréviations.....	I
Liste des tableaux.....	III
Liste des figures.....	V
Introduction .....	01

## Partie I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### **Chapitre I : Support génétique de la résistance bactérienne aux ATB**

<b>1. La résistance chromosomique.....</b>	<b>5</b>
<b>2. La résistance extra-chromosomique (plasmides).....</b>	<b>6</b>
• Les plasmides .....	6
• Les transposons.....	7
• Les intégrons.....	9
• La plateforme fonctionnelle .....	9
<b>Les moyens de transfert génétique .....</b>	<b>12</b>
1 La transformation.....	13
2 La conjugaison.....	13
3 La transduction.....	14

### **Chapitre n°2 « Les antibiotiques et l'antibiorésistance »**

<b>1. Antibiotique.....</b>	<b>18</b>
1.2 classification des antibiotiques.....	18
1.3 Mécanismes d'action des ATB.....	19
1.3 Les Quinolones .....	20
1.4 Relation structure-activité.....	21
1.5 Classification.....	21
1.6 Mode d'action.....	23
1.7 Utilisation des quinolones.....	25
<b>2. Résistance des entérobactéries aux quinolones.....</b>	<b>26</b>
I. Mécanismes de résistance.....	26
II. Epidémiologie de la résistance plasmidique aux quinolones.....	31
III. Association Qnr-BLSE.....	31
IV. Environnement génétique des gènes qnr.....	31

## **Partie II : MATERIEL & METHODES**

<b>Objectif de l'étude</b> .....	33
<b>A.L'identification des entérobactéries</b> .....	33
1. Questionnaire.....	33
2. L'échantillonnage et Recueil des urines.....	33
3. Conservation et transport des urines.....	33
4. Collecte de souches bactériennes.....	33
5. Repiquage et identification des souches.....	33
- Isolements sur milieu chromogène « URISelect.....	33
- Galerie API 20E.....	34
<b>B.Etude de la résistance des souches d'entérobactéries aux antibiotiques.</b>	<b>35</b>
B.1. Antibiogramme.....	35
B.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	35
• Détermination des CMI de la ciprofloxacine en milieu solide (CA-SFM, 2007).....	38
B.3. Extraction de l'ADN Total.....	39
B.4. Dépistage du Gène qnr par La PCR Multiplex.....	40
B.5. Dépistage du Gène aac (6')-Ib par PCR.....	41
B.6. Dépistage des gènes de $\beta$ - Lactamase et de ampC par PCR.....	41
B.7. Analyse des produits de PCR.....	41
B.8. Purification des produits PCR.....	42
B.9. Séquençage des produits PCR.....	42
• Conjugaison et transfert de la résistance.....	46
<b>Résultat et discussion</b>	
1. L'identification des souches .....	49
2. Répartition des souches par espèce.....	49
3. 3.Analyse des phénotypes de résistance.....	50
3.1. Déduction des phénotypes de résistance aux quinolones .....	50
3.2 L'antibiogramme .....	51
Mécanismes moléculaires de résistance aux quinolones.....	51
Etude du transfert de la résistance aux quinolones .....	53
La conjugaison.....	58
Discussion.....	59
Conclusio.....	61
Références bibliographiques.....	64
Annexes	

## *Listes des figures*

Figure 1 Les types de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Ourvalin,2008).....	5
Figure 2: Un plasmide R avec des gènes de résistance portés dans un transposon (Carroll et al, 2013).....	7
Figure 3 Structure d'une séquence d'insertion (IS) (Mainil et Muylaert, 2013).....	7
Figure 4: Structure des transposons composites (Merlin et Toussaint,1999).....	8
Figure 5: Structure des transposons non composites (Merlin et al, 1999). ....	8
Figure 6: Structure usuelle des intégrons (Barraud, 2011). ....	9
Figure 7: Structure d'une cassette (Ploy et al., 2005). ....	10
Figure 8 Mécanisme d'intégration et d'excision de cassettes (Barraud, 2011). ....	11
Figure 9 Les bactéries échangent de l'ADN par plusieurs processus.....	13
Figure 10: Transformation naturelle (Raven et al, 2017).....	13
Figure 11: Les types de transfert d'ADN peuvent avoir lieu au cours de la conjugaison (Carroll et al. ,2013) .....	14
Figure 12: Représentation schématique des séquences entourant le gène qnrA identifiées chez deux souches d'E.cloacae et d'E.aerogenes (Poirel et al, 2006).....	15
Figure 13:Environnement génétique du gène qnrB2 (Garnier et al., 2006).....	15
Figure 14: Représentation schématique des séquences entourant le gène (Poirel et al., 2006). ....	16
Figure 15: Comparaison des séquences des déterminants plasmidiques QnrA1, QnrA2,QnrS et QnrB avec les détLa recherche des progéniteurs des gènes qnrB et qnrS a permis d'identifier trois gènes chromosomiques structurellement proches chez les espèces marines Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus et Photobacterium profundum (Nordmann et Mammeri, 2007) .....	16
<b>Error! Bookmark not defined.</b> Figure 16: Résumé des différents modes d'action (Laving, 2007).....	19
Figure 17: Structure de base des quinolones (dérivées pyridone $\beta$ -carboxylique).....	20
Figure 18: Relation structure-activité des fluoroquinolones(Bryskier,1999).....	21
Figure 19: Shéma de la formation du complrxe fluoroquinolones-topoisomérase-ADN (Hooper, 2002).....	24
Figure 20: La résistance par modification de la cible (PLP modifié) (Plésiat,2006) .....	27
Figure 21: Inoculation de la galerie (Malki.L.,et al, 2019).....	34
Figure 22: Galerie après incubation(malki.L.; et al, 2019).....	35
Figure 23: Modèle d'un résultat d'un antibiogramme(Ayad, 2017) .....	36
Figure 24 : mesure des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse(Malki.,et al ;2019).	37
Figure 25 : Aspect des colonies de certaines espèces d'entérobactéries sur milieu Uriselect (Yanat.,2009).....	49
Figure 26: Antibiogrammes des quinolones des deux souches d'entérobactéries ayant différents phenotypes de résistance.(Yanat.,2009).....	51
Fig 27 : Photo de la détermination de la CMI d'antibiotiques vis-à-vis de la souche S 17: Klebsella pneumoniae(Meradi.,2017).....	52

Fig 28 : Photo de la détermination de la CMI d'antibiotiques vis-à-vis de la souche transconjugante Tc 17 (Meradi,2017).....	52
Fig 29 : Détection par PCR Multiplex du gène qnr à l'aide de trois couples d'amorces spécifiques du gène qnrA; qnrB; qnr S.....	55
Fig 30: Détection par PCR simplex du gène qnr à l'aide d'amorces spécifiques du gène qnrB;chez les souches qnr B positif et leurs transconjugants.....	55
Fig 31: Détection par PCR simplex du gène aac; chez les souches aac positif et les transconjugants des souches qnrB positif .....	56
Fig 32: Détection par PCR simplex du gène Tem chez les souches BLSE positif .....	56
Fig 33: Détection par PCR simplex du gène shv chez les souches BLSE positif.....	56
Fig 34: Détection par PCR simplex du gène Tem et shv chez les souches qnr positif et leurs transconjugants.....	57
Fig 35: Détection par PCR simplex du gène CTXM1, CTXM2, CTXM9 chez les souches BLSE positif et les transconjugants des souches qnr B positif.....	57
Fig36 : Photo du profil plasmidique des souches qnr positives (S14 et S17) et leurs transconjugants (Tc.14 et Tc17).....	58

## *Liste des tableaux*

Tableau 1: Classification de résistance aux antibiotiques décrites sur des intégrons (Ploy et al, 2000).....	11
Tableau 2: Classification des antibiotiques(prescott et al.,2010).....	18
Tableau 3 : <i>Spectre d'activité des quinolones (King et al., 2000 ; Larouche, 2001)</i> .....	22
Tableau 4: Les mutations détectées dans les gènes codant pour la topoisomérase IVchez E. coli et chez Salmonella (Hopkins et al, 2005 ; Sorlozano et al., 2007).....	28
Tableau 5 : <i>Charges des antibiotiques testés et caractérisation des diamètres de la zone d'inhibition selon les normes du CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie)</i> .....	37
Tableau 6 : <i>Liste des antibiotiques testés</i> .....	38
Tableau 7 : <i>Amorces utilisées dans l'étude (Guessennd et al, 2008 ; Park et al, 2006)</i> .....	39
Tableau 8 : <i>Conditions d'amplification par PCR (Guessennd et al, 2008 ; Park et al, 2006)</i> .....	43
Tableau 9 : <i>les ddNTP et leurs fluorochrome spécifique (Tagu et al, 2003)</i> .....	44
Tableau N°10: <i>Aspect des colonies sur milieu sélectif et chromogène des espèces d'entérobactéries les plus fréquemment isolées.(Yanat.,2009)</i> .....	49
Tableau N°11 : <i>Répartition des souches par espèce.(Yanat.,2009)</i> .....	50
Tableau N° 12: <i>Mécanismes probables de la résistance aux quinolones (Soussy, 2006)</i> .....	50
Tableau n°13 <i>Sensibilité aux antibiotiques et types de gènes de résistance aux BLSE et aux quinolones des souches étudiées</i> .....	53
Tableau14: <i>Caractéristiques des souches hébergeant les gènes : qnr et leurs transconjugants</i> .....	54
Taleau n° 15: <i>Résultats du séquençage des gènes</i> .....	55





# **Introduction Générale**

# Introduction Générale

---

**Une infection urinaire(IU)** est une infection qui touche le système urinaire. Selon les cas, il peut s'agir des reins, de la vessie, de l'urètre, ou encore de la prostate chez l'homme (APPIT, 1997).

*E.coli* est responsable de près de 70% des IU. *Enterococcus sp* est en cause dans 10% des cas, *Proteus mirabilis*, et *Klebsiellapneumoniae* dans 7-8% des cas. Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* surviennent dans des contextes particuliers, uropathies sous-jacente ou antibiothérapie préalable (FRANÇOIS *et al.*, 2013).

Les services d'urologie sont particulièrement concernés par la prise en charge des infections urinaires. En revanche, il existe peu de données concernant l'état de résistance et de la virulence des germes uropathogènes, contrairement à une utilisation large des antibiotiques surtout de façon empirique.

Le bon usage des antibiotiques vise à prescrire des antibiothérapies ou antibioprophylaxies cliniquement efficaces tout en cherchant à minimiser les dommages collatéraux de ces traitements aussi bien sur le plan individuel que collectif, notamment la sélection de bactéries pathogènes et l'émergence de résistance bactériennes (Dellit, 2005). Cette dernière est particulièrement liée à deux classes d'antibiotiques (Paterson, 2004) : les céphalosporines et les quinolones.

L'introduction des quinolones en thérapeutique a été suivie rapidement par la description de souches résistantes chez les entérobactéries. Pendant plus de 30 ans, les seuls mécanismes de résistance connus étaient chromosomiques. Les mutations responsables sont localisées dans des gènes qui conduisent soit à la perte d'affinité de l'antibiotique pour sa cible (les topo isomérasés), soit à une augmentation de son excrétion hors du cytoplasme, ou bien à une diminution de sa pénétration transmembranaire (Hopkins *et al.*, 2005 ; Nordmann et Mammeri, 2007).

En Algérie, la présence de QnrS et de QnrB a été déterminée chez des souches d'*E. cloacae* (Iabadenet *al.*, 2008 ; Touati *et al.*, 2008). Dernièrement, deux nouveaux types de Qnr (QnrD et QnrC) ont été décrits en Chine (Cavacoet *al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Ces protéines s'intercaleraient entre les quinolones, les topo isomérasés et l'ADN, limitant ainsi la fixation ultérieure des quinolones sur leur cible (Tran et Jacoby, 2002). La dissémination de ces déterminants est mondialement connue (Robicsek *et al.*, 2006).

L'émergence de la résistance acquise des entérobactéries aux quinolones et aux fluor quinolones aussi bien à l'hôpital qu'en ville est devenue une préoccupation majeure et ce un peu partout dans le monde (Lecaillonet *al.*, 2004). Bouzenoune et al, on rapporté des taux de résistance de 11,7 % pour l'acide nalidixique et de 10,1 % pour l'ofloxacine dans une étude réalisée à l'hôpital de Ain M'lila (Bouzenoune *et al.*, 2009). Des taux de résistance à la ciprofloxacine de 43%, de 28% et de 22.1% ont été révélés chez des souches communautaires isolées au Brésil, en Italie et en Chine respectivement (Pereira *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2007; Cagnacciet *al.*, 2008). Ces taux de résistance élevés justifient une surveillance régionale périodique de l'efficacité de ces antibiotiques en milieu extra-hospitalier.

L'impact économique de la résistance bactérienne aux antibiotiques (RBAB) est considérable.,

# Introduction Générale

---

On estime qu'elle est responsable de plus de 25000 décès en Europe par an et entraîne des coûts de santé et une perte de productivité de plus de 1,5 milliard d'euros par an et aux États-Unis, le CDC estime que les bactéries résistantes aux antibiotiques causent 2 millions de maladies et environ 23 000 décès chaque année (**Slayton *et al.* 2015**).

Actuellement, très peu de travaux nationaux ont été consacrés à l'étude de la résistance aux quinolones. Il est donc indispensable de disposer de données actualisées sur l'évolution de cette résistance.

C'est dans cette optique que nous proposons d'évaluer la sensibilité aux quinolones des souches d'entérobactéries isolées au niveau de quelques laboratoires d'analyses médicales de la région Sidi Bel Abbès et la détermination de certains facteurs de risque dans l'acquisition des souches résistantes.

Et afin de développer cet aspect, les objectifs suivants sont tracés pour la réalisation de ce présent travail :

- Identification des microorganismes potentiellement responsables des infections urinaire.
- Etude du profil de résistance ou de sensibilité aux Quinolones des germes identifiés « Entérobactéries » sur le plan moléculaire.
- Voir si le phénomène de multi résistance bactérienne existe et à quel taux, tout en essayons de comprendre les causes qui par la suite seront discutées et même pourquoi pas de trouver des suggestions pour éviter ou diminuer sa propagation.

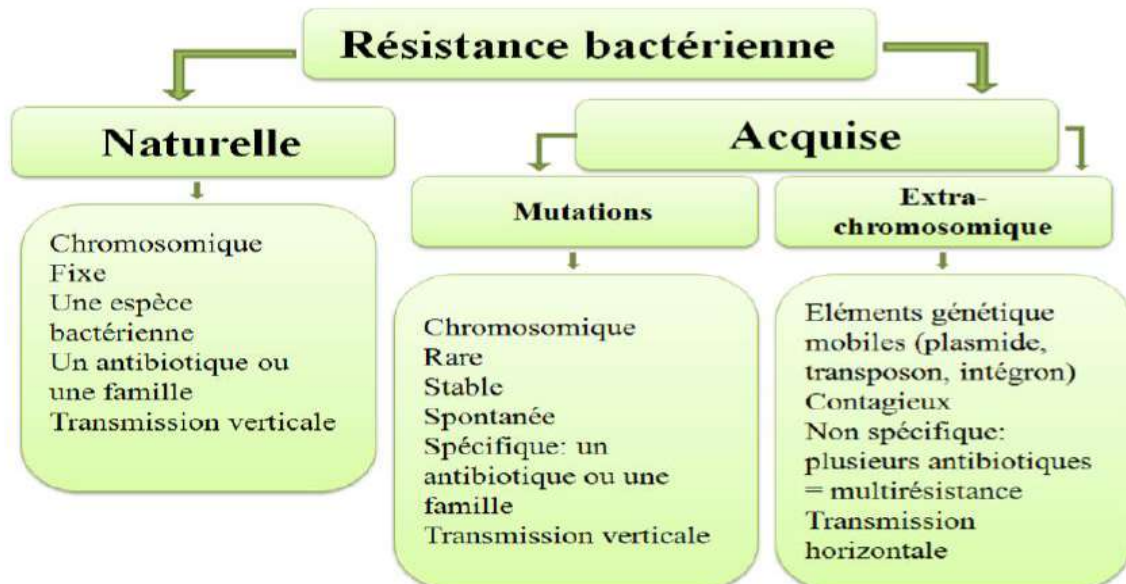


***Partie I:***  
***SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE***

***Chapitre N°1***  
***Support génétique de la résistance***  
***bactérienne aux ATB***

L'émergence et la dissémination de la résistance des entérobactéries aux quinolones, aussi bien en milieu hospitalier qu'en communauté, rend difficile le traitement des infections causées par ces germes. Cette résistance est due à plusieurs mécanismes qui peuvent être chromosomiques ou plasmidiques (Paterson, 2006).

Il existe deux grands types de la résistance aux antibiotiques, la résistance



Intrinsèque (naturelle) et la résistance acquise (Figure 01) (Ourvalin,2008)

**FIGURE 1: LES TYPES DE LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES (OURVALIN,2008).**

### 1. La résistance chromosomique

Elle résulte d'une mutation. C'est un phénomène rare, dû au hasard il n'est pas provoqué par la présence de l'antibiotique, mais l'antibiotique révèle la mutation de résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistante (ou plus exactement, en détruisant les autres bactéries de l'espèce, celles restées sensibles à l'action de l'antibiotique).

C'est un phénomène indépendant, l'apparition d'une mutation ne favorise pas l'apparition d'autres mutations de résistance à d'autres antibiotiques. La probabilité de deux mutations simultanées est donc très faible. Cette indépendance des mutations constitue un des meilleurs arguments pour justifier l'association des antibiotiques. Elle est transmissible, elle est permanente et a donc un caractère héréditaire (transmission sur un mode vertical de bactérie-mère à bactéries-filles). Toutes les mutations ont pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique et une bactérie mutée est souvent contre-sélectionnée en l'absence d'antibiotique (Lozniewski et al. 2010).

## **2. La résistance extra-chromosomique (plasmides)**

La résistance plasmidique est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie. Les bactéries porteuses de plasmides sont normales alors que les bactéries résistantes par mutation sont souvent fragilisées. Aussi, les bactéries porteuses de plasmides ne sont pas ou peu contre-sélectionnées en l'absence d'antibiotique (Lozniewski et al, 2010).

De nombreux plasmides de résistance sont conjugatifs ou mobilisables ce qui permet un transfert horizontal, ces transferts sont à l'origine d'une dissémination très importante de la résistance au sein des populations bactériennes ce qui fait qualifier la résistance plasmidique de "contagieuse ou d'infectieuse". Les plasmides de résistance sont susceptibles d'évoluer par acquisition ou pertes successives de déterminants de résistance portés par des éléments génétiques transposables. Les éléments génétiques transposables permettent la dissémination de gènes entre des bactéries phylogéniquement éloignées en permettant l'implantation d'un gène là où celle d'un plasmide échoue. Comme pour la résistance chromosomique, les gènes de la résistance extra-chromosomique ne sont pas induits par l'utilisation des antibiotiques qui se contentent de sélectionner les bactéries porteuses de tels gènes. Il est important de noter que la résistance extra-chromosomique étant souvent une multirésistance, l'utilisation d'un seul antibiotique va sélectionner des bactéries multirésistantes qui ne sont pas contre-sélectionnées en l'absence d'antibiotique (Lozniewski et al, 2010)

## **3. Les plasmides**

### **3.1 Définition**

Les plasmides sont de petits fragments d'ADN double brin, circulaires et cytoplasmiques, capables de répllication autonome. Cependant, les plasmides peuvent conférer à leur hôte des aptitudes qui dans certains cas lui donnent un avantage sélectif. Cet avantage sélectif peut provenir d'une résistance à un antibiotique ou encore de la possibilité d'utiliser une nouvelle voie métabolique (Skurnik et Andremont, 2006).

### **3.2 Les plasmides R**

Les plasmides R sont des éléments génétiques extra-chromosomiques à répllication autonome, porteurs de facteurs R, soit un groupe de différents gènes de résistance. Ces éléments, généralement classés en groupes d'incompatibilité, sont d'une importance majeure dans le phénomène de résistance aux antibiotiques (Roy, 2000).

Plasmides de shigella ont été les premières découvertes et ils portent de nombreux types différents de gènes responsables de la résistance aux antibiotiques se trouve souvent dans une unité appelée transposon (Figure 2), de nombreux plasmides F comme les plasmides R sont capables de conjugaison. Même les plasmides R incapables de conjugaison et qui ne quitte jamais leurs cellules peuvent donner leurs allèles R à un plasmide conjuguant par transposition (Carroll et al., 2013).





**Figure 2 : Un plasmide R avec des gènes de résistance portés dans un transposon (Carroll et al, 2013).**

## 4 Les transposons

### 4.1 Définition

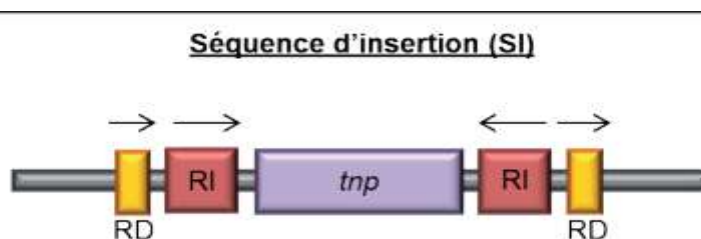
Les transposons, ou éléments génétiques transposables, sont des séquences d'ADN double brin linéaires, n'apparaissant jamais à l'état libre, n'ayant pas d'existence autonome stable pouvant s'insérer à différents endroits dans un génome ou plasmide pour être dupliqués avec lui et exprimés. Ces éléments "sauteurs" comprennent généralement des gènes de résistance ou facteurs impliqués dans la pathogénicité (Roy, 2000 ; Dufour, 2008).

Les éléments transposables présentent des caractéristiques communes qui ont permis de les regrouper selon des critères structuraux ou fonctionnels.

### 4.2. Les séquence d'insertion ISs :

Sont les éléments transposables les plus simples, retrouvés dans presque tous les génomes bactériens, de petite taille (de 750 à 2500 pb). Ils ne codent généralement que les informations nécessaires à leur mobilité. Ces dernières comportent des séquences d'ADN répétées inversées (RI) de 10 à 40 pb délimitant les extrémités des éléments et une enzyme (la transposase) codée par un cadre ouvert de lecture ORF et reconnaissant ces extrémités et catalysant la mobilité des éléments (Figure 3).

Une classification des séquences d'insertion selon la nature et structure des IRs, nature et structure de la transposase et devenir du site cible d'insertion ; 17 familles sont ainsi reconnues : IS1, IS3, IS4, IS5, IS6, IS21, IS30, IS66, IS91, IS110, IS200/605, IS256, IS630, IS982, IS1380, ISAs1 et ISL3 (Dufour, 2008).



**Figure 3 : Structure d'une séquence d'insertion (IS) (Mainil et Muylaert, 2013).**

### 4.3. Les transposons composites :

Des structures plus importantes (quelques milliers de pb ) dans lesquelles un ou plusieurs gènes sont encadrés par deux séquences d'insertion identiques disposées dans la même direction ou en direction opposée (Figure 4), collaborant entre elles lors de leur transposition et mobilisant ainsi toute la séquence d'ADN qui les sépare. Les transposons composites sont très nombreux chez les bactéries à Gram négatif. Les plus connus sont : l'élément Tn5 de 5700 pb portant trois gènes de résistance à la kanamycine, à la bléomycine et à la streptomycine, l'élément Tn9 de 2638 pb portant un gène de résistance au chloramphénicol et l'élément Tn10 de 9300 pb portant un gène de résistance à la tétracycline (Dufour, 2008).

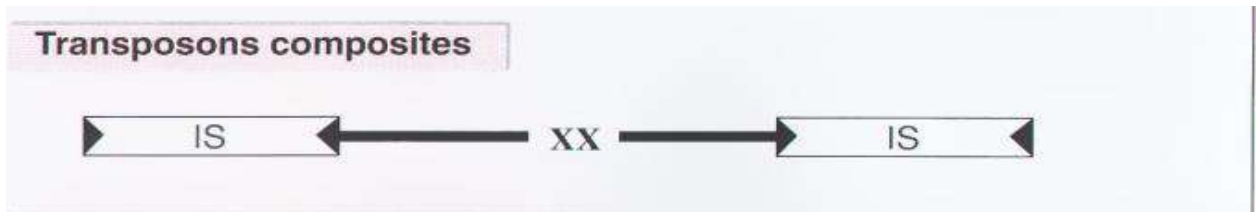


Figure 4 : Structure des transposons composites (Merlin et Toussaint,1999).

### 4.4. Les transposons non composites :

Les transposons non composites se caractérisent par l'absence d'IS à leurs extrémités. La plupart d'entre eux sont apparentés par leurs séquences terminales de 35 à 48 pb, répétées en orientation inverse et encadrant une région centrale composée notamment des gènes de transposase et des gènes de résistance (Figure 5), dans le transposon Tn3 code pour un seul gène de résistance, celui de la  $\beta$ -lactamase TEM-1 (Merlin et al, 1999 ; Mainil et al, 2012).

Leur mode de transposition implique une transposase (TnpA) mais également une autre enzyme, une résolvasse (TnpR), qui permet de terminer la réaction en catalysant une étape de recombinaison à un site spécifique (*res*) porté par le transposon (Dufour, 2008)

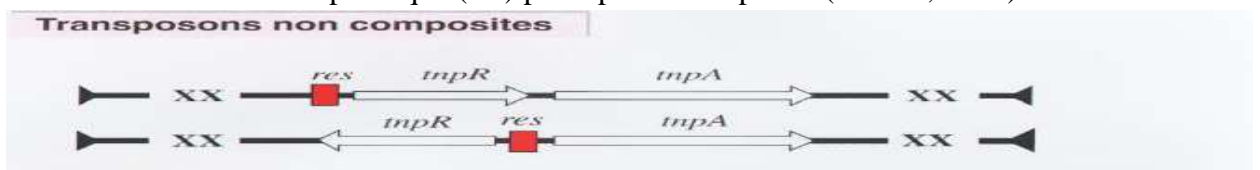


Figure 5 : Structure des transposons non composites (Merlin et al, 1999).

### 4.5. Les transposons conjugatifs :

Les transposons conjugatifs, qui sont des éléments génétiques mobiles très répandus chez les cocci à Gram positif (entérocoques, streptocoques y compris les pneumocoques). Les transposons conjugatifs diffèrent des autres transposons car, d'une part, ils possèdent des fonctions de transfert, faisant d'eux une sorte d'hybride entre le transposon et le plasmide, et d'autre part, l'absence de séquences répétées inversées. Le transposon conjugatif est capable de promouvoir son excision du génome de la cellule hôte, pour former une structure intermédiaire circulaire d'ADN bicaténaire, suivie ensuite d'une étape de conjugaison à une bactérie voisine. Cette étape de conjugaison peut, en fait, être vue comme une forme de répllication. En effet, au cours de ce processus, l'intermédiaire

circulaire est scindé en deux, une structure simple brin maintenue dans la bactérie donneuse et l'autre fournie à la bactérie receveuse, qui doivent encore être dupliquées pour former à nouveau une structure double-brin essentielle à l'intégration ultérieure au chromosome ou dans un plasmide (Courvalin, 1997 ;Mainil et al, 2012).

## 5 Les intégrons

Au cours des années 1980, de nouveaux éléments génétiques susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques sont été décrits et désignés sous le nom d'intégrons (Samine, 2011).

### 5.1 Définition

La structure de base d'un intégron se définit par sa plateforme fonctionnelle et les cassettes localisées en aval de cette plateforme constituent la région dite variable (Figure 6).



Figure 6 : Structure usuelle des intégrons (Barraud, 2011).

*Pc* : promoteur des cassettes ; *C1*, *C2* : cassettes ; *attI*, *attC1*, *attC2* : sites spécifiques de recombinaison ; *intI* : gène de l'intégrase.

#### 5.1.1 La plateforme fonctionnelle

Se compose de trois éléments essentiels :

1- un gène *intI* qui code une intégrase appartient à la famille des recombinases à tyrosine spécifique de site (Collis et Hall, 1995). Les variations de séquences en acides aminés des intégrases *IntI* ont permis de distinguer 5 classes d'intégrons de résistance IR .

- **Classe 1 (IR1)** : Les plus prévalents sont caractérisés par une intégrase *IntI1* composée de 337 acides aminés. De nombreux gènes codant des résistances à des antibiotiques différents : *catA2* (résistance au chloramphénicol), *blaDHA\_1*, *blaCTXM\_2*, *blaCTX\_M\_9* (résistance aux b-lactamines), *dfrA10*, *dfrA19* (résistance au triméthoprim), *qnrA*, *qnrB* (résistance aux quinolones).

- **Classe 2 (IR2)** : Ont une intégrase *IntI2* de 325 acides aminés. La taille de cette dernière est réduite à 178 acides aminés du fait de la présence d'un codon stop en position 179 dans le gène *intI2* rendant ainsi la protéine non fonctionnelle. Ils présentent une grande stabilité dans leur réseau de cassettes avec la présence quasi-constante de trois cassettes : *dfrA1* (résistance au triméthoprim), *sat2* (streptothricine) et *aadA1* (streptomycine et spectinomycine), suivies d'une séquence *orfX*.

- **Classe 3 (IR3)** : L'intégrase IntI3 est composée de 346 acides aminés. Ils associent une cassette de résistance aux b-lactamines à une cassette aac (6')-Ib (résistance à tobramycine, nétilmicine et amikacine).

- **Classe 4 et 5 (IR4 et IR5)** : Sont des intégrons décrits uniquement chez *Vibrio*, associés à des transposons conjugatifs. Leur implication en microbiologie clinique est considérée à ce jour comme nulle.

2- Un site spécifique de recombinaison attI se comporte au moins deux sites d'attachement de l'intégrase, nommés L et R. Il existe une forte spécificité des intégrases pour leur site attI mais des recombinaisons peuvent intervenir de façon moins efficace avec les sites attI d'autres IR. Par exemple, IntI1 reconnaît aussi les sites attI2 et attI3 (Barraud et Ploy, 2011).

3- Un promoteur de cassettes Pc qui assure l'expression des gènes de cassettes. Chez les IR de classe 1 et 3, le promoteur Pc est localisé dans la séquence codante d'IntI1 et IntI3 (Barraud et Ploy, 2011).

### 5.1.2 La région variable :

#### *Les cassettes*

Les cassettes constituent la partie variable des intégrons, en aval de la plateforme fonctionnelle. Elles constituent des unités fonctionnelles indépendantes, non répliquatives, mobilisables de manière individuelle : elles existent sous forme linéaire au sein d'un intégron ou sous forme circulaire à l'état libre (Barraud, 2011).

Les cassettes contiennent un gène flanqué à son extrémité 3' d'une séquence palindromique, le site attC. Il s'agit d'un site spécifique de recombinaison reconnu par l'intégrase, et souvent désigné « élément 59-pb » car les premiers sites attC décrits une taille de 59pb. Il est constitué de plusieurs séquences relativement conservées, inversées et répétées. Les séquences conservées recouvrent surtout les 20 premières et les 20 dernières bases, et encadrent une région de séquence et de longueur variables. Ainsi, certains sites attC sont formés de 141 paires de bases, d'où l'ambiguïté de la terminologie « élément 59-pb ». On trouve aux deux extrémités de chaque site attC deux séquences inversées et répétées de 7 paires de bases désignées core et core inverse. Le core (GTTRRRY ; R : purine ; Y : pyrimidine) est localisé à l'extrémité 3' du site attC et le core inverse, de séquence complémentaire RYYAAC, à l'extrémité 5' (Figure 7) (Ploy et al., 2000).

La plupart des gènes de cassettes des IR codent une résistance aux antibiotiques (Tableau 2), d'autres orf codent des protéines de fonction inconnue (Barraud et Ploy, 2011).

### 5.1.3 Structure et diversité des transposons procaryotes

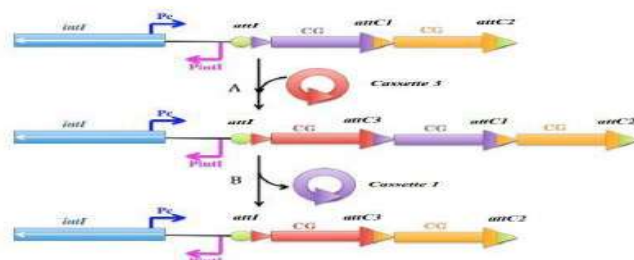


Figure7: Structure d'une cassette (Ploy et al., 2005).

Tableau 1 : Classification de résistance aux antibiotiques décrites sur des intégrons (Ploy et al, 2000).

	Intégrons de classe I	Intégrons de classe 2	Intégrons de classe 3
Espèces bactériennes	Entérobactéries Pseudomonas aeruginosa Acinetobacter Vibrio cholerae Corynebacterium glutamicum Campylobacter jejuni Enterococcus faecalis	Entérobactéries Acinetobacter	Pseudomonas aeruginosa Serratia marcescens Alcaligenes xylooxidans Pseudomonas putida Klebsiella pneumoniae
Fonctions des cassettes (blaIMP)	Résistance aux $\beta$ -lactamines $\beta$ -lactamases classes A, C D $\beta$ -lactamases classe B (blaIMP) Résistance aux aminosides 3-acétyltransférases 2''-adénylyltransférases 3''-adénylyltransférases Résistance au chloramphénicol acétyltransférases mécanisme non enzymatique Résistance au triméthoprim dihydrofolate réductases Résistance à la rifampicine ADP-ribosyl transférase	Résistance aux aminosides 3''-adénylyltransférases Acétyltransférases Résistance au triméthoprim dihydrofolate réductases	Résistance aux $\beta$ -lactamines $\beta$ -lactamases classes B Résistance aux aminosides 6'-acétyltransférases

Plusieurs cassettes peuvent exister en tandem sur un même intégron et entraîner ainsi pour la bactérie qui l'héberge une résistance en bloc à différentes familles d'antibiotiques, jusqu'à huit cassettes de résistance ont été décrites sur un même intégron. Les cassettes sont des éléments génétiques mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison catalysée par l'intégrase IntI. Au sein des intégrons (Figure 8) (Ploy et al, 2005).



A : Mécanisme de recombinaison impliquant le site attI et le site attC3 de la cassette rouge, l'intégration de cette dernière se fait au plus proche du promoteur Pc. B : Recombinaison entre 2 sites attC des cassettes violette et rouge entraînant l'excision de la deuxième cassette (violette). Les recombinaisons sont médiées par l'intégrase IntI.

Figure 8 : Mécanisme d'intégration et d'excision de cassettes (Barraud, 2011).

## 5.2. Types de l'intégrons

On distingue deux grands types d'intégrons :

- Les super-intégrons (SI) : les SI ont été caractérisés sur le génome de différentes espèces de *Vibrio* mais aussi chez d'autres genres bactériens tels que *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Xanthomonas*, *Listonella*, *Nitrosomonas*. Les super-intégrons ont donc une structure similaire à celle des intégrons de résistance aux antibiotiques mais cependant différent par :

- Les SI sont toujours présents sur le chromosome.
- La région variable est caractérisée par un nombre de cassettes plus élevé.
- Les sites de recombinaison attC des cassettes d'un même SI sont très conservés tandis qu'ils varient en séquences et en taille pour les cassettes présentes chez les IR (Tchuente, 2016)

- Les intégrons de résistance aux antibiotiques (IR) : Les IR contiennent un nombre plus restreint de cassettes dans un même IR, dont les gènes codent le plus souvent des résistances aux antibiotiques. Les IR ne codent pas de fonction de transposition mais, localisés sur des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides ou les transposons, ils peuvent être transférés entre bactéries et contribuent ainsi à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques (Barraud, 2011).

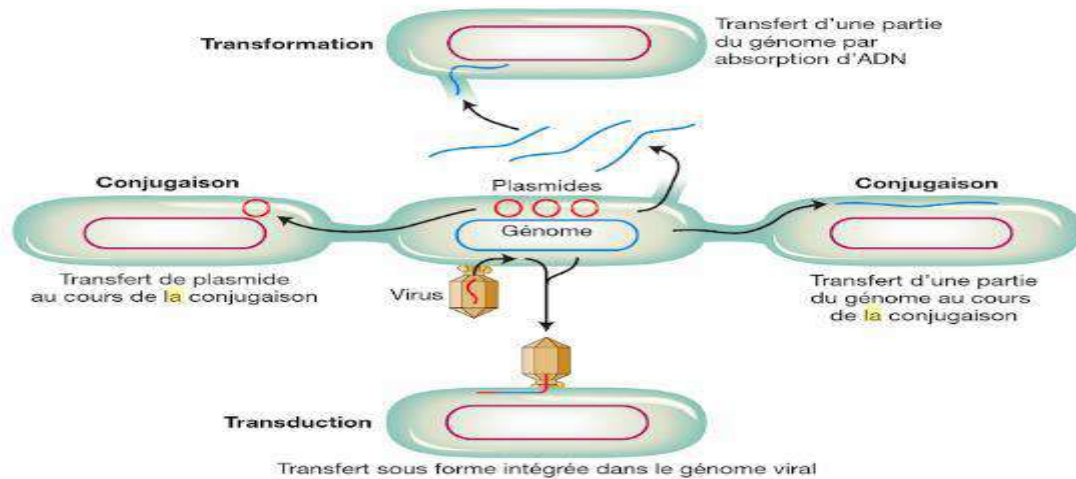
### 5.3. Origine des intégrons

L'origine des intégrons et des cassettes constitue une énigme, de même que la genèse des cassettes. Plusieurs hypothèses ont été avancées, mais la plus probable considérerait que les super-intégrons seraient les ancêtres des trois classes d'intégrons impliquées dans la multirésistance aux antibiotiques. Les intégrons de résistance auraient évolué à partir de super-intégrons par le biais de la capture d'un gène *intI* et d'un site *attI* dans des structures mobiles type transposon et ensuite, sous l'effet de la pression de sélection, il y aurait eu capture de gènes de résistance provenant de pools de cassettes contenus dans différents super-intégrons (Ploy et al., 2005)\*

## 6. Les moyens de transfert génétique

Le transfert horizontal de gènes est un phénomène d'échange d'information génétique entre bactéries par l'acquisition d'ADN étranger. Ce phénomène représente 80% des cas de résistance aux antibiotiques (Samine, 2011).

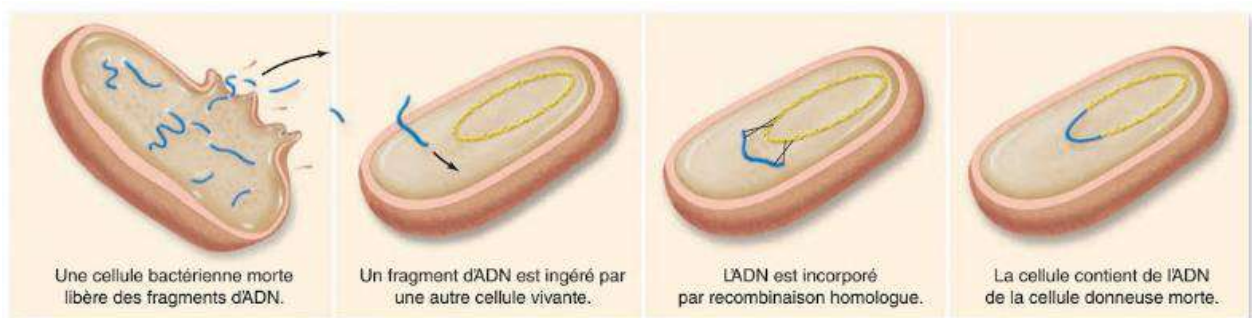
Il existe des mécanismes spécifiques qui permettent à de l'ADN étranger d'accéder au génome, dont les trois principaux sont la transformation, la conjugaison et la transduction (Figure 9) (Lefevre et al., 2016).



**Figure 9 : Les bactéries échangent de l'ADN par plusieurs processus (Carroll et al., 2013).**

### 6.1 La transformation

Certaines bactéries peuvent capter des fragments d'ADN à partir du milieu extérieur. Ceci est un autre moyen pour les bactéries d'échanger leurs gènes (Carroll et al., 2013). La transformation c'est le transfert d'un fragment d'ADN d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice. Ce phénomène n'a été mis en évidence que pour quelques espèces (*S. pneumoniae*, *Acinetobacter* sp, *Neisseria* sp). L'ADN d'une bactérie donatrice, libéré naturellement lors d'une lyse bactérienne, est transféré sous forme libre à une bactérie réceptrice. La bactérie réceptrice doit être dans un état réceptif dit de compétence, caractérisé par la présence de récepteurs spécifiques de l'ADN à la surface bactérienne. La pénétration de l'ADN de la donatrice s'accompagne d'une hydrolyse de l'un des deux brins de la molécule et l'intégration de l'ADN exogène dans le chromosome de la réceptrice se fait par recombinaison légitime (Figure 10) (Flandrois, 1997).



**Figure 10 : Transformation naturelle (Raven et al, 2017)**

### 6.2 La conjugaison

Répliqué et transféré à F- dont l'ADN est modifié par un enjambement entre gènes homologues (Figure La conjugaison bactérienne mise en évidence en 1945 par Joshua Lederberg, ne se produit qu'entre bactéries d'une même espèce surtout chez les bactéries à Gram (-) telles que Entérobactéries (*E.coli*, *Salmonella*.....etc.) est un mécanisme de

transmission unidirectionnel d'ADN d'une cellule à l'autre, via un "pilus sexuel". La bactérie donneuse est qualifiée de mâle alors que la bactérie receveuse est appelé femelle. Les gènes à l'origine de la conjugaison sont portés par des plasmides (Lefevre et al., 2016).

Une bactérie contenant un plasmide F est désignée par F<sup>+</sup>, alors qu'une bactérie sans plasmide F est désignée par F<sup>-</sup>. Une bactérie contenant un facteur F inséré dans son ADN est désignée par Hfr ; elle peut être obtenue à partir d'une bactérie F<sup>+</sup> par insertion d'un plasmide F dans le chromosome (Figure 12) (Courtin, 2012).

Une bactérie F<sup>+</sup> peut transformer une bactérie F<sup>-</sup> en F<sup>+</sup>, tout en restant elle-même F<sup>+</sup> : le plasmide F est répliqué et transféré à la bactérie F<sup>-</sup>. Une bactérie Hfr peut transformer une bactérie F<sup>-</sup> en une bactérie F<sup>-</sup> recombinée : l'ADN de F<sup>+</sup> est partiellement

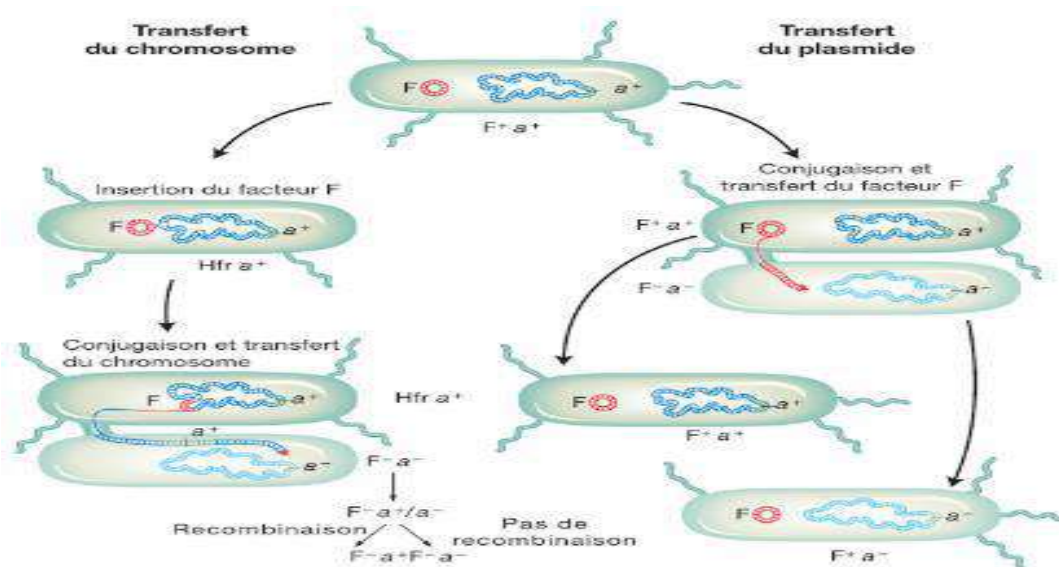


Figure 11 : Les types de transfert d'ADN peuvent avoir lieu au cours de la conjugaison (Carroll et al., 2013).

### 6.3 La transduction

La transduction est le transfert d'un fragment d'ADN par un bactériophage entre une bactérie donatrice et une réceptrice. Le bactériophage n'est que le transporteur involontaire de l'ADN (Jawetz et al., 1973). Elle a été observée chez de nombreuses bactéries à Gram négatif et à Gram positif (entérobactéries, Bacillus subtilis, Staphylococcus, Streptococcus) (Carroll et al., 2013).

Il existe deux formes de transduction, qui toutes deux résultent d'anomalies des cycles de réplication phagique :

✓ La transduction généralisée : lors du cycle lytique d'un phage, un segment d'ADN de la cellule hôte est enfermé dans une capsule à la place du génome du phage ; ce segment sera inséré dans l'ADN d'une autre cellule selon le processus habituel d'infection du virus (Courtin, 2012).

✓ La traduction localisée : dans le cycle lysogénique d'un phage tempéré, le génome du phage est excisé du chromosome hôte en entraînant avec lui de petits segments d'ADN bactérien adjacent ; lorsque le phage infecte une autre cellule, le génome phagique s'insère dans l'ADN cible en même temps que les gènes bactériens (Courtin, 2012).





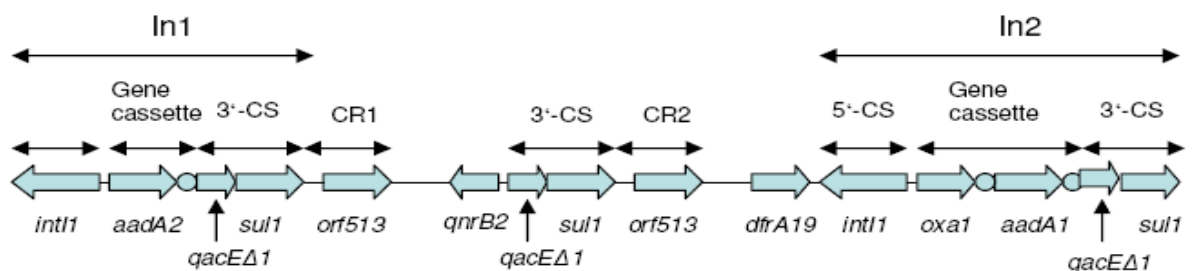
**FIGURE 17: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES SEQUENCES ENTOURANT LE GENE QNRA IDENTIFIEES CHEZ DEUX SOUCHES D'E.CLOACAE ET D'E.AEROGENES (POIREL ET AL, 2006).**

L'environnement génétique du gène *qnrA* décrit chez une souche de *K. pneumoniae* rapportée par Shen et al., (*aac(6')*Ib-cr, *qacFD*, *sul1*, *ISCR1*, *qnrA1*, *ampR*, *Orf5* et *Orf6*) montre que *qnrA* peut être associé à un autre gène codant pour la résistance aux quinolones (Shen et al., 2008).

#### 6.4. Environnement génétique de *qnrB*

Initialement le gène *qnrB1* fut décrit dans le plasmide pMG298 à proximité du gène *orf1005* qui présente une structure similaire à celle d'un transposon avec des séquences inversées répétées de 83-pb et un cadre de lecture ouvert codant pour une probable transposase (Jacoby et al., 2006).

L'analyse de l'environnement du gène *qnrB2* décrit par Jacoby et al. chez une souche de *Citrobacter koseri* isolée aux États-Unis n'a pas mis en évidence de structure génétique impliquée dans la mobilisation de gène de résistance. Le gène *qnrB2* identifié dans une souche de *Salmonella enterica* sérotype keurmassar isolée au Sénégal est localisé dans un transposon de type *ISCR1* (figure 18) (Garnier et al., 2006).

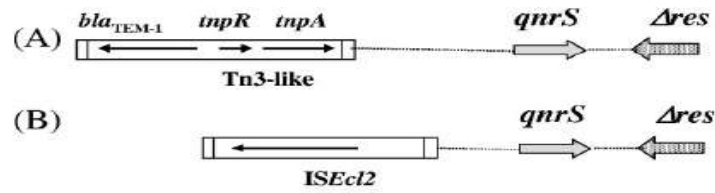


**FIGURE 18: ENVIRONNEMENT GENETIQUE DU GENE QNRB2 (GARNIER ET AL, 2006).**

#### 6.5. Environnement génétique de *qnrS*

Le gène *qnrS*, initialement décrit par Hata et al. chez une souche de *Shigella flexneri* isolée au Japon, est encadré par deux séquences inversées répétées de 1,2 kb. En amont de ce gène, se trouve le transposon Tn3 associé au gène *blaTEM-1*, et en aval, un gène codant pour une probable résolvasse (Hata et al., 2005).

L'environnement du gène *qnrS1* de souches d'*E. cloacae* isolées au Vietnam et en France, est caractérisé par la présence d'une séquence d'insertion dénommée *ISEc12* dans un plasmide portant le gène *blaLap-1* (figure 19) (Poirel et al., 2006).



A : Structure identifiée chez *S. flexneri* 2b (Japan).

B : structure identifiée chez *E. cloacae* (France et Vietnam)

FIGURE 19: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES SEQUENCES ENTOURANT LE GENE (POIREL ET AL., 2006).

La variabilité des structures entourant les gènes de type *qnr* révèle la diversité des systèmes de capture et de mobilisation de gènes qui sont impliqués dans la dissémination des déterminants de type *Qnr*. L'émergence mondiale de ce nouveau mécanisme de résistance ne provient pas de la dissémination d'une structure génétique unique, mais de l'apparition de plusieurs structures génétiques issues d'événements de mobilisation différents (Nordmann et Mammeri, 2007).

### 6.6.. Origine des gènes de résistance de type *qnr*

L'origine des gènes plasmidiques de résistance aux antibiotiques reste dans la très grande majorité des cas totalement inconnue. Des études tendent à identifier le générateur du gène *qnr* soit vers des bactéries de l'environnement, soit vers des bactéries sélectionnées chez l'animal (*Salmonella*) qui dans les deux cas transférerait horizontalement la résistance aux bactéries retrouvées chez l'Homme (Nordmann et al., 2005 ; Robicsek et al., 2006). L'analyse de l'environnement génétique du gène *qnrA3* a confirmé son origine chromosomique chez l'espèce *Shewanella algae* (figure 20)

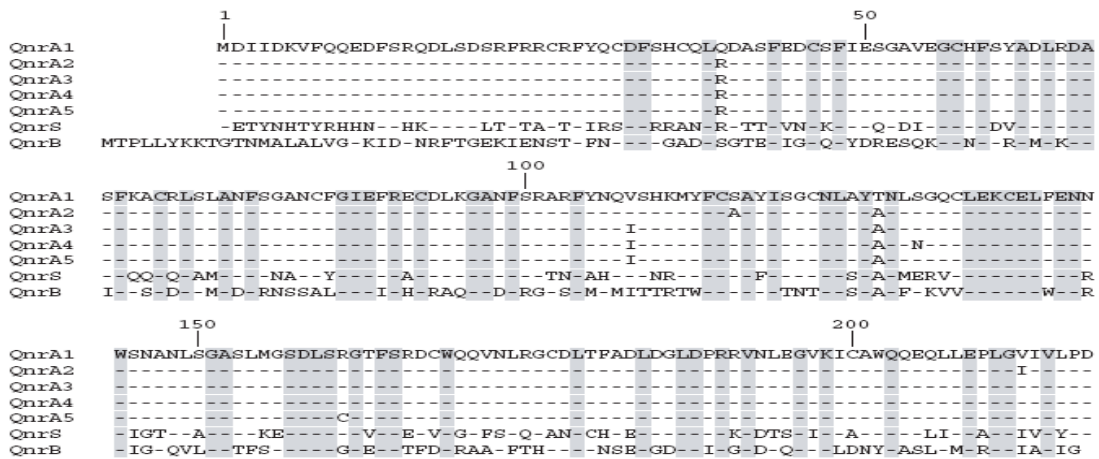


Figure 20: Comparaison des séquences des déterminants plasmidiques QnrA1, QnrA2, QnrA3, QnrA4, QnrA5, QnrS et QnrB avec les déterminants chromosomiques identifiés chez les espèces marines *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* et *Photobacterium profundum* (Nordmann et Mammeri, 2007).

La recherche des progéniteurs des gènes *qnrB* et *qnrS* a permis d'identifier trois gènes chromosomiques structurellement proches chez les espèces marines *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* et *Photobacterium profundum* (Nordmann et Mammeri, 2007).



## *Chapitre N° 2*

*«Les antibiotiques et l'antibiorésistance »*

**1. Antibiotique :**

**1.1 Définition :**

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries, sans affecter l'hôte (cellules humaines dans notre propos). Ils permettent aux défenses naturelles du corps telles que le système immunitaire, de les éliminer. Ils agissent souvent en inhibant la synthèse d'une cellule bactérienne, la synthèse de protéines, l'ADN, l'ARN, par un agent désorganisant la membrane, ou d'autres actions spécifiques (Levy,2004)

**1.2 classification des antibiotiques**

Il existe plusieurs modalités de classification des antibiotiques d'utilité variable :

- ✚ **La structure chimique de base :** bêtalactamines, aminoglycosides, quinolones, cyclines, ...
- ✚ **La cible au niveau des bactéries :** ribosomes, paroi, ...
- ✚ **Le mécanisme d'action :** inhibition de la synthèse protéique, inhibition de la synthèse du peptidoglycane, ...
- ✚ **Le spectre d'activité :** groupes bactériens ou espèces sensibles.

Afin de pouvoir exercer son activité antibactérienne, un antibiotique doit :

- ✓ Atteindre sa cible, et donc pénétrer la membrane externe, la paroi, et la membrane cytoplasmique.
- ✓ Persister à des concentrations suffisantes
- ✓ Reconnaître la cible.

Les bactéries développent des mécanismes afin d'empêcher l'une ou l'autre de ces étapes, et ainsi permettre l'émergence de résistances aux antibiotiques (Sophie, 2014)

**TABLEAU 2: CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES(PRESCOTT ET AL.,2010)**

Mode d'action	Antibiotiques
Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	<b>-lactamines Glycopeptides</b>
Modification de la perméabilité de la membrane Cytoplasmique	<b>Polymyxines</b>
Inhibition de la synthèse protéique	<b>Aminosides Macrolides Tétracyclines Chloramphénicol</b>
Inhibition de la synthèse des acides nucléiques	<b>Rifampicine Quinolones</b>
Inhibition des voies métaboliques de l'acide folique	<b>Sulfamides Triméthoprime</b>

### 1.3 Mécanismes d'action des ATB

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie. Ils agissent par :

- Toxicité sélective Au niveau de la synthèse de la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique, des protéines et des acides nucléiques.
- Inhibition compétitive Dans ce cas l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle à la bactérie Le tableau V ci-après regroupe les principaux modes d'action des antibiotiques ( Archambaud , 2009)

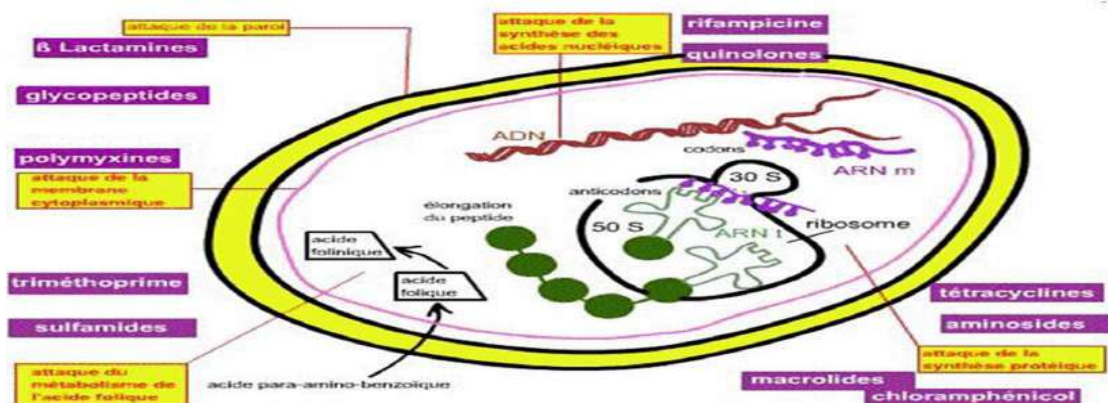


FIGURE12 : RESUME DES DIFFERENTS MODES D'ACTION (LAVING, 2007)

5 modes d'action (Lavigne,2007) : (1) sur la synthèse du peptidoglycane, (2) altération de la paroi

(3) sur la synthèse des protéines, (4) sur la synthèse des acides nucléiques, (5) sur Le métabolisme intermédiaire

#### ⚡ Antibiotique à action urinaire

Un ATB à action urinaire doit posséder certaines qualités ;

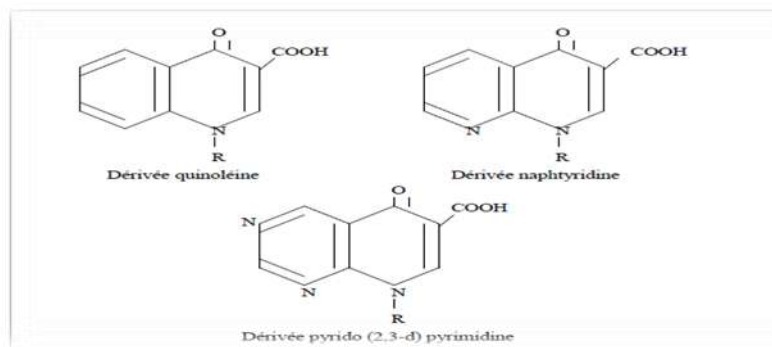
- Etre bactéricide et bactériostatique.
- Etre actif sur les espèces bactériennes habituellement responsables d'IUs.
- S'éliminer dans les urines sous forme active.
- Atteindre les concentrations suffisantes dans le parenchyme rénal et les urines.
- Etre aussi peu tributaire que possible des conditions physico-chimiques du milieu (pH, osmolarité, composition ionique, etc.).
- Dans certains cas, des modifications de pH sont nécessaires pour permettre à un antibiotique d'avoir un effet maximal (pH alcalin pour les aminosides et les macrolides, pH acide pour les pénicillines et les tétracyclines.
- Etre peu affecté par la densité des bactéries. Certains produits comme les polymyxines perdent une partie de leur activité en présence d'inoculum denses tels que ceux de la plus part des IUs (généralement >10<sup>7</sup> /mL).
- Induire un faible taux de mutation bactérienne

- Convenir aux malades les plus exposés aux IUs, femmes enceintes, sujets âgés, sujets opérés, sujets avec insuffisance rénale. (PECHERE et al., 1991).

### 1.4 Les Quinolones

Les quinolones sont des composés antibactériens de synthèse dont le chef de file, l'acide nalidixique, a été décrit en 1962. En raison de son spectre étroit et de ses propriétés pharmacocinétiques, son utilisation est limitée aux infections urinaires de l'adulte à entérobactéries (Soussy, 2006).

Les quinolones sont des molécules obtenues par synthèse chimique à partir du noyau 4-oxo, 3-carbonyl, pyridine : les 4-quinolones, dont l'azote peut être diversement substitué. L'acide nalidixique est le premier antibiotique de la famille des quinolones décrit en 1962 par Leshner et coll et commercialisé en 1968 faisant partie de la série 1, 8 naphtyridine (Bryskier, 1999). Le remplacement de l'atome d'azote en position 8 par un atome de carbone a donné naissance aux dérivés de type quinoléine, dont la première molécule utilisée en thérapeutique a été l'acide oxalinique. L'acide pipémidique est la seule molécule avec une structure pyrido(2,3-d) pyrimidine (figure 13)



**FIGURE 13: STRUCTURE DE BASE DES QUINOLONES (DERIVEES PYRIDONE β-CARBOXYLIQUE)**

(Gaudy et Buxeraux, 2005).

**L'utilisation des quinolones classiques** (acide nalidixique, acide pipémidique, acide oxalinique et acide piromidique) est limitée aux infections urinaires de l'adulte à entérobactéries et ce en raison de leur spectre étroit, de leur fortes liaisons aux protéines plasmatiques et leur mauvaise tolérance (Bryskier, 1999 ; Trystam et al., 2002).

Les fluoroquinolones ont une activité intrinsèque bien supérieure à celle de l'acide nalidixique, un spectre antibactérien élargi et des propriétés pharmacocinétiques intéressantes (administration orale, bonne résorption per os, demi-vie plus élevée et bonne diffusion tissulaire). Ces molécules sont utilisées non seulement dans le traitement des infections urinaires, mais aussi dans le traitement des infections digestives, génitales, respiratoires ou osseuses (Trystam et al., 2002 ; Mahamat et al., 2005).

### 1.5 Relation structure-activité

Les groupements carboxyliques en position 3 et 4 des fluoroquinolones sont responsables de l'activité antibactérienne car ils permettent la fixation de la molécule sur le complexe « ADN-gyrase ». L'atome de fluor en C6 augmente l'inhibition de l'activité de la gyrase et la pénétration transmembranaire. Le cycle azoté en position 7 a pour effet d'augmenter l'activité antibactérienne en régulant la pénétration intra-bactérienne (figure 14) (Chu et Fernandes, 1989 ; Bryskier, 1999).

Les substitutions du radical X8 influencent sur l'activité envers les germes anaérobies ainsi que la pharmacocinétique (Schaumann et Rodloff 2007).

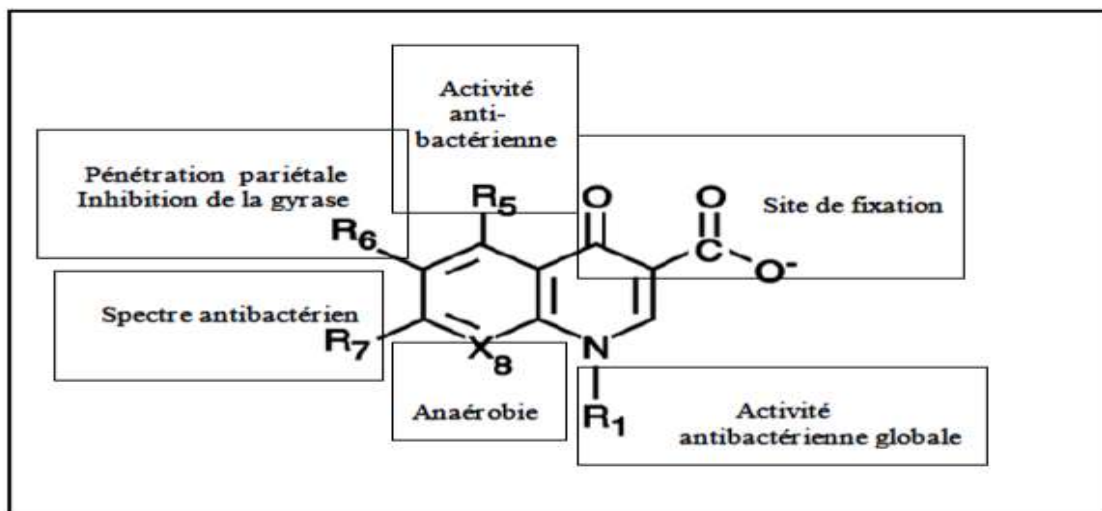


FIGURE 14: RELATION STRUCTURE-ACTIVITE DES FLUOROQUINOLONES (BRYSKIER, 1999)

### 1.6 Classification

#### 1.6.1. Classification chimique

En fonction du nombre de cycles associés au noyau pyridone  $\beta$ -carboxylique, il est possible de décrire quatre groupes chimiques des quinolones : mono-, bi-, tri- et tétracycliques (Bryskier, 1999).

- **Le groupe I** : comprend des dérivés monocycliques
- **Le groupe II** : comprend des dérivés bicycliques dont le second cycle peut être pentahexa- ou hepta-atomique.

A l'intérieur de ce groupe, quatre sous-groupes peuvent être décrits :

- **IIA1** : 1, 8 naphtyridine (acide nalidixique).
- **IIA2** : quinoléine (la majorité des fluoroquinolones).
- **IIA3** : pyridone (2, 3-b) pyridimidine (cycle pipémidique).
- **IIA3** : cinnoline (cinoxacine).



- **Le groupe III** : renferme des molécules tétracycliques qui se répartissent en molécules non fluorées (acide oxolinique) et fluorées (ofloxacin).
- **Le groupe IV** : comprend des molécules quadricycliques.

### 1.6.2 Classification biologique

Les quinolones peuvent être classées en quatre générations (Tableau N°I). D'une génération à l'autre, le spectre d'activité s'élargit en incluant un nouveau groupe de pathogènes (King et al., 2000 ; Larouche, 2001).

#### A. Quinolones de première génération :

Représentées par l'acide nalidixique et la cinoxacin possédant le spectre d'activité le plus étroit, limité aux bactéries à Gram négatif.

#### B. Quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones représentées principalement par la norfloxacin, la ciprofloxacine et l'ofloxacin.

Elles sont efficaces contre les bactéries à Gram négatif et ont un spectre élargi aux bactéries à Gram positif. D'autres exemples de molécules telles que l'enrofloxacin et la marbofloxacine sont utilisées en médecine vétérinaire.

#### C. Quinolones de troisième génération : Dénommées les nouvelles fluoroquinolones, elles sont représentées par la lévofloxacin, la gatifloxacin, la moxifloxacin, la grépafloracin, la gémifloxacin et la sparfloracin.

Ces molécules possèdent un spectre englobant les bactéries Gram positives, Gram négatives ainsi que les bactéries atypiques (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*). A ce spectre, s'ajoute l'activité partielle sur les anaérobies pour lamoxifloxacin et la gatifloxacin.

#### D. Quinolones de quatrième génération : Représentées par la trovafloxacin ayant une activité plus accrue sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies

**Tableau N°3 : Spectre d'activité des quinolones (King et al., 2000 ; Larouche, 2001)**

Classe	Exemples d'agents	Nom commercial	Spectre d'activité			
			Gram+	Gram-	Atypique	Anaérobie
1 <sup>ère</sup> génération	Acide nalidixique	NegGram m D	-	+++	-	-
2 <sup>ème</sup> génération	Norfloxacin Ofloxacin Ciprofloxacine	Noroxine mD Oflocet mD, Floxin mD Ciflox mD, Cipro mD	+	+++	+	-

3 <sup>ème</sup> génération	Lévofloxacine	Tavanic mD, Levaquin mD	++	++	+++	-
	Moxifloxacine	Ilzilox mD, Avelox mD	+++	++	+++	++
	Gatifloxacine	Tequin mD	++	++	+++	+
	Sparfloxacine	Tequin mD	++	++	+++	-
	Grépafloracine	RaxarmD	++	++	+++	-
	Gémifloxacine	Factive mD	+++	++	+++	+
4 <sup>ème</sup> génération	Trovafloracine	TrovanmD	+++	+++	+++	+++

**mD** : marque déposée

(-) : Peu ou aucune activité, (+) : Activité faible, (++) : Activité modérée,  
(+++): Excellente activité

## 1.7 Mode d'action

### 1.7.1. Pénétration membranaire

Selon la taille, la charge et l'hydrophobicité relative de la molécule, les quinolones peuvent emprunter différentes voies afin de pénétrer à l'intérieur des cellules bactériennes.

Les quinolones hydrophiles (acide pipémidique, ciprofloxacine, norfloxacine) diffusent souvent à travers les porines OmpF (rarement à travers les porines OmpC). Les composés plus hydrophobes (acide nalidixique, fluméquine, pefloxacine, sparfloxacine) se fixent par chélation aux ions Mg<sup>++</sup> de la membrane externe, grâce à la fonction cétonique à proximité de l'atome hétérocyclique, puis passent à travers la porine OmpF. Ces composés peuvent également pénétrer à travers la double couche phospholipidique de la membrane externe (cas de l'acide nalidixique) (Soussy, 2006).

Lorsqu'elles ont diffusé dans le cytoplasme, les quinolones inhibent de manière sélective la réplication de l'ADN bactérien en agissant au niveau des surenroulements. Les fluoroquinolones ont pour cible deux enzymes de la classe des topoisomérases : la gyrase (cible principale chez les bactéries à Gram négatif) et la topoisomérase IV (cible principale chez les bactéries à Gram positif) (Soussy, 2006). Certaines quinolones de nouvelles générations (clinafloxacine, moxifloxacine) possèdent une affinité similaire pour les deux cibles (Ruiz, 2003).

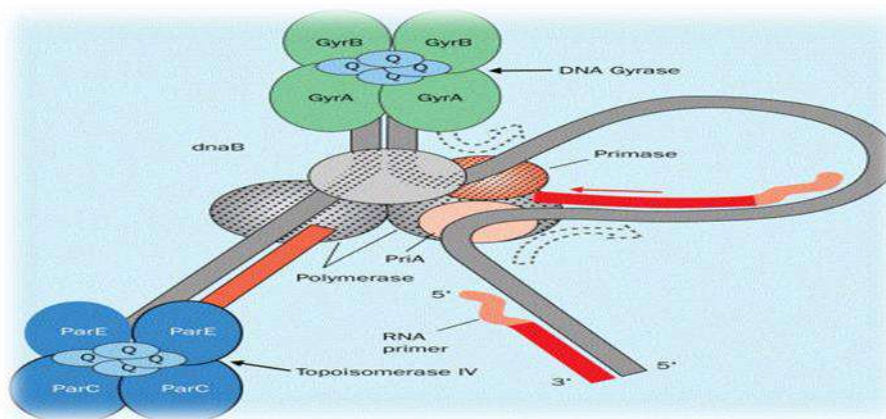
### 1.7.2 Inhibition de la gyrase

La gyrase est une topoisomérase du groupe II qui permet de réguler la fourche de réplication en introduisant un surenroulement négatif et d'éliminer les noeuds apparaissant dans l'ADN et aide à la formation des boucles et des replis de l'ADN (Bryskier, 1999).

Cette enzyme est constituée de deux sous-unités GyrA et GyrB, chacune sous la forme d'un dimère.

- **La sous-unité A** est une protéine de 100 KDa, composée de 875 acides aminés et dont la synthèse est codée par le gène *gyrA*. C'est la cible principale des quinolones chez les bactéries à Gram négatif (Soussy, 2006). Son extrémité N-terminal contient le site actif de la gyrase (Tyrosine 122, site de fixation à l'ADN à son extrémité 5'). Son extrémité C-terminal, assure la stabilité du complexe ADN/Gyrase (Bryskier, 1999).
- **La sous-unité B** est une protéine de 90KDa, composée de 884 acides aminés et dont la synthèse est codée par le gène *gyrB*. Elle comprend un domaine N-terminal responsable de l'hydrolyse de l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire aux réactions catalysées par l'enzyme, et d'un domaine C-terminal qui assure l'interaction avec la sous-unité A et avec l'ADN (Bryskier, 1999 ; Soussy, 2006).

Le complexe ADN-Gyrase-Quinolones formé va bloquer la progression de l'ADN polymérase bactérienne au cours de la réplication, d'où l'inhibition de la synthèse d'ADN et donc de la croissance bactérienne (figure 15) (Hooper, 2002).



**FIGURE 15: SCHEMA DE LA FORMATION DU COMPLEXE FLUROQUINOLONES-TOPOISOMERASES-ADN (HOOPER, 2002)**

### 1.7.3. Inhibition de la topoisomérase VI

La topoisomérase VI est la première cible des quinolones chez les bactéries à Gram positif et chez *Haemophilus influenzae* (**Bryskier, 1999**).

Son rôle principal est de désenchevêtrer les brins d'ADN fils après réplication et intervient aussi dans la partition des chromosomes lors de la croissance bactérienne. Cette enzyme présente 40% d'homologie avec la gyrase, elle est aussi présente sous forme tétramérique C2E2. Deux gènes, par cet *parE*, codent respectivement pour les sous-unités ParC et ParE.

✓ **La sous-unité ParC (75 kDa, homologue à la GyrA)** est le siège de l'activité

catalytique de la topoisomérase IV (la tyrosine 420 chez *E. coli* est l'acide aminé catalytique).

✓ **La sous-unité ParE (70kDa, homologue à la Gyr B)** contient le site ATPase

(**Bryskier, 1999 ; Soussy, 2006**).

L'interaction entre ADN, quinolone et topoisomérase IV stimule la coupure de l'ADN et inhibe la relégation (**Soussy, 2006**).

Les quinolones ont des effets différents en fonction de leur concentration. A faible concentration, on assiste à un effet bactériostatique par l'inhibition des phénomènes de réplication et de transcription. A concentration élevée, on observe un effet bactéricide dû à l'irréversibilité du complexe ADN-topoisomérase-quinolone formé, ce qui conduit à la fragmentation du chromosome bactérien et à l'induction du système de réparation SOS (**Hooper, 2002; Robiesek et al., 2006**).

## 1.8 Utilisation des quinolones

Les quinolones et les fluoroquinolones sont utilisées aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, dans des indications parfois similaires. Cette classe d'antibiotiques permet de traiter efficacement plusieurs infections communautaires et nosocomiales (**Fàbrega et al., 2008**).

✚ **Acide nalidixique et norfloxacine ou « quinolones urinaires »** : Sont régulièrement utilisées en prévention de l'infection urinaire récidivante dont le principal pathogène est *E. coli*. En effet, les quinolones s'avèrent être un traitement de première ligne lors d'infections urinaires, bien que leur administration reste contre indiquée chez l'enfant de moins de trois mois chez qui il peut être responsable de tableaux d'hypertension intracrânienne (**Nathanson et Deschênes, 2002**).

✚ **Ofloxacine et ciprofloxacine ou « quinolones systémiques »** : Sont utilisées dans les infections compliquées du tractus urinaire (pyélonéphrites) et de la prostate. La forte pénétration de ces molécules fait qu'elles sont aussi utilisées dans le traitement des infections de la peau et des os impliquant les bacilles à Gram négatif,

les infections gastrointestinales associées à *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* et *Yersinia enterocolitica*. Mais également, les infections des voies respiratoires inférieures, les infections intraabdominales (avec un agent anti-anaérobie) et les otites externes malignes (*Larouche, 2001 ; Soussy, 2006*).

✚ **Lévofoxacine et sparfloxacine ou « quinolones respiratoires »** : Ces molécules sont très actives contre les micro-organismes à Gram positif surtout *Streptococcus pneumoniae*, elles sont donc utilisées pour le traitement des infections des voies respiratoires telles que les pneumonies acquises en communauté et les exacerbations des bronchites chroniques (*Larouche, 2001*).

✚ **Trovafloxacin** : Elle est indiquée pour le traitement des infections gynécologiques, intra-abdominales, urinaires et les pneumonies nosocomiales. En raison de son hépatotoxicité grave, cette molécule a été retirée du marché (*Larouche, 2001*).

## 2. Résistance des entérobactéries aux quinolones

L'émergence et la dissémination de la résistance des entérobactéries aux quinolones, aussi bien en milieu hospitalier qu'en communauté, rend difficile le traitement des infections causées par ces germes. Cette résistance est due à plusieurs mécanismes qui peuvent être chromosomiques ou plasmidiques (*Paterson, 2006*).

### I. Mécanismes de résistance

#### A. Résistance à médiation chromosomique aux quinolones

Classiquement, les mécanismes de résistance aux quinolones chez les entérobactéries (et chez les autres bactéries à Gram négatif) résultent essentiellement des modifications ponctuelles des cibles; les topoisomérases, et plus rarement d'une diminution de la concentration intracellulaire de ces antibiotiques par imperméabilité membranaire et/ou par surexpression des systèmes d'efflux. Les déterminants de ces mécanismes sont chromosomiques. Ils ne sont pas associés physiquement à des gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques (*Nordmann, 2006*).

##### A.1 Résistance par modification de la cible

Diverses mutations dans les gènes codant les sous-unités de ces enzymes (*gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*) ont été identifiées chez des souches résistantes. Cependant, leur impact sur les CMI des quinolones varie selon la nature et le nombre de substitutions en acides aminés qu'elles engendrent, la nature et le nombre des sous-unités qu'elles affectent et les espèces bactériennes concernées (*Plésiat, 2006*).

Il existe différents mécanismes de modification de la cible de l'antibiotique à noter :

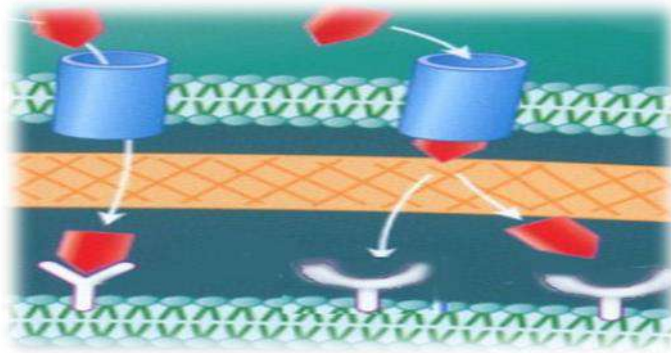


FIGURE 16: LA RESISTANCE PAR MODIFICATION DE LA CIBLE (PLP MODIFIE)  
(PLESIAT,2006)

### A.2. Résistance par modification de la gyrase

La majorité des mutations décrites dans la gyrase se situent au niveau de l'extrémité Nterminale de GyrA et GyrB dans une région spécifique du site actif de l'enzyme appelée « Quinolone Resistance Determining Region » (QRDR). Cette région est hautement conservée chez les espèces bactériennes et elle est localisée au niveau des acides aminés Ala67/Gln106 dans GyrA et Asp426/Lys447 dans GyrB (Hopkins *et al.*, 2005; Talukder *et al.*, 2006).

Une seule mutation au niveau de *gyrA* est suffisante pour engendrer un haut niveau de résistance à l'acide nalidixique (augmentation de la CMI de 8 à 10 fois), mais pour obtenir une résistance de haut niveau aux fluoroquinolones, une deuxième mutation de *gyrA* et/ou d'autres cibles comme *parC* s'impose (Ruiz, 2003).

### A.3 Résistance par modification de la topoisomérase IV

Actuellement, les mutations *parC* et *parE* chez *E. coli* sont toujours associées avec les mutations dans *gyrA*, jouant un rôle important chez les souches ayant un haut niveau de résistance aux quinolones (Hopkins *et al.*, 2005). La mutation la plus fréquente dans *parC* est située dans le codon 80, la substitution Ser80Ile est la plus connue. D'autres mutations dans les codons Glu84Gly, Lys ou Val sont aussi identifiées mais moins souvent (tableau N°4) (Hopkins *et al.*, 2005). Cattoir *et al.* ont décrit l'association des deux mutations Gly81Asp dans *gyrA* et Ser80Arg dans *parC* qui confère une résistance de haut niveau à l'ofloxacine mais une sensibilité à l'acide nalidixique chez une souche d'*E. coli*, durant un traitement de dix jours à l'ofloxacine (Cattoir *et al.*, 2006). Les modifications dans *ParE* sont assez rares et constituent les mutations ultimes pour conférer un haut niveau de résistance (Lascols *et al.*, 2007). Récemment, une nouvelle mutation dans *ParE* a été détectée en position 458 (Ser→Ala) (Sorlozano *et al.*, 2007).

**TABLEAU 4: LES MUTATIONS DETECTÉES DANS LES GENES CODANT POUR LA TOPOISOMERASE IV CHEZ *E. COLI* ET CHEZ *SALMONELLA* (HOPKINS ET AL., 2005 ; SORLOZANO ET AL., 2007).**

Gène	E. coli		Salmonella	
	Position	Substitution	Substitution	Substitution
parC	Ala56	Thr	Tyr57	Ser
	Ser57	Thr	Thr66	Ile
	Gly78	Asp Lys	Gly78	Asp
	Ser80	Ser80 Arg80	Ser80	Arg Ile
	Ser83	Leu	Glu84	Lys Gly
	Glu84	Gly Lys Val		
	Ala108	Val		
parE	Leu416	Phe		
	Ile444	Phe		
	Leu445	His	Glu453	Gly
	Ser458	Thr	Ser548	Pro
		Ala		
	Glu460	Asp	His461	Tyr
	Ile464	Phe	Ala498	Thr
Ile529	Leu	Val512	Gly	

#### ***A.4. Résistance par diminution de la concentration intracellulaire***

##### ***A.4.a. Imperméabilité membranaire***

Chez *E. coli*, OmpF est la porine principale à travers laquelle passent différents antibiotiques. Le changement dans le nombre, la taille ou la sélectivité de cette porine, peut altérer le taux de diffusion des antibiotiques et de ce fait, augmenter la résistance à ces molécules (Gootz, 2006).

Des isolats d'entérobactéries synthétisant des quantités normales de porines mais montrant un profil de résistance similaire à un phénotype d'imperméabilité ont été décrits. La première identification d'un isolat d'*E. aerogenes* de ce type, en 1998, a permis d'établir les bases moléculaires de ce mécanisme de résistance original qui est lié au remplacement du résidu Gly par le résidu Asp dans la boucle L3 de la porine, induisant le rétrécissement du canal et l'altération du champ électrostatique (Pagès, 2004).

Le système d'osmorégulation à deux composants ompR-envZ, qui règle l'expression de OmpC-OmpF chez *E. coli*, pourrait également jouer un rôle dans la résistance des souches. D'autres processus faisant intervenir des cascades de régulation génétique (via

soxS, ramA, IHF) sont aussi associés à la diminution des porines. À côté de ces régulations génétiques possibles, l'influence de facteurs structuraux associés, comme celle du LPS dans l'assemblage, le transport et l'insertion dans la membrane externe, ainsi que celle des protéines chaperons peuvent avoir un effet déterminant sur la quantité de porines exprimées (Pagès, 2004).

#### **A.4.b. Système d'efflux**

Les pompes d'efflux représentent 6% à 8% des transporteurs membranaires totaux (Kumar et al., 2005). Elles sont la cause de résistances intrinsèques chez certaines espèces. Ainsi, les souches sauvages d'*Acinetobacter baumannii* ont une CMI de la ciprofloxacine allant de 0.125 à 1 mg/l, alors que les souches sauvages d'*E. coli* n'ont qu'une CMI de la ciprofloxacine allant de 0.007 à 0.25 mg/l. Ceci résulte d'une résistance intrinsèque due à la surexpression de la pompe d'efflux chez *Acinetobacter* (Ruiz, 2003 ; Piddock, 2006).

Le système d'efflux est souvent associé aux mutations dans *gyrA* chez les souches résistantes à haut niveau aux fluoroquinolones. Cependant, chez une souche de *S. enterica* sérovar typhimurium, il a été démontré que la pompe AcrAB était plus souvent responsable de la résistance aux fluoroquinolones que les mutations *gyrA* (Giraud et al., 2006).

Le système AcrAB s'ouvre et se ferme par une série de changements conformationnels par un mécanisme électrochimique proton dépendant faisant intervenir deux résidus Aspartate-407 et 408 et un résidu lysine-940 qui fournissent une paire de charge dans la région interne de la membrane. Ces acides aminés sont essentiels pour l'exportation du substrat et leur substitution amène à la perte de la résistance de la cellule (Kiralj et Feneira 2006 ; Satoshi, 2008). Lorsque la pompe AcrAB n'est pas fonctionnelle, d'autres pompes d'efflux de type RND peuvent être recrutées, telle que, AcrEF et SmeDEF, responsables de l'excrétion active des quinolones caractérisée chez *S. maltophilia* (Ruiz, 2003 ; Giraud et al., 2006).

### **B. Résistance à médiation plasmidique**

#### **B.1. Protection des cibles : Protéines Qnr**

C'est en réalisant des expériences de conjugaison pour analyser la résistance aux  $\beta$ -lactamines que Martinez-Martinez et al., ont découvert, en 1998, le premier déterminant de résistance plasmidique aux quinolones. Le plasmide pMG252, provenant de la souche clinique *Klebsiella pneumoniae* UAB1, isolée en Alabama (USA) en 1994, était associé à une résistance aux quinolones (Martinez-Martinez et al., 1998).

Le clonage du gène de résistance a mis en évidence un cadre de lecture ouvert de 657 pb codant pour une protéine de 218 acides aminés dénommée Qnr (pour Quinolone



résistance) et renommée par la suite QnrA1 (Tran et Jacoby, 2002 ; Nordmann et Mammeri, 2007).

Depuis la découverte du premier déterminant de résistance plasmidique aux quinolones QnrA, d'autres déterminants ont été identifiés :

➤ **qnrS** fut découvert chez une souche de *Shigella flexneri* 2b responsable d'une toxiinfection alimentaire dans la préfecture de Aichi (Japon) (Hata et al., 2005). Ce gène code pour une protéine de 218 acides aminés présentant 59 % d'identité avec QnrA1.

-Un nouveau variant, dénommé QnrS2, a été découvert dans une souche de *Salmonella enterica* stéréotype anatum isolée de carcasses de volailles aux USA. Il présente 91 % d'identité avec QnrS, renommé QnrS1 (Gay et al., 2006).

➤ **qnrB** fut découvert en 2006 chez des souches de *K. pneumoniae* isolées à Coimbatore (Inde), puis chez d'autres espèces d'entérobactéries (*Citrobacter koseri*, *E. coli* et *Enterobacter cloacae*) isolées aux USA. Ce gène code pour une protéine de 226 acides aminés présentant 40 % et 37 % d'identité avec QnrA1 et QnrS1, respectivement (Jacoby et al., 2006).

### **B.2. Inactivation enzymatique : AAC(6')-Ib-cr**

En 2005, un second mécanisme de résistance plasmidique a été décrit chez des souches de *E. coli* isolées en Chine, contribuant de façon indépendante à la résistance aux quinolones en modifiant la molécule par l'enzyme AAC(6')-Ib-cr qui est une aminoside 6'Nacétyltransferase mutée. L'AAC(6')-Ib « sauvage » est à l'origine de la résistance aux aminosides par inactivation de l'antibiotique. Deux mutations faux sens, Trp102Arg et Asp179Tyr, retrouvées dans le variant Ib-cr lui permettent de N-acétyler le cycle pipérazinyl au niveau du groupement amine secondaire de la ciprofloxacine et de la norfloxacine. La présence de cette enzyme diminue la sensibilité à la ciprofloxacine de 4 fois (Robicsek et al., 2006 ; Nordmann et Mammeri, 2007).

Le gène **aac(6')-Ib-cr** est bien répandu en Chine et en Amérique du Nord. En effet, sa prévalence était de 51% à Shanghai (Chine) chez des souches de *E. coli* isolées entre 2000 et 2002 (Robicsek et al., 2006), contre un taux de 14% chez des entérobactéries isolées aux USA entre 1999 et 2004 (Park et al., 2006).

### **B.3. Efflux actif : Pompe « QepA »**

En 2007, a été décrit chez une souche d' *E. coli* isolée en Belgique et une autre isolée au Japon, un mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones par efflux actif. Ces souches hébergeaient des plasmides conjugatifs (pIP1206 et pHPA respectivement) portant le gène *qepA* qui code pour un homologue d'un transporteur à 14-segments transmembranaires dépendant de protons appartenant à la famille MFS (Major Facilitator Superfamily).

Cette pompe est impliquée dans l'excrétion des fluoroquinolones hydrophiles (norfloxacine, ciprofloxacine et enrofloxacine) avec une CMI augmentant de 32 à 64 fois (Perichon et al., 2007 ; Yaman et al., 2007).

Plus récemment, une nouvelle pompe QepA a été décrite en France chez une souche d'entérobactérie clinique. Cette pompe est dénommée QepA2 dont le gène, porté sur un plasmide conjugatif de 90 kb, est associé au gène *blaCTX-M-15* (Cattoir et al., 2008).

## **II. Epidémiologie de la résistance plasmidique aux quinolones**

Les déterminants de résistance de type Qnr sont de dissémination mondiale. Les analyses génotypiques ont révélé que les souches qnr positives ne sont pas épidémiologiquement reliées, à l'exception d'une épidémie nosocomiale causée en Hollande par un clone d'*E. cloacae* multirésistant portant le gène qnrA (Paaw et al., 2006).

## **III. Association Qnr-BLSE**

La majorité des souches qnr positives décrites jusqu'à présent sont multirésistantes aux antibiotiques et en particulier aux  $\beta$ -lactamines par production de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) ou d'une céphalosporinase plasmidique (AmpC), ce qui souligne la possibilité d'une sélection de ces deux mécanismes de résistance plasmidiques (Honoré et al., 2004 ; Nordmann et Mammeri, 2007)

QnrA fut détecté dans des souches produisant les BLSE de type CTX-M-1 (Poirel et al., 2006 ; Lavigne et al., 2006), CTX-M-9 (Lavilla et al., 2008 ; Saito et al., 2007), CTX-M-15 (Lavigne et al., 2006), SHV-7 (Wang et al., 2004)...etc.

Les déterminants de type QnrB ont été identifiés chez des souches produisant les BLSE de type CTX-M-3 et CTX-M-9 (Liassine et al., 2008), CTX-M-15 (Jacoby et al., 2006 ; Cattoir et al., 2006 ; Touati et al., 2008 ; Iabaden et al., 2008), SHV12 (Pai et al., 2007 ; Cattoir et al., 2006)...etc.

Les déterminants de type QnrS ont été associés aux BLSE de type TEM-1 (Kehrenberget al., 2006), TEM-52, CTX-M-1 (Poirel et al., 2006), CTX-M-15 (Iabaden et al., 2008), SHV-12 (Lavilla et al., 2008 ; Poirel et al., 2006 ; Iabaden et al., 2008 ; Wu et al., 2007) et la  $\beta$ -lactamase LAP-1 (Poirel et al., 2007).

## **IV. Environnement génétique des gènes qnr**

La majorité des gènes qnr sont portés par différents plasmides conjugatifs de grande taille (54 et >180 kb) associés à d'autres déterminants de résistance notamment aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides (Li, 2005).



# *Partie II*

## *MATERIEL & METHODES*

En raison de la pandémie Corona Covid-19 et de confinement générale qui a accompagné la propagation de l'épidémie, nous n'avons pas été en mesure de mener de stage pratique sur le terrain et nous avons été satisfaits des recherches bibliographiques.

### ❖ *Objective de l'étude*

#### *A.L'identification des entérobactéries .....*

Notre travail consiste à étudier le profil de résistance ou de sensibilité aux Quinolones des germes identifiés « Entérobactéries » chez les malades atteints d'une infection urinaire sur le plan moléculaire.

#### *A.1. Questionnaire*

Un questionnaire standard a été élaboré. Il a pris en compte les données épidémiologiques telles que l'âge, le sexe et le service (Annexe 1).

#### *A.2. L'échantillonnage et Recueil des urines*

Après lavage hygiénique des mains et toilette soignée au savon ou antiseptique doux de la région vulvaire chez la femme et du méat chez l'homme suivi d'un rinçage, le sujet élimine le premier jet pour ne recueillir dans un tube à urine stérile que les 20 ml en prenant soin de ne pas toucher le bord supérieur du récipient.

#### *A.3. Conservation et transport des urines*

L'urine prélevée peut rester, au maximum, 30 min à température ambiante (< 20°C) si non les urines doivent être acheminées le plus rapidement possible au laboratoire.

Le transport sera fait dans une glacière en moins de 2 heures vers le laboratoire. (HELENE et al., 2007).

#### *A.4. Collecte de souches bactériennes*

On collecte des souches d'entérobactéries issues du prélèvement urinaire.

#### *A.5. Repiquage et identification des souches*

Les souches collectées sont repiquées sur un milieu sélectif (Hecktoen, BCP ou MacConkey). La composition de ces milieux est donnée en (annexe 2).

Une identification préliminaire des souches est réalisée par les laboratoires d'analyses médicales, pour chaque laboratoire sa propre méthode d'identification (galerie API20<sup>E</sup>, galerie biochimique ou URISelect4 (BIO-RAD)). Afin de confirmer l'espèce ou le genre auquel appartiennent ces souches d'entérobactéries, une deuxième identification a été effectuée en se basant sur les tests suivants :

- *Isolements sur milieu chromogène « URISelect4 »*

L'URISelect4 (BIO-RAD) est un milieu sélectif contenant deux substrats chromogènes qui permettent une identification directe, par mise en évidence d'activité enzymatique des

germes les plus fréquemment responsables d'infections urinaires (E.coli, Proteus, Klebsiella, Enterobacter, Serattia).

Chaque espèce apparait sous forme de colonies de couleur différente.

- **La Galerie API 20<sup>E</sup>**

C'est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries à Gram négatif, dont les entérobactéries. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Ces microtubes ont été inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation (18h-24h à 37°C) se traduisaient par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

- **Préparation de la suspension bactérienne**

Une colonie bien isolée (2 à 3 colonies identiques) sur milieu gélosé a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur, déposée sur les parois d'un tube contenant de l'eau physiologique (5-7 ml) pour dissocier la colonie, puis agitée manuellement. (Ayad, 2017)

- **Inoculation de la galerie**

Mettre de l'eau physiologique dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide

✓ Remplir le micro tube de la galerie avec la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur. Au sein du micro tube, on distingue deux parties, le tube et la cupule. Selon les tests, la suspension bactérienne doit être placée dans le tube et la cupule (CIT, VP, GEL) ou uniquement dans le tube des autres tests.

✓ Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en ajoutant l'huile de vaseline.

✓ Refermer la boîte, puis écrire le numéro de patient. Incubation à 37°C pendant 24h. (Michael,B.;et al.,1993)



Figure 17 : Inoculation de la galerie (Malki.L.,et al, 2019)

- **Lecture**

- Prendre notes sur la fiche de lecture des résultats (annexe 3) obtenus pour les tests à lecture spontanée

- Révélation des tests nécessitant l'addition de réactifs.

- TDA : ajouter une goutte du réactif TDA (annexe 4)
- IND : ajouter une goutte du réactif de Kovacs (annexe 4).
- VP : ajouter une goutte du réactif VP I et une goutte du réactif VP II (annexe 4).
- Noter les résultats sur la fiche de lecture et calcule du profil numérique (Michael,B ;et al , 1993)



Figure 18 : Galerie après incubation (malki.L.; et al, 2019)

### ***B.Etude de la résistance des souches d'entérobactéries aux antibiotiques***

Toutes les souches d'entérobactéries collectées ont été testées vis-à-vis des quinolones représentées par l'acide nalidixique. La sensibilité des souches est évaluée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2007).

#### ***B.1. Antibiogramme***

##### ***Définition et principe***

C'est l'étude de la concentration minimale inhibitrice en milieu gélosé. (Ya Bi Foua. 2006). Le principe de l'antibiogramme par diffusion permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques. Des disques de papier buvard imprégnés d'antibiotiques à tester sont disposés à la surface d'une gélose Mueller Hinton préalablement ensemencée avec une culture pure de la souche à étudier. Dans l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque.

##### ***Contrôle de qualité du milieu et des disques***

La gélose Muller Hinton a été préparée en respectant une épaisseur de 4 mm. Pour vérifier la validité des disques et la conformité du milieu Muller Hinton des souches de référence ont été utilisées ; E. coli / ATCC 25922. L'antibiogramme de ces souches a été réalisé en même temps que celui des souches à étudier. A chaque changement de lot de disques ou de milieu gélose, ce contrôle est réalisé.

##### ***b-Préparation et ajustement de l'inoculum***

L'inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18h sur milieu gélosé. Trois colonies de la bactérie à étudier sont prélevées à la pipette pasteur, puis introduit dans un

tube à bout rodé contenant 10 ml d'eau distillée stérile pour former une suspension. Par la suite l'inoculum est ajusté à l'étalon 0,5 Mac Ferland (108UFC/ml). Pour l'ajustement une certaine quantité de la première suspension est prélevée puis introduit dans un autre tube à bout rodé contenant 10 ml d'eau distillée stérile, cette suspension servira à l'ensemencement. Cet ajustement se fait en fonction de chaque type de germe.

*pour les entérobactéries* : dilution 1/1000 ème,

*Staphylocoque* : 1/100 ème,

*Pseudomonas* : 1/10 000,

*Streptocoque* une culture pure a été utilisée.

### *c- Ensemencement*

L'ensemencement se fait par inondation de la surface entière de la gélose avec 3 ou 5 ml de la suspension bactérienne. A l'aide de la pipette Pasteur on effectue une rotation complète en s'assurant d'une bonne répartition de la solution. Le surplus est rejeté en aspirant à l'aide d'une pipette Pasteur et enfin les boîtes de pétri sont incubées à l'étuve à 37° C pendant 15minutes.

### *d- La Posée des disques*

Après le séchage, les disques sont déposés sur la gélose à 30 mm l'un de l'autre à l'aide d'un applicateur automatique ou à la pince flambée. Les boîtes sont ensuite laissées à une température ambiante pendant 30 minutes sur la paillasse pour permettre la diffusion de l'antibiotique dans la gélose.



**Figure 19: le dépôt des disques d'ATB(Malki.;et al, 2019)**

### *e- Interprétation*

Les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse ; puis ils sont comparés aux diamètres critiques rassemblés dans les abaques de lecture conformément aux normes CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie. (Tableau 5) Il convient de noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée " sensible, intermédiaire ou résistante "après consultation des abaques de lecture.



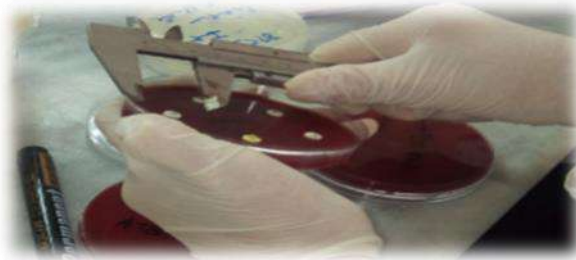


Figure 20 : mesure des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse(Malki.,et al ;2019)

Tableau 5 : Charges des antibiotiques testés et caractérisation des diamètres de la zone d'inhibition selon les normes du CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie).

Antibiotiques testés et leurs abréviations		Charge des Disques en $\mu\text{g}$	Charge des Disques en $\mu\text{g}$	
			Sensible $\geq$	Résistant $<$
<i>Penicilline</i>	<i>P</i>	6	29	28
<i>Amoxicilline</i>	<i>AML</i>	25	21	14
<i>Amixicilline Clavulanate</i>	<i>AM C</i>	20/10	21	14
<i>Imipenem</i>	<i>IMP</i>	10	22	14
<i>Cefoxitine</i>	<i>FOX</i>	30	22	15
<i>Cefotaxime</i>	<i>CTX</i>	30	21	15
<i>Acide nalidixique</i>	<i>NA</i>	30	20	15
<i>Ciprofloxacine</i>	<i>CIP</i>	5	22	15
<i>Gentamicine</i>	<i>GM</i>	10	16	14
<i>Amikacine</i>	<i>AN</i>	30	17	15
<i>Tetracycline</i>	<i>TET</i>	30	19	15
<i>Nitroxoline</i>	<i>NI</i>	300	17	14
<i>Cotrimoxazone</i>	<i>SXT</i>	1.25/23,75	16	10
<i>Ticarcilline</i>	<i>TIC</i>	75	22	18

#### Famille des antibiotiques utilisés

Les antibiotiques sont repartis en plusieurs familles : (Ait Miloud.2011). Les Béta – lactamines : (AMX), (AMC), (TIC), (FOX), (CTX), (IMP).

Ait miloud.2011.les

Les aminosides : (GM), (AN). Les quinolones : (NA). Les fluoroquinolones : (CIP). Le cotrimoxazole : (SXT). Les polypeptides : (CS). Les nitrofuranes : (FT). Le diamètre des

zones d'inhibition obtenues est comparé aux normes françaises de l'antibiogramme (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CAFSM)).

**Tableau N°6 : Liste des antibiotiques testés**

Aantibiotique	Abréviation	Charge (µg)	Famille
Ciprofloxacine	CIP	5	Fluroquinolones
Ofloxacin	OFX	5	
Norfloxacine	NOR	5	
Amoxicilline-acide clavulanique	AMC	20+10	β-lactamines(aminopénicilines)
Céfoxitine	FOX	30	β-lactamine(C2G)
Pipéraciline	RIP	75	β-lactamines(ureidopénicilines)
Céfotaxime	CTX	30	β-lactamines (C3G)
Céftazidime	GAZ	30	
Céfèpime	FEP	30	β-lactamines (C4G)
Céfpirume	CPO	30	
Imipènème	IMP	10	β-lactamines(Carbapénèmes)
Rifampicine	RA	30	Rifamycines
Tétracycline	TE	30UI	Tetracyclines
Cefotaxime	SXT	1.25+23.75	Sulfamides
Colistine	CT	50	Polypéptdides

### 3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) :

Par définition, la CMI est la plus faible concentration capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une souche donnée après une certaine période d'incubation. Pour déterminer les CMI, nous avons suivi les mêmes étapes que pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne (JOFFIN, LEYRAL, 2014) en variant les concentrations de l'extrait dans la microplaque.

#### • Détermination des CMI de la ciprofloxacine en milieu solide (CA-SFM, 2007)

##### 1.Préparation des boîtes

- Une solution mère de ciprofloxacine à 2 mg/ml a été préparée.
- A partir de cette solution mère, une gélose Mueller Hinton en surfusion est additionnée d'une concentration croissante de ciprofloxacine (à raison de 2) (Tableau N°7).
- Après homogénéisation, le milieu (Mueller Hinton + ciprofloxacine) est coulé sur• boîte puis séché 30 minutes à l'étuve à 37° C.

**Tableau N°7 : Réalisation de la gamme d'antibiotique pour un volume final de 100ml**

Concentration finale en CIP ( $\mu\text{g/ml}$ )	8	16	32	64	128
Volume de la solution de CIP en (ml)	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4
Volume de Mueller Hinton en (ml)	99.6	99.2	98.4	96.8	93.6

## 2. Ensemencement

Une suspension de  $10^8$  UFC/ml est diluée à  $10^{-2}$ . 10  $\mu\text{l}$  de la dernière dilution est déposé sur le milieu soit un inoculum de  $10^4$ UFC/spot. On incube à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24h.

## 3. Lecture

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'ya pas de croissance visible. La présence d'une ou de deux colonies ou d'un fin film n'est pas prise en considération.

La valeur lisible à la zone d'intersection entre la bandelette et l'ellipse de croissance bactérienne correspondra à la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique donné, exprimée en  $\mu\text{g/ml}$ . (CLSI, 2005).

### B.3 Extraction de l'ADN Total

La technique décrite par (Honoré et al, 2006) est une technique rapide utilisée pour l'extraction de l'ADN total des entérobactéries. L'ADN total a été extrait par choqué thermique.

### Technique

- Pour chaque souche, ensemenecer le milieu Trypticase soya Agar (TSA), puis incubé à  $37^\circ\text{C}$  pendant 18 heures.
  - Dissociées 2 à 3 colonies dans 500  $\mu\text{l}$  d'eau pour la biologie moléculaire.
  - Faite chauffée à  $95^\circ\text{C}$  cette suspension pendant dix minutes, puis refroidie immédiatement dans de la glace.
  - Centrifuger pendant deux minutes à 13 000 tours par minute.
  - le surnageant est transféré dans un nouveau tube puis stockée à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à utilisation.

#### B.4. Dépistage du Gène *qnr* par La PCR Multiplex :

La « **Polymerase Chain Reaction** » ou **PCR** est une technique qui permet l'amplification de segments d'ADN situés entre les sites d'appariement de deux amorces. Cette technique implique une série de cycles de dénaturation de l'ADN, appariement "annealing" d'oligonucléotides sur des sites précis d'ADN simple brin, et synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à l'aide d'une polymérase thermorésistante, la Taq polymérase: *Thermus aquaticus* polymérase. (Kaneko, 1985).

Le dépistage des gènes *qnr* a été réalisé par **PCR Multiplex** sur toutes les souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique en utilisant les amorces spécifiques (tableau 8).

Pour valider la réaction de PCR diverses souches de référence (délivré par l'institut Pasteur de Paris) sont utilisées comme témoin positif.

- **E. coli U2A2118 (qnr A1)**
- **E. coli U2A2120 (qnr S1)**
- **E. coli U2A2119 (qnr B1)**

##### ➤ **Préparation de la réaction :**

La réaction de PCR se fait sous un volume final de 100 µl, dans un tube Eppendorf, on prépare le mélange ci-dessous en multipliant chaque volume par le nombre d'échantillon d'ADN étudiés, et prévoir un tube sans ADN qui servira de témoin négatif; Le mélange réactionnel est réalisé sous hotte de biologie moléculaire et comprend :

##### • **Solution de mélange :**

<b>Tampon de la réaction 10x</b>	.....	<b>10 µl</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>50 mM</b> .....	<b>5 µl</b>
<b>Oligo</b>	<b>A (+)</b> .....	<b>1 µl</b>
<b>Oligo</b>	<b>B (+)</b> .....	<b>2 µl</b>
	<b>B (-)</b> .....	<b>2 µl</b>
<b>Oligo</b>	<b>S (+)</b> .....	<b>1 µl</b>
	<b>S (-)</b> .....	<b>1 µl</b>
<b>Taq DNA polymerase</b>	.....	<b>0.6 µl</b>
<b>ADN</b>	.....	<b>1 µl</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	.....	<b>qsp 100 µl</b>

La réaction se fait dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Warrington, UK) en réalisant 30 cycles de 94°C pendant 5 min, 94°C pendant 1 min, 60°C pendant 45 secondes et 72°C pendant une minute (Guessennd et al, 2008).

### B.5. Dépistage du Gène *aac* (6')-Ib par PCR :

La recherche du gène *aac* (6')-Ib a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques (tableau 8) ; La PCR est réalisée sur toutes les souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique.

La souche de référence utilisée et qui sert de contrôle positif est : *E.coli* U2A1528

#### • Préparation de la réaction :

La réaction de PCR se fait sous un volume final de 50 µl. Dans un tube Eppendorf, on prépare le mélange ci-dessous en multipliant chaque volume par le nombre d'échantillon d'ADN étudiés, et prévoir un tube sans ADN qui servira de témoin négatif; Le mélange réactionnel est réalisé sous hotte de biologie moléculaire et comprend :

#### • Solution de mélange

<i>Tampon de la réaction 10x</i> .....	5 µl
<i>MgCl<sub>2</sub> 50 mM</i> .....	2.5 µl
<i>dNTP 5 mM</i> .....	2 µl
<i>Oligo (+)</i> .....	1 µl
<i>(-)</i> .....	1 µl
<i>Taq DNA polymerase</i> .....	0.2 µl
<i>ADN</i> .....	1 µl
<i>H<sub>2</sub>O biologique stérile</i> .....	qsp 50 µl

La réaction est réalisée suivant les conditions d'amplification suivantes : dénaturation initiale de 5 min à 94°C suivie de 30 cycles de 94°C pendant 1 min, 55°C pendant 1 min, et 72°C pendant 1 min, puis une élongation finale de 72°C pendant 7 min (*Park et al* , 2006).

### B.6. Dépistage des gènes de $\beta$ - Lactamase et de *ampC* par PCR :

La recherche des gènes de  $\beta$ - Lactamase : bla gène (TEM, SHV, CTX M, CMY, VEB) et de *ampC* (*dha*) a été réalisée par PCR sur l'ADN total des souches productrice de BLSE. Toutes les conditions de PCR et les primers utilisés sont résumés dans les « tableaux 8 et 9 ». Pour valider la réaction de PCR diverses souches de référence sont utilisées (délivré par l'institut Pasteur de Paris).

*Salmonella sp* U2A1446 (*TEM1*+ *SHV12*)

*E. coli* U2A1790 (*CTXM* groupe 1)

*E. coli* U2A1799 (*CTX M* groupe 2)

*E. coli* U2A1796 (*CTX M9* + *CMY2*)

*K. pneumoniae* U2A2240 (*dha*)

### 7. Analyse des produits de PCR :

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% contenant du Bromure d'ethidium (BET) à la concentration finale de 0,5 µg/ml, et tamponné avec du TBE x0.5

(Tris Borate Ethylène Diamine Tétracétique Acide).

10 µl d'ADN amplifié est déposé dans chaque puit avec un alourdisseur : le bleu de dépôt; Un marqueur de poids moléculaire λ de 100 pb (coupé par Hind III) est utilisé pour repérer la taille des bandes obtenues. L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 100 V pendant une heure. La lecture s'effectue sous une lampe à U.V. (Ultra Violet) avec un imageur, intégrant le logiciel informatique Alpha Imager (Alpha Inntech Corporation, San Leandro, USA). (Tagu et al, 2003)

Aucun produit d'amplification ne doit apparaître pour le témoin négatif (tube sans ADN).

Les produits d'amplification obtenus pour les souches de contrôle doivent avoir la taille attendue.

Lorsqu'il ya un produit d'amplification avec l'ADN de la souche étudiées, comparer la taille du fragment obtenu avec celle de la souche de contrôle.

### **8. Purification des produits PCR: (Bogard, 1998)**

Ce protocole permet de purifier les produits PCR pour effectuer ensuite la réaction de séquençage.

Les échantillons amplifiés sont purifiés selon le protocole de purification enzymatique, ainsi deux types d'enzymes sont utilisés:

**1- L'exonucléase I** : permet d'éliminer les amorces libres grâce à son activité exonucléasique

**2-La Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (ou phosphatase de crevette)**: Enlève les phosphates

en 5' des dNTP et donc rend leur incorporation dans l'ADN impossible.

Cette purification enzymatique nécessite deux incubations successives :

- Incubation à 37°C; pour permettre l'action des enzymes
- Incubation à 85 °C; permet la dénaturation des enzymes.

Le produit PCR est ensuite directement utilisable pour la réaction de **séquençage**.

#### **• Préparation du mix de purification :**

(0.2 à 0.4) µl ..... *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)*

(0.2 à 0.4) µl ..... *Exonucléase I*

3 µl ..... *de produit de PCR*

*Qsp 10 µl.....d'H2O de biologie moléculaire stérile*

• Incubation dans le thermocycleur Eppendorf

Programme : PURIFENZ

20 min à 37°C

20 min à 85°C

**Taleau 8: Amorces utilisées dans l'étude (Guessennd et al, 2008 ; Park et al, 2006)**

Gène	Amorce	Séquence (5' _ 3')	Position	La taille
<b>QnrA</b>	QnrA (+)	T T CTCACGCCAGGATTTGAG	339 - 358	571
	QnrA (-)	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	910 - 891	
<b>QnrB</b>	QnrB (+)	TGGCGAAAAAATT(GA)ACAGAA	54 - 73	594
	QnrB (-)	GAGCAACGA(TC)GCCTGGTAG	648- 630	
<b>QnrS</b>	QnrS (+)	GACGTGCTAACTTGCGTGAT	101 - 120	388
	QnrS (-)	AACACCTCGACTTAAGTCTGA	489 - 469	
<b>aac(6')-Ib</b>	aac(6')-Ib (+)	ATGACTGAGCATGACCTTG	442 - 460	476
	aac(6')-Ib (-)	AACCATGTACACGGCTGG	918 - 901	
<b>os-5 (+)</b> <b>os-6 (-)</b>	os-5 (+)	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	23 - 42	795
	os-6 (-)	GATTTGCTGATTTTCGCTCGG	818 - 799	
<b>a216 (+)</b> <b>a217 (-)</b>	a216 (+)	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1 - 21	1079
	a217 (-)	GACAGTTACCAATGCTTAATCA	1080 - 1059	
<b>bla SHV</b>	ctxM1(+)	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	65 - 84	863
	ctxM1(-)	TTGGTGACGATTTTAGCCGC	928 - 909	
<b>bla TEM</b>	ctxM2(+)	ATGATGACTCAGAGCATTCG	6 -25	865
	ctxM2(-)	TGGGTTACGATTTTCGCCGC	871 - 852	
<b>bla</b>	ctxM9(+)	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	6336-6355	869
	ctxM9(-)	CCCTTCGGCGATGATTCTC	7205-7187	
<b>CTXM- Groupe1</b>	cmy2 (+)	AATCGTTATGCTGCGCTCTGC	1934-1954	1136
	cmy2 (-)	G(CT)AGCTTTTCAAGAATGCGCC	3064-3043	
<b>bla CTXM- Groupe2</b>	veb (+)	ATTTATTCCGGAAGTCCCTGT	351-370	542
	veb (-)	TTCCCGATGCAAAGCGT	893 – 875	
	dhaM(+)	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	1244-1265	405
	dhaM (-)	CCGTACGCATACTGGCTTTGC	1648-1628	

**Taleau N°9 : Conditions d'amplification par PCR (Guessennd et al, 2008 ; Park et al, 2006)**

	<b>Température / Temps</b>				
	<i>blaTEM</i>	<i>blaSHV</i> , <i>CTXM</i> , <i>veb,ges</i>	<i>AmpC</i> ( <i>fox,cit</i> , <i>dha</i> )	AAC	<i>Qnr</i> A, B, S
<b>Dénaturation Initiale</b>	94°C/5min	94°C/5min	94°C/3min	94°C/5min	94°C/5min
<b>Dénaturation Cyclique</b>	94°C/1min	94°C/1min	94 °c/30s	94°C/1min	94°C/1min
<b>Hybridation</b>	50°C/1min	60°C/1min	64 °c/30s	55°C/1min	60 °c/45s
<b>Cyclic elongation</b>	72°C/1min	72°C/1min	72°C/1min	72°C/1min	72°C/1min
<b>Final elongation</b>	72°C/1min	72°C/7min	72°C/7min	72°C/7min	72°C/1min
<b>Number of cycles</b>	30	30	25	30	30

### 9. Séquençage des produits PCR :

#### • Principe:

La réaction de séquence consiste en une synthèse in vitro d'ADN avec une incorporation aléatoire de dideoxynucléotides.

La matrice (ici un fragment d'ADN purifié) doit être présente en grande quantité (> 100 millions de copies dans le tube de réaction). Elle est mise en contact avec un mélange réactionnel comprenant d'une ADN polymérase (Taq polymérase), une amorce s'hybridant en 3' du fragment à séquencer, un tampon et un mélange de dNTP+ddNTP .

Chaque ddNTP porte un fluorochrome spécifique (voir tableau 10). Le ratio ddNTP/dNTP est de l'ordre de 1/100. Il existe donc 100 fois plus de chance d'incorporer un dNTP qu'un ddNTP.

L'incorporation d'un ddNTP stoppe la réaction d'élongation (formation d'un fragment plus court que le fragment d'origine).

La synthèse d'ADN est complémentaire de la matrice initiale : donc, sur un brin de matrice, lorsqu'il existe un A, il va y avoir incorporation d'un dTTP ou d'un ddTTP fluorescent. Si le fragment de PCR initial comporte 300 A, comme la réaction est faite avec un très grand nombre de copie de la matrice, il y aura incorporation d'un ddATP à toute les positions possibles (incorporation aléatoire).

Il existera dans le tube, 300 fragments néosynthétisés, porteurs du ddTTP fluorescent et de taille différente. Cette réaction est effectuée simultanément avec les 4 ddNTP. Ainsi, pour un produit PCR de 800 pbd, il y aura donc génération de 800 fragments fluorescents ne différant que d'une pbd. Ces fragments néosynthétisés sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide, et après séparation électrophorétique, un laser vient exciter le fluorochrome ce qui permet d'identifier la base correspondante. Un tracé est finalement obtenu après analyse de l'ensemble des fragments générés.



En général, une réaction de séquençage est effectuée sur les deux brins de l'ADN (réaction sens et reverse) : ceci permet de contrôler la présence d'une mutation au niveau de l'ADN et donc de les différencier des erreurs effectuées par l'ADN polymérase utilisée lors de la réaction de séquençage. (*Tagu et al, 2003*).

**Taleau10 : les ddNTP et leurs fluorochrome spécifique (*Tagu et al, 2003*)**

<i>Didesoxyribonucléotide tri-Phosphate</i>	<i>Fluorochrome</i>	<i>Couleur</i>
<i>ddGTP</i>	R110	Noir
<i>ddTTP*</i>	TAMRA	rouge
<i>ddATP</i>	R6G	vert
<i>ddCTP</i>	ROX	bleu

• **Protocole :**

La séquence nucléotidique est déterminée grâce à l'utilisation du kit Cycle Sequencing using the ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit.

**Préparation du mix de la réaction de séquençage :**

Numéroter des tubes épendorff de 0,2 ml, 2 tubes épendorff par échantillon, (1 sens et 1 antisens) :

<i>Mix big Dye terminator</i>	<i>1 µl</i>
<i>Primer dilué à 3,2 pmol / µL</i>	<i>1.6 µl</i>
<i>Tampon de séquence 5X</i>	<i>2 µl</i>
<i>Eau stérile QSP</i>	<i>7 µl</i>
<i>Addition du Produit de PCR purifiée :</i>	<i>3 µl</i>

Bien mélanger

Mise en marche du thermocycleur EPPENDORF

Utiliser le programme SEQ de 25 cycles

<b>94°C</b>	<b>2 min</b>
<b>96 °c</b>	<b>10 s</b>
<b>50°C</b>	<b>5 s</b>
<b>60°C</b>	<b>4 min</b>

**Purification des produits PCR:**

- Ajouter 70µL d'éthanol absolu et 5 µL d'EDTA, mélanger par retournements successifs.

- incuber 30 secondes à température ambiante.

- Centrifuger 3300 rpm pendant 30 secondes à 14°C.

- Eliminer le surnageant par retournement.

- Centrifuger 300rpm à température ambiante pendant une minute la plaque à l'envers.

- Ajouter 70 µL d'éthanol à 70 % (mélanger par retournement successif).
- Centrifuger 3300 rpm pendant 15 minutes à température ambiante.
- Eliminer le surnageant par retournement.
- Centrifuger à 300 rpm pendant 1 min la plaque à l'envers.
- Laisser sécher 10 à 15 s à température ambiante pour éliminer les vapeurs d'éthanol.
- addition de 20 µl de formamide déionisé.
- Laisser pendant 15 minutes à l'ombre, puis faire une électrophorèse sur ABI PRISM.

### ***Interprétation des résultats***

Les séquences ont été réalisées à l'aide du séquenceur capillaire ABI PRISM R 3130 puis analysées avec le logiciel Seqscape et comparés avec le logiciel BioEdith.

Les comparaisons avec les séquences connues ont été effectuées avec le programme Blast du National Center for Biotechnology Informatiuon.

### ***✚ Conjugaison et transfert de la résistance : (Honoré et al, 2006)***

La conjugaison bactérienne a été réalisée selon la méthode suivante :

A partir d'une culture de 6 heures en bouillon BHI sous agitation, mélanger les volumes 1ml / 1ml :

d'une souche donatrice (souche qnr +) avec la souche réceptrice E.coli K12J5 (résistante à l'azide de sodium) puis laisser conjuguer à 37°C pendant 40 minutes.

Le choix des agents sélectionnant se fait dans le but d'éliminer les souches donatrices et les souches réceptrices qui n'ont pas reçues le plasmide conjugatif, ainsi il ne doit rester sur la boîte de sélection que les souches réceptrices portant le plasmide avec le gène de résistance dont on veut prouver le support plasmidique.

Les clones tranconjugants ont été sélectionnés sur gélose LB (*Luria Bertani*) supplémenté avec l'azide de sodium (200 mg/l) et la ceftasidime (2 mg/l).

Pour vérifier le transfert de la résistance, le contrôle de la sensibilité de chaque souche a été réalisé par la méthode de diffusion en gélose selon les recommandations du CA-SFM et par la détermination de la CMI par la technique de E test.

La confirmation du transfert des gènes de résistance a été réalisée par la technique de PCR.

Détermination du profil plasmidique : (*Kado et Lu, 1981*)

L'extraction de l'ADN plasmidique des souches qnr positives et de leur transconjugant a été extrait en utilisant deux solution **A** et **B** :

**Solution A** : 1 ml Tris 1 M pH 8  
 0.4 ml EDTA 0.5 M pH 8  
 18.6 ml H2O stérile

**Solution B**: 1 ml Tris 1 M pH 8  
 3 ml SDS 20 %  
 15 ml H2O sterile

1.025ml            NaOH 2M

***Technique:***

- A l'aide d'une pipette on prélève directement les colonies sur boîte (culture jeune).
- Resuspendre ces colonies dans 50 µl de solution A (cell suspension)
- Ajouter 100 µl de la solution B (solution de lyse)
- Incuber 30 à 40 minutes à 56°C, puis faire refroidir dans la glace
- Ajouter 100 µl de la solution phénol / chloroforme, puis agiter.
- Centrifuger 12000 rpm pendant 20 minutes.
- Récupérer 80 µl de surnageant
- Déposer 30 µl sur gel d'agarose à 0.75 %, laisser migrer pendant 3 heures.

Les profils plasmidiques ont été analysés après migration de 30 µl du surnageant avec un bleu de dépôt par électrophorèse en gel d'agarose à 0.75 % ; l'agarose est dissous dans le tampon TBE ×1 (Tris Borate EDTA).

L'électrophorèse est réalisée dans du tampon TBE×1 sous une tension de 90 V pendant 3 heures. Le gel est ensuite observé sous lumière UV.

La taille des plasmides a été estimée par comparaison avec des plasmides de taille connue : RP4 (54 kb) et Pip 173 (125.8 kb).

# **Résultat et discussion**

## Résultat et Discussion

### 1. L'identification des souches

Les résultats de l'identification des souches d'entérobactéries selon l'aspect des colonies sur milieu sélectif et chromogène des espèces d'entérobactéries les plus fréquemment isolées.

**Tableau N°11: Aspect des colonies sur milieu sélectif et chromogène des espèces d'entérobactéries les plus fréquemment isolées. (Yanat.,2009)**

Espèces	Aspect des colonies		
	BCP	Hecktoen	UriSelect
<i>E. coli</i>	Jaune, bombées	Rose/saumon	Rose
<i>K. pneumoniae</i>	Jaune, muqueuses	Saumon, muqueuses	Bleu foncé
<i>E. cloacae</i>	Jaune	Saumon	Violette ou Bleu à reflet rose
<i>P. mirabilis</i>	Incolores, envahissantes	Vertes à centre foncé, envahissantes	Brun orangé



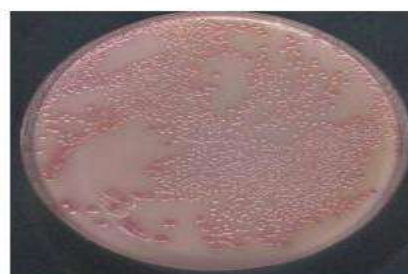
*Proteus mirabilis*



*Klebsiella pneumoniae*



*Enterobacter cloacae*



*Escherichia coli*

**Figure 21 : Aspect des colonies de certaines espèces d'entérobactéries sur milieu Uriselect (Yanat.,2009)**

### 2. Répartition des souches par espèce

L'espèce la plus fréquemment isolée est *E. coli* avec un taux de 71.42%, suivie des espèces du genre *Klebsiella* (*K. pneumoniae* et *K. oxytoca*), *Proteus mirabilis* et *Enterobacter cloacae* avec des taux de 12.92%, 8.16% et 5.89% respectivement (Tableau N°10)

**Tableau N°10 : Répartition des souches par espèce. (Yanat.,2009)**

	<i>Espèces</i>				
	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Autre</i>
<b>Nombre de souches</b>	315	57	36	27	7
<b>%</b>	71.42	12.92	8.16	5.89	1.58

*Autres : Citrobacter sp, Providencia sp, Serratia sp*

L'espèce *E. coli* est de loin le germe le plus fréquemment isolé dans les infections urinaires, ces résultats sont à rapprocher d'une étude réalisée par Lemort et al., (*Lemort et al., 2006*).

Cela est en rapport avec la physiopathologie de l'infection urinaire qui est en général ascendante, et il existe une forte colonisation du périnée par les entérobactéries d'origine digestive, et en particulier *E. coli*. A cela s'ajoutent des facteurs spécifiques d'uropathogénicité. Ainsi, *E. coli* possède des adhésines, capables de lier la bactérie à l'épithélium urinaire et d'empêcher son élimination par les vidanges vésicales. *Klebsiella* et *Proteus* secrètent une uréase qui alcalinise l'urine, dont le pH naturellement acide empêche la prolifération des germes (*Le Minor et Veron, 1989*).

### 3. Analyse des phénotypes de résistance

#### 3.1. Déduction des phénotypes de résistance aux quinolones

Les phénotypes de résistance aux quinolones des souches d'entérobactéries isolées sont déduits selon leur sensibilité vis à vis de trois antibiotiques : l'acide nalidixique (NA), la ciprofloxacine (CIP) et la norfloxacine (NOR) (tableau N°11).

**Tableau N° 11: Mécanismes probables de la résistance aux quinolones (Soussy, 2006).**

<i>NA</i>	<i>NOR</i>	<i>CIP</i>	<i>Mécanisme probable de résistance</i>
<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>Sauvage</i>
<i>I</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>Réduction d'accumulation ou Qnr</i>
<i>R</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>1 mutation gyrA</i>
<i>R</i>	<i>I</i>	<i>S</i>	<i>1 mutation gyrA</i>
<i>R</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>1 mutation gyrA + 1 mutation parC</i>
<i>R</i>	<i>R</i>	<i>I</i>	<i>2 mutations gyrA + 1 mutation parC</i>
<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>2 mutations gyrA + 1 mutation parC+-perméabilité</i>

## Résultat et Discussion

**S : Sensible, I : Intermédiaire, R : Résistant**

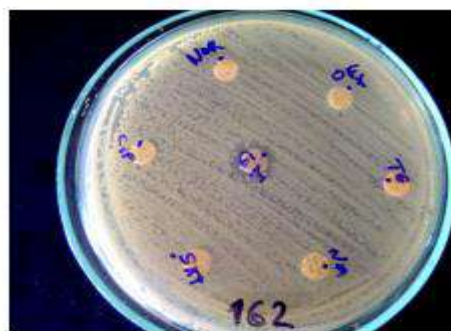
**gyrA** : gène codant pour la sous-unité A de la gyrase.

**qnr** : gène codant pour la protéine Qnr.

**parC** : gène codant pour la sous-unité C de la la topoisomérase IV.

### 3.2 L'antibiogramme

Lorsqu'une bactérie est isolée à partir d'un prélèvement, sa sensibilité aux antibiotiques doit être recherchée. Ce test est capital, il permet de choisir un antibiotique adéquat pour le traitement. La détermination de l'activité des antibiotiques est réalisée par la méthode de diffusion sur gélose (Mueller Hinton), et l'interprétation a été faite selon les normes du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie CASFM. Lors de notre étude nous avons cherché à déterminer la sensibilité et la résistance des microorganismes identifiés à différents antibiotiques.



**a : Phénotype une mutation dans *gyrA***

**b : Phénotype deux mutations dans *gyrA* +  
une mutation dans *parC* +/- perméabilité**

**NA : acide nalidixique, OFX : ofloxacine, NOR : norfloxacin, CIP : ciprofloxacine,**  
**Figure 22: Antibiogrammes des quinolones des deux souches d'entérobactéries ayant  
différents phénotypes de résistance.(Yanat.,2009)**

### **Mécanismes moléculaires de résistance aux quinolones :**

L'amplification par PCR en utilisant des amorces spécifiques montrent que les BLSE exprimées sont de type TEM (5/6), SHV (2/6), et CTXM du groupe 1 (4/6), aucune bla de type CTX M groupe 2, 8 et 9, n'a été détectée, et aucune souche ne produisait les céphalosporinases de type AmpC testées (DHA, CMY, CIT, FOX, VEB). Quatre souches sur six exprimaient au moins deux types de bêta-lactamase (Tableau 2).

Le criblage du gène *aac* (6')-Ib montre que ce gène était présent dans trois souches des 25 étudiées et qui étaient aussi productrices d'une BLSE. Les réactions de séquençage indiquent la présence du variant *aac* (6')-Ib-cr dans l'une des souches (Tableau 16 et 18) (figure 16)

La recherche de souches porteuses des gènes *qnr* parmi les souches étudiées montre que

## Résultat et Discussion

deux souches (2 / 25) sont qnr B positives qui s'avèrent être le variant qnrB1 après séquençage. Les gènes qnr A et qnr S n'ont pas été détectés (figure 14).

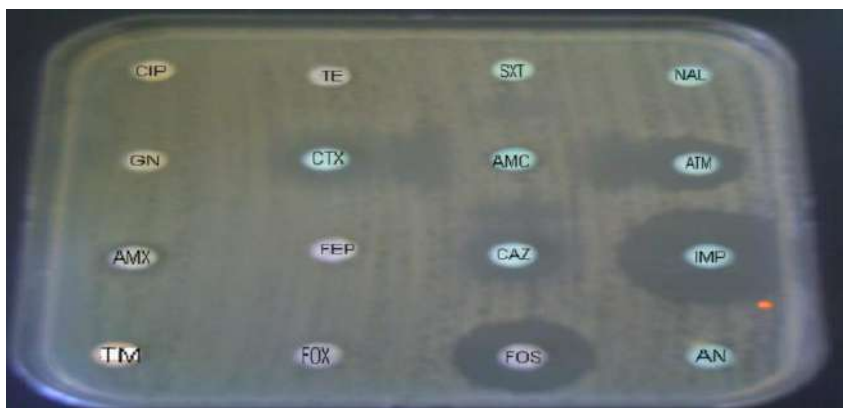
Les deux souches qnr B positives (S14: *Enterobacter cloacae* et S17: *Klebseilla pneumoniae*) sont multi-résistantes par production de BLSE.

Ces deux souches qnr B positives présentent un très haut niveau de résistance à l'acide Nalidixique (CMI > 256 µg/ml) à la ciprofloxacine (CMI > 32 µg/ml) et à toutes les Céphalosporines testées avec des CMI > 256 µg/ml.

Ces deux souches sont aussi résistantes à la gentamycine et à la tobramycine mais le niveau de résistance est différent, ainsi la souche S14: *Enterobacter cloacae* présente un très haut niveau de

résistance avec des CMI > 256 µg / ml pour toutes les aminosides testées.

Par contre pour la souche S17 la CMI vis à vis de ces aminosides oscille entre 8 et 128 ug/ml (Tableau 17)



**Fig 23 : Photo de la détermination de la CMI d'antibiotiques vis-à-vis de la souche S 17: *Klebseilla pneumoniae*(Meradi.,2017)**



**Fig 24 : Photo de la détermination de la CMI d'antibiotiques vis-à-vis de la souche transconjugante Tc 17 (Meradi,2017)**



## Résultat et Discussion

**AK : 0.16 - 256 µg / ml**

**CI : 0.02 - 32 µg / ml**

**GM: 0.16 - 256 µg / ml**

**NA: 0.16 - 256 µg / ml**

### ***Etude du transfert de la résistance aux quinolones :***

Afin de déterminer la transférabilité du plasmide portant le gène *qnr* et examiner une éventuelle association des gènes *qnr* et les BLSE des souches *qnr* positives, des expériences de conjugaisons ont été réalisées en utilisant la souche d' *E.coli* K12J5 résistante à l'azide de sodium comme souche réceptrice.

Après criblage des transconjugants sur milieu sélectif, les réactions de PCR montrent que les transconjugants hébergeaient le gène *qnr* (figure 15).

Deux transconjugants Tc14 et Tc17 obtenus respectivement des isolats 14 et 17 étaient résistants à l'amoxicilline, ceftazidime, céfotaxime, cefoxitine et céfépime et montrent une diminution de sensibilité à la tobramicine et gentamicine.

Ceci indique un co-transfert des gènes de betalactamases et d'aminoglycosides.

Ce résultat phénotypique concorde avec les résultats d'amplification des gènes de résistance de BLSE et de *aac (6')-Ib* chez les transconjugants. (Tableau 13) (Figure 27 , 30 et 31).

Tous les transconjugants ont révélé une diminution de sensibilité vis-à-vis des quinolones comparativement à la souche d'*E.coli* K12J5.

Le niveau de résistance aux quinolones transférés par le gène *qnr* est relativement faible, puisque l'augmentation des CMI des quinolones n'est que de 2 à 48 fois par rapport aux CMI mesurées vis à vis de la bactérie réceptrice *E.coli* K12J5 Cette augmentation est peu visible sur l'antibiogramme par diffusion.

L'analyse du contenu plasmidique des souches hébergeant le gène *qnr* et de leurs Transconjugants montre que les gènes de résistance aux quinolones (*qnr*, *aac (6') Ib-cr*) et la *blaCTM1* sont portés par un même plasmide de haut poids moléculaire (>125 kb) (Figure 32), par contre le gène *SHV11* de la souche S17 semble être porté par un autre plasmide autre que celui portant les gènes de résistance aux quinolones.

**Tableau n°12 Sensibilité aux antibiotiques et types de gènes de résistance aux BLSE et aux quinolones des souches étudiées.**

<i>code</i>	<i>Souche</i>	<i>Qnr</i>	<i>aac (6')Ib</i>	<i>Type de BLSE</i>	<i>Profil de résistance aux antibiotiques</i>
S1	<i>Kp</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>TEM SHV</i>	NAL SXT TE AN ATM TM GM CTX CAZ AMX
S2	<i>Kp</i>			<i>TEM CTXM1</i>	NAL CIP TE ATM TM GM AMC CTX CAZ FEP AMX
S3	<i>Ecl</i>			<i>CTXM1</i>	NAL TE AN TM GM AMC CTX FOX AMX
S4	<i>Pm</i>			<i>TEM</i>	NAL SXT TE AN ATM GM CTX CAZ FEP AMX
S5	<i>Pm</i>				NAL SXT TE TM GM AMC CTX CAZ FEP AMX
S6	<i>Pm</i>				NAL SXT TE AN GM CTX AMX
S7	<i>Pm</i>				NAL SXT TE GM AMC FOS FOX

## Résultat et Discussion

S8	<i>Pm</i>				NAL SXT TE GM AMC CTX AMX
S9	<i>Ec</i>				NAL SXT CIP TE AMX
S10	<i>Mm</i>				NAL SXT CIP TE AMX
S11	<i>Pv</i>				NAL SXT CIP TE AMC FOS AMX
S12	<i>Pv</i>				NAL SXT TE AN GM CTX AMX
S13	<i>Pm</i>	B			NAL SXT TE AMC FOS AMX
S14	<i>Ecl</i>		aac(6')-Ib-cr	<i>TEM CTXMI</i>	NAL SXT CIP TE AN ATM TM GM AMC CTX CAZ FEP
S15	<i>Mm</i>	B			AMX FOX
S16	<i>Pv</i>		aac(6')-Ib	<i>TEM SHV CTXMI</i>	NAL TE GM FEP AMX
S17	<i>Kp</i>				NAL SXT CIP TE GM AMX FOX
S18	<i>Ec</i>				NAL SXT CIP ATM TM GM CTX CAZ FEP AMX
S19	<i>Ec</i>				NAL SXT CIP TE AN ATM GM AMC CTX CAZ FOS FEP
S20	<i>Ec</i>				AMX FOX
S21	<i>Ec</i>				NAL SXT CIP TE AMX
S22	<i>Pm</i>				NAL SXT CIP TE GM AMX
S23	<i>Ec</i>				NAL SXT CIP TE GM AMX
S24	<i>Ecl</i>				NALTE AMX
S25	<i>Ec</i>				NAL SXT CIP TE AMX NAL SXT CIP TE AMX NAL SXT CIP TE TM GM AMC AMX

EC : Escherichia coli ; ECl : Entrobacter cloacae ; Kp : Klebsiella pneumoniae ;  
Mm : Morganella morganii ; Pm : Proteus morabilis ; Pv : Proteus vulgaris.

**Tableau13: Caractéristiques des souches hébergeant les gènes : qnr et leurs transconjugants**

Souches	Les gènes de Résistance	Profil de résistance	CMI (mg / µl)								
			Nal	CIP	CTX	CAZ	FEP	Fox	G	AK	Tb
Recipient <i>K12J5</i>	-	-	3	0,02	0,5	1	0,75	8	0,09	0,5	0,3
14	<i>TEM1 CTXM28</i> <i>QnrB1aac(6)Ibcr</i>	<i>Nal SXT CIP TE</i> <i>AN ATM TMGM</i> <i>AMC CTX CAZ</i> <i>FEPAMXFOX</i>	>256	>32	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
E 14	<i>TEM1 CTXM28</i> <i>QnrB1aac(6)Ibcr</i>	<i>Nal SXT CIP TE</i> <i>ATM TM GM</i> <i>AMC CTX CAZ</i> <i>FEP AMXFOX</i>	>256	>32	>256	>256	>256	>256	16	2	8
17	<i>TEM1 CTXM28</i> <i>SHV11</i> <i>QnrB1aac(6)Ib</i>	<i>Nal SXT CIP</i> <i>ATM TM GM</i> <i>CTX CAZ FEP</i> <i>AMX</i>	>256	>32	>256	>256	>256	16	64	8	128
E 17	<i>TEM1 CTXM28</i> <i>QnrB 1aac(6)Ib</i>	<i>ATM TM GM</i> <i>AMC CTX</i> <i>CAZ FEP AMX</i>	6	0.94	>256	128	>256	12	16	3	6

**Taleau n° 14: Résultats du séquençage des gènes**

<i>Souches</i>	<i>QnrB variant</i>	<i>Qnr S variant</i>	<i>AAC variant</i>	<i>SHV</i>	<i>TEM</i>	<i>CTXM</i>
<i>17</i>	<i>B1</i>	-	<i>aac(6')Ib</i>	<i>SHV11</i>	<i>TEM1</i>	
<i>E17</i>	<i>B1</i>	-	<i>aac(6')Ib</i>	<i>Non transféré</i>	<i>TEM1</i>	<i>CTXM 28</i>
<i>14</i>	<i>B1</i>	-	<i>aac(6')Ib-cr</i>	-	<i>TEM1</i>	<i>CTXM 28</i>
<i>E14</i>	<i>B1</i>	-	<i>aac(6')Ib-cr</i>	-	<i>TEM1</i>	<i>CTXM 28</i>

*MW 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 T- A B S MW*

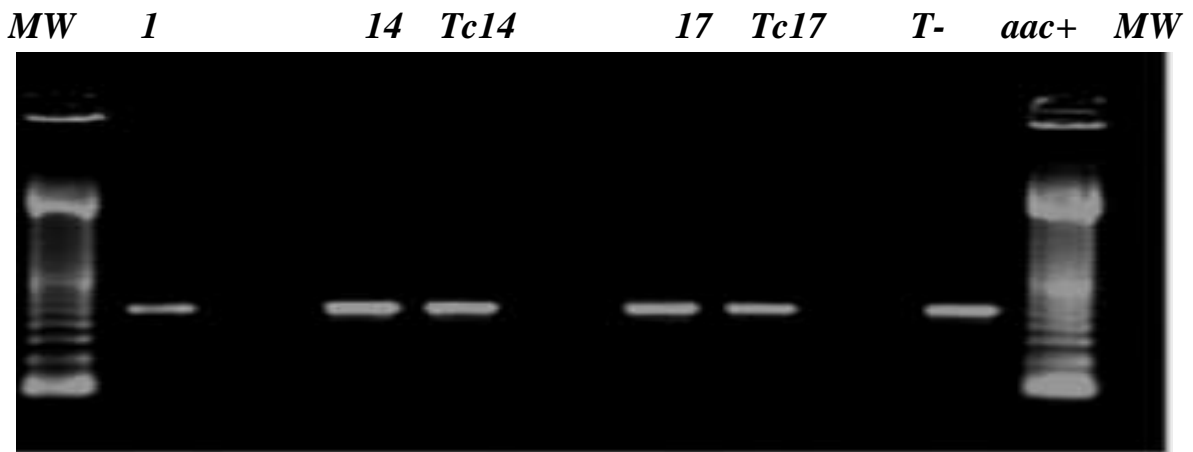


**Fig 25 : Détection par PCR Multiplex du gène qnr à l'aide de trois couples d'amorces spécifiques du gène qnrA; qnrB; qnr S.**

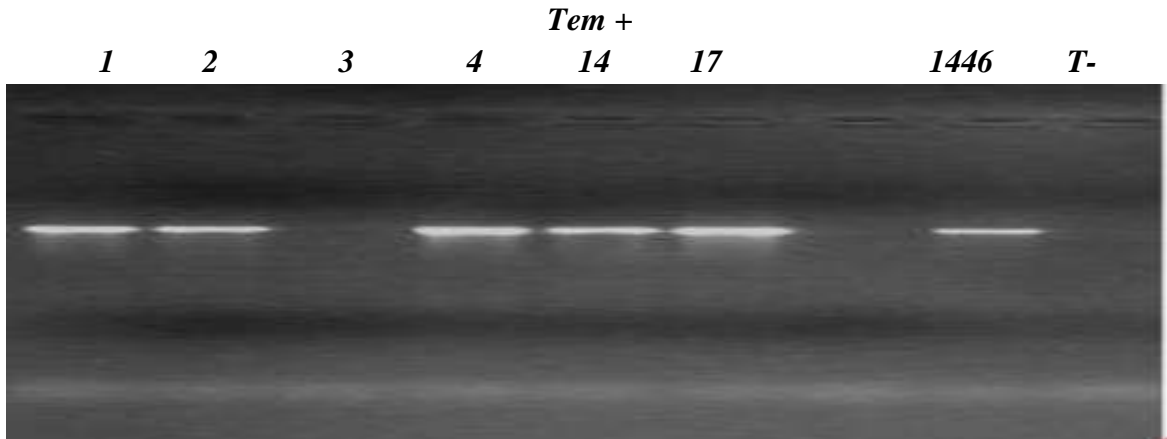
*MW B+ T- 14 Tc14 17 Tc17 T- B+ MW*



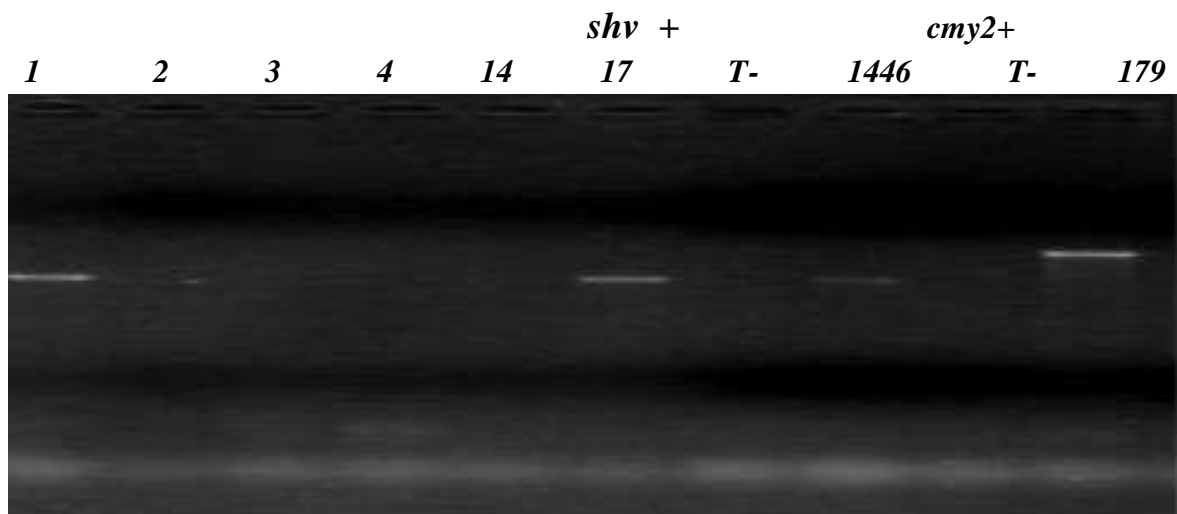
**Fig 26: Détection par PCR simplex du gène qnr à l'aide d'amorces spécifiques du gène qnrB;chez les souches qnr B positif et leurs transconjugants**



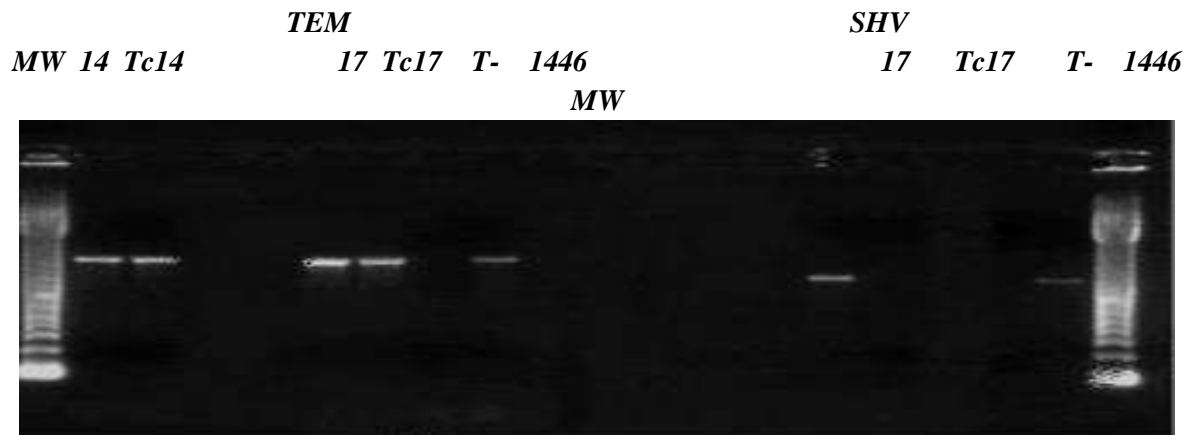
**Fig 27:** Détection par PCR simplex du gène *aac*; chez les souches *aac* positif et les transconjugants des souches *qnrB* positif



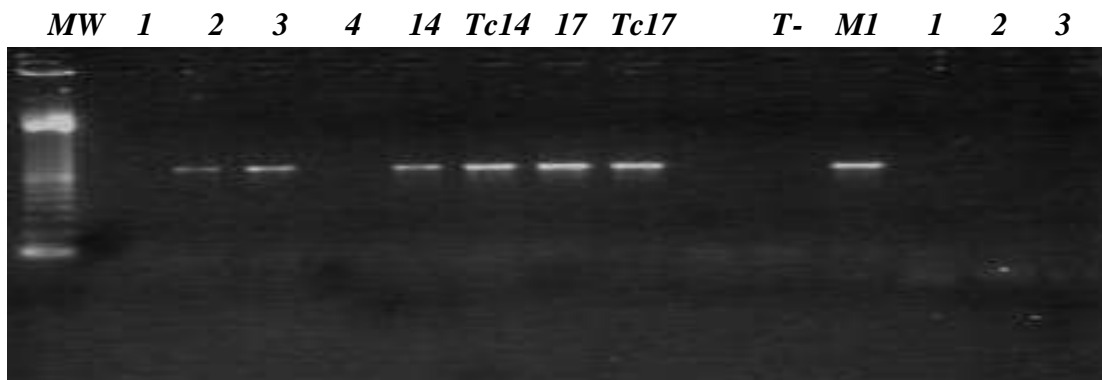
**Fig 28:** Détection par PCR simplex du gène *Tem* chez les souches *BLSE* positif



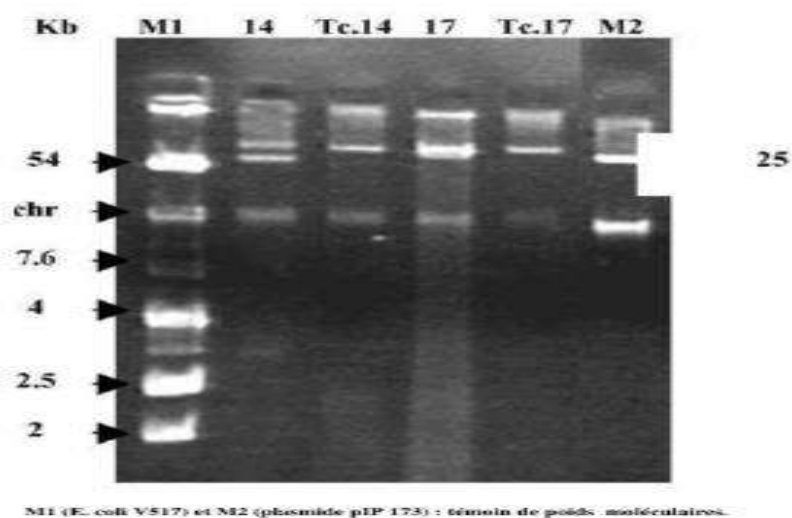
**Fig 29:** Détection par PCR simplex du gène *shv* chez les souches *BLSE* positif.



*Fig 30: Détection par PCR simplex du gène Tem et shv chez les souches qnr positif et leurs transconjugants*



*Fig 31: Détection par PCR simplex du gène CTXM1, CTXM2, CTXM9 chez les souches BLSE positif et les transconjugants des souches qnr B positif*



**Fig 32 : Photo du profil plasmidique des souches qnr positives (S14 et S17) et leurs transconjugants (Tc.14 et Tc17).**

### ***La conjugaison***

Le transfert par conjugaison a été réalisé pour les deux souches productrices de BLSE et intermédiaires à la rifampicine : A134 et A162. Sur la gélose de sélection, aucune croissance n'a été observée. Il n'ya donc pas eu de transfert par conjugaison du gène blaCTX-M. Des résultats similaires ont été rapportés par Touati et al., pour deux souches d'entérobactéries (Touati et al., 2006)

L'absence de transconjugants peut être expliquée par le fait que les plasmides portant le gène blaCTX-M ne soient pas conjugatifs. En effet, même si, dans la majorité des cas, le gène blaCTX-M est porté par un plasmide conjugatif, certains plasmides portant ce même gène ne sont pas transférables (Walther-Rasmussen et Høiby, 2004). Le gène blaCTX-M peut cependant être transféré par d'autres éléments mobilisables à savoir, les intégrons et les transposons (Corkill et al., 2005).

Bien que la technique de PCR multiplex utilisée dans cette étude a permis d'identifier les gènes qnrA, B et S ; elle reste néanmoins limitée. En effet les amorces utilisées ne permettent pas de cribler la totalité des variants qnr décrit jusqu'à présent.

De même d'autre gènes de résistance plasmidique aux quinolones sont récemment décrit qnr C et qnr D (Wang et al, 2009 ; Cavaco et al, 2009) et qui ne sont amplifiables par ces amorces.

### *Discussion*

Quoique la recherche des gènes qnr est souvent effectuée chez les entérobactéries productrices de betalactamases, certaines études ont rapporté la présence de ces gènes chez des souches non BLSE et chez des souches résistantes à l'acide nalidixique et /ou fluoroquinolones avec ou sans une production de BLSE (*Mammeri et al, 2005 ; Wang, 2003*)

Beaucoup d'études basées sur des approches moléculaires ont montré l'association entre les déterminants de la résistance aux quinolones et la production de BLSE.

(*Poirel, et al, 2006 ; Ambrozic Avgustin et al, 2007 ; Rodriguez-Martinez et al, 2008*)

Dans notre étude les souches qnr sont associées à au moins deux types de gènes bla, ce constat a été également fait à Abidjan en Côte d'Ivoire où 30 / 41 des souches qnr produisent au moins deux types de gènes bla. (*Guessennd et al, 2008*)

La caractérisation moléculaire des tansconjugants issus de la souche S14 et S17 et l'étude de leurs profil plasmidique montrent que les gènes CTXM 28, qnr B1 et aac ('6) Ib-cr sont portés par des plasmides conjugatifs de haut poids moléculaire dépassant les 125 kb. Beaucoup d'études ont rapporté des plasmides conjugatifs dont poids moléculaire varie entre 40 et 320 kb comme support des gènes de résistances aux BLSE et aux quinolones (*Mammeri et al, 2005 ; Wang et al, 2003 ; Ambrozic Avgustin et al, 2007 ; Fihman et al, 2008*)

Bien que la technique de PCR multiplex utilisée dans cette étude a permis d'identifier les gènes qnrA, B et S ; elle reste néanmoins limitée. En effet les amorces utilisées ne permettent pas de cribler la totalité des variants qnr décrit jusqu'à présent.

De même d'autres gènes de résistance plasmidique aux quinolones sont récemment décrit qnr C et qnr D (*Wang et al, 2009 ; Cavaco et al, 2009*) et qui ne sont amplifiables par ces amorces.

# **Conclusion Général**



## Conclusion Générale

---

L'efficacité remarquable des antibiotiques au cours du XXe siècle a motivé leur utilisation massive et répétée en santé humaine et animale, que ce soit en ville ou à l'hôpital, ce qui a conduit à l'apparition de bactéries résistantes à ces médicaments, ces résistances sont devenues massives et préoccupantes. Certaines souches sont multirésistantes, c'est-à-dire résistantes à plusieurs antibiotiques. D'autres sont même devenues toto-résistantes, c'est-à-dire résistantes à quasiment tous les antibiotiques disponibles.

L'émergence et la dissémination des bactéries uropathogènes multirésistantes constituent un véritable problème de santé publique et un véritable défi pour les biologistes, les cliniciens, les hygiénistes et les autorités sanitaires.

L'émergence de la résistance plasmidique aux quinolones, aussi bien en milieu hospitalier qu'en pratique de ville, est devenue une préoccupation majeure, d'autant plus qu'elle est souvent associée à la résistance vis-à-vis d'autres classes d'antibiotiques habituellement utilisés en thérapeutique telles que les  $\beta$ -lactamines par la co-expression des gènes *bla* et *qnr*, et peut ainsi conduire à des impasses thérapeutiques.

Le risque épidémique lié à la transmission de la résistance des entérobactéries aux quinolones en milieu extra-hospitalier existe bien en Algérie. Le taux enregistré est d'environ 15% ce qui est relativement élevé et comparable aux taux rapportés dans la littérature, alors que les recommandations actuelles des sociétés d'urologie comme la European Association of Urology (EAU) définissent la possibilité d'utiliser de façon probabiliste un antibiotique dans le traitement des infections urinaires si la résistance des principaux agents infectieux.

Les mesures tendant à prévenir et à maîtriser les conséquences de cette résistance, en milieu communautaire, doivent agir sur les facteurs qui conditionnent son émergence et son évolution :

- ❖ La sensibilisation de la population aux risques par le biais de publicités par exemple.
- ❖ De faire en sorte qu'il y ait une coopération permanente entre médecins, techniciens et chercheurs en organisant chaque année des colloques nationaux et internationaux dans un but thérapeutique et prophylactique.
- ❖ D'améliorer l'usage des antibiotiques en respectant la durée du traitement et en évitant l'automédication.
- ❖ De mettre en place un système de surveillance des résistances et de consommation d'antibiotiques à travers de large base de données et à l'aide de modèle dynamique en vue d'un meilleur contrôle de la diffusion des souches résistantes.

## Conclusion Générale

---

❖ Enfin, une recherche active de nouvelles molécules, fondée sur une connaissance approfondie des mécanismes génétiques et biochimiques de la résistance mais aussi des éléments mobiles qui permettent leurs diffusions, et la mise en évidence de nouveaux sites d'action intrabactériens, doit être développée.



# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ♣ **Ait Miloud, K., 2011.** L'infection urinaire : expérience du laboratoire de microbiologie de l'hôpital des spécialités de Rabat. Thèse Docteur en pharmacie, Faculté de médecine et de pharmacie. Université Mohamed VI Page 76.
- ♣ **Ambrozic Avgustin J., Keber R., Zerjavic K., Orazem T. et Grabnar M., 2007** Emergence of the quinolone resistance-mediating gene *aac (60)-Ib-cr* in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005.
- ♣ Antimicrob. Agents Chemother. 51: 4171–4173.
- ♣ **Andremont D., Skurnik A. (2006).** Antibiothérapie sélectionnante. De la théorie à la pratique. Réanimation 15, 198–204.  
<https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2006.03.002>, consulté le 06/04/2020
- ♣ **APPIT** Association des Professeurs de Pathologie Infectieuse et Tropicale. Infections urinaires. (1997). 2<sup>ème</sup> édition. Montmorency : E PILLY, 169.
- ♣ **Aspevall O, Hallander H. Gant V. Kouri T. (2001).** European Guidelines for Urinalysis: a Collaborative Document Produced By European Clinical Microbiologists and Clinical Chemists Under ECLM in Collaboration with ESCMID. Clin. Microbiol. Infect. ;173-8.
- ♣ **Aprin C, Quentin C, Gobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V. (2009).** Nationwide survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing enterobacteriaceae in the French community setting. J Antimicrob Chemother, 63(6): 1205-14.
- ♣ **Archambaud M. (2009).** Laboratoire Bactériologie-Hygiène Chu Rangueil Toulouse .
- ♣ **Avguštin J. A., Keber R., Žerjavič K., Oražem T., Grabner M. (2007).** Emergence of the quinolone resistance-mediating gene *aac(6')-Ib-cr* in extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. Antimicrob. Agents. Chemother. 51(11): 4171-4173.
- ♣ **Ayad A. ( 2017).** Etude Des Mécanismes De Résistance Aux Antibiotiques Chez *Escherichia coli* Au Niveau Des Hôpitaux De L'Ouest Algérien ; Thèse de doctorat en biologie ; Université Abou Bekr Belkaid ; Tlemcen.
- ♣ **Barraud O, Ploy, M-C. (2011).** Actualités sur les intégrons de résistance aux antibiotiques : mise au point. Journal des Anti-infectieux 13, 133–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.antinf.2011.03.001>, consulté le 01/05/2020
- ♣ **Barraud O. (2011).** Intégrons de résistance et pression de sélection antibiotique (Thèse de doctorat). Université de Limoges. Faculté de médecine et de pharmacie, France.
- ♣ **Baudry P. J., Nichol K, DeCorby M, Lagacé-Wiens P, Olivier E, Boyd D, Mulvey M. R, Hoban D. J, Zhanel G. G. (2009).** Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from Canadian intensive care units: the 1st report of QepA in North America. Diagn. Microbiol. and Infect. Dis. 63 (3):319-3.
- ♣ **Ben-Ami R., Rodriguez-Banjo J, Arsalan, J.D. D., Pitout, Quentin E. S., (2009).** A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing enterobacteriaceae in non-hospitalized patients. Clin Infect Dis; 49(5): 682-90

- ♣ **Battraud,P., ( 2017).**La Résistance Aux Antibiotiques ; Un Mythe Ou Une Réalité ; Thèse de Doctorat ; Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille ; France.
- ♣ **BogardM. et LamorilJ. (1998)**  
Biologie Moléculaire en biologie clinique. I. Méthodes.  
Collection Option Bio. Ed, Elsevier. p.309
- ♣ **Boutoille D., (2011).** IFSI Nantes. Infections Urinaires ; Maladies infectieuses et Tropicales.
- ♣ **Brown K., (2004).** Penicillin Man: Alexander Fleming and the Antibiotic Revolution. 320 Sutton Publishing. ISBN 0-7509-3152-3.
- ♣ **Bryskier A.(1999).**Antibiotiques et agents antibactériens. In : Bryskier. A. (eds), Antibiotiques,agents antibactériens et antifongiques. Ellipses, Paris; 71-72, 688,
- ♣ **Cambau E., Lascols C., SougakoffW., Bébéar C., Bonnet R., Cavallo J.-D., Gutmann L., M.-C. Ploy, Jarlier V.,Soussy C.-J.,Robert J., (2006).** Occurrence of qnrApositivclinical isolates in French teaching hospitals during 2002–2005. Clin. Microbiol.Infect. 12: 1013-1020.
- ♣ **Carroll S.B., Doebley J., Griffiths A.J.F., Wessler S.,(2013).**Introduction à l’analyse génétique. De Boeck Supérieur.
- ♣ **Cattoir V. P., Lesprit C., Lascols, Denamur E., Legrand P., Soussy C. J., Cambau .E., (2006).** In vivo selection during ofloxacin therapy of *Escherichia coli* with combinedtopoisomerase mutations that confer high resistance to ofloxacin but susceptibility to nalidixicacid. J. Antimicrob. Chemother.58(5):1054-7.
- ♣ **Cattoir V., Weill F-X., Poirel L., FabreLSoussy., C-J., Nordmann P., (2007).**Prevalence of qnr genes in *Salmonella* in France. Int J Antimicrob Chemother. 59: 751–754.
- ♣ **Cattoir V., Poirel L., Nordmann P.,(2007).**Plasmid-mediated quinolone resistancedeterminant QnrB4 identified in France in an *Enterobacter cloacae* clinical isolatecoexpressing a QnrS1 determinant. Antimicrob. Agents. Chemother. 51(7): 2652–2653.
- ♣ **Cattoir V., Poirel L., Nordmann P, (2008).**Plasmid-mediated quinolone resistancelpump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. Antimicrob. Agents. Chemother. 52(10): 3801-3804.
- ♣ **Cattoir V., Nordmann P., Silva-Sanchez J., Espinal P., PoirelL,(2008).**ISEcp1-Mediated Transposition of qnrB-Like Gene in *Escherichia coli*. Antimicrob AgentsChemother. 52(8): 2929–2932.
- ♣ **Cavaco L., HasmanM. H., Xia S., Aurestrup F. M.,(2009).** Qnr D, a novel gene conferringtransferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and*Bovismorbificans* strains of humain origin. Antimicrob Agents Chemother. 53(2):603-8.
- ♣ **Cesaro A., Dit Bettoni R. R., Lascols C., Mérens A., Soussy C. J. , Cambau E.,(2008).**Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmidborneqnr genes. Int J Antimicrob. Chemother. Abstract
- ♣ **Chmelnitsky I., Navon-Venezia S., Strahilevitz J., Carmeli Y., (2008).** PlasmidmediatedqnrB2 and carbapenemase gene blaKPC-2 carried in the same plasmid in

carbapenem- resistant ciprofloxacin –suceptible *Enterobacter cloacae* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 52(8): 2962-2965.

♣ **Chu D. T. W., Fernandes P. B.,(1989).**Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. Antimicrob Agent Chemother. 33(2): 131-135.

♣ **CLSI,2005 Clinical and Laboratory Standards institute.**

Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth informational supplement M100-S15. CLSI, Wayne, PA, USA.

♣ **Collis C. M., HalR. M.,(1995).**-Antimicrobial agent and chemotherapy,-Am Soc Microbiol

♣ **Corvec, S., D. Lepelletier, A. Reynaud, S. Dauvergne, C. Giraudeau and N. Caroff. (2008).** In vivo selection of an *Escherichia coli* isolate highly resistant to ciprofloxacin and ceftazidime: role of 4-bp duplication in *acrR* and *ampC* overexpression. Int. J. Antimicrob. Agents. 32 (2) : 196-198.

♣ **COURTIN J.-P., (2012).** L’homme et les lois de la nature 2. Lulu.com.

♣ **Courvalin P., (1997).** Évoluât, on de la résistance aux antibiotiques. m/s 13, 2

♣ **Darguere JM.** antibiotiques : intérêts, limites alternatives naturelles:<http://presse.signesetsens.com/science/lhistoire-des-antibiotiques.html>.

♣ **Davies SC, Fowler T, Watson J, Livermore DM, Walker D.** Annual report of the Chief Medical Officer: infection and the rise of antimicrobial resistance. Lancet. 2013 May 11; 381(9878):1606–9. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60604-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60604-2) PMID: 23489756.

♣ **Decoster A, Lahieu J C.,(2006).**Cours de Bactériologie : Les entérobactéries Disponible sur : <http://anne.decoster.free.fr/bgn/enterob.htm>.

♣ **Dellit T.H., Owens RC., McGowan JE.,(2012).**Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. Clin Infect Dis 2007 ; 44 : 159-77

♣ **Dufour D.,(2008).** Recherche de déterminants génétiques permettant l’adaptation d’une souche *Escherichia coli* à la mamelle bovine (Thèse de Doctorat). Institut National Polytechnique de Lorraine.

♣ **Escribano I., Rodriguez J.C., Cebrian L., RoyoG.,(2004).**The importance of active efflux systems in the quinolone resistance of clinical isolates of *Salmonella spp.*Int. Antimicrob. Agents. 24: 428-432.

♣ **Fàbrega A., Sánchez-Céspedes J., Soto S., Vila J.,(2008).** Quinolone resistance in the foodchain. Int J Antimicrob Agents. 31(4):307-15.

♣ **Fihman V., Lartigue M.F., Jacquier H., (2008)**

Appearance of *aac* (60) –*Ib* -*cr* gene among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a French hospital. J. Infect. 56 : 454 – 459.

♣ **Flandrois, (1997).** Bactériologie médicale. Presses Universitaires Lyon.

♣ **Fouquet.M, V. Morange, F. (2012).** Bruyère. Évolution sur cinq ans des infections à germes produisant une  $\beta$  -lactamase à spectre étendu. Prog Urol. ; 22 : 17-21.

- ♣ **François H., Brandstätter A., Bréchet C., Huttner A., (2013).** Infections Urinaire. HUGDMCPRU- Service de médecine de premier recours.
- ♣ **Garnier F., Raked N., Gassama A., Denis F., Ploy M-C, (2006).** Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sul1*-type integron in the newly described *Salmonella enterica serovar* Keurmassen. *Antimicrob Agents and Chemother.* 50(9): 3200-3202.
- ♣ **Gay K., Robicsek A., Strahilevitz J., (2006).** Plasmid mediated quinolone resistance in nonTyphi *Salmonella*. *Clin Infect Dis.* 43: 297-304.
- ♣ **Georges, C. François-Marie, L. (2008).** Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Lavoisier.
- ♣ **Giraud E., Boucheron S., Cloeckert A., (2006).** Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging of mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes and Infect.* 8: 1937-1944.
- ♣ **Giraud M., Fosse T., (2008).** Evolution récente et caractérisation des entérobactéries productrices de BLSE au CHU de Nice (2005-2007). *Pathol Biol.* 2676-2683.
- ♣ **Gootz. T. D. (2006).** The forgotten Gram-negative bacilli: What genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. *Biochemical Pharmacol.* 71(7):1073-1084.
- ♣ **Gruteke P., Goessens W., Gils J. V., Peerbooms P., Toom N. L., Santen-Verheuel M. V, Belkum A. V., Verbrugh H., (2002).** Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. *Clin Microbiol. Rev.* 41: 1161-1166.
- ♣ **Guessennd N., Bremont S., Gbonon V., Kacou-NDouba A., Ekaza E., Lambert T., Dosso M., Courvalin P., (2008).** Résistance aux quinolones de type *qnr* chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire. *Pathol Biol.* 56
- ♣ **Guillot J., (1990).** Bases moléculaires et épidémiologiques de l'antibiorésistance bactérienne. *Annales de Recherches Vétérinaires* 21, 1-11.
- ♣ **Hata M., Suzuki M., Matsumoto M., Takahashi M., Sato K., Ibe S., Sakae K., (2005).** Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 801-803.
- ♣ **Ho PL., WW. Poon, SL. Loke, MS. Leung, KH. Chow, RC. Wong, KS. Yip, EL. Lai, KW. Tsang. (2007).** Community emergence of CTX-M type extended-spectrum betalactamases among urinary *Escherichia coli* from women. *J Antimicrob Chemother.* 60(1):140
- ♣ **Hocquet D., Patry I., Dupont P., Bize M., Jeannot K., Chavanet P. and Plésiat P. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* : conséquences thérapeutiques et détection au laboratoire. *Pathol Biol.* 53 : 495-499.
- ♣ **Honoré S., Lascols C, Malin D, Targaouchi R, Cattoir V, Legrand P, Soussy C. J and Cambau E (2006).** Emergence et diffusion chez les entérobactéries du nouveau



mécanisme derésistance plasmidique aux quinolones Qnr (hospital Henri\_Mondor 2002-205). Pathol Biol.54: 270-279.

♣ **Hooper, D. C. (2002).** Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. Infect Dis. 2:530-536.

♣ **Hopkins K. L., Davies R. H and Threlfall E.J.(2005).** Mechanisms of quinolone resistance in Escherichia coli and Salmonella: Recent developments. Int J Antimicrob Agents. 25: 358-373.

♣ **Hopkins K. L., Wootton L. Day M.R and Threlfall E.J.(2007).** Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrS1 found in Salmonella enterica strains isolated in the UK. Int J Antimicrob Chemother. 59: 1071–1075.

♣ **Hu, Li-Fen., Jia-Bin. Li, Ying. Ye, and Xu. Li. (2007).** Mutations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in clinical strains of fluoroquinolone resistant *Shigella* in Anhui, China. J of Microb. 45 (2): 168-170.

♣ **Jacoby G., Chow N, 1 and Waites K.B. (2003).** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother. 47 (2): 559-562.

♣ **Jacoby G. A., Walsh K.E, Mills D.M, Walker V.J, Oh H, Robicsek A et Hooper D. C. (2006).** Qnr B, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. Antimicrob Agents Chemother. 50 (4): 1178-1182.

♣ **Jacoby G. A., Cattoir V, Hooper D, Martínez- Martínez L, Nordmann P, Pascual A., Poirel L and M. Wang. (2008).** Qnr gene nomenclature. Antimicrob Agents Chemother. 52(7): 2297-2299.

♣ **Joly B, Reynaud A.(2003)** Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic (Coll.Monographie de microbiologie).

♣ **Kado C.I., Liu S.T, (1981)**

Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids.

J. Bacteriol. 45:1365 – 1373

♣ **Kaneko,2005.**

♣ **Kehrenberg C., Friederichs S, Jong A, Brenner Michael G, and Shwarz S. (2006).** Identification of the plasmid born-quinolone resistance gene qnrS in *Salmonella enterica* serovar Infantis. Int J Antimicrob Chemother. 58 : 18-22.

♣ **Kim S.Y., Park Y-J, J. K. Yu. Y. S. Kim, and K.H. (2009).** Prevalence and characteristics of aac(6')-Ib-cr in AmpC- producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicenter study from Korea. Diagn Microbiol Infect Dis. 63:114-118.

♣ **Kim H. B., Park C.H., Kim C.J, Kim E-C, Jacoby G.A. (2009).** Prevalence of plasmid mediated quinolone resistance determinant over 9 year-period. Antimicrob Agents Chemother. 53 (2): 639-645.

♣ **King D. E., Malone R, et Lilley S.H. (2000).** New classification and update on the quinolone antibiotics. Am Fam Physician. 61: 2741-8.

♣ **Kiralj R.M., Ferreira M.C. (2005).** Molecular graphics approach to bacterial AcrB protein-β-lactam antibiotic molecular recognition in drug efflux mechanism. J. Mol. Graph. Mod. 25 (1):126-145.

- ♣ **Kumar A., Schweizer H. P. (2005).** Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev.* 57:1486-513
- ♣ **Larouche G. (2001).** Les quinolones des années soixante à aujourd'hui. *Pharmactuel.* 34(2) :40-46.
- ♣ **Lascols C., Robert J., Cattoir V., Bébéar C., Cavallo J-D., Podglajen I., Ploy M-C., Bonnet R., Soussy C-J., Cambau E. (2007).** Type II topoisomerase mutations in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and other enterobacterial species harbouring the *qnrA* gene. *Int J Antimicrob Chemother.* 29: 402-409.
- ♣ **Lavigne J-P., Marchandin H., Delmas J., Bouziges N., Lecaillon E., Cavalie L., Jean-Pierre H., Bonnet R., Sotto A.,(2006).** *qnrA* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 50 (12) : 4224–4228.
- ♣ **Lavigne J.P.(2007)** ; Effet Des Antibiotiques, Mécanismes De Résistance ;Thèse de doctorat. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes ; France.
- ♣ **Lavigne JP, Le Moing V, Sotto A.(2005).** Quels antibiotiques utiliser en pratique courante dans les infections urinaires communautaires en France .*Spectra Biologie.* n° 146.
- ♣ **Lavilla S., González-Lopez J.J, Sabaté M, Garcia-Fernández A, Larrosa M.N., Bartolomé R.M., Carattoli A and Prats G. (2008).** Prevalence of *qnr* genes among extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *Int J Antimicrob Chemother.* 61: 291–295.
- ♣ **Lecaillon. E, Blosser-Middleton R, Sahm D, Jones M . (2004).** Activity of nalidixic acid and fluoroquinolones on *Escherichia coli* strains isolated from non-complicated urinary infections (réseau TSN - France, 1999 - 2001). *Med Mal Infect.*34(10):450-4.
- ♣ **Le Minor. L et Veron. M. (1989).** Bactériologie médicale. Paris. Flammarion. P773
- ♣ **Le Minor C. and Richard C(1993).** Méthode de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur, France.
- ♣ **Lefevre T. Raymond M. Thomas F. (2016).** Biologie évolutive. De Boeck Supérieur
- ♣ **Lemort ML, Neuville S, Medus M, Gueudet P, Saada M, Aumaître H, Lecaillon E. (2006).** Évolution comparée de la sensibilité de souches de *Escherichia coli* isolées d'infections urinaires de patients consultant aux urgences et de patients hospitalisés en 2002 et 2004 à l'hôpital de Perpignan. *Pathol Biol.* 54 (8-9): 427-430.
- ♣ **Levy SB, Marshall B (2004).** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.*, 10: 122-129. 10.1038/nml 145.
- ♣ **Li X-Z. (2005).** Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Antimicrobial Agents.* 25 : 453–463.
- ♣ **Liassine N., Zulueta-Rodriguez P, Corbel C, Lascols C, Soussy C.J. and Cambau E. (2008).** First detection of the plasmid-mediated quinolone resistance in extended spectrum  $\beta$ -lactamases producing Enterobacteriaceae isolated from in- and out-patients in Switzerland. *Int J Antimicrob Chemother.* 62(5):1151-1152.
- ♣ **Lobel. B., Valot A, Cattoir V, Lemenand O et Gaillot O. (2008).** Comparaison de la sensibilité aux antibiotiques de 1217 isolats consécutifs de *Escherichia coli* responsables d'infections urinaires féminines en ville et à l'hôpital. *Press Med.* 37 : 746-750.

- ♣ **Lozniewski A., Rabaud C., Nancy, (2010).**Résistance bactérienne aux antibiotiques. [http://nosobase.chulyon.fr/recommandations/cclin\\_arlin/cclinSudEst/2010\\_ResistanceAntibioResist\\_CCLinSE.pdf](http://nosobase.chulyon.fr/recommandations/cclin_arlin/cclinSudEst/2010_ResistanceAntibioResist_CCLinSE.pdf), consulté le 22/03/2020
- ♣ **Mainil A, Muylaert J.(2013).** Résistance bactérienne aux antibiotiques, les mécanismes et leur “contagiosité.” *Annales de Médecine Vétérinaire* 156.
- ♣ **Mahamat A., Daurès J.P, and Sotto A. (2005).**Evaluation de la relation consommation de fluoroquinolones et émergence de résistance chez *Escherichia coli*: rôles respectifs et comparatif des études observationnelles et quasi expérimentales. *Médecine Mal Infect.* 35 : 543-548.
- ♣ **Mallèa M., Chevalier J, Eyraud A, and J. M. Pages. (2002).** Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:1370-3.
- ♣ **Mammeri H., Van De Lee M, Poirel L, Martinez-Martinez L, and Nordmann P. (2005).**Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 49 (1): 71-76.
- ♣ **Marchal N, Bourdon J L, Richard C L. (1982).**Les milieux de culture, pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries *Biologie appliquée*.
- ♣ **Martinez-Martinez L., Pascal A, and Jacoby G.A. (1998).** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 351 : 797-99.
- ♣ **Merlin C. Toussaint A. (1999).** Les éléments transposables bactériens. *médecine/sciences* ♣ 15, I. <https://doi.org/10.4267/10608/1491>, consulté le 02/04/2020.
- ♣ **Michael, B. et Smith, H. (1993);** Dépistage Des Infections Des Voies Urinaires Chez Les Nourrissons Et Les Enfants Asymptomatique ;Canada ;247-259p.
- ♣ **Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé, (2011).** Plan National D'alerte Sur Les antibiotiques. Disponible sur [http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/plan\\_antibiotiques\\_2011-2016\\_DEFINITIF.pdf](http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/plan_antibiotiques_2011-2016_DEFINITIF.pdf)
- ♣ **Mrich H.(2018);** Profil De L'antibio-Résistance De L'infection Urinaire Nosocomiale En Urologie Expérience Du Service D'urologie CHUMohammed VI ;Thèse de doctorat. Faculté de médecine et de pharmacie ; Marrakache.
- ♣ **Nathanson S., et Deschênes G. (2002).** Antibioprophylaxie urinaire. *Arch Pediatr.* 9(5):511-8.
- ♣ **Nazic H., Poire L and Nordmann P. (2005).** Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(5) : 2146-2147.
- ♣ **Nordmann P., Poirel L., (2005).** Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 56: 463-469.
- ♣ **Nordmann P.,(2006).** L'émergence de la résistance plasmidique aux quinolones chez les entérobactéries. *Pathol Biol.* 54 : 7-9.
- ♣ **Nordmann P., et Mammeri H. (2007).** Résistance plasmidique aux quinolones. *ANTIBIOTIQUE.* 9 : 246-53.
- ♣ **Olliver A., Vallé M., Chalus-Dancla E and Cloeckeaer A. (2004).** Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of in vitro-selected fluoroquinolone-resistant

mutants of *Salmonella enterica serovar typhimurium*. FEMS Microbiol Lett.; 238(1):267-72.

♣ **OMS, (2014)** ; Rapport Mondial De L'oms Sur La Résistance Aux Antimicrobiens ; [En ligne]. Disponible sur <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/>

♣ **Ourvalin P. (2008)**; La Résistance Des Bactéries Aux Antibiotiques: Combinaisons De Mécanismes Biochimiques Et Génétiques ; Bull. Acad. Vét. France-Tome 161 - N°1.

♣ **Paaw A., Fluit A.C., Verhoef J. (2006)**. Enterobacter cloacae outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital. Emerg Infect Dis. 12: 807-12.

♣ **Pagès J. M. (2004)**. Porines bactérienne et sensibilité aux antibiotiques. M.S. 20 (3): 346-351.

♣ **Pai H., Seo M-R. and Choi T.Y. (2007)**. Association of QnrB determinants and production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases or plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 51(1)

♣ **Park C. H., Robicsek A, Jacoby G.A., Sahm D, and Hooper D.C. (2006)**. Prevalence in the United States of aac (6)-Ib-cr Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. Antimicrob Agents Chemother. 50(11): 3953–3955.

♣ **Park Y-J., Yu J.K., Lee S., Oh E-J and Woo G-J. (2007)**. Prevalence and diversity of qnr alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. Antimicrob Agent Chemother. 60: 868–871.

♣ **Pascual A. Poirel L and Wang M. (2008)**. Qnr gene nomenclature. Antimicrob Agents Chemother. 52 (7): 2297-2299.

♣ **Paterson DL. (2004)**. Collateral damage from cephalosporin or quinolone antibiotic therapy. Clin Infect Dis; 38 Suppl 4: S341-5.

♣ **Paterson D. L. (2006)**. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. Am J Infect Control. ; 34(1):S20-8.

♣ **Pechere J.C., Acar J., Armengaud M., Grenier B., Moellering R., Sande M., Waldvogel F., Zinner S. (1991)**. Les infections (chapitre 20 : infections urinaires). 3<sup>ème</sup> édition. Paris : edisem, 334-338.

♣ **Pereira A. S., Andrade S.S., Monteiro J, Sader H.S., Pignatari A.C.C., Gales A.C. (2007)**. Evaluation of the Susceptibility profiles, genetic similarity and presence of qnr gene in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals. Brazilian J Infec Dis. 11(1):1413-8670.

♣ **Perichon B., Courvalin P, Galimard M. (2007)**. Transferable resistance to aminoglycoside by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA mediated efflux in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 51(7): 2564-69

♣ **Piddock L.J.V. (2006)**. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pump in bacteria. Clin Microb Review. 19(2): 382-402.

♣ **Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. (2005)**. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. J Antimicrob Chemother. 56(1):52-9.

- ♣ **Pitout, J.D.D., Wei Y, Church D.L. and Gregson D.B. (2008).** Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary health region, Canada: the emergence of aac (60)-Ib-cr. *Antimicrob Chemother.* 61: 999–1002.
- ♣ **Plésiat. P. 2006.** Biochimie de la résistance. In : Courvalin. P, Leclerc. R et Bingen. E (eds), *ANTIBIOGRAMME*, 2ème ed ESKA, Paris; 17.
- ♣ **Ploy M.-C., Lambert T., Gassama A., Denis F.(2000).** Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. *Annales de Biologie Clinique* 58, 439-44.
- ♣ **Poirel L., Van De Loo M, Mammeri H, and Nordmann P. (2005).** Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase VEB-1. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (7) : 3091–3094
- ♣ **Poirel L., Rodriguez-Martinez J-M, Mammeri H, Liard A. and Nordmann P. (2005).** Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother.* 49 (8): 3523–3525.
- ♣ **Poirel L., Leviandier C, and Nordmann P. (2006).** Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and Qnr S in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(12): 3992-3997.
- ♣ **Poirel L., Pitout J.D.D. ; Calvo L, Rodriguez-Martinez J-M., Church D. and Nordmann P. (2006).** In vivo selection of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 50 (4): 1525-1527.
- ♣ **Poirel L., Vu Nguyen T., Weintraub A, Leviandier C and Nordmann P. (2006).** Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrS in *Enterobacter cloacae*. *Clin Microbiol.* 12:1021–1023.
- ♣ **Poirel L., Cattoir V, Soares A, Soussy C-J and Nordmann P. (2007).** Novel Ambler class A  $\beta$ -Lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrS1. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(2): 631–637.
- ♣ **Prescott L.M., Klein D.A., et Harley J.P. (2010).** *Microbiologie ; 3ème édition De Boeck ; 1088 p.s selon leurs sites d'action*
- ♣ **Raven P.H., Singer S.R., Johnson G.B., Mason K.A., Losos J.B. (2017).** *Biologie. De Boeck Supérieur*
- ♣ **Robicsek A., Jacoby G.A and Hooper D.C. (2006).** The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Infect. Diseases.* 6: 629-640.
- ♣ **Robicsek A., Strahilevitz J, Jacoby G.A. (2006).** Fluoroquinolone modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* 12: 83-8.
- ♣ **Robicsek A., Strahilevitz J, Sahn D.F, Jacoby G.A and Hooper D.C. (2006).** Qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrob Agent Chemother.* 50(8): 2872-2874.
- ♣ **Rodriguez-j -Banjo, Picon E, Gijon.P, Ramon-Hernandez J, Cisnero J.M, Pena C et al.(2010)** Risk factors and prognosis of nosocomial bloodstream infections caused by

extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol; 48(5): 1726-31.

♣ **Rodríguez-Martínez J. M., Pascual A, García I and Martínez-Martínez L. (2003).** Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type  $\beta$ -lactamase. Antimicrob Chemother 52: 703–706.

♣ **Rodríguez-Martínez J.M., Velasco C , Garcia I , Cano M.E, Martínez-Martínez L, Pascual A. (2007).** Characterisation of integrons containing the plasmid-mediated quinolone resistance gene qnrA1 in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents 29: 705-709.

♣ **Ruiz J. (2003).** Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. Antimicrob Chemother. 51: 1109-1117.

♣ **Roy D. (2000).** Identification et caractérisation de la région variable des intégrons de classe 1 identifiés chez différents isolats cliniques à gram négatif et caractérisation du mécanisme de résistance aux  $\beta$ -Lactamines chez un isolat de salmonelle spp. Isolé au Québec (Mémoire de maître ès sciences). Université Laval

♣ **Saito R., Kumita W, Sato K, Chida T, Okamura N, Moriya K and Koike K. (2007).** Detection of plasmid-mediated quinolone resistance associated with qnrA in an *Escherichia coli* clinical isolate producing CTX-M-9  $\beta$ -lactamase in Japan. Antimicrob Agents. 29: 597-611.

♣ **Samir I. (2011).** Intégrons : structure et épidémiologie (Thèse de Doctorat). Université de Mohammed V

♣ **Satoshi M. (2008).** Multidrug efflux transporter, AcrB –the pumping mechanism. Current Opin in structur Biol. 18: 459-465.

♣ **Schaumann R et Rodloff A.C. (2007).** Activities of quinolones against obligately anaerobic bacteria. Anti-infect Agents in Med Chem 6: 49-56.

♣ **Shen et coll. (1989).** Cités par **Soussy C.J. (2006).** Quinolones et bactérie à Gram négatif In : Courvalin. P, Leclerc. R et Bingen. E (eds), ANTIBIOGRAMME, 2ème ed ESKA, Paris; p264.

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

♣ **Shen P., Jiang Y, Zhou Z, Zhang J, Yu Y, Li L. (2008).** Complete nucleotide sequence of pKP96 a 67 850pb multiresistance plasmid encoding qnrA1, aac(6')-Ib-cr and blaCTX-M-24 from *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 62(6): 1252-6.

♣ **Skurnik D. Andremont A. (2006).** Antibiothérapie sélectionnante. De la théorie à la pratique. Réanimation 15, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2006.03.002>, consulté le 03/04/2020

♣ **Slayton RB, Toth D, Lee BY, Tanner W, Bartsch SM, Khader K, et al. (2015).** Vital Signs: Estimated Effects of a Coordinated Approach for Action to Reduce Antibiotic Resistant Infections in Health Care Facilities - United States. MMWR / August 4, / Vol. 64: 1-7.

- ♣ **Sophie Z.** (2014) ;La Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques : Apparition Et Stratégies De Lutte. Thèse de doctorat en Pharmacie ;Université De Limoges. Vienne.
- ♣ **Sorlozano A., Gutierrez J, Jimenez A, Luna J.D and Martinez J.L.** (2007).Contribution of a new mutation in parE to quinolone resistance in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *J of Microb.* 45 (8): 2740-2742.
- ♣ **Soussy C.J.** (2006). Quinolones et bactérie à Gram négatif In : Courvalin. P, Leclerc. R et Bingen. E (eds), ANTIBIOGRAMME, 2ème ed ESKA, Paris; p263-275.
- ♣ **Soussy C.J.** (2007). Résistance bactérienne aux antibiotiques. In : B. Lobel et C-J Soussy. Les infections urinaires. Ed Springer Paris. p21.
- ♣ **Steven J Hoffman, Grazia M Caleo, Nils Daulaire, Stefan Elbe et al.** (2015).Strategies for achieving global collective action on antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ* ;93:867–876 | doi : <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.15.153171>
- ♣ **Steven L. Chang. et Linda, D.**(2006);Pediatric Urinary Tract Infections in *Pediatr Clin N Am* 53; Edition: Elsevier Inc; 379-385-386-400
- ♣ **Strahilevitz J., Engelstein D, Adler A, Temper V, Moses A.E., Block C, and Robicsek A.** (2007). Changes in qnr prevalence and fluoroquinolone resistance in clinical systems: self-imposed selection pressure. *Antimicrob Chemother.* 57, 1026-1029.
- ♣ **Tagu D. et Moussard C.**(2003)  
Principes des techniques de biologie moléculaire  
2ème édition, INRA. p. 102.
- ♣ **Tchuinte, P.L.S. n.d.** Intégrons de classe 3 : aspects mécanistiques et épidémiologiques (Thèse de Doctorat). Université de Limoges.
- ♣ **Teo J. W. P., K. Y. Ng and Lina R. T. P.** (2009). Detection and genetic characterisation of qnrB in hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. *Antimicrobial Agents.* 33:177–180. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(8): 2872–2874
- ♣ **Torpdahl M., Hammerum A.M., Zachariasen C and Nielsen E.M.**(2009). Detection of qnr genes in *Salmonella* isolated from humans in Denmark. *J Antimicrob Chemother.*63(2):406-408.
- ♣ **Touati. A.** (2006). Caractérisation des phénotypes de résistance des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines isolées en milieu hospitalier ; cas de deux hôpitaux de ola wilaya de Béjaia.(Thèse de doctorat). Université A. Mira.
- ♣ **Touati A., Brasme L, Benallaoua S, Gharout A, Madoux J and C. De Champs.** 2008.First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagnos Microbiol Infect Dis.* 60 : 287–290.
- ♣ **Tran J.H., and Jacoby G.A.**(2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Pnas.* 99(8): 5638-5642.
- ♣ **Tran J. H., Jacoby G.A., and Hooper D.C.** (2005). Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(1) : 118-125.
- ♣ **Trystam, D., Grenet K, Cambau E, Péan Y, Fiévet M H, Jarlier V et Robert J.** (2002).Evolution de la sensibilité aux quinolones et aux fluoroquinolones des bacilles à

Gram négatif aérobies isolés dans un hôpital universitaire (1992-2000). *Pathol Biol.* 50 : 30-37.

♣ **Vuillemin P. (1890).** Antibiose et symbiose, Association française pour l'avancement des sciences, compte rendu de la 18e session, seconde partie, Notes et mémoires, vol. 11, p. 525-543.

♣ **Wang, M., Sahm D. F., Jacoby G. A., Zhang Y, and Hooper D.C. (2004).** Activities of newer quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr. *Antimicrob Agents Chemother.* 48 (4) : 1400-1401.34 (5) : S20-S28.

♣ **Wang, M., Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, Hooper D. C., and Wang M. (2009).** New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, qnrC, Found in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* Abstract.

♣ **Wang M., Guo Q., Xu X., Wang X., Ye X., Wu S., et al. 2009**  
**New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of proteus mirabilis.**

***Antimicrob. Agents. Chemother.* 53 : 1892 - 1897**

♣ **Wiegand I., Khalaf N, Al-Agamy N. H. M., Wiedermann B. (2004).** First detection of the transferable quinolone resistance in clinical *Providencia stuartii* strains in Egypt. *Clin Microbiol Infect.* 10 (3): 64.

♣ **Wu, Jiunn-Jong, Ko W-C, Tsai S-H, and 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(4) : 1223–1227.

♣ **Yamane, K., Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T and Arakawa Y. (2007).** New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 51 (9): 3354-3360.

♣ **Yoshida, H., Bogaki. M, Nakamura. M, Yamanaka. L. M and Nakamura. S. (1991).** Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrB gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 35 (8): 1647-1650.





# *Annexes*

**ANNEXE 1**  
Questionnaire

Code :				Code labo :				
Date:			Age :		Sexe : M/F			
Hospitalisation dans les 3 mois précédent : Oui / Non								
Antibiothérapie : Oui / Non								
Antibiotique administré :					Date de début :			
Prélèvement :								
Souche identifiée :								
Antibiogramme réalisé au laboratoire d'analyse								
Antibiogramme complémentaire								
Présence ou absence d'image de synergie								
.....								
.....								
.....								
.....								

## ANNEXE 2

Composition des milieux de culture (pour 1l d'eau distillée) (Le Minor et Richard, 1993).

### Gélose Hektoen :

Protéose peptone	12 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Thiosulfate de sodium	5 g
Sels biliaires	9 g
Citrate de fer ammoniacal	1.5 g
Salicine	2 g
Lactose	12 g
Saccharose	12 g
Fuchsine acide	0.04 g
Bleu de bromothymol	0.065 g
Agar	14 g
	PH 7,5

### Gélose BCP :

Peptone	5 g
Extrait de viande	3 g
Lactose	10 g
Pourpre de bromocrésol	0,025 g
Agar	15 g
	pH 7

### Gélose Mueller Hinton :

Infusion de viande de bœuf	300 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	17 g

PH 7.4

### Gélose mannitol-mobilité :

Peptone trypsique de viande	20 g
Mannitol	2 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
Rouge de phénol à 1 %	0.04 g
Agar	4 g

PH 7.6

### Gélose Mac Conkay :

Peptone de caséine	17 g
Peptone de viande	3 g
Lactose	10 g
Mélange de sels biliaires	1.5 g
Rouge neutre	0.03 g
Chlorure de sodium	05 g
Cristal violet	0.001g
Agar	10 g
	pH 7 ,4

### **Milieu de Hajna-Kligler (KIA) :**

Extrait de viande de bœuf	3 g
de levure	3 g
Peptone (riche en lysine)	20g
NaCl 5 g	5 g
Citrate ferrique 0.3 g	0.3 g
Thiosulfate de sodium	0.3 g
Lactose	1 g
Glucose	1 g
Rouge de phénol (solution à 1%)	5 ml
Agar	12g
	PH 7.4

### **Milieu Uriselect4 :**

- Base nutritive contenant 4 peptones
- 2 substrats chromogènes :  $\beta$ -galactosidase et  $\beta$ -glucosidase
- Tryptophane

### **Bouillon Trypticase soja :**

Peptone tryptique de caséine	17 g
Peptone papaïnique de soja	3 g
Chlorure de Sodium	5 g
Phosphate bipotassique	2 g
Glucose	2 g
	pH 7.3

### **Réactifs**

#### **❖ Réactif de Kovacs**

Para dimethyl-amino-benz-aldehyde	05g
Alcool iso amylique	75ml
Acide chlorhydrique (37%)	25ml

#### **❖ Réactif de VPI**

Naphtol .	6g
Alcool à 90°	100 ml

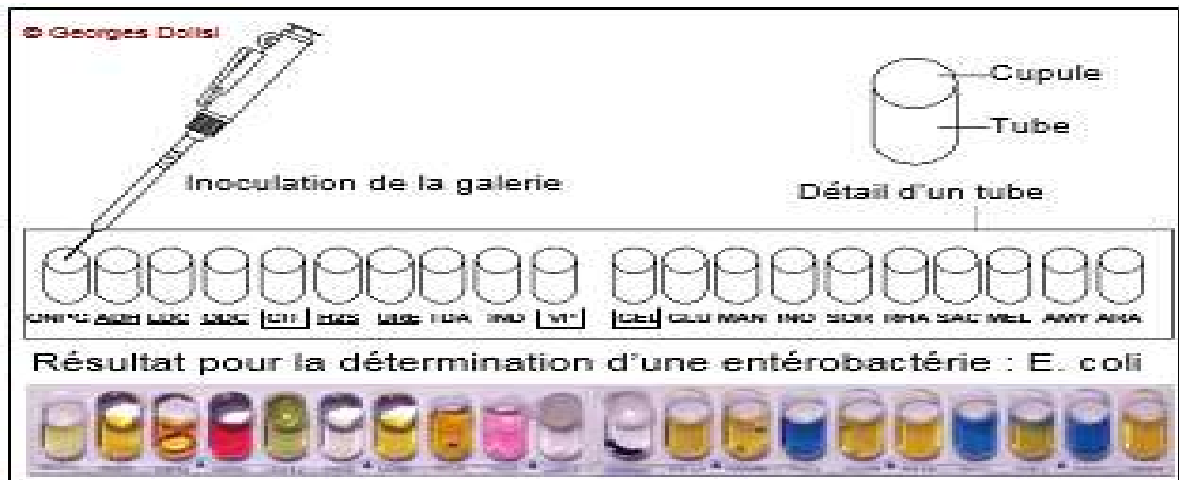
#### **❖ Réactif VP II**

NaOH 4N

#### **❖ Réactif de Tryptophane désaminase (TDA)**

Soluté de perchlorure de fer $FeCl_3$ .	10ml
Eau distillée	20ml

### Annexe 3



**TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E**

Microtube	Substrat :	Caractère recherché	Révéléateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Béta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de phénol	Lecture directe		
[CIT]	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Fe III	Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte		
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte		
[VP]	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte		
[GEL]	Gélatine	gélatinase	Particules de charbon	Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> )	Nitrate réductase		Lecture indirecte		

#### ANNEXE 4

Tableau n°: Diamètres (mm) des zones édités par le CA-SFM, 2007

<b>Antibiotiques</b>	<b>Abréviation</b>	<b>S</b>	<b>R</b>
Céfotaxime	CTX	≥ 21	<15
Ceftazidime	CAZ	≥ 21	<15
Céfépime	FEP	≥ 21	<15
Cefpirome	CFP	≥ 21	<15
Céfoxitine	FOX	≥ 22	<15
Imipénème	IMP	≥ 22	<17
Pipéracilline	PIP	≥ 20	<12
Amoxicilline-clavulanate	AMC	≥ 21	<14
Tétracycline	TE	≥ 19	<17
Colistine	CT	≥ 15	<15
Acide nalidixique	NA	≥ 20	<15
Ciprofloxacine	CIP	≥ 25	<22
Norfloxacine	NOR	≥ 25	<22
Ofloxacine	OFX	≥ 25	<22
Triméthoprime-sulfaméthoxazole	SXT	≥ 16	<10
Rifampicine	RA	≥ 19	<14

## ANNEXE 5

### Electrophorèse en gel d'agarose

#### • Matériel

- Une cuve pour gel immergé + Support de gel + Peigne (VWR international).
- Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 10X (EurobioFrance).
- Solution de bromure d'éthidium (Sigma Aldrich).
- Solution de dépôt : bleu de bromophénol (EurobioFrance).
- Agarose (Invitrogen).
- Four à micro-onde.
- Marqueur de poids moléculaire (fragment de 100 Pb et 1Kb) (EurobioFrance).
- Chambre de visualisation Bio-Profil (Vilbert Lourmat).

#### • Protocole

La technique présentée ici est celle des gels immergés : le gel, horizontal, est immergé dans le tampon d'électrophorèse. Ceci permet d'avoir un contact gel-tampon toujours correct.

Le tampon utilisé est le Tris-Borate-EDTA (TBE). L'avantage de ce tampon par rapport au tampon acétate par exemple, est qu'il n'est pas électrolysé et donc réutilisable à plusieurs reprises. De plus il permet d'obtenir d'assez grandes différences de potentiel pour un ampérage qui reste faible (25 mA à 150 V) ce qui évite un échauffement nuisible à la qualité de l'électrophorèse.

#### • Préparation des gels

- On pèse respectivement 2.4 g d'agarose dans 1 bécher de 250 ml. On ajoute 12 ml de tampon TBE 10X (10 fois concentré) et on complète avec 108 ml d'eau distillée.
- On fait fondre le mélange au four à micro-ondes en arrêtant le four de temps en temps pour agiter. Le mélange doit être parfaitement transparent. On laisse refroidir.
- On ajoute 6 µl de solution de bromure d'éthidium et on homogénéise
- On coule le gel dans le support du gel sans faire de bulles et on place les peignes. On laisse refroidir.

#### • Electrophorèse des produits d'amplification

- Lorsque le gel est polymérisé (environ 20 min), on retire délicatement les peignes et les adhésifs.
- On met le gel dans la cuve d'électrophorèse avec le support.
- On remplit la cuve avec le tampon TBE 1X de façon à ce que le gel soit immergé sous environ 1 mm de tampon.
- 10 µl de produits d'amplification sont mélangés avec 3 µl de « solution de dépôt » qui contient du bromophénol.
- On dépose à l'aide d'une micropipette 10 µl de ce mélange.
- Un puit recevra le produit de l'amplification du témoin positif, un autre celui du témoin négatif et un autre le marqueur de poids moléculaire.
- On branche le générateur et on applique une ddp de 150 V. La durée de migration est d'environ 30 min.



- **Visualisation**

Lorsque la migration est suffisante (environ 30 min), on arrête le générateur, on ôte le support contenant le gel de la cuve et on le place dans une chambre de visualisation. Les bandes d'ADN sont fluorescentes grâce au bromure d'éthidium et une photo du gel est prise.