

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



Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,
des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

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

THESE DE DOCTORAT

En Biologie

Option : Microbiologie

THEME

**Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques
chez *Escherichia coli* au niveau des hôpitaux de l'Ouest
algérien**

Présentée par Amel AYAD

Devant le jury composé de

Pr ABDELOUAHID D.E.	Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen	Président du jury
Pr KHELIL N.	Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen	Examinatrice
Pr BAKOUR R.	Université Houari Boumediène- Alger	Examineur
Pr TOUATI A.	Université Abderrahmane Mira- Bejaia	Examineur
Dr SEBAIHIA M.	Université Hassiba Benbouali- Chlef	Examineur
Pr DRISSI M.	Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen	Directeur de Thèse

Année Universitaire : 2016-2017

« يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ »

سورة المجادلة الآية ١١

العلم يبني بيوتا لا عماد لها

والجهل يهدم بيوت العز و الشرف

احمد شوقي

REMERCIEMENTS

Avant tous je remercie **Dieu, Allah tout puissant**, de m'avoir donné la force, le courage et la volonté pour la réalisation de ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au sein de deux laboratoires : «**Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique**» (LAPSAB) de l'Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Algérie et «**Bactériologie Médicale**» du centre hospitalier universitaire Dijon, France.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse **Monsieur Mourad DRISSI**, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, pour la confiance qu'il m'a témoigné en m'accueillant au sein de son équipe. Je lui exprime ma très grande reconnaissance et le témoignage de mon profond attachement pour l'attention qu'il a porté à cette thèse, pour ses encouragements, sa constante disponibilité et la gentillesse dont il a fait preuve à mon égard.

J'adresse mes vifs remerciements et ma profonde reconnaissance à **Madame Catherine NEUWIRTH**, Professeur et Chef de service du laboratoire de Bactériologie Médicale au CHU de Dijon, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser la plus importante partie de ma thèse au sein de son équipe de recherche et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à son bon déroulement. Je lui remercie d'avoir dirigé ce travail avec beaucoup d'enthousiasme en me faisant bénéficier de ses précieux conseils, de son sens critique et de sa rigueur dans le travail. Merci également pour les corrections de l'article, pour votre gentillesse et votre bonne humeur, veuillez trouver ici le signe de mon profond respect.

Mes remerciements s'adressent également à

Monsieur Djamel Eddine ABDELOUAHID, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Madame Nihel KHELIL, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, **Monsieur Rabah BAKOUR**, Professeur à l'université Houari Boumédiène d'Alger, **Monsieur Abdelaziz TOUATI**, Professeur à l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia, **Monsieur Mohamed SEBAIHIA**, Maître de conférences de classe A à l'université Hassiba Benbouali de Chlef, pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail en acceptant de l'examiner et de le juger. Un remerciement particulier aux examinateurs qui viennent de loin.

Madame Zahia BOUCHERIT, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen et Directrice du Laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » et **Monsieur Kebir BOUCHERIT**, Professeur et Directeur du centre universitaire d'Ain Temouchent, de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de leur équipe de recherche. Veuillez trouver ici tout mon respect et ma gratitude.

Je tiens à remercier aussi

Eliane SIEBOR, Ingénieur de recherche au laboratoire de Bactériologie Médicale au CHU de Dijon, de m'avoir formé en biologie moléculaire. Je lui remercie pour sa disponibilité, ses conseils, sa patience, son soutien et sa gentillesse. Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans ton aide.

Angélique SOULIER-CHAPUIS, Médecin biologiste et **Claire de Curraize**, pharmacienne biologiste au laboratoire de Bactériologie Médicale au CHU de Dijon, pour leur accueil toujours chaleureux au sein du laboratoire, leur aide et leurs précieux conseils.

Lucie AMOUREUX, Médecin biologiste au laboratoire de Bactériologie Médicale au CHU de Dijon, pour sa gentillesse, son aide et de m'avoir fait l'arbre phylogénétique MLST.

Nathalie TAILLEFUMIER et Véronique VARIN, Ingénieurs de recherche au laboratoire de Bactériologie Médicale au CHU de Dijon, pour m'avoir formé au champ pulsé, dont tout le monde connaît sa complexité.

Nadej, Hélène et **Michelle**, Ingénieurs au laboratoire de Virologie au CHU de Dijon, pour le passage des échantillons à séquencer. Sans votre aide je n'aurais jamais pu terminer le séquençage des gènes du MLST.

Monsieur Alain HARTMANN, Professeur et Chercheur à l'INRA de Dijon et **Sébastien SOLANAS**, Ingénieur de recherche à l'INRA de Dijon pour le southern blot.

Julien BADOR, Andrés et **Jean-Marie** ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire de Bactériologie Médicale au CHU de Dijon. Merci pour l'ambiance agréable du travail.

L'ensemble des techniciens et membres du Laboratoire, **LAPSAB**, qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail. Toute ma reconnaissance à tous mes amis et mes collègues de paillasse.

Tous les chefs de services de l'hôpital de Tlemcen, Oran et Sidi Bel Abbes, particulièrement **Madame Souad BEKKHOUCHA**, Chef de service de Bactériologie à l'hôpital d'Oran, **Madame Rachida BENHADDOUCHE**, Chef de service de réanimation à l'hôpital de Tlemcen et **Monsieur Amir BATSSI**, Chef de service de réanimation à l'hôpital de Sidi Bel Abbes, de nous avoir facilité la réalisation des prélèvements.

Tous mes collègues et amis ainsi que l'ensemble du personnel responsables et employés d'administration du Département de Biologie et de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Hassiba Benbouali de Chlef pour leurs aides. Je remercie également les responsables d'avoir m'accordé des financements de stages.

DEDICACES

Je dédie cette thèse à :

***Mes très chers parents,** en hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti pour moi durant mes longues années d'études. Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant et de m'avoir appris de vivre dans l'honneur et dans la dignité. Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer réellement votre juste valeur, mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. Votre confiance et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et continuer vers l'avant. Je mets aujourd'hui entre vos mains le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices. Chaque ligne de cette thèse, chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être toujours avec moi. Quoique je fasse, je ne pourrai jamais vous rendre ce que vous avez fait pour moi.*

***Mon cher frère Mohamed et mes chères sœurs Wafaa et Imene,** veuillez trouver dans ce travail un modeste témoignage de mon amour et toute ma gratitude, de mon affection la plus sincère et de mon attachement le plus profond. Je vous souhaite une belle vie.*

***La mémoire de ma grande mère Fatna, mon oncle Mohamed et ma tante fatiha,** que Dieu les accueille dans son vaste paradis.*

Ma famille et mes amis.

ملخص

Escherichia coli هو ممرض انتهازى ذو احتمالية وباء مرتفعة و غالبا ما يكون مسؤول عن الالتهابات المكتسبة في المستشفيات. ارتفاع وانتشار مقاومة هذه البكتيريا للمضادات الحيوية ، هو مشكلة صحية رئيسية في جميع أنحاء العالم. والهدف من هذه الدراسة متعددة المراكز هو تقييم الوضع الحالي لمقاومة *E. coli* للمضادات الحيوية في مستشفيات شمال غرب الجزائر .

مجموع 240 عينة من نوع *E. coli* تم عزلها، في الفترة الممتدة ما بين أكتوبر 2008 و جوان 2012، على مستوى مختلف الوحدات بالمستشفيات الجامعية لكل من ولاية تلمسان ، سيدي بلعباس و وهران. دراسة حساسية هذه الجراثيم ل 22 مضاداً حيوي منهم 13 بيتاكتامين، 4 أمينوزيد، 3 كينولون، تغميثوبريم/سلفاميثوكسازول والكولستين، كشفت معدلات مقاومة عالية لمعظم المضادات الحيوية التي تم اختبارها. تم الكشف عن العديد من جينات مقاومة البيتاكتامين مع هيمنة الجين التي تشفر البيتاكتاماز ذو المدى الواسع (BLSE) من نوع CTX-M-15 و مع ظهور جينات جديدة *bla*_{CMY-16} و *bla*_{TEM-167}. جينات أخرى لمقاومة الأمينوزيد (*armA*, *rmtB*, *aac(6')-Ib*, *aadA*, *aadB*) ، الكينولون (*aac(6')-Ib-cr*)، تغميثوبريم/سلفاميثوكسازول (*dfrA*) و الكولستين (*mcr-1*) تم أيضا الكشف عنها. انتشار جينات المقاومة في المستشفيات المدرجة في هذه الدراسة يرتبط بانتشار ST405، نسخة دولية خطيرة و بنقل بلازميدات مختلفة (IncF, IncFIA, IncL/M, IncII, IncA/C , IncN) بين سلالات غير متصلة جينيا.

في هذه الدراسة نكشف لأول مرة في الجزائر، عن جينات مقاومة الأمينوزيد (*armA* و *rmtB*) و الكولستين (*mcr-1*) في سلالات *E. coli* جمعت من المستشفى، مسلطين الضوء عن زيادة نسبة السلالات المقاومة للمضادات الحيوية في المستشفيات الجزائرية الأمر الذي يتطلب اتخاذ تدابير الرقابة لمنع انتشارها .

الكلمات المفتاحية: *E. coli*، مقاومة المضادات الحيوية، علم الأوبئة، الجزائر، BLSE ، *armA* ، *rmtB* ، *mcr-1*

Résumé

Escherichia coli est un pathogène opportuniste, à fort potentiel épidémique, fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales. L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez cette espèce, représente un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. L'objectif de cette étude multicentrique est de faire le point sur l'état actuel de la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* dans les hôpitaux du Nord-Ouest algérien.

Un total de 240 souches d'*E. coli* a été collecté, entre Octobre 2008 et Juin 2012, à partir de différents services des centres hospitalo-universitaires de Tlemcen, Sidi Bel Abbes et Oran. L'étude de la sensibilité aux 22 antibiotiques, dont 13 β -lactamines, 4 aminosides, 3 quinolones, le triméthoprim/sulfaméthoxazole et la colistine, a révélé des taux de résistance élevés pour la plupart des antibiotiques testés. Différents gènes de résistance aux β -lactamines ont été détectés avec dominance du gène codant la β -lactamase à spectre élargi (BLSE) CTX-M-15 et émergence de nouveaux gènes *bla*_{TEM-167} et *bla*_{CMY-16}. D'autres gènes de résistance aux aminosides (*armA*, *rmtB*, *aac(6')-Ib*, *aadA* et *aadB*), aux quinolones (*aac(6')-Ib-cr*) au triméthoprim/sulfaméthoxazole (*dfrA*) et à la colistine (*mcr-I*) ont été également détectés. La dissémination des gènes de résistance, au niveau des CHUs étudiés, est liée principalement à la circulation du clone épidémique ST405, clone à haut risque international et au transfert de plasmides de différents groupes d'incompatibilité (IncF, IncFIA, IncL/M, IncII, IncA/C et IncN) entre souches non reliées génétiquement.

Dans cette étude on rapporte pour la première fois en Algérie, la détection des gènes de résistance aux aminosides (*armA* et *rmtB*) et à la colistine (*mcr-I*) chez des souches cliniques d'*E. coli*, soulignant ainsi l'augmentation de la fréquence des souches multirésistantes, dans cette espèce, dans les hôpitaux algériens, ce qui nécessite d'établir des mesures de contrôle pour éviter leur diffusion.

Mots clés : *E. coli*, résistance aux antibiotiques, épidémiologie, Algérie, BLSE, *armA*, *rmtB*, *mcr-I*.

Abstract

Escherichia coli is an opportunistic pathogen with a high epidemic potential, frequently involved in nosocomial infections. The increase and dissemination of antibiotic resistance in this species is a major public health concern worldwide. The aim of this multicentric study is to make the point on the current situation of antibiotic resistance in *E. coli* in hospitals of North-Western Algeria.

A total of 240 strains of *E. Coli* was collected, between October 2008 and June 2012, from various wards of the university hospitals of Tlemcen, Sidi Bel Abbes and Oran. The study of susceptibility to 22 antibiotics, including 13 β -lactams, 4 aminoglycosides, 3 quinolones, trimethoprim/sulfamethoxazole and colistin, revealed high levels of resistance rates for most of the antibiotics tested. Different β -lactam resistance genes were detected with dominance of gene encoding the extended spectrum β -lactamase (ESBL) CTX-M-15 and the emergence of new genes *bla*_{TEM-167} and *bla*_{CMY-16}. Other genes of resistances to aminoglycosides (*armA*, *rmtB*, *aac(6')-Ib*, *aadA* and *aadB*), quinolones (*aac(6')-Ib-cr*), trimethoprim/sulfamethoxazole (*dfrA*) and colistin (*mcr-1*) were also detected. The dissemination of resistance genes, in the hospitals included in this study, is mainly linked to the circulation of the high-risk international clone ST405 and the transfer of plasmids belonging to different incompatibility groups (IncF, IncFIA, IncL/M, IncII, IncA/C and IncN) between strains unrelated genetically.

In this study we report for the first time in Algeria, the detection of aminoglycosides resistance genes (*armA* and *rmtB*) and colistin resistance gene (*mcr-1*) in clinical strains of *E. coli*, pointed out the increase of the frequency of multiresistant strains, in this species, in algerian hospitals, which requires the establishment of control measures to avoid their spread.

Keywords: *E. coli*, Resistance to antibiotics, epidemiology, Algeria, ESBL, *armA*, *rmtB*, *mcr-1*.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.....	I
Liste des figures.....	IV
Liste des tableaux.....	VI
INTRODUCTION.....	1

Première partie : Synthèse bibliographique

1. <i>Escherichia coli</i>	3
2. Antibiotiques	7
2.1 β -lactamines.....	8
2.1.1 Structure et classification.....	8
2.1.2 Mécanisme d'action.....	10
2.2 Aminosides.....	12
2.2.1 Structure et classification.....	12
2.2.2 Mécanisme d'action.....	12
2.3 Quinolones.....	14
2.3.1 Structure et classification.....	14
2.3.2 Mécanisme d'action.....	15
3. Résistance aux antibiotiques chez <i>Escherichia coli</i>	17
3.1 Résistance aux β -lactamines.....	17
3.2 Résistance aux aminosides.....	31
3.3 Résistance aux quinolones.....	36

Deuxième partie : Matériel et Méthodes

1. Lieu d'étude.....	42
2. Prélèvements.....	42
3. Isolement et identification.....	42
3.1 Galerie API 20E.....	42
3.2 MALDI-TOF MS.....	43
4. Etude de la résistance aux antibiotiques.....	43
4.1 Antibiogramme.....	43
4.2 Détermination des CMI.....	44
5. Détection phénotypique des mécanismes de résistance aux β -lactamines.....	44
5.1 Test de synergie.....	44

5.2 Test à la cloxacilline.....	45
5.3 Test d'antagonisme.....	45
6. Détection et identification des gènes de résistance aux antibiotiques.....	45
6.1 Extraction de l'ADN par choc thermique.....	45
6.2 Amplification de l'ADN par PCR simple.....	46
6.3 Séquençage des produits d'amplification.....	49
7. Typage moléculaire des souches d'<i>E. coli</i> multirésistantes.....	51
7.1 Electrophorèse en champ pulsé (ECP).....	51
7.2 Typage par séquençage multilocus (Multi-locus sequence typing ou MLST).....	52
8. Etude de transfert des gènes de résistance aux antibiotiques.....	54
8.1 Conjugaison bactérienne.....	54
8.2 Typage des plasmides.....	54
Troisième partie : Résultats et discussion	
1. Résultats.....	57
1.1 Prélèvements.....	57
1.2 Souches identifiées.....	57
1.3 Résistance aux antibiotiques.....	60
1.3.1 Phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	62
1.3.2 Résistances associées.....	69
1.3.3 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	70
1.4 Identification des gènes de résistance aux antibiotiques.....	72
1.4.1 Gènes de résistance aux β -lactamines.....	72
1.4.2 Gènes de résistance aux aminosides.....	76
1.4.3 Gènes de résistance aux quinolones.....	76
1.4.4 Gènes de résistance à la colistine.....	77
1.4.5 Recherche des intégrons de classe 1.....	78
1.5 Typage moléculaire des souches d' <i>E. coli</i>	79
1.5.1 Electrophorèse en champ pulsé (ECP).....	79
1.5.2 Typage par séquençage multilocus (MLST).....	81
1.6 Transfert des gènes de résistance aux antibiotiques.....	88
1.6.1 Conjugaison bactérienne.....	88
1.6.2 Analyse des plasmides.....	89
2. Discussion.....	95
CONCLUSION.....	105

Références bibliographiques.....	107
ANNEXES.....	139

Liste des abréviations

ACC:	Ambler class C
ACT:	AmpC type
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AME :	Aminoglycoside Modifying Enzyme
AmpC :	β -lactamase de classe C ou céphalosporinase
ArmA:	Aminoglycoside-resistance rRNA methyltransferase A
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique
ATCC:	American Type Culture Collection
ATP:	Adénosine triphosphate
BEL:	Belgium Extended-Spectrum β -lactamase
BES:	Brazilian Extended-Spectrum β -lactamase
BET:	Bromure d'éthidium
BGN:	bacilles à Gram négatif
BIL:	Bilal : nom du patient
bla :	Gène codant une β -lactamase
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
BLSE :	β -lactamases à spectre élargi ou étendu
CASE :	Céphalosporinase
CA-SFM :	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CF :	Céfalotine
CFE:	<i>Citrobacter freundii</i> enzyme
CHU :	Centre Hospitalier Universitaire
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CMY:	Céphamycinase
CTX-M:	Cefotaximase Munich
ddNTP :	Didésoxyribonucléotide triphosphate

DHA :	DHArhan hospital
dNTP :	Désoxyribonucléotide triphosphate
DOR:	Doripénème
DOS :	Désoxystreptamine
DOX:	Doxycycline
ECP:	Electrophorèse en Champ Pulsé
EDTA :	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EPPI :	Eau pour préparation injectable
ESAC :	Extended-Spectrum AmpC
FOX :	Cefoxitin
FSF:	Fosfomycine
GES:	Guyana Extended-Spectrum β -lactamase
IBC:	integron-associated β -lactamase
Inc :	Incompatibilité
Kb :	Kilobase
KN:	Kanamycine
LAT :	Latamoxef
MBL :	Métallo- β -lactamase
ME:	Méropénème
MIR:	Miriam Hospital
MOX:	Moxalactam
NmcA:	Non metallo-carbapenemase-A
NpmA:	novel plasmid-mediated Aminoglycoside-resistance rRNA methyltransferase A
ONERBA :	Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques
OqxAB :	Olaquinox AB
OXA :	Oxacillinase
pAmpC :	β -lactamase plasmidique de classe C
PASE:	Pénicillinase
Pb :	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PER:	<i>Pseudomonas</i> Extended Resistance

PFGE:	Pulsed Field Gel Electrophoresis
QepA:	Quinolone efflux pump A
Qnr:	Quinolone resistance
QRDR :	Quinolone Resistance Determining Region
Rmt :	rRNA methyltransferase
SFC:	<i>Serratia Fonticola</i> carbapenemase
SFO:	<i>Serratia Fonticola</i>
SHV:	Sulfhydryl reagent Variable
SME :	<i>Serratia marcescens</i> enzyme
TAE :	Tris-acétate-EDTA
TBE :	Tris-borate-EDTA
TC :	Transconjugant
TE :	Tris-EDTA
TEM:	Temoneira : nom du patient
TGC:	Tigécycline
TLA :	Tlahuicas-tribu indienne
UFC :	Unité Formant Colonie
UV :	Ultra-violet
V/cm :	Volt/centimeter
VEB:	Vietnam Extended-Spectrum β -lactamase
Xba1 :	<i>Xanthomonas badrii</i> (enzyme de restriction ou endonucléase)

Liste des figures

Figure 1. Sites de colonisation des <i>Escherichia coli</i> pathogènes.....	4
Figure 2. Ordre chronologique de l'apparition des différentes classes d'antibiotiques en usage clinique.....	7
Figure 3. Principales structures des β -lactamines.....	11
Figure 4. Structures des aminocyclitols, noyaux de base des aminoglycosides.....	13
Figure 5. Principales structures des quinolones.....	16
Figure 6. Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase.....	17
Figure 7. Principales enzymes modificatrices des aminosides et leurs substrats.....	33
Figure 8. Carte de l'Algérie montrant la localisation géographique des gènes de résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux quinolones décrits chez <i>E. coli</i>	41
Figure 9. Chromatogramme obtenu par la méthode de séquençage de Sanger.....	50
Figure 10. Fréquence d'isolement d' <i>E. coli</i> en fonction des hôpitaux et de la période d'étude.....	58
Figure 11. Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines selon les hôpitaux.....	63
Figure 12. Phénotype BLSE.....	63
Figure 13. Phénotype PASE.....	64
Figure 14. Phénotype BLSE + CASE.....	64
Figure 15. Test de synergie en présence de cloxacilline à 250 $\mu\text{g/ml}$ pour la souche présentant le phénotype BLSE + CASE.....	65
Figure 16. Phénotype CASE.....	65
Figure 17. Antibiogramme avec cloxacilline à 250 $\mu\text{g/ml}$ pour la souche présentant le phénotype CASE.....	66
Figure 18. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène <i>bla</i> _{CTX-M}	72

Figure 19. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène <i>bla</i> _{CTX-M} du groupe 1.....	73
Figure 20. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène <i>bla</i> _{CTX-M} du groupe 9.....	73
Figure 21. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène <i>bla</i> _{TEM}	73
Figure 22. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène <i>bla</i> _{SHV}	74
Figure 23. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène <i>bla</i> _{CMY-2}	75
Figure 24. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène <i>armA</i>	76
Figure 25. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène <i>rmtB</i>	77
Figure 26. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène <i>aac(6')-Ib-cr</i>	77
Figure 27. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène <i>mcr-1</i>	78
Figure 28. Profil électrophorétique des produits de PCR des Intégrons de classe 1.....	78
Figure 29. Résultat d'électrophorèse en champ pulsé.....	80
Figure 30. Arbre phylogénétique basé sur les séquences des gènes de ménage de 69 souches d' <i>E. coli</i>	82
Figure 31. Antibiogramme de la souche réceptrice K12 C600 (A), la souche donatrice (C) et son transconjugant (B).....	88
Figure 32. Résultats des PCR multiplex des groupes d'incompatibilité des plasmides.....	90

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des antibiotiques selon leurs sites d'action.....	8
Tableau 2. Classification de Bush et Jacoby et correspondance avec la classification structurale d'Amblar.....	18
Tableau 3. Découverte et origine des BLSE.....	22
Tableau 4. β -lactamases identifiées chez <i>E. coli</i> en Algérie.....	29
Tableau 5. Les méthylases de l'ARNr 16S décrites chez <i>E. coli</i>	35
Tableau 6. Gènes de résistance aux aminosides et aux quinolones décrits chez <i>E. coli</i> en Algérie.....	40
Tableau 7: Score d'identification des bactéries.....	43
Tableau 8. Amorces utilisées pour les réactions de PCR.....	47
Tableau 9. Amorces utilisées pour MLST.....	53
Tableau 10. Amorces utilisées pour le typage des plasmides.....	56
Tableau 11. Répartition des prélèvements.....	57
Tableau 12. Fréquences d'isolement d' <i>E. coli</i>	58
Tableau 13. Répartition des souches d' <i>E. coli</i> selon les services.....	59
Tableau 14. Répartition des souches d' <i>E. coli</i> selon les sites de prélèvement.....	60
Tableau 15. Taux de résistance aux antibiotiques des souches d' <i>E. coli</i>	61
Tableau 16. Répartition des phénotypes de résistance aux β -Lactamines des souches d' <i>E. coli</i> selon les services.....	67
Tableau 17. Répartition des phénotypes de résistance aux β -Lactamines des souches d' <i>E. coli</i> selon les sites de prélèvement.....	68
Tableau 18. Résistances associées d' <i>E. coli</i> en fonction des phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	69
Tableau 19. Intervalles de CMI ($\mu\text{g/ml}$) observés en fonction des phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	71

Tableau 20. Répartition des gènes codant les BLSE selon les hôpitaux.....	75
Tableau 21. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches multirésistantes d' <i>E. coli</i> isolées aux CHUs du Nord-Ouest algérien.....	83
Tableau 22. Résultats de conjugaison bactérienne et de typage des plasmides.....	91
Tableau 23. Support des gènes de résistance aux antibiotiques chez les souches productrices de méthylases de l'ARNr 16S.....	94

INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques au début du XXe siècle a constitué une véritable révolution dans le domaine médical. Ces molécules ont été considérées comme étant des armes puissantes qui sauraient éradiquer toute maladie infectieuse d'origine bactérienne. Cette euphorie, longtemps entretenue par la synthèse de nouveaux antibiotiques, a connu un coup d'arrêt vers la fin des années 90 (Monnet, 2000). En effet, devant l'augmentation des infections nosocomiales à bactéries à Gram positif (BGP), les années 1990 et le début des années 2000 ont été marquées par la diffusion des BGP multirésistantes et plus particulièrement des *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) et des entérocoques résistants aux glycopeptides (Hiramatsu, 2001). Pour cela, de nouvelles molécules destinées à traiter ce type de germes ont été développées, mais ceci aux dépens de bacilles à Gram négatif (BGN), chez lesquels sont apparues de multiples résistances (Bush, 2010). Ainsi, l'isolement dans les hôpitaux du monde entier de BGN multirésistants, appartenant essentiellement aux espèces *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*, chez des patients présentant des pathologies sévères, est devenu un phénomène préoccupant pour la santé publique. En outre, avec l'émergence des entérobactéries multirésistantes, responsables de plusieurs pandémies, une nouvelle étape inquiétante est franchie (Cohen et Rollet, 2013).

Les entérobactéries, en particulier *Escherichia coli*, sont des résidents habituels du tractus gastro-intestinal, susceptibles de provoquer de très nombreuses infections, même chez des sujets sans pathologie. *E. coli*, en dépit de son image de bactérie communautaire représente la première cause d'infection nosocomiale dans plusieurs pays (Soussy *et al.*, 2000 ; Amazian *et al.*, 2010). Naturellement sensible à de très nombreux antibiotiques, l'émergence puis la diffusion de différents mécanismes de résistance acquise au sein de cette espèce, aussi bien en ville qu'à l'hôpital, conduit à l'apparition des souches multirésistantes, confrontant parfois les cliniciens à des quasi-impasses thérapeutiques (Brigante *et al.*, 2005). La multirésistance des souches d'*E. coli* est principalement liée à la production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE), à l'hyperproduction de céphalosporinases ou à la production de carbapénémases, qui sont souvent associées à la résistance aux aminosides et/ou aux quinolones (Courvalin et Leclercq, 2012).

La survenue d'infections, à *E. coli*, intraitables par des antibiotiques n'est plus une simple menace pour l'avenir mais une réalité actuelle. Pouvoir endiguer ou du moins maîtriser cette problématique, nécessite une meilleure compréhension des mécanismes d'acquisition de

résistance aux antibiotiques afin de mieux contrôler sa dissémination et pour une meilleure prise en charge thérapeutique.

Ces dernières années, plusieurs études ont rapporté l'isolement des souches multirésistantes d'*E. coli* dans les hôpitaux algériens, qui sont à l'origine de petits foyers épidémiques (Agabou *et al.*, 2014 ; Yanat *et al.*, 2014 ; Sassi *et al.*, 2014 ; Gharout-Sait *et al.*, 2015 ; Yahiaoui *et al.*, 2015 ; Yanat *et al.*, 2016a ; Yanat *et al.*, 2016b ; Yanat *et al.*, 2016c ; Medboua-Benbalagh *et al.*, 2017). Ces études ont été principalement réalisées dans les régions du Centre et de l'Est de l'Algérie. Cependant, les données sur la résistance aux antibiotiques, chez *E. coli* dans l'Ouest Algérien, restent rares. Dans ce cadre, ce projet de thèse a été proposé avec comme principaux objectifs l'étude de la résistance aux antibiotiques ainsi que l'épidémiologie moléculaire des souches d'*E. coli* isolées au niveau des trois centres hospitalo-universitaires du Nord-Ouest algérien (Tlemcen, Sidi Bel Abbes et Oran).

Cette thèse est présentée en trois parties. La première partie consiste en une synthèse bibliographique présentant l'agent pathogène *E. coli* et rappelant les caractéristiques structurales et les mécanismes d'action des antibiotiques les plus utilisés dans le traitement des infections dues à ce germe. A la fin de cette partie, sont présentés également les mécanismes de résistance d'*E. coli* aux antibiotiques ainsi que l'épidémiologie de ses gènes de résistance, notamment en Algérie et dans les pays voisins (pays de l'Afrique du Nord et de la méditerranée). Ensuite, dans une deuxième partie, seront présentés le matériel et les méthodes utilisés. Enfin, la troisième partie sera consacrée aux résultats obtenus, qui portent principalement sur l'état actuel de la résistance aux antibiotiques d'*E. coli* dans le Nord-Ouest algérien, la caractérisation des gènes de résistance aux β -lactamines, aminosides et quinolones ainsi que leur support plasmidique et la détermination du lien de clonalité entre les souches étudiées.

Première partie

Synthèse
bibliographique

1. *Escherichia coli*

C'est en 1885 que Theodore Escherich, un pédiatre allemand, a identifié pour la première fois la bactérie *Escherichia coli* dans des selles de nourrissons, qu'il appela *Bacterium coli commune* (Kaper *et al.*, 2004). Son nom actuel lui est donné en 1919 par Castellani et Chaombers (Grimont, 1987). Depuis ce temps, *E. coli* est devenue la bactérie la mieux connue et la plus étudiée, sa découverte précoce et sa culture aisée (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37°C) en font un outil d'étude pratique. En effet, nous devons beaucoup de nos connaissances du métabolisme intermédiaire, recombinaison génétique, réplication de l'ADN, Transcription de l'ARN et la synthèse des protéines à des études menées sur *E.coli* (Donnenberg, 2002).

E. coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle possède les caractères classiques de cette famille : c'est un bacille à Gram négatif, non sporulé, généralement mobile grâce à une ciliature péritriche, aéro-anaérobie facultatif, à métabolisme respiratoire et fermentaire, oxydase négative, catalase positive et nitrate réductase positive (Bidet et Bingen, 2011). Cette bactérie possède également des caractères biochimiques particuliers permettant de la différencier des espèces voisines. Il s'agit de la production d'indole à partir de tryptophane, l'absence d'utilisation du citrate comme source de carbone et l'absence de production d'acétoïne (Joly et Reynaud, 2007).

Le premier système permettant une classification des souches de l'espèce *E. coli* fut Le système de typage sérologique, qui est basé sur les propriétés antigéniques du lipopolysaccharide (antigène O), du flagelle (antigène H) et de surface (antigène K) (Kauffmann, 1947). Il a été proposé, en 1976, par Orskov et ses collaborateurs (Orskov *et al.*, 1976). Quelques années plus tard la classification ECOR (*E. coli* Collection Reference) est apparue, Ochman et Sealander ont pu référencer 72 souches d'*E. coli* qui représentaient l'espèce totale en utilisant la méthode MLST (multilocus sequence typing) (Ochman et Sealander, 1984). Cette classification se fondait sur les séquences nucléotidiques de plusieurs gènes de ménage (Herzer *et al.*, 1990). Dès les années 2000, en utilisant la PCR, l'espèce *E. coli* a pu être classée en six groupes phylogénétiques (A, B1, B2, C, D et E), sur la base de six gènes essentiels (*trpA*, *trpB*, *pabB*, *icd* et *polB*) (Clermont *et al.*, 2000).

E. coli est une bactérie ubiquitaire retrouvée dans l'eau, dans les sédiments et en abondance dans l'intestin de l'homme et de nombreux animaux à sang chaud, où elle joue communément

le rôle de bactérie commensale (Savageau, 1983 ; Tenaillon *et al.*, 2010). Cependant, suite à l'acquisition et la combinaison de facteurs de virulence, cette espèce bactérienne peut également se comporter comme un microbe pathogène à localisation intestinale (Levine, 1987) ou extraintestinale (Pohl, 1993).

Les souches pathogènes d'*E. coli* sont classées en huit pathovars, en fonction des facteurs de virulence acquis par transfert horizontal, des environnements colonisés et de la pathologie induite (Figure 5) (Croxen et Finlay, 2010).

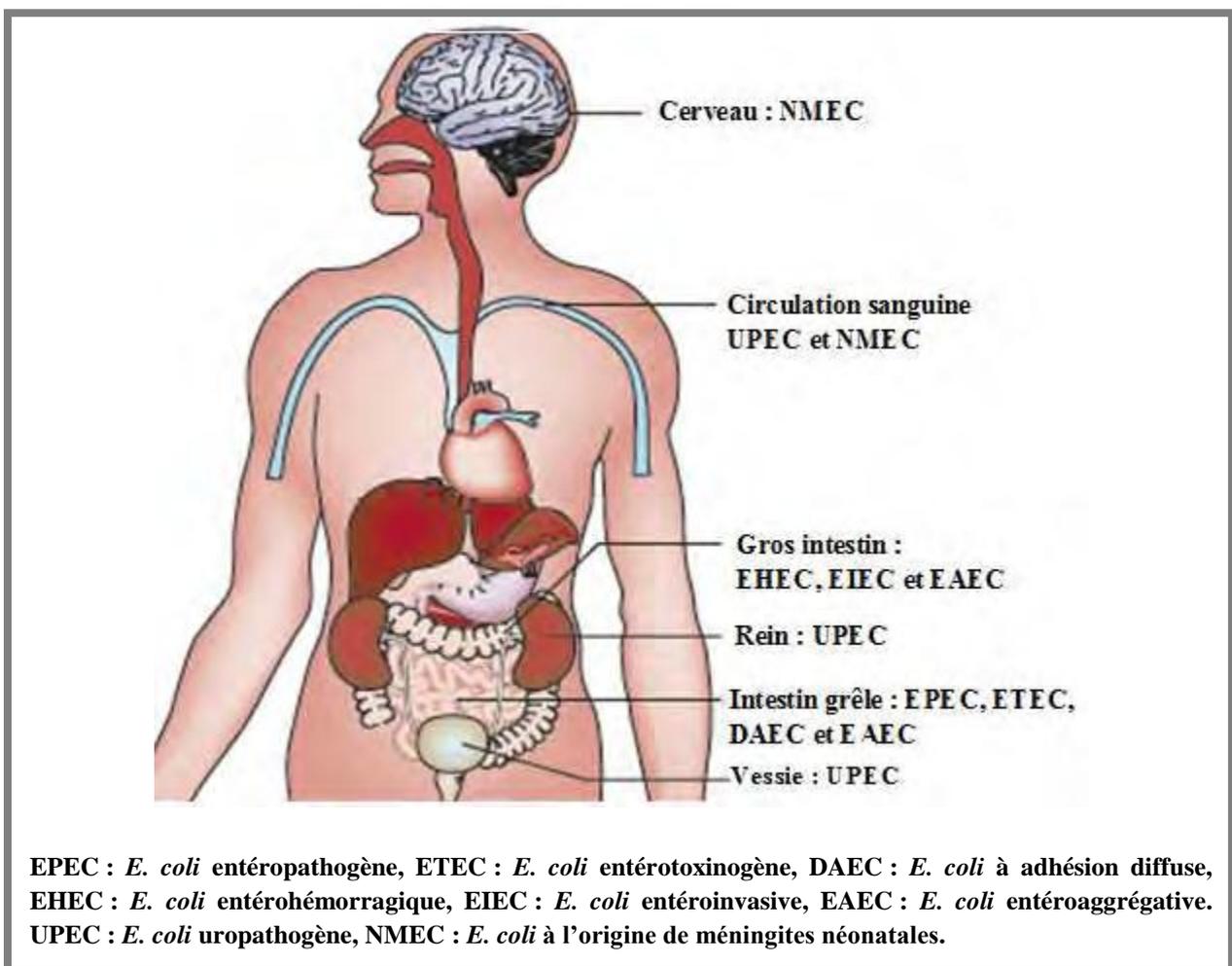


Figure 1. Sites de colonisation des *Escherichia coli* pathogènes (Croxen et Finlay, 2010)

Les *E. coli* à l'origine de maladies intestinales ont en commun de se multiplier dans l'intestin de leurs hôtes. Elles sont reconnues comme des agents responsables de syndrome diarrhéique d'origine alimentaire ou hydrique. Six principaux pathovars classifiés en fonction des signes cliniques et des facteurs de pathogénicité exprimés, sont inclus dans ce groupe: les *E. coli*

enterohémorragiques (EHEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entérotoxigènes (EPEC), les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), les *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC) et les *E. coli* entéroinvasives (EIEC) (Croxen et Finlay, 2010). Le deuxième groupe d'*E. coli* à l'origine de maladies extraintestinales, a acquis la capacité de déjouer les défenses immunitaires de l'hôte et de se propager dans l'organisme (Johnson et Russo, 2005). Il représente un risque sanitaire plus élevé que celui des *E. coli* pathogènes intestinales. Ce groupe comprend les *E. coli* uropathogènes (UPEC), principaux responsables d'infections urinaires et les *E. coli* associées à des méningites et des septicémies (NMEC) (Mokady *et al.*, 2005). De plus, il est important de noter l'existence de groupes distincts d'*E. coli* : le groupe des *E. coli* à adhérence invasive (AIEC) qui est associé à la maladie de Crohn (Darfeuille-Michaud, 2002 ; Martinez-Medina *et al.*, 2009) et le groupe des *E. coli* productrices de Shigatoxines (STEC) dont la souche *E. coli* O104:H4 responsable de l'épidémie de syndrome hémolytique et urémique en 2011 en Allemagne (Mora *et al.*, 2011).

Le génome d'*E. coli* a été entièrement séquencé pour la première fois en 1997 chez la souche commensale *E. coli* K-12 MG1655 avec 4.6 millions de paires de bases (Blattner *et al.*, 1997). Depuis, plusieurs génomes de différentes souches pathogènes d'*E. coli* ont été séquencés : *E. coli* EHEC O157:H7 EDL933, *E. coli* EHEC O157:H7 Sakai et *E. coli* EAEC-STEC O104:H4 (Perna, 2001 ; Hayashi, 2001 ; Rohde *et al.*, 2011). Le répertoire total de gènes de l'espèce est estimé à 17838. La majorité des souches, portent environ 4721 gènes et seulement 1976 gènes appartiennent au fond commun. Ainsi, uniquement 11% des gènes connus sont communs à toutes les souches d'*E. coli* (Touchon *et al.*, 2009). Cette variabilité génétique retrouvée chez *E. coli* est due à la grande plasticité de son génome. Cette instabilité génomique, qui est due principalement aux échanges de gènes par transfert horizontal, peut expliquer la diversité de style de vie et de facteurs de virulences chez les souches d'*E. coli* (Rasko *et al.*, 2008 ; Touchon *et al.*, 2009 ; Donnenberg, 2013).

E. coli est par ordre de fréquence la bactérie la plus souvent isolée de prélèvements cliniques à visée diagnostique, aussi bien en milieu hospitalier que dans la communauté (Soussy *et al.*, 2000; ONERBA, 2005). Une enquête méditerranéenne de prévalence en 2010, la classe comme étant le principal agent des infections nosocomiales (Amazian *et al.*, 2010). C'est un germe naturellement sensible aux antibiotiques (Jarlier et Nordmann, 2000). Cependant, face à l'utilisation intensive de ces molécules, les *E. coli* risquent de devenir, sous les effets conjugués d'antibiotiques et de transfert de gènes de résistance, de plus en plus résistantes (Adjidé *et al.*, 2006). En effet, l'émergence des souches d'*E. coli* productrices de β -lactamases

à spectre élargi (BLSE), qui présentent souvent des résistances associées aux aminosides et aux quinolones, est devenue une préoccupation majeure pour la santé publique à l'échelle mondiale (Garau *et al.*, 1999; Doit *et al.*, 2010; Smaoui *et al.*, 2015).

2. Antibiotiques

Le terme « antibiotique » fut proposé en 1941 par Waksman pour désigner toute substance chimique produite par un micro-organisme et capable d'inhiber le développement ou de détruire d'autres micro-organismes (Courvalin *et al.*, 2001). Par la suite, cette notion s'est étendue aux substances semi-synthétiques ou même synthétiques ayant la même fonction (Nauciel et Vildé, 2005). L'antibiotique doit répondre aux critères de la définition de Paul Ehrlich sur la chimiothérapie. Pour ce dernier, une substance chimio-thérapeutique utilisable par voie générale dans le traitement des maladies infectieuses doit être nuisible pour le microorganisme pathogène mais inoffensive pour les cellules de l'hôte. De ce fait, un nombre restreint d'antibiotiques découverts est utilisés en médecine thérapeutique (Walsh, 2003).

De 1940 à 2005, on a assisté à la découverte et à la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques dont la chronologie est présentée dans la Figure 1.

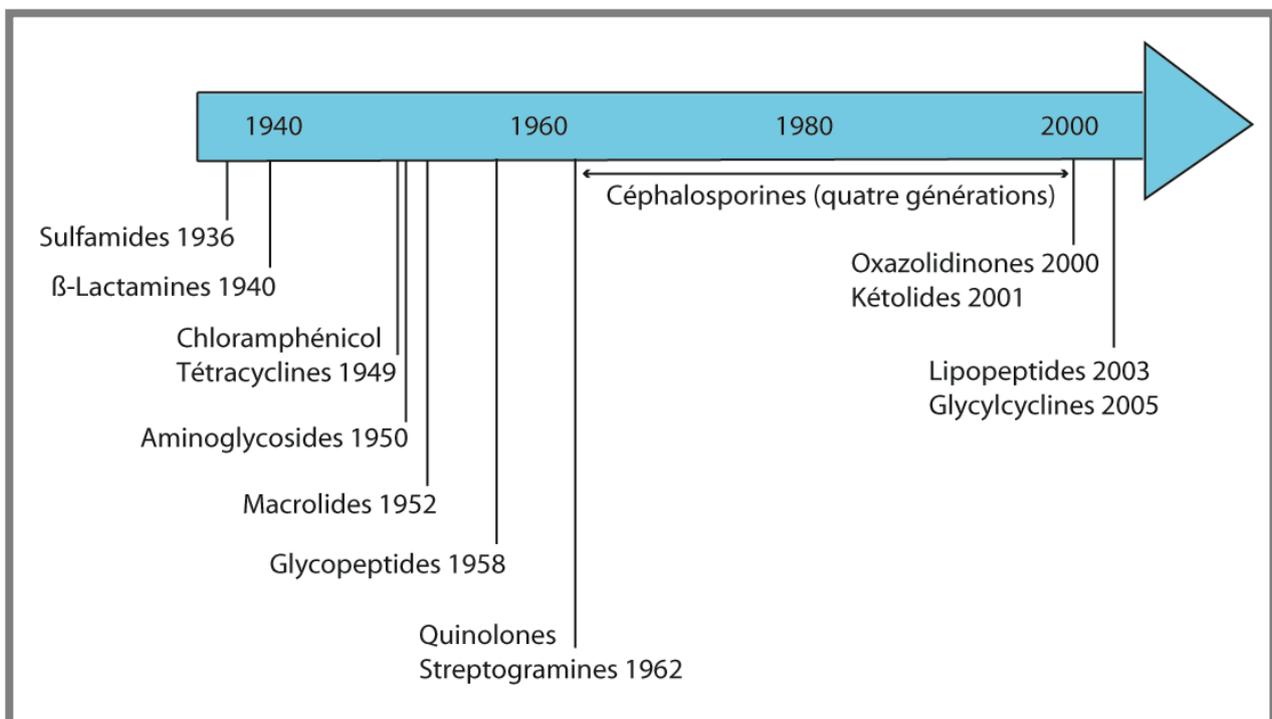


Figure 2. Ordre chronologique de l'apparition des différentes classes d'antibiotiques en usage clinique. Adaptée de Walsh (2003)

Les antibiotiques sont classés sur la base de leur structure chimique qui conditionne leurs principales propriétés bactériologiques (mode d'action, mécanisme de résistance, spectre), pharmacologiques (mode d'admission, diffusion, élimination) et toxicologiques (effets indésirables et contre-indications) (Bosgiraud, 2003). Ils sont également classés selon leurs sites d'action (Tableau 1).

Tableau 1. Classification des antibiotiques selon leurs sites d'action. Adapté de Prescott et al. (2010)

mode d'action	Antibiotiques
Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	β -lactamines Glycopeptides
Modification de la perméabilité de la membrane cytoplasmique	Polymyxines
Inhibition de la synthèse protéique	Aminosides Macrolides Tétracyclines chloramphénicol
Inhibition de la synthèse des acides nucléiques	Rifampicine Quinolones
Inhibition des voies métaboliques de l'acide folique	Sulfamides Triméthoprim

Les principales familles d'antibiotiques présentant un intérêt thérapeutique contre les entérobactéries, y compris *E. coli*, sont les β -lactamines, les aminosides et les quinolones (Bert et Lambert-Zechovsky, 2000).

2.1 β -lactamines

Les β -lactamines demeurent à l'heure actuelle les molécules les plus utilisées dans le traitement des infections dues aux entérobactéries. Cette large utilisation est principalement liée à leur faible toxicité, à leur pouvoir bactéricide et à l'extrême diversité de leurs structures (Philippon, 2008 ; Robin et al., 2012).

2.1.1 Structure et classification

La base commune à toutes les β -lactamines (Figure 4) est le noyau azétidinone, qui contient la structure carbonyle lactame indispensable pour l'activité de ces molécules (Bryskier, 1999). À partir de cette structure, cinq groupes ont été développés par adjonction d'un cycle latéral: les pénames, les céphèmes, les pénèmes, les monobactames et les inhibiteurs de β -lactamases (Figure 2) (Cavallo et al., 2004).

2.1.1.1 Pénames (Pénicillines)

Il s'agit d'un groupe de molécules, ayant en commun le noyau pénème, qui est caractérisé par un pentacycle saturé (cycle thiazolidine) associé au noyau β -lactame. Selon la nature de la chaîne latérale, on a défini plusieurs sous-classes, dont les plus utilisées sont les aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline), les carboxypénicillines (ticarcilline) les uréidopénicillines (pipéracilline) et les amidinopénicillines (pivmecillinam) (Ruppé, 2010).

2.1.1.2 Céphèmes (Céphalosporines)

Leur noyau de base associe un cycle β -lactame à un cycle dihydrothiazine pour former le noyau céphème. La particularité du noyau céphème et les nombreux radicaux de substitution proposés expliquent les propriétés antibactériennes différentes des céphalosporines, justifiant leur distinction fonctionnelle en plusieurs générations, de spectre et d'intérêt clinique variables (Cavallo *et al.*, 2004). On distingue ainsi:

- Les céphalosporines de première génération (C1G) : elles sont plutôt actives sur les bactéries à Gram positif. Exemples : céfalotine, céfazoline et céfalexine ;
- Les céphalosporines de deuxième génération (C2G) : elles ont un spectre étendu vers les bactéries à Gram négatif. Exemples : céfamandole, céfuroxime, céfoxitine et céfotétan ;
- Les céphalosporines de troisième génération (C3G) : elles ont un spectre étendu à la plupart des entérobactéries. Exemples : céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone et céfopérazone ;
- Les céphalosporines de quatrième génération (C4G) : elles sont relativement stables à l'hydrolyse des céphalosporinases. Elles restent actives sur les entérobactéries ayant acquis une résistance aux C3G par hyperproduction d'une céphalosporinase. Exemples : céfépime et cefpirome (Ruppé, 2010).

2.1.1.3 Pénèmes

Les pénèmes se caractérisent par la présence d'un cycle penta-atomique insaturé collé au cycle β -lactame. En fonction de l'hétéroatome fixé en position 1, on distingue trois groupes : les sulfopénèmes, les carbapénèmes et oxapénèmes (Bryskier, 1999). Les carbapénèmes possèdent un très large spectre antibactérien associé à une grande stabilité envers la quasi-totalité des β -lactamases. Elles sont considérées comme traitement de choix des infections sévères à bactéries à Gram négatif (Kattan *et al.*, 2008). Quatre molécules sont

commercialisées : l'imipénème, le méropénème, l'ertapénème et le doripénème (Nordmann et Carrer, 2010).

2.1.1.4 Monobactames

Se caractérisent par la présence du noyau monocyclique, azétidine, limité au cycle β -lactame. L'aztréonam est le seul monobactame commercialisé (Ruppé, 2010). Il montre une très bonne activité contre les bactéries à Gram négatif aérobies et plus particulièrement contre les entérobactéries, pour lesquelles il possède une activité comparable à celle des céphalosporines de troisième génération en raison de sa bonne stabilité vis-à-vis des β -lactamases (Cavallo *et al.*, 2004).

2.1.1.5 Inhibiteurs de β -lactamases

Il s'agit de l'acide clavulanique (clavame ou oxapénème), sulbactam et tazobactam (pénicillines sulfones). Ce sont des β -lactamines à faible activité antibactérienne intrinsèque. Associés à une β -lactamine, ils en restaurent l'activité antibactérienne qu'elle n'avait plus du fait de son hydrolyse par les β -lactamases (Cavallo *et al.*, 2004). En effet, l'acide clavulanique est utilisé avec l'amoxicilline dans l'Augmentin et la ticarcilline dans le Claventin, alors que le tazobactam est utilisé avec la pipéracilline dans la Tazocilline. Le spectre d'inhibition de ces molécules est limité aux pénicillinases (Ruppé, 2010).

2.1.2 Mécanisme d'action

Les β -lactamines interfèrent avec les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane, polymère majeur de la paroi bactérienne, par inactivation des enzymes appelées protéines liant les pénicillines ou PLPs (Cavallo *et al.*, 2004). Il s'agit d'enzymes d'activité variable de type transpeptidase, transglycosylase ou carboxypeptidase, localisées sur la face interne de la membrane cytoplasmique (Philippon, 2008).

Les β -lactamines présentent une analogie structurale entre le noyau β -lactame et le dipeptide terminal D-alanyl-D-alanine, du pentapeptide constitutif du peptidoglycane, qui constitue le substrat naturel des PLPs. La fixation du cycle β -lactame sur le site actif des PLPs aboutit à la formation d'un complexe acylenzyme covalent provoquant l'inactivation de ces enzymes (Livermore, 1995). Cette liaison ainsi formée a deux conséquences : elle empêche la synthèse du peptidoglycane en inhibant la transglycosylation et la transpeptidation (effet

bactériostatique) (Tankovic, 2000) et elle entraîne une activation endogène des autolysines bactériennes (effet bactéricide) (Bonnet, 2006).

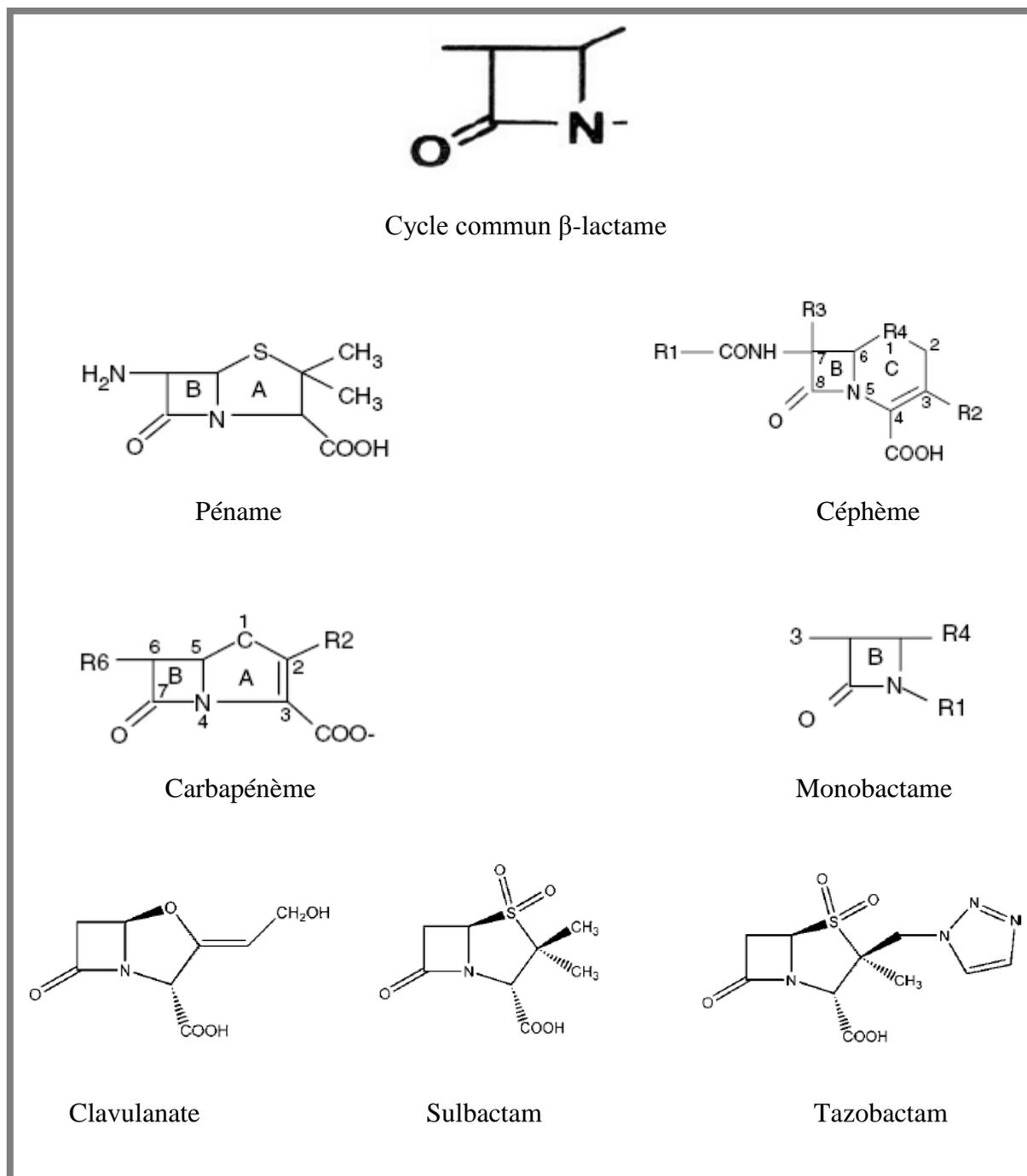


Figure 3. Principales structures des β -lactamines (Cavallo *et al.*, 2004 ; Bonomo, 2006)

2.2 Aminosides

Les aminosides forment une classe d'antibiotiques qui conserve une place incontournable au sein de l'arsenal antibactérien hospitalier. Leur large spectre d'activité et leur effet bactéricide rapide constituent des atouts majeurs (Nguyen et Lambert, 2012). Ces antibiotiques sont utilisés en thérapeutique depuis la découverte de la streptomycine par Waksman et ses collaborateurs en 1944 (Bryskier, 1999). Ils sont le plus souvent utilisés en association avec les β -lactamines ou les fluoroquinolones pour leur effet synergique (Doi et Arakawa, 2007).

2.2.1 Structure et classification

Les aminosides ou aminoglycosides sont des molécules hydrophiles, basiques et polycationiques. Leur structure de base comporte un cycle central aminocyclitol saturé, relié par des liaisons glycosidiques à deux ou trois hexoses (Vakulenko et Mobashery, 2003). Ce cycle central peut être la streptidine, l'actinamine ou la fortamine mais le plus souvent il s'agit de la 2-désoxystreptamine (DOS) (Figure 3). Les 2-DOS regroupent la plupart des composés utilisés en thérapeutique humaine comme : la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine et la nétilmicine (Nguyen et Lambert, 2012).

Les composés contenant le cycle DOS sont classés en sous-familles en fonction de la substitution de ce cycle. On distingue ainsi :

- Les 2-désoxystreptamines monosubstituées en position 4 : Néamine
- Les 2-désoxystreptamines monosubstituées en position 5 : Hygromycine B
- Les 2-désoxystreptamines bisubstituées en position 4 et 5 (groupe 4,5-2-DOS) : Néomycine B ou C, Paromomycine, Lividomycine A ou B, Ribostamycine, Framycétine.
- Les 2-désoxystreptamines bisubstituées en position 4 et 6 (groupe 4,6-2-DOS) : Kanamycines A, B, C et dérivés, Amikacine, Tobramycine, Dibékacine, Gentamicine, Sisomycine, Nétilmicine (Jana et Deb, 2006).

2.2.2 Mécanisme d'action

Les aminosides ont pour principale cible le ribosome. Ils doivent tout d'abord pénétrer dans le cytoplasme bactérien (Magnet et Blanchard, 2005). Chez les bactéries à Gram négatif, Les aminosides diffusent à travers la membrane externe par un système de porines. Une fois dans l'espace périplasmique, le franchissement de la membrane cytoplasmique nécessite un transport actif, oxygène dépendant. Cette étape limitante, explique la résistance naturelle aux

aminosides des germes anaérobies stricts (Bryan et Kwan, 1983). Les quelques molécules ayant atteint le cytoplasme se fixent au site aminoacyl de l'ARN ribosomal 16S (Le site A), dans la sous-unité 30S du ribosome (Durante-Mangoni *et al.*, 2009). Cette liaison inhibe l'appariement de l'ARNm au ribosome et empêche l'initiation de la traduction et peut aussi causer une mauvaise interprétation du code génétique, conduisant à la synthèse de protéines "nonsens" (Kotra *et al.*, 2000). Les protéines aberrantes nouvellement synthétisées sont incorporées à la membrane cytoplasmique. Elles endommagent son intégrité et facilitent ainsi l'entrée dans le cytoplasme de nouvelles molécules aminosides, qui vont accroître les dommages cellulaires et entraîner la mort de la cellule (Taber *et al.*, 1987). Les aminosides peuvent en outre, s'accumuler de façon irréversible dans la cellule bactérienne, altérer la synthèse de l'ADN ou dégrader l'ARN ou encore provoquer des désordres ioniques importants dans la cellule bactérienne (Lambert, 1997). Cette pléiotropie suggère que l'action des aminosides pourrait ne pas être limitée à la synthèse protéique, ce qui explique leur effet bactéricide rapide (Forge et Schacht, 2000).

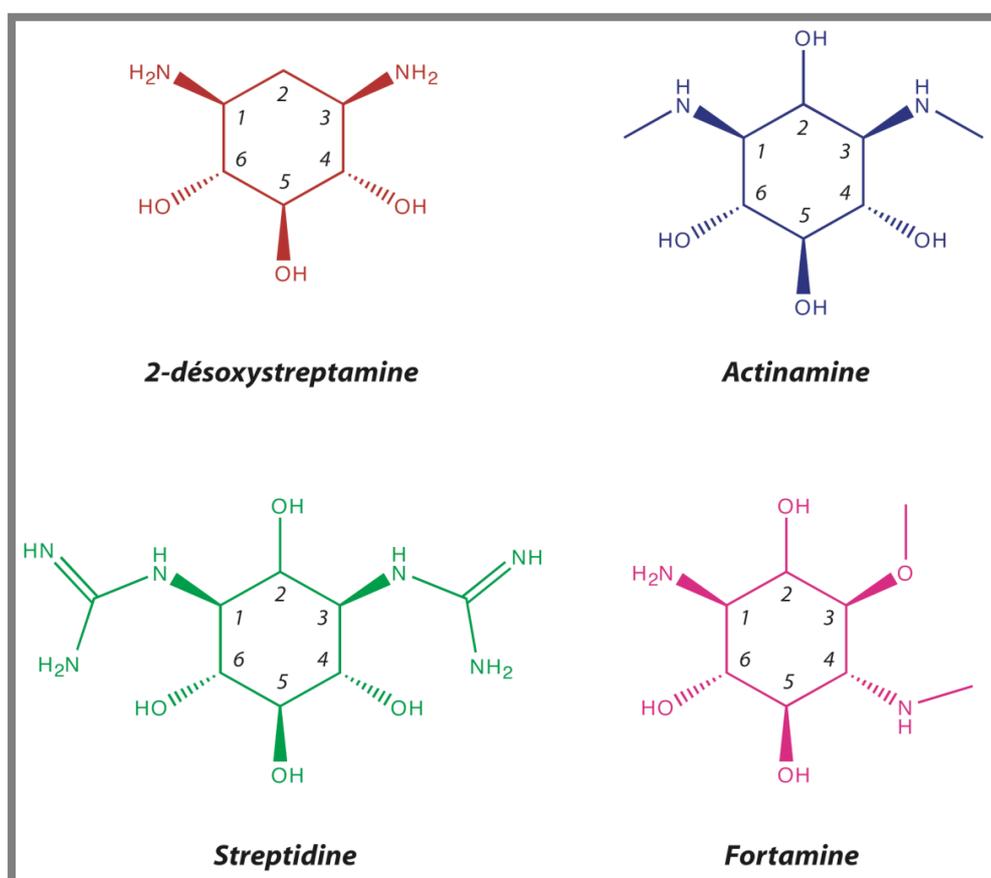


Figure 4. Structures des aminocyclitols, noyaux de base des aminoglycosides (Vakulenko et Mobashery, 2003)

2.3 Quinolones

Depuis la découverte de l'acide nalidixique, en 1962 (Leshner *et al.*, 1962), les quinolones, antibiotiques synthétiques, ont évolué et sont devenues des agents importants et efficaces dans le traitement des infections bactériennes (Zhanel *et al.*, 2004). Ce sont des antibiotiques bactéricides très largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire. Ils sont caractérisés par un large spectre d'activité, une bonne biodisponibilité orale et une bonne diffusion dans les tissus (Hooper et Rubinstein, 2003).

2.3.1 Structure et classification

La structure chimique des quinolones est un acide pyridine- β -carboxylique avec un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4 (Figure 4) (Soussy, 2006). Dans les années 80, sont apparues les fluoroquinolones ou quinolones de 2^{ème} génération par l'addition d'une molécule de fluor en position 6 et d'un cycle azoté en position 7 (Figure 4), qui a augmenté l'activité de ces composés ainsi que leur absorption orale et leur distribution dans les tissus (Ball, 2000).

Les quinolones sont classées en générations en fonction de leur spectre d'activité et de leur date de mise sur le marché (Figure 4) (Cattoir, 2012). On distingue :

- Les quinolones de première génération : comprennent des molécules à spectre étroit, utilisées dans le traitement des infections urinaires dues aux entérobactéries (Andriole, 2005). Exemples : acide nalidixique, acide oxolinique, acide pipémidique ;
- Les quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones : présentent un spectre élargi à d'autres bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*), à certains cocci à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et aux bactéries intracellulaires. Exemples : norfloxacin, ofloxacin, péfloxacin, ciprofloxacine ;
- Les quinolones de troisième génération ou fluoroquinolones anti-pneumococciques : ont été développées pour étendre le spectre à *Streptococcus pneumoniae*. Exemples : sparfloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine ;
- Les quinolones de quatrième génération : présentent un spectre d'activité étendu aux bactéries anaérobies strictes. Exemples : trovafloxacine, gatifloxacine (Cattoir, 2012).

2.3.2 Mécanisme d'action

Les quinolones inhibent les topoisomérase de type II (gyrase) et IV empêchant leur action dans le déroulement harmonieux de l'ADN qui est nécessaire à sa réplication (Hooper, 2001). L'ADN gyrase introduit un super-enroulement négatif dans la double hélice d'ADN bactérien. Cette activité est essentielle pour l'initiation de la réplication de l'ADN ainsi que pour sa transcription (Levine *et al.*, 1998). La topoisomérase IV a une activité de décaténation, qui permet la séparation des chromosomes répliqués à la fin d'une séquence de réplication (Zechiedrich *et al.*, 1997).

Les quinolones interagissent avec le complexe enzyme-ADN (la gyrase ou la topoisomérase IV) et provoquent des changements conformationnels entraînant une désactivation de l'enzyme (Drlica et Zhao, 1997). Le complexe quinolone-enzyme-ADN ainsi formé, bloque la progression de la fourche de réplication ce qui inhibe la synthèse de l'ADN et conduit à l'arrêt de la croissance bactérienne (Soussy, 2006). De plus, les coupures d'ADN double brin stabilisées par les quinolones constitueraient des lésions non réparables de l'ADN, capables de déclencher l'inactivation de certaines synthèses protéiques responsable de l'effet bactéricide de ces antibiotiques (Drlica *et al.*, 2008).

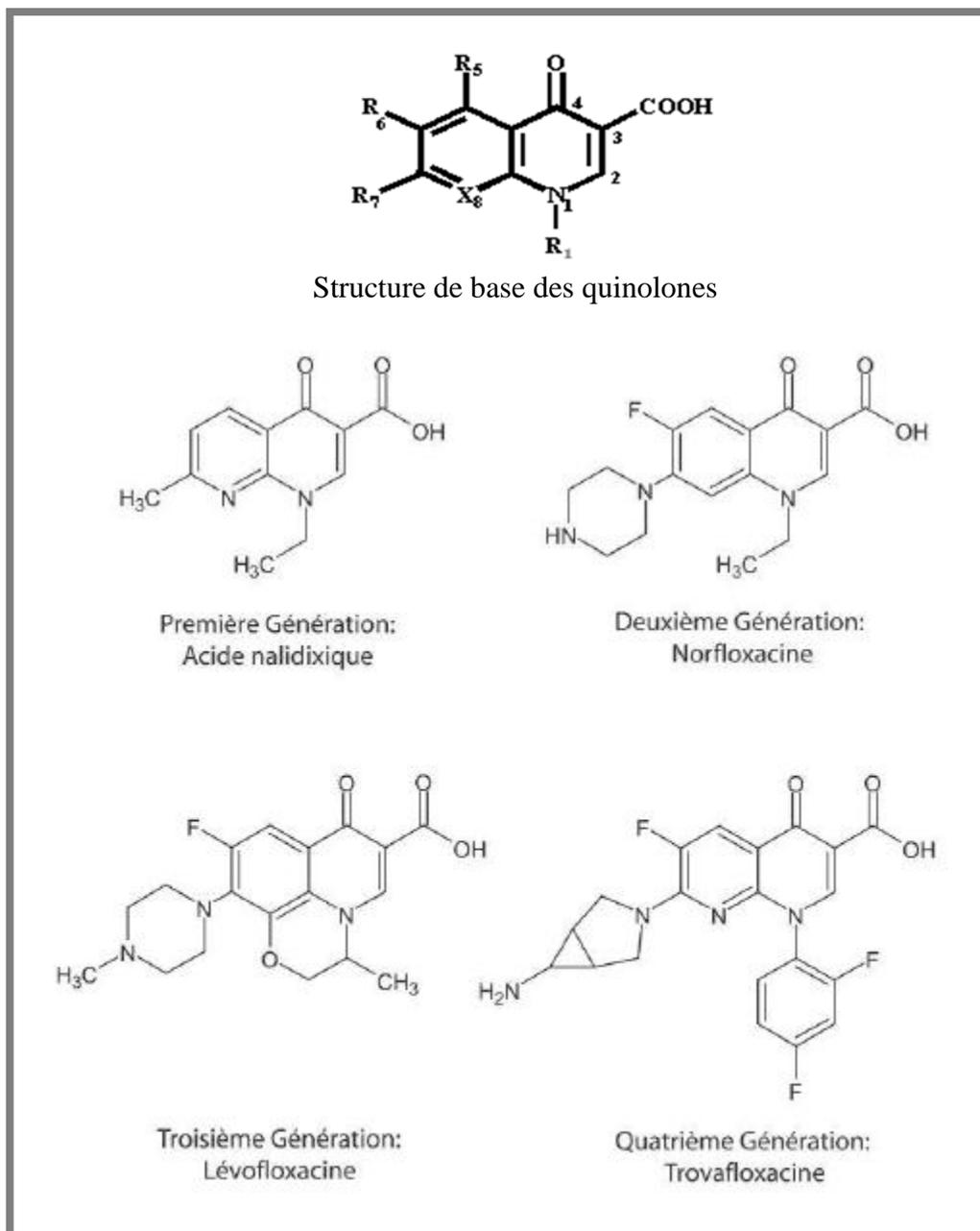


Figure 5. Principales structures des quinolones (Andriole, 2000)

3. Résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli*

3.1 Résistance aux β -lactamines

Les mécanismes de résistance déployés par les entérobactéries, y compris *E. coli*, à l'encontre des β -lactamines sont de quatre ordres, parfois plus ou moins associés : défaut de pénétration par imperméabilité de la paroi bactérienne, excrétion de la molécule antibiotique, défaut d'affinité pour la cible (PLP), mais la production d'enzymes inactivatrices, les β -lactamases, est le principal mécanisme (Bonnet, 2006).

Les β -lactamases sont des enzymes capables d'ouvrir le cycle β -lactame en créant un intermédiaire acylenzyme instable, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle (Figure 6) (Ruppé, 2010).

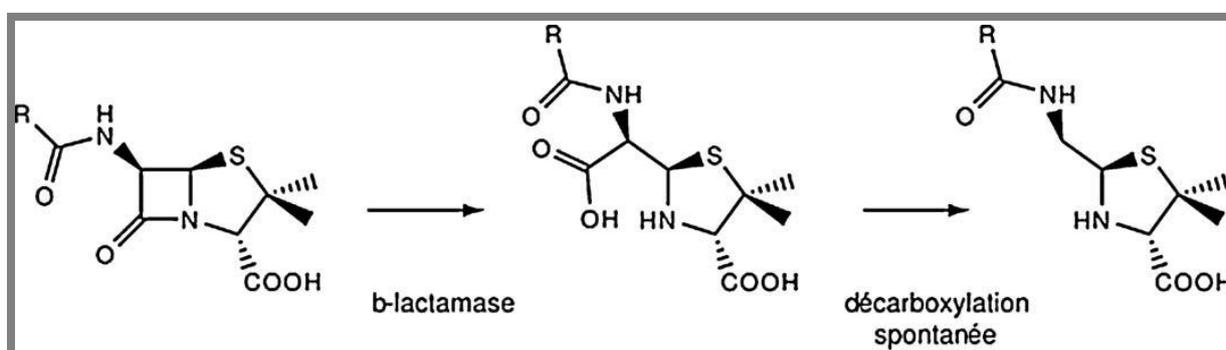


Figure 6. Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase (Ruppé, 2010)

Plus de 1300 β -lactamases ont été identifiées (Bush, 2013). Ces enzymes sont classées en fonction de leur spectre d'activité enzymatique (Bush *et al.*, 1995 ; Bush et Jacoby, 2010) ou de leur séquence en acides aminés (Ambler, 1980) (Tableau 2). La classification structurale d'Ambler distingue quatre classes. La classe A correspond aux « pénicillinasés » inhibées par l'acide clavulanique, la classe B correspond aux carbapénémases inhibées par l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), la classe C regroupe les « céphalosporinasés » non inhibées par l'acide clavulanique et la classe D correspond aux oxacillinasés de sensibilité variable à l'acide clavulanique. Les enzymes des classes A, C et D sont des serine-enzymes. En revanche, les enzymes de la classe B sont des métallo- β -lactamases comportant deux atomes de zinc dans leur site actif. La classification fonctionnelle de Bush, Jacoby et Medeiros repose sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des β -lactamases aux inhibiteurs. Elle rend compte de leur diversité fonctionnelle au sein des quatre classes structurales d'Ambler.

Tableau 2. Classification de Bush et Jacoby et correspondance avec la classification structurale d'Amblar (Bush et Jacoby, 2010)

Classe (Amblar)	Groupe (Bush)	Substrats	Inhibition		Exemples
			AC/TZB	EDTA	
A	2a	Pénicillines	+	-	PC1
	2b	Pénicillines, céphalosporines de 1 ^{ère} et 2 ^{ème} génération	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Pénicillines, Céphalosporines de 1 ^{ère} , 2 ^{ème} , 3 ^{ème} et 4 ^{ème} génération, monobactames	+	-	BLSE de type TEM, SHV, CTX-M, VEB,
	2br	Pénicillines, Céphalosporines de 1 ^{ère} et 2 ^{ème} génération.	+/-	-	TEM-30, -76, -103, SHV-10, -26
	2ber	Pénicillines, Céphalosporines de 1 ^{ère} , 2 ^{ème} , 3 ^{ème} et 4 ^{ème} génération, monobactames	+/-	-	TEM-50, -68, -89
	2c	Carbénicillines	+	-	PSE-1, -3, -4
	2e	Céphalosporines	+	-	CepA
	2f	Pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes	+(faible)	-	KPC-2, -3, GES-2, IMI-1, SME-1.
B	3a	Toutes les β-lactamines sauf les monobactames	-	+	VIM-1, IMP-1, NDM-1, L1
	3b	Carbapénèmes	-	+	Cpha, sfh-1
C	1	Meilleure hydrolyse des céphalosporines que de la pénicilline G ; Hydrolyse des céphamycines	-	-	β-lactamases de type AmpC, CMY-2, FOX-1, MIR-1
	1e	Pénicillines, céphamycines, céphalosporines de 3 ^{ème} et 4 ^{ème} génération	-	-	GCl, CMY-37
D	2d	Pénicillines, cloxacillines, oxacilline	+/-	-	OXA-1, -10
	2de	Pénicillines, céphalosporines de 3 ^{ème} (voire 4 ^{ème}) génération	+/-	-	OXA-11, -15
	2df	Oxacilline, cloxacilline, carbapénèmes	+/-	-	OXA-23, -48

AC: acide clavulanique ; TZB: tazobactam

E. coli produit à très bas niveau une céphalosporinase chromosomique naturelle non inductible de type AmpC, qui peut entraîner chez certaines souches une réduction de la sensibilité aux aminopénicillines, à leur association au clavulanate et/ou aux céphalosporines de première génération (Bonnet, 2012). La régulation de l'expression de β -lactamase AmpC chez cette espèce, diffère considérablement de celle chez les autres entérobactéries productrices naturellement d'une AmpC inductible. Cette différence est due à l'absence du gène régulateur *ampR* et à la présence d'un atténuateur transcriptionnel diminuant ainsi la force du promoteur (Jaurin *et al.*, 1981). Les souches sauvages restent donc le plus souvent sensibles à l'ensemble des β -lactamines (Nelson et Elisha, 1999). Cependant, l'hyperproduction d'enzyme AmpC provoque une résistance à diverses β -lactamines dont la ticarcilline, la pipéracilline, les céphamycines, les céphalosporines de troisième génération, l'aztréonam et aux combinaisons des pénicillines avec les inhibiteurs de β -lactamases. Le mécilinam, les céphalosporines de quatrième génération (céfépime, cefpirome) et les carbapénèmes gardent leur activité sur les souches produisant ces enzymes (Philippon et Arlet, 2006). Cette hyperproduction peut se produire par amplification du gène *ampC* (Edlund *et al.*, 1979) ou des mutations dans le promoteur et / ou l'atténuateur, ce qui augmente le taux de transcription du gène (Jaurin *et al.*, 1982 ; Low *et al.*, 2001). Plusieurs mutations dans le gène *ampC* ont été décrites chez des souches cliniques d'*E. coli* isolées dans diverses régions du monde (Caroff *et al.*, 2000 ; Siu *et al.*, 2003 ; Mulvey *et al.*, 2005 ; Peter-Getzlaff *et al.*, 2011). Depuis 2004, de nouvelles β -lactamases AmpC à spectre étendu (ESAC) ont été décrites chez des isolats cliniques d'*E. coli* (Mammeri *et al.*, 2004 ; Mammeri *et al.*, 2006 ; Mammeri *et al.*, 2007 ; Crémet *et al.*, 2010). Il s'agit d'enzymes dérivées de céphalosporinases chromosomiques capables d'inhiber efficacement les céphalosporines à spectre étendu (céfépime, cefpirome) (Nordman et Mammeri, 2007).

Les céphalosporinases Correspondaient jusqu'à une période récente à des enzymes chromosomiques spécifiques d'espèces. Ce n'est que vers 1988, que sont apparues, en Corée du Sud et aux Etats-Unis, les premières souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* productrices de céphalosporinases plasmidiques (Bauernfeind *et al.*, 1989 ; Papanicolaou *et al.*, 1990). La découverte de ces enzymes originaires d'entérobactéries naturellement productrices, a constitué une nouvelle étape de la résistance acquise aux antibiotiques en particulier les céphalosporines de troisième génération, par mobilisation de gènes chromosomiques (Philippon *et al.*, 2002). De nombreuses céphalosporinases plasmidiques ont été décrites dans le monde parmi des souches hospitalières mais aussi communautaires

(Jacoby, 2009). Des différences dans leurs séquences en acides aminés ont permis de les classer en plusieurs familles : CMY, ACT, ACC, DHA, FOX, MOX, LAT, MIR et CFE. Leur production est constitutive à l'exception des enzymes ACT-1, DHA-1 et CFE-1. Pour ces dernières, il a été démontré la présence d'un gène régulateur *ampR* en amont du gène de structure, *ampC*, situé sur le plasmide (Philippon *et al.*, 2002 ; Nakano *et al.*, 2004). A l'heure actuelle, les β -lactamases de type CMY correspondent au groupe le plus vaste avec 136 allèles répertoriés parmi les 240 AmpC plasmidiques déjà connues (www.lahey.org/studies/). Le phénotype de résistance observé chez les souches produisant ces enzymes est similaire à celui d'une céphalosporinase chromosomique hyperproduite, à l'exception de celles productrices de l'enzyme ACC-1 qui restent sensibles à la céfoxitine (Arlet et Philippon, 2003).

La première souche d'*E.coli* productrice d'une céphalosporinase plasmidique a été identifiée en 1989 au Royaume-Uni chez un patient pakistanais. IL s'agit d'une céphalosporinase de type BIL-1 (Payne *et al.*, 1992). Par la suite, plusieurs céphalosporinases plasmidiques ont été rapportées à travers le monde chez cette espèce (Gazouli *et al.*, 1998 ; Alvarez *et al.*, 2004 ; Mulvey *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2006 ; Woodford *et al.*, 2007 ; Ding *et al.*, 2008). En Algérie, les enzymes de type CMY-2, CMY-4 et DHA-1 ont été identifiées chez des souches cliniques d'*E.coli* (Iabadene *et al.*, 2009a ; Robin *et al.*, 2010 ; Gharout-Sait *et al.*, 2015). Le variant CMY-2 a été également détecté chez des souches d'origine animale à Béjaïa (Yousfi *et al.*, 2016a ; Belmahdi *et al.*, 2016). De plus, un nouveau variant CMY-42 a été identifié chez une souche isolée d'un chien (Yousfi *et al.*, 2016a) et chez 4 souches isolées du lait cru à Béjaïa (Yaïci *et al.*, 2016) (Tableau 4, Figure 8).

Dans les dernières décennies, de nombreuses études ont montré l'augmentation, de part le monde, des infections à *E. coli* productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) (Lahlaoui *et al.*, 2014). Ces enzymes sont définies comme des β -lactamases appartenant à la classe A ou D de la classification d'Ambler (Philippon, 2013), capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} génération et les monobactames. Par contre, les céphamycines (céfoxitine, céfotétan et latamoxef) et les carbapénèmes restent actifs (Livermore, 2008). Les BLSE sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases (Peirano et Pitout, 2010). En effet, Pour les souches productrices de BLSE, il en résulte une synergie remarquée entre les C3G inactivées et l'acide clavulanique, ce qui est à la base du test de synergie utilisé pour leur détection (Philippon et Arlet, 2006).

Les premières BLSE ont émergé suite à l'utilisation massive des C3G au début des années 80 (Philippon *et al.*, 1989). Elles ont d'abord été décrites en Allemagne (Shah et Stille, 1983), puis en France et en Tunisie chez des souches de *K. pneumoniae* multirésistantes responsables d'infections nosocomiales (Sirot *et al.*, 1987; Brun-Buisson *et al.*, 1987 ; Philippon *et al.*, 1989). Ces enzymes ont rapidement diffusé à travers tous les continents chez d'autres entérobactéries comme *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes* et *Serratia marcescens*. Actuellement, Plus de 600 BLSE ont été décrites à travers le Monde (Geser *et al.*, 2012) et sont en général portées par des plasmides et des transposons, expliquant la rapidité de leur diffusion (Tenover, 2006). En fonction de leurs séquences en acides aminés, ces enzymes ont été classées en 12 familles différentes: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, IBC, BEL et OXA (enzyme appartenant à la classe D) (Cantón *et al.*, 2008) (Tableau 3).

Tableau 3. Découverte et origine des BLSE (Cantón *et al.*, 2008)

BLSE	Progéniteur	Pays d'émergence	Espèce de 1 ^{ère} détection
De prévalence élevée			
SHV	SHV-1 (>90%) ^a	Allemagne (1983) ^b	Enterobacteriaceae
TEM	TEM-1, -2 (>90%) ^a	France (1985) ^b	Enterobacteriaceae
Le groupe CTX-M-1	KLUC <i>Kluyvera cryocrescens</i> (85%) ^a	Allemagne (1989) ^c	<i>Escherichia coli</i>
Le groupe CTX-M-2	KLUA <i>K. ascorbata</i> (80–100%) ^a	Japon (1986) ^c / Argentina (1989) ^c	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i>
Le groupe CTX-M-8	KLUG <i>K. georgiana</i> (95%)	Bazille (1996–1997) ^c	<i>Citrobacter amalonaticus</i> , <i>Enterobacter spp.</i>
Le groupe CTX-M-9	KLUG <i>K. georgiana</i> (80%) ^a	Espagne (1994) ^c	<i>E. coli</i>
Le groupe CTX-M-25	ND	Canada (2000) ^c	<i>E. coli</i>
OXA	OXA-10 (PSE-2) (>90%) ^a	Turquie (1991) ^c	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
De faible prévalence			
PER		France (1991) ^c	<i>P. aeruginosa</i>
VEB	PER (39%) ^a	France (Vietnam ^d) (1996) ^c	<i>E. coli</i>
SFO	AmpA <i>Serratia fonticola</i> (96%) ^a	Japon (1988) ^c	<i>Enterobacter cloacae</i>
TLA	CME-1 (50%) ^a <i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	Mexico (1991) ^c	<i>E. coli</i>
BES	YENT (51%) ^a <i>Yersinia enterocolitica</i>	Brazil (1996) ^c	<i>Serratia marcescens</i>
GES	YENT (36%) ^a <i>Y. enterocolitica</i>	France (Guinée Française ^d) (1998) ^c	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
IBC	YENT (40%) ^a <i>Y. enterocolitica</i>	Grèce (1999) ^c	<i>E. cloacae</i>
BEL	GES-1 (50%) ^a	Belgique (2004) ^c	<i>P. aeruginosa</i>

ND : non déterminé ; a : homologie de séquence d'acides aminés ; b : date de publication ; c : date d'isolation ; d : Origine du patient chez lequel l'enzyme a été détectée.

Jusqu'à la fin des années 90, la majorité des BLSE détectées étaient de type TEM et SHV, après évolution des enzymes anciennes par mutation (s) ponctuelle (s) (Gniadkowski, 2008). A ce jour, de nombreux mutants de TEM-1/2 (plus de 190) ont été identifiés avec un phénotype BLSE. Les mutations responsables de l'élargissement du spectre d'activité de ces enzymes résultent très souvent de la substitution des acides aminés situés en positions 104, 164, 238 et 240 (www.lahey.org/Studies/). Bien que fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, les BLSE de type TEM ont été aussi rapportées parmi les autres membres de la famille des entérobactéries ainsi que *P. aeruginosa* (Bradford, 2001 ; Paterson et Bonomo, 2005). L'émergence de ces enzymes a été montrée en France, en Italie, en Espagne, en Belgique et en Portugal. les variants les plus fréquents sont TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes* (Neuwirth *et al.*, 1996 ; Cantón *et al.*, 2002 ; Caccamo *et al.*, 2006), TEM-3 et TEM-4 chez *K. pneumoniae* (De Champs *et al.*, 2000) et TEM-52 chez *Salmonella enterica* et *E. coli* (Weill *et al.*, 2006 ; Cantón *et al.*, 2008). Chez *E. coli*, ces BLSE ont été rarement rapportées en Afrique du Nord. Le variant TEM-26 a été détecté en Tunisie chez trois souches cliniques (Mnif *et al.*, 2013) et les variants TEM-3, TEM-4 et TEM-24 ont été identifiés chez des souches hospitalières et communautaires ainsi que des souches d'origine animale isolées en Algérie (Agabou *et al.*, 2014 ; Brahmi *et al.*, 2014 ; Yahiaoui *et al.*, 2015) (Tableau 4, Figure 8).

Tout comme les enzymes de type TEM, la majorité des enzymes SHV identifiées actuellement sont des BLSE (> 160) et dérivent toutes de SHV-1, enzyme chromosomique chez *K. pneumoniae* (Philippon, 2013). Les substitutions d'acides aminés dans cette enzyme ont lieu au niveau de quelques résidus, notamment 238 et 240 (Gniadkowski, 2008). Les BLSE de ce type ont été détectées parmi de nombreuses entérobactéries à travers le monde (Paterson et Bonomo, 2005). En Afrique du Nord, quelques études seulement ont rapporté la présence de ces enzymes chez *E. coli*. En effet, trois études ont signalé la présence des variant SHV-12, SHV-2a et SHV-5 chez des souches hospitalières au Maroc et en Tunisie (Bourjilat *et al.*, 2011 ; Mnif *et al.*, 2013 ; Girlich, *et al.*, 2014), une étude a rapporté la présence de l'enzyme SHV-2a chez une souche uropathogène communautaire en Algérie (Yahiaoui *et al.*, 2015) et deux autres ont rapporté la détection de l'enzyme SHV-12 chez des souches d'origine animale isolées également en Algérie (Yousfi *et al.*, 2016b; Belmahdi *et al.*, 2016) (Tableau 4, Figure 8).

En 1989, un nouveau type de BLSE non TEM non SHV, a été identifié presque simultanément chez une souche d'*E. coli* isolée en Allemagne à Munich et chez une souche

de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolée en Argentine (Bauerfeind *et al.*, 1990 ; Tzouvelekis *et al.*, 2000). Cette nouvelle enzyme appartenant à la classe A d'Ambler a été dénommée CTX-M pour « cefotaximase Munich » (Ruppé, 2010). A ce jour, Plus de 150 variants CTX-M ont été décrits (www.lahey.org/Studies/) et répartis en 6 groupes phylogénétiques, le groupe CTX-M-1, M-2, M-8, M-9, M-25 et M-45, en fonction des similitudes de leurs séquences en acides aminés (Naas *et al.*, 2007; Rossolini *et al.*, 2008). Ces enzymes, qui dérivent des gènes ancestraux de β -lactamases chromosomiques de différentes espèces du genre *Kluyvera*, ont communément une activité préférentielle sur le céfotaxime et la ceftriaxone par rapport à la ceftazidime (Bonnet, 2004), à l'exception des enzymes CTX-M-15, M-16, M-19, M-23, M-27 et M-32 qui ont une forte capacité hydrolytique pour la ceftazidime (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006 ; Livermore *et al.*, 2007).

Depuis leurs progéniteurs, les gènes Codant les CTX-M ont été capturés grâce à des éléments génétiques mobiles type séquence d'insertion ou grâce à des phages, et transférés sur des plasmides conjugatifs qui ont ensuite diffusé parmi les entérobactéries pathogènes (Cantón et Coque, 2006 ; Rossolini *et al.*, 2008). Les CTX-M sont actuellement les BLSE les plus fréquentes chez les entérobactéries (Cantón et Coque, 2006). Quelques CTX-M sont retrouvées spécifiquement dans certains pays (comme CTX-M-9 et CTX-M-14 en Espagne, CTX-M-1 en Italie ou CTX-M-2 en Amérique du Sud et au Japon), tandis que CTX-M-15 est mondialement distribuée (Cantón et Coque, 2006). Elle a été détectée pour la première fois en 2001 chez *E. coli* isolée en l'Inde (Karim *et al.*, 2001). Depuis, plusieurs souches d'*E. coli* productrices de CTX-M-15 ont émergé à travers le monde (Pitout et Laupland, 2008). Elles ont été signalées dans la plupart des pays en Europe (Livermore *et al.*, 2007), certains pays en Asie (Hawkey, 2008), en Afrique (Blomberg *et al.*, 2005 ; Bourjilat *et al.*, 2011 ; Mnif *et al.*, 2013), en Amérique du Nord (Mulvey *et al.*, 2004 ; Lewis 2nd *et al.*, 2007), en Amérique du Sud (Villegas *et al.*, 2008) et en Australie (Zong *et al.*, 2008). En Algérie, Plusieurs études ont rapporté la présence de BLSE de type CTX-M-15 chez des souches d'*E.coli* isolées en milieu hospitalier, en communauté, chez des animaux ainsi que dans l'environnement (Touati *et al.*, 2006 ; Ramdani-Bouguessa *et al.*, 2006 ; Touati *et al.*, 2007 ; Iabaden *et al.*, 2009b ; Alouache *et al.*, 2012 ; Touati *et al.*, 2012 ; Gharout-Sait *et al.*, 2012 ; Baba Ahmed *et al.*, 2012 ; Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013 ; Alouache *et al.*, 2014 ; Anssour *et al.*, 2014 ; Agabou *et al.*, 2014 ; Yanat *et al.*, 2014 ; Sassi *et al.*, 2014 ; Brahmi *et al.*, 2014 ; Gharout-Sait *et al.*, 2015 ; Meguenni *et al.*, 2015 ; Mezhoud *et al.*, 2015 ; Yahiaoui *et al.*, 2015 ; Anssour *et al.*, 2016 ;

Yousfi *et al.*, 2016a ; Yousfi *et al.*, 2016b ; Yanat *et al.*, 2016a ; Yaici *et al.*, 2016 ; Yanat *et al.*, 2016b ; Yanat *et al.*, 2016c ; Medboua-Benbalagh *et al.*, 2017) (Tableau 4, Figure 8). D'autres variants ont été également rapportés, chez *E. coli* en Algérie, chez des souches hospitalières, communautaires et d'origine animale, mais avec une faible fréquence. Il s'agit de CTX-M-14 (Medboua-Benbalagh *et al.*, 2017), CTX-M-3 (Ramdani-Bougoussa *et al.*, 2006 ; Gharout-Sait *et al.*, 2012 ; Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013 ; Alouache *et al.*, 2014 ; Medboua-Benbalagh *et al.*, 2017) et CTX-M-1 (Yousfi *et al.*, 2016b; Belmahdi *et al.*, 2016) (Tableau 4, Figure 8).

D'autres BLSE, caractérisées par un haut niveau de résistance à la ceftazidime et parfois à l'aztréonam, ont une distribution moins large que celle du groupe CTX-M (Bradford, 2001; Philippon et Arlet, 2006) (Tableau 3). Dans ce groupe, les variants PER-1, VEB-1, GES-1, GES-7 et TLA-1 ont été détectés chez *E. coli* dans différentes régions du monde (Cattoir, 2008 ; Philippon, 2013). En Algérie, aucun type de ces enzymes n'a été détecté chez cette espèce. Cependant, l'enzyme VEB-1 a été identifiée chez des souches de *Providencia stuartii* et d'*E. cloacae* (Aubert *et al.*, 2005 ; Iabadene *et al.*, 2008), PER-1 chez des souches de *Proteus vulgaris* et *Providencia stuartii* (Iabadene *et al.*, 2009b) et PER-2 chez des souches de *Serratia marcescens* (Batah *et al.*, 2015).

Ces dernières années, les carbapénèmes sont devenues les traitements de choix des infections sévères dues aux entérobactéries productrices de BLSE. Cependant, comme pour toutes les β -lactamines mises sur le marché, des souches résistantes sont apparues (Cuzon *et al.*, 2010b). Cette résistance est principalement due à deux mécanismes impliquant des β -lactamases (Nordmann et Carrer, 2010). Le premier associe la production d'une céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique) ou d'une BLSE à une diminution de perméabilité membranaire par perte ou altération de porines et se traduit par une diminution de l'activité de nombreuses β -lactamines y compris l'imipénème (Mainardi *et al.*, 1997). Le second mécanisme met en jeu des β -lactamases capables d'hydrolyser fortement les carbapénèmes, nommées carbapénémases (Nordmann *et al.*, 2011). La première description d'une carbapénémase produite par des entérobactéries (NmcA) a été rapportée en 1993 (Naas et Nordmann, 1994). Depuis, plusieurs carbapénémases ont été identifiées appartenant à trois classes moléculaires d'Ambler : les classes A, B et D (Queenan et Bush, 2007).

Les carbapénémases de classe A confèrent une résistance à toutes les β -lactamines. Elles sont peu inhibées par l'acide clavulanique, mais sont sensibles à l'action inhibitrice de l'acide

boronique qui est parfois utilisé dans leur test de détection (Robin *et al.*, 2012). Les premières enzymes de ce groupe ont été découvertes chez des entérobactéries de l'environnement. Il s'agit des β -lactamases chromosomiques NMC-A, SME, IMI-1 et SFC-1 (Walther-Rasmussen et Hoiby, 2007). Ensuite, des enzymes à support plasmidique, KPC et GES, ont été découvertes (Poirel *et al.*, 2007). Les KPC (*Klebsiella Pneumoniae* carbapenemase) sont les carbapénémases de classe A, les plus fréquentes et les plus menaçantes (Nordmann *et al.*, 2009). Les variants KPC-2 et KPC-3 sont les plus répandus dans le monde (Pfeifer *et al.*, 2010). Chez *E. coli* les carbapénémases de classe A restent rares. Ils n'ont pas encore été rapportées dans les pays d'Afrique du Nord (Mathlouthi *et al.*, 2016) et sont rarement détectées dans les pays de la Méditerranée. En effet, seuls les variants KPC-2 et GES-5 ont été rapportés chez des souches cliniques en Grèce (Mavroidi *et al.*, 2012) et en France (Walsh, 2010) respectivement.

Les carbapénémases de classe B ou métallo- β -lactamases (MBL) sont essentiellement des enzymes de type IMP (IMiPénémase) ou VIM (Verona Integron–encoded Metallo- β -lactamase) responsables d'épidémies hospitalières sévères des souches d'entérobactéries dans certains pays, particulièrement en Asie et en Europe de sud (Walsh, 2005 ; Loli *et al.*, 2006 ; Queenan et Bush, 2007 ; Vatopoulos, 2008). Ces MBL possèdent des ions zinc dans leur site actif et hydrolysent fortement toutes les β -lactamines à l'exception de l'aztreonam. Leur activité est inhibée par l'EDTA mais non inhibée par l'acide clavulanique (Walsh, *et al.*, 2005). Les enzymes IMP ont été initialement décrites à la fin des années 80 au Japon, chez des souches hospitalières de *S. marcescens* (Osano *et al.*, 1994). Depuis, 52 types d'enzymes IMP ont été identifiées à travers le monde (www.lahey.org/studies/). Chez *E. coli*, ces enzymes sont rarement rapportées. En effet, dans le bassin méditerranéen une seule étude effectuée au Maroc a signalé la présence de variant IMP-1 chez une souche d'*E. coli* uropathogène (Barguigua *et al.*, 2013). Les premières MBL de type VIM ont été découvertes plus tard en Europe (Lauretti *et al.*, 1999). Ces enzymes, qui ont émergé chez *P. aeruginosa* puis chez *Acinetobacter baumannii*, sont maintenant très répandues chez les entérobactéries dans le monde entier (Nordmann *et al.*, 2011). On en dénombre actuellement 46 types distincts (www.lahey.org/studies/). Pour *E. coli*, quelques études ont rapporté la présence des enzymes de type VIM chez des souches cliniques isolées dans les pays de la méditerranée. VIM-1 a été détectée en Espagne (Tórtola *et al.*, 2005) et en Egypte (Poirel *et al.*, 2013 ; Abdelaziz *et al.*, 2013), VIM-19 a été identifiée en Algérie (Robin *et al.*, 2010) et en France chez un patient algérien (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2010) et VIM 29 a été également signalée

en Egypte (Abdelaziz *et al.*, 2013).

Plus récemment, une nouvelle carbapénémase, la New Delhi métallo- β -lactamase-1 (NDM-1) a été identifiée chez *K. pneumoniae* et *E. coli* isolées en 2008 chez un patient suédois précédemment hospitalisé à New-Delhi, en Inde (Yong *et al.* 2009). Depuis cette découverte, plus de 268 publications ont signalé la diffusion de cette enzyme chez *E. coli* dans plusieurs pays à travers le monde (Berrazeg *et al.*, 2014). NDM-1 représente la MBL la plus identifiée chez *E. coli* dans le bassin méditerranéen (Gaibani *et al.*, 2011 ; Birgy *et al.*, 2011 ; Solé *et al.*, 2011 ; El-Herte *et al.*, 2012). En Algérie, trois études seulement ont rapporté l'émergence du NDM-1, mais chez des souches cliniques d'*A. baumannii* (Boulanger *et al.*, 2012 ; Mesli *et al.*, 2013 ; Bakour *et al.*, 2014). Cependant, pour *E. coli*, NDM-5 reste le seul variant qui a été identifié dans ce pays (Sassi *et al.*, 2014 ; Yousfi *et al.*, 2015 ; Yousfi *et al.*, 2016a ; Yaici *et al.*, 2016) (Tableau 4, Figure 8). Le variant NDM-7 a été également détecté, en France, chez des souches cliniques d'*E. coli* (Cuzon *et al.*, 2010a).

Les β -lactamases de Classe D, nommées également OXA pour oxacillinase, ont plus de 440 variants connus avec 232 présentant une activité carbapénémase (Nordmann *et al.*, 2012). Initialement, les OXA β -lactamases ont été signalées chez *P. aeruginosa*. Par la suite, ces carbapénémases ont été détectées chez de nombreuses autres bactéries à Gram négatif, y compris les entérobactéries (Pfeifer *et al.*, 2010). Parmi ces enzymes, OXA-48 représente la carbapénémase la plus fréquemment isolée chez les entérobactéries (Nordmann *et al.*, 2011 ; Nordmann *et al.*, 2012). Elle a été identifiée pour la première fois chez une souche de *K. pneumoniae* en Turquie (Poirel *et al.*, 2004). Depuis, les bactéries productrices d'OXA-48, ont très largement émergé dans tous les pays du pourtour méditerranéen et en Afrique (Nordmann *et al.*, 2011 ; Djahmi *et al.*, 2014). Le Moyen-Orient et le Nord d'Afrique sont considérés comme des réservoirs de souches productrices d'OXA-48 (Poirel *et al.*, 2012). Cette enzyme hydrolyse plus faiblement les carbapénèmes et les céphalosporines de 3ème génération, ce qui sous-estime probablement sa fréquence de diffusion chez les entérobactéries (Boutet-Dubois *et al.*, 2012). Toutefois, le niveau de résistance aux carbapénèmes est plus élevé lorsqu'elle est associée à une BLSE et à un défaut de perméabilité membranaire (Carrère *et al.*, 2010). Contrairement aux MBL et KPC, l'OXA-48 est résistante à l'action inhibitrice de l'acide clavulanique et de l'EDTA (Cuzon *et al.*, 2011). Cette enzyme est parmi les carbapénémases les plus répandues chez *E. coli* dans la méditerranée (Mathlouthi *et al.*, 2016). Elle a été détectée en France (Poirel *et al.*, 2011), en Italie (Giani *et al.*, 2012), en Turquie (Gulmez *et al.*, 2008 ; Kilic *et al.*, 2011), au Liban

(Baroud *et al.*, 2013), au Maroc (Barguigua *et al.*, 2012), en Egypte (Abdelaziz *et al.*, 2013) et plus récemment en Algérie (Agabou *et al.*, 2014 ; Yousfi *et al.*, 2016a) (Tableau 4, Figure 8).

Tableau 4. β -lactamases identifiées chez *E. coli* en Algérie

Référence	Année	Lieu	Nombre de souches productrices de β -lactamases(*)	Enzymes décrites (**)
Touati <i>et al.</i>	2006	Béjaia	3	CTX-M-15
Messai <i>et al.</i>	2006	Alger	3	CTX-M
Ramdani-Bouguessa <i>et al.</i>	2006	Alger	16	CTX-M-15 (13) ; CTX-M-3 (3)
Touati <i>et al.</i>	2007	Béjaia	1 (environnement hospitalier)	CTX-M-15
Iabadene <i>et al.</i>	2009a	Alger	3	CMY-2 (2) ; DHA-1 et CTX-M-15 (1)
Robin <i>et al.</i>	2010	Alger	2	VIM-19 (2) ; CMY-4 (2)
Alouache <i>et al.</i>	2012	Alger	1 (eau de mer)	CTX-M-15
Baba Ahmed <i>et al.</i>	2012	Tlemcen	4	CTX-M-15
Touati <i>et al.</i>	2012	Alger	3	CTX-M-15
Gharout-Sait <i>et al.</i>	2012	Béjaia	13	CTX-M-15 (9) ; CTX-M-3 (4)
Baba Ahmed-Kazi Tani <i>et al.</i>	2013	Tlemcen	17	CTX-M-15 (16) ; CTX-M-3 (1)
Alouache <i>et al.</i>	2014	Boumerdes	6 (station d'épuration)	CTX-M-15 (3) ; CTX-M-3 (3)
Anssour <i>et al.</i>	2014	Alger	7 (effluents hospitaliers)	CTX-M-15
Agabou <i>et al.</i>	2014	Constantine	85	CTX-M-15 (82) ; TEM-24 (1) ; TEM-3 (1) ; OXA-48 (1)
Yanat <i>et al.</i>	2014	Béjaia	4	CTX-M-15
Sassi <i>et al.</i>	2014	Annaba	3	CTX-M-15 (3) ; NDM-5 (3)
Brahmi <i>et al.</i>	2014	Béjaia	22 (poissons sauvages)	CTX-M-15 (15) ; CTX-M de groupe 9 (1) ; TEM-24 (6)
Gharout-Sait <i>et al.</i>	2015	Béjaia	9	CMY-4 (9) ; CTX-M-15 (2)

Meguenni <i>et al.</i>	2015	centre de l'Algérie	11 (oiseaux)	CTX-M-15
Mezhoud <i>et al.</i>	2015	Béjaia	17 (poulets de reproduction)	CTX-M de groupe 1
Yahiaoui <i>et al.</i>	2015	Alger	107	CTX-M-15 (6) ; SHV-2a (1) ; TEM-4 (1) ; TEM-31 (1) ; TEM-35 (1) ; TEM-1 (95)
Yousfi <i>et al.</i>	2015	Béjaia	1 (chien)	NDM-5
Anssour <i>et al.</i>	2016	Alger	2 (effluents hospitaliers)	CTX-M-15
Yousfi <i>et al.</i>	2016a	Béjaia	5 (chiens et chats)	CTX-M-15 (1) ; CMY-2 (1) ; CMY-42 (1) ; NDM-5 (1) ; OXA-48 (4)
Yousfi <i>et al.</i>	2016b	Béjaia	20 (chiens et chats)	CTX-M-15 (16) ; CTX-M-1 (2) ; SHV-12 (3)
Belmahdi <i>et al.</i>	2016	Béjaia	20 (poulets)	SHV-12 (14) ; CTX-M-1 (2) ; CMY-2 (4)
Yanat <i>et al.</i>	2016a	Béjaia	13	CTX-M-15
Yaici <i>et al.</i>	2016	Béjaia	4 (lait cru)	CTX-M-15 (4) ; CMY-42 (4) ; NDM-5 (4)
Yanat <i>et al.</i>	2016b	Oran	1	CTX-M-15
Yanat <i>et al.</i>	2016c	Oran	2	CTX-M-15
Medboua-Benbalagh <i>et al.</i>	2017	Alger	38	CTX-M-15 (32) ; CTX-M-14 (5) ; CTX-M-3 (1)

* : origine des souches qui ne sont pas isolées des patients ; ** : nombre de souches produisant l'enzyme.

3.2 Résistance aux aminosides

La modification enzymatique de l'antibiotique est le mécanisme de résistance aux aminosides le plus fréquemment observé chez les entérobactéries (Shakil *et al.*, 2008). Trois familles d'enzymes modifiant les aminosides (AME) ont été décrites et classées en fonction de la réaction qu'elles catalysent : acétylation d'un groupement aminé (AAC: aminosides N-acétyltransférases), phosphorylation (APH: aminosides O-phosphotransférases) ou nucléotidylation (ANT: aminosides O-nucléotidyltransférases) d'un groupement hydroxyle (Lambert, 2006). Ces enzymes ont été par la suite divisées en classes sur la base du site de modification (indiqué en parenthèse) et en sous classes en fonction du phénotype de résistance aux aminosides (indiqué en chiffre romain) (Figure 7). Les enzymes de même classe et sous-classe mais codées par des gènes différents sont désignées par une lettre minuscule à la fin (Ramirez et Tolmasky, 2010). Dans un autre système de nomenclature, les gènes sont désignés *aac*, *aad* et *aph* suivis par une lettre majuscule qui identifie le site de modification. Un chiffre est ajouté à la fin pour identifier les différents gènes (Wright, 2008). Les gènes codant les AME sont généralement trouvés en tant que gènes cassettes dans des intégrons, sur des plasmides ou des transposons, souvent associés aux gènes de résistance aux β -lactamines et aux quinolones (Ramirez et Tolmasky, 2010).

Les AAC constituent le groupe d'AME le plus diversifié tant par le nombre d'enzymes existantes que par la multiplicité de leurs hôtes. Il existe 4 classes d'acétyltransférases, les AAC(1), AAC(3), AAC(2') et AAC(6') (Jana et Deb, 2006). La classe des AAC(6'), la plus grande avec 26 gènes différents, est le mode de résistance le plus fréquemment rencontré parmi les AAC. Ce sont des enzymes à large spectre capables de modifier la plupart des aminosides utilisés en thérapeutique (Valulenko et Mobashery, 2003). Chez *E. coli*, plusieurs variants d'acétyltransférases ont été identifiés dans différentes régions du monde, il s'agit des enzymes : AAC(1), AAC(3)-Ia, AAC(3)-IIb, AAC(3)-IIc, AAC(3)-IVa, AAC(3)-VIa, AAC(6')-Ia, AAC(6')-Im et AAC(6')-Ib-cr (Ramirez et Tolmasky, 2010). Cependant, AAC(3) est la seule enzyme décrite en Algérie en association avec la BLSE CTX-M-15, chez des souches cliniques isolées à l'hôpital de Tlemcen (Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013) et chez des souches isolées des poissons sauvages capturés dans la mer Méditerranée à Béjaia (Brahmi *et al.*, 2014) (Tableau 6, Figure 8).

Les APH appartiennent à la famille des kinases. Elles sont très répandues parmi les bactéries pathogènes. On dénombre sept classes de phosphotransférases : APH(3'), APH(2''), APH(3''),

APH(7''), APH(4), APH(6) et APH(9), qui sont déterminées en fonction de leur site de phosphorylation (Poole, 2005), la plus importante étant la classe des APH(3') (Nurizzo *et al.*, 2003). En Algérie, une seule étude a rapporté la détection du gène *aph(3')-Ia* chez quatre souches d'*E. coli* isolées des effluents hospitaliers (Anssour *et al.*, 2016) (Tableau 6, Figure 8), tandis que plusieurs variants d'APH (APH(4)-Ia, APH(6)-Ic, APH(6)-Id, APH(3')-Ia, APH(3')-Ib, APH(3')-IIa et APH(2'')-IIa) ont été signalés chez cette espèce à travers le monde (Ramirez et Tolmasky, 2010).

Les ANT représentent la plus petite classe d'enzymes modificatrices des aminoglycosides avec seulement une dizaine de variants identifiés. Elles ont cependant un impact clinique important. Ces enzymes sont regroupées en cinq classes : ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6) et ANT(9) (Magnet et Blanchard, 2005). Les enzymes ANT(3'') sont les plus fréquentes. Elles confèrent une résistance à la streptomycine et à la spectinomycine. Les gènes codant ces enzymes sont le plus souvent nommés *aad*. Chez *E. coli*, ces gènes sont fréquemment décrits en tant que gènes cassettes au sein de différents intégrons (Ramirez et Tolmasky, 2010). En Algérie, différents allèles du gène *aadA* ont été détectés, en association avec différents gènes de résistance aux antibiotiques, chez des souches cliniques ainsi que chez des souches d'origine animale ou isolées des effluents hospitaliers (Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013 ; Sassi *et al.*, 2014 ; Anssour *et al.*, 2016 ; Belmahdi *et al.*, 2016). Un autre variant de nucléotidyltransférases a été également identifié, en Algérie, chez deux souches d'*E. coli* isolées des poissons sauvages, il s'agit de l'enzyme ANT(2'')-I (Brahmi *et al.*, 2014) (Tableau 6, Figure 8).

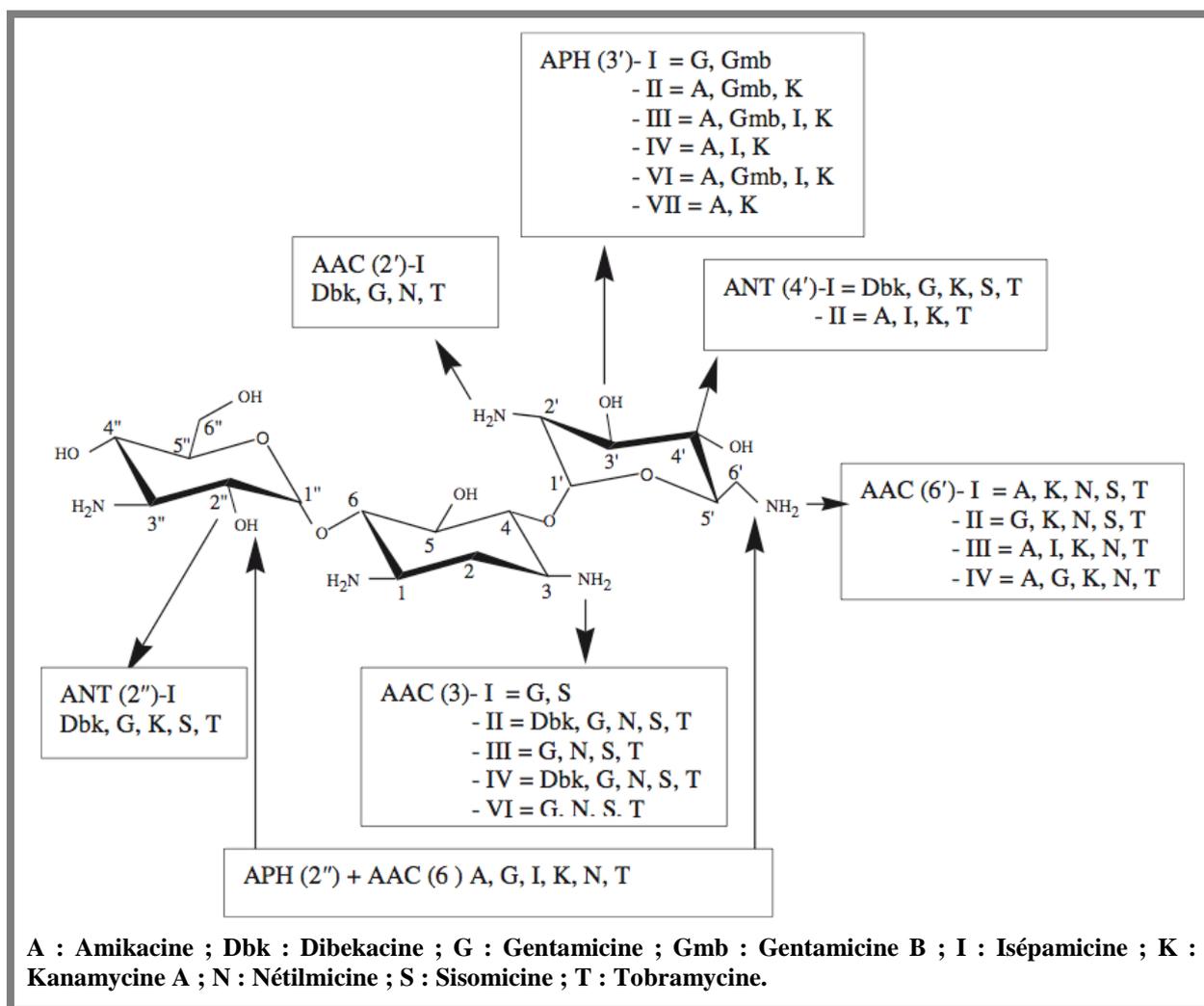


Figure 7. Principales enzymes modificateuses des aminosides et leurs substrats (Jana et Deb, 2006)

Un autre mécanisme, non enzymatique, conférant la résistance aux aminosides a été décrit chez *E. coli*, il s'agit de la diminution de la concentration intra-cytoplasmique en aminosides (Magnet et Blanchard, 2005). Ce mécanisme est du généralement à une exportation active de l'antibiotique par des pompes d'efflux. Ces systèmes expulsent des antibiotiques dans le milieu extérieur, en utilisant l'énergie du gradient électrochimique de la membrane cytoplasmique (Cattoir, 2004). Chez *E.coli*, il existe 37 pompes d'efflux distinctes (Nishino et Yamaguchi, 2001). Toutefois, il semble que seulement trois systèmes d'efflux sont capables d'exporter les aminosides vers le milieu extérieur et d'entraîner une résistance à cette famille d'antibiotiques. Il s'agit des pompes AcrD appartenant à la famille RND (Resistance-Nodulation cell Division), MdfA de la famille MFS (Major Facilitator Superfamily) et YdhE appartenant à la famille MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) (Cattoir, 2004). Ces pompes, codées par des gènes chromosomiques, sont strictement régulées et confèrent des résistances de très bas niveau aux antibiotiques pris en charge. Cependant, des mutations

au niveau des gènes régulateurs peuvent élever le niveau de résistance (Cattoir, 2004).

Plus récemment, un autre mécanisme de résistance aux aminosides a été décrit. Il s'agit de la méthylation des nucléotides spécifiques, situés au niveau du site A de l'ARNr 16S, site de liaison des aminosides sur le ribosome, ce qui empêche la liaison de ces antibiotiques à la sous-unité 30S ribosomale (Doi et Arakawa, 2007). Ce mécanisme confère une résistance de haut niveau à tous les aminosides cliniquement importants, à l'exception de la streptomycine (Krishnappa *et al.*, 2012). En 2003, le premier gène codant une méthylase de l'ARNr 16S, nommé *armA*, a été identifié (Galimand *et al.*, 2003). Depuis, onze déterminants de ces enzymes ont été détectés (*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtD2*, *rmtE*, *rmtE2*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* et *npmA*). Ces gènes sont généralement portés par des éléments génétiques mobiles retrouvés intégrés dans des plasmides transférables appartenant à divers groupes d'incompatibilité, ce qui a favorisé leur propagation mondiale (Wachino et Arakawa, 2012). Les méthylases ArmA et RmtB sont les plus fréquemment décrites (Galimand *et al.*, 2003; Bogaerts *et al.*, 2007; Yamane *et al.*, 2007a; Fritsche *et al.*, 2008). Chez *E. coli*, les gènes *armA* et *rmtB* ont été détectés pour la première fois en 2004 à Taiwan. Depuis, plusieurs variants de méthylases de l'ARNr 16S ont été identifiés chez cette espèce dans différentes régions du monde (Tableau 5). Cependant, ces enzymes sont rarement détectées chez *E. coli* en Afrique du Nord. En effet, le gène *armA* n'a jamais été détecté et le gène *rmtB* a été rapporté uniquement en Egypte (Helaly *et al.*, 2010) et en Algérie (Yanat *et al.*, 2016c) (Tableau 6, Figure 8).

Tableau 5. Les méthylases de l'ARNr 16S décrites chez *E. coli*

Référence	Année	Lieu	Nombre de souches productrices de méthylases de l'ARNr 16S (*)	Enzymes décrites (**)
Yan <i>et al.</i>	2004	Taiwan	14	ArmA (12) ; RmtB (2)
Yamane <i>et al.</i>	2005	Japon	3	ArmA (1) ; RmtB (2)
González-Zorn <i>et al.</i>	2005	Espagne	1 (porcs)	ArmA
Bogaerts <i>et al.</i>	2007	Belgique	5	ArmA (4) ; RmtB (1)
Wachino <i>et al.</i>	2007	Japon	1	NpmA
Doi <i>et al.</i>	2008	USA	1	RmtB
Liu <i>et al.</i>	2008	Chine	48 (porcs)	RmtB
Berçot <i>et al.</i>	2008	France	3	ArmA (2) ; RmtB (1)
Davis <i>et al.</i>	2010	USA	11 (bovins)	RmtE
Helaly <i>et al.</i>	2010	Egypte	3	RmtB
Poirel <i>et al.</i>	2010	Australie	1	ArmA et RmtB
Pfeifer <i>et al.</i>	2011	Allemagne	1	RmtC
Kiiru <i>et al.</i>	2011	Kenya	9	ArmA (2) ; RmtB (3) ; RmtA (4)
Mushtaq <i>et al.</i>	2011	UK, Pakistan, Inde	19	ArmA (7) ; RmtC (12)
Williamson <i>et al.</i>	2012	Nouvelle Zelande	3	RmtC
Al Sheikh <i>et al.</i>	2014	Arabie Saoudite	24	ArmA (18) ; RmtB (3) ; RmtC (3)
Leigue <i>et al.</i>	2015	Brasil	1 (cheval)	RmtD
Xia <i>et al.</i>	2015	Chine	2 (porcs)	RmtE2
Yanat <i>et al.</i>	2016c	Algérie	2	RmtB

* : origine des souches qui ne sont pas isolées des patients ; ** : nombre de souches produisant l'enzyme.

3.3 Résistance aux quinolones

Depuis leur mise sur le marché, l'incidence de la résistance aux quinolones ne cesse de croître chez les entérobactéries. Cette résistance fait intervenir différents mécanismes chromosomiques et plasmidiques (Cattoir, 2012).

La résistance chromosomique aux quinolones chez les entérobactéries, résulte essentiellement des mutations ponctuelles au niveau des gènes codant les cibles de ces molécules, les sous-unités A et B de l'ADN gyrase (GyrA et GyrB) et les sous-unités C et E de la topoisomérase IV (ParC et ParE) (Drlica et Zhao, 1997). Chez *E. coli*, ces mutations sont principalement localisées dans de courtes régions conservées, situées entre les acides aminés 67 et 106 du gène *gyrA* et les acides aminés 63 et 102 du gène *parC*, appelées QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) (Yoshida *et al.*, 1990 ; Wohlkonig *et al.*, 2010). Une mutation simple du *gyrA* confère généralement un faible niveau de résistance aux fluoroquinolones. Une mutation supplémentaire de *gyrA* et/ou du *parC* est nécessaire afin d'obtenir un haut niveau de résistance (Vila *et al.*, 1994). Les substitutions en positions 83 et 87 du *gyrA*, notamment celles du types Ser₈₃Leu et Asp₈₇Asn et la substitution en position 80 du *parC*, notamment celle du type Ser₈₀Ile, sont les plus fréquemment rencontrées chez *E. coli* (Piddock, 1999 ; Saenz *et al.*, 2003 ; Fendukly *et al.*, 2003). En Algérie, plusieurs études ont rapporté la prédominance de ces types de mutations chez des souches d'*E. coli* résistantes aux quinolones (Alouache *et al.*, 2014 ; Yanat *et al.*, 2014 ; Meguenni *et al.*, 2015 ; Yahiaoui *et al.*, 2015 ; Anssour *et al.*, 2016 ; Yanat *et al.*, 2016a).

La résistance chromosomique aux quinolones peut également être associée à la diminution de la perméabilité membranaire et/ou à la surexpression des systèmes d'efflux (Mitsuyama *et al.*, 1992 ; Putman *et al.*, 2000). Chez *E. coli*, l'altération des protéines de la membrane externe (porines) comme OmpF et OmpC a déjà été observée. Ces porines sont nécessaires à la diffusion des quinolones dans le cytoplasme (Chapman et Georgopapadokou, 1988). De plus, des systèmes d'efflux, non spécifiques et constitutifs, sont exprimés par des bacilles à Gram négatif et prennent en charge les quinolones. En effet, Le système AcrAB-TolC, appartenant à la famille RND (Resistance-Nodulation cell Division), joue un rôle important dans l'efflux des quinolones chez *E. coli* (Poole, 2005). AcrB est la pompe, AcrA est la MFP (Membrane Fusion Protein) et TolC est une porine de la membrane externe. (Borges-Walmsley *et al.*, 2003). Des mutations survenant au niveau de différents éléments régulateurs modifient l'activité de cette pompe d'efflux (Jacoby, 2005). Il est à noter que quelque soit le mécanisme

réduisant la concentration intracellulaire en antibiotique, il ne confère qu'une résistance de bas niveau aux quinolones mais il peut se cumuler à d'autres mécanismes et conférer une résistance de haut niveau (Mérens et Servonnet, 2010).

Le support de la résistance aux quinolones était supposé être uniquement chromosomique, jusqu'en 1998 où Martinez-Martinez et ces collaborateurs, ont décrit pour la première fois une souche de *Klebsiella pneumoniae* dont le support de la résistance aux quinolones est un plasmide transférable (PMQR, « Plasmid Mediated Quinolone Resistance ») (Martinez-Martinez *et al.*, 1998). Le déterminant génétique de cette résistance est le gène « *qnr* ». Les protéines Qnr s'intercalent entre les topoisomérases et les quinolones, bloquant ainsi leur activité (Tran et Jacoby, 2002 ; Tran *et al.*, 2005). Depuis la résistance plasmidique aux quinolones a été rapportée, les gènes *qnr* ont été identifiés chez différentes espèces d'entérobactéries dans le monde entier et sont souvent associés à la production de β -lactamases à spectre étendu (Guessennd *et al.*, 2008). Six déterminants Qnr (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD* et *qnrVC*) ainsi que différents variants des protéines QnrA (n=8), QnrB (n=88), QnrS (n=9), QnrD (2) et QnrVC (7) ont été identifiés (Yanat *et al.*, 2016d). Chez *E. coli*, les variants QnrA, QnrB, QnrS et QnrD ont été décrit à travers le monde (Armas-Freire *et al.*, 2015 ; Harifi Mood *et al.*, 2015 ; Yanat *et al.*, 2016d ; Liu *et al.*, 2016 ; Moremi *et al.*, 2016), tandis qu'en Algérie, *qnrA*, *qnrB* et *qnrS* restent les seuls gènes qui ont été rapportés par plusieurs études, en association avec différents gènes de résistance aux β -lactamines et aux aminosides, chez des souches d'origine humaine, animale ainsi que chez des souches de l'environnement (Gharout-Sait *et al.*, 2012 ; Alouache *et al.*, 2014 ; Agabou *et al.*, 2014 ; Yanat *et al.*, 2014 ; Brahmi *et al.*, 2014 ; Yahiaoui *et al.*, 2015 ; Anssour *et al.*, 2016 ; Yousfi *et al.*, 2016b ; Agabou *et al.*, 2016 ; Belmahdi *et al.*, 2016 ; Yanat *et al.*, 2016a ; Yanat *et al.*, 2016c) (Tableau 6, Figure 8). Les protéines Qnr confèrent une résistance de bas niveau aux fluoroquinolones, mais elles peuvent faciliter la sélection des souches avec un niveau de résistance plus élevé, notamment lorsque elles sont associées à des mutations des topoisomérases (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2007).

Un autre mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones a été décrit chez des souches d'*E. coli* isolées en Chine. Il s'agit d'une inactivation de ces antibiotiques par acétylation. Le déterminant de cette résistance est le gène *aac(6')-Ib-cr* (Robicsek *et al.*, 2006), variant du gène *aac(6')-Ib* qui code pour une aminoside N-acétyltransférase, responsable d'une résistance à la kanamycine, la tobramycine et l'amikacine (Park *et al.*, 2006). Deux substitutions en positions 102 (Trp → Arg) et 179 (Asp → Tyr) de la protéine AAC(6')-Ib

élargissent le spectre d'activité de la nouvelle enzyme, AAC(6')-Ib-cr, qui confère également une résistance de bas niveau à la ciprofloxacine et la norfloxacine (Robicsek *et al.*, 2006). Le gène *aac(6')-Ib-cr* est généralement identifié comme gène cassette au sein d'intégron de classe 1 (Mérens et Servonet, 2010). Il est souvent associé à d'autres gènes de résistance aux quinolones tels les différents variants *qnr* et aux β -lactamines (Strahilevitz *et al.*, 2009). *aac(6')-Ib-cr* représente le PMQR le plus fréquemment identifié chez *E. coli*. En effet, plusieurs études ont rapporté sa présence chez des souches d'*E. coli* isolées dans différents pays du monde. Il a été identifié en Europe (Literacka *et al.*, 2009 ; Mavroidi *et al.*, 2012 ; Musumeci *et al.*, 2012 ; Machuca *et al.*, 2016), En Chine (Liu *et al.*, 2016), à Taiwan (Kao *et al.*, 2016), en Iran (Heidary *et al.*, 2016), en Tanzanie (Moremi *et al.*, 2016) et en Egypt (Hassan *et al.*, 2012 ; Abd El-Aziz et Gharib, 2015). Il a été également détecté en Algérie, en association avec d'autres gènes de résistances aux antibiotiques, chez des souches cliniques, souches animales ainsi que chez des souches isolées dans une station d'épuration (Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013 ; Alouache *et al.*, 2014 ; Brahmi *et al.*, 2014 ; Yahiaoui *et al.*, 2015 ; Yousfi *et al.*, 2016a ; Yousfi *et al.*, 2016b ; Agabou *et al.*, 2016 ; Yanat *et al.*, 2016a ; Medboua-Benbalagh *et al.*, 2017) (Tableau 6, Figure 8).

Des nouveaux déterminants plasmidiques de résistance aux quinolones ont été identifiés, il s'agit des gènes *qepA* et *oqxAB*, codant des pompes d'efflux. *qepA* a été décrit pour la première fois, en 2007, chez deux souches cliniques d'*E. coli* isolées au Japon et en Belgique (Yamane *et al.*, 2007b ; Perichon *et al.*, 2007). A ce jour, trois variants ont été identifiés : *qepA1*, *qepA2* et *qepA3* (Cattoir *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2015), codant une pompe d'efflux appartenant à la famille MFS, qui confère une résistance aux quinolones hydrophiles (norfloxacine et ciprofloxacine) et induit une augmentation de leur CMI d'un facteur de 8 à 32 sans avoir d'effet significatif sur les autres quinolones (Yamane *et al.*, 2007b ; Perichon *et al.*, 2007). La prévalence des souches cliniques ayant la pompe d'efflux QepA est assez faible (Yanat *et al.*, 2016d). En effet, dans le bassin méditerranéen, trois études seulement ont rapporté la présence du gène *qepA* chez des souches cliniques d'*E. coli*. Sa première détection était en 2008 en France en association avec le gène *bla_{CTX-M-15}* (Cattoir *et al.*, 2008), ensuite en Egypte en 2010 (Helaly *et al.*, 2010). Plus récemment, il a été identifié en Algérie en association avec les gènes *bla_{CTX-M-15}*, *rmtB* et *qnrB* (Yanat *et al.*, 2016c) (Tableau 6, Figure 8).

La pompe d'efflux OqxAB a été découverte pour la première fois en 2004 chez une souche porcine d'*E. coli* (Hansen *et al.*, 2004). Ce mécanisme de résistance est déterminé par deux

gènes, *oqxA* et *oqxB*, codant un système d'efflux de la famille RND (Norman *et al.*, 2008). Ce dernier confère une résistance à un antibiotique utilisé pour stimuler la croissance dans des élevages porcins, l'olaquinox, mais il induit aussi une résistance au chloramphénicol, à l'acide nalidixique, à la norfloxacine et à la ciprofloxacine (Hansen *et al.*, 2007). Alors que ces gènes étaient toujours identifiés chez des souches d'origine animale, une étude chinoise parue en 2009 a rapporté, pour la première fois, la présence des gènes *oqxAB* chez des souches humaines de *K. pneumoniae* et d'*E. coli* (Kim *et al.*, 2009). Chez *E. coli*, ces gènes sont rarement détectés dans le bassin méditerranéen. En effet, deux études seulement ont rapporté la présence de pompe d'efflux OqxAB, chez cette espèce. Elle a été décrite chez des souches d'origine animale en Italie (Dotto *et al.*, 2014) et plus récemment, chez des souches cliniques en Turquie (Buruk *et al.*, 2016). Elle n'a pas encore été rapportée en Algérie.

Tableau 6. Gènes de résistance aux aminosides et aux quinolones décrits chez *E. coli* en Algérie

Référence	Année	Lieu (*)	Gènes décrits (**)
Gharout-Sait <i>et al.</i>	2012	Béjaia	<i>qnrS1</i> (4)
Baba Ahmed-Kazi Tani <i>et al.</i>	2013	Tlemcen	<i>aac(3')-II</i> (8) ; <i>aadA2</i> (7) ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> (6)
Alouache <i>et al.</i>	2014	Boumerdes (station d'épuration)	<i>qnrB1</i> (1) ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> (1)
Agabou <i>et al.</i>	2014	Constantine	<i>qnrB</i> (2) ; <i>qnrS</i> (7)
Yanat <i>et al.</i>	2014	Béjaia	<i>qnrB</i> (1) ; <i>qnrS</i> (2)
Sassi <i>et al.</i>	2014	Annaba	<i>aadA2</i> (3)
Brahmi <i>et al.</i>	2014	Béjaia (poissons sauvages)	<i>aac(3')-IV</i> (6) ; <i>aac(3')-III</i> (5) ; <i>aac(3')-II</i> (4) ; <i>aac(3')-I</i> (1) ; <i>ant(2'')-I</i> (2) ; <i>qnrB</i> (2) ; <i>qnrS</i> (6) ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> (5)
Yahiaoui <i>et al.</i>	2015	Alger	<i>qnrB5</i> (3) ; <i>qnrS1</i> (3) ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> (2)
Anssour <i>et al.</i>	2016	Alger (effluents hospitaliers)	<i>aadA1 et aadA2</i> (4) ; <i>aadA5</i> (1) ; <i>aph(3')-Ia</i> (4) ; <i>qnrB5</i> (1) ; <i>qnrB19</i> (1) ; <i>qnrS1</i> (1)
Yousfi <i>et al.</i>	2016a	Béjaia (chien)	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (1)
Yousfi <i>et al.</i>	2016b	Béjaia (chiens et chats)	<i>qnrB5</i> (1) ; <i>qnrS1</i> (10) ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> (5)
Agabou <i>et al.</i>	2016	Constantine	<i>qnrB</i> (5) ; <i>qnrS</i> (7) ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> (51) <i>aac(6')-Ib-cr</i> (8 souches isolées de poulets)
Belmahdi <i>et al.</i>	2016	Béjaia (poulets)	<i>aadA</i> , <i>qnrA</i>
Yanat <i>et al.</i>	2016a	Béjaia	<i>qnrB</i> (1) ; <i>qnrS</i> (2) ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> (11)
Yanat <i>et al.</i>	2016c	Oran	<i>rmtB</i> (2) ; <i>qnrB</i> (1), <i>qepA</i> (2)
Medboua-Benbalagh <i>et al.</i>	2017	Alger	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (11)

* : origine des souches qui ne sont pas isolées des patients ; ** : nombre de souches porteuses du gène de résistance.

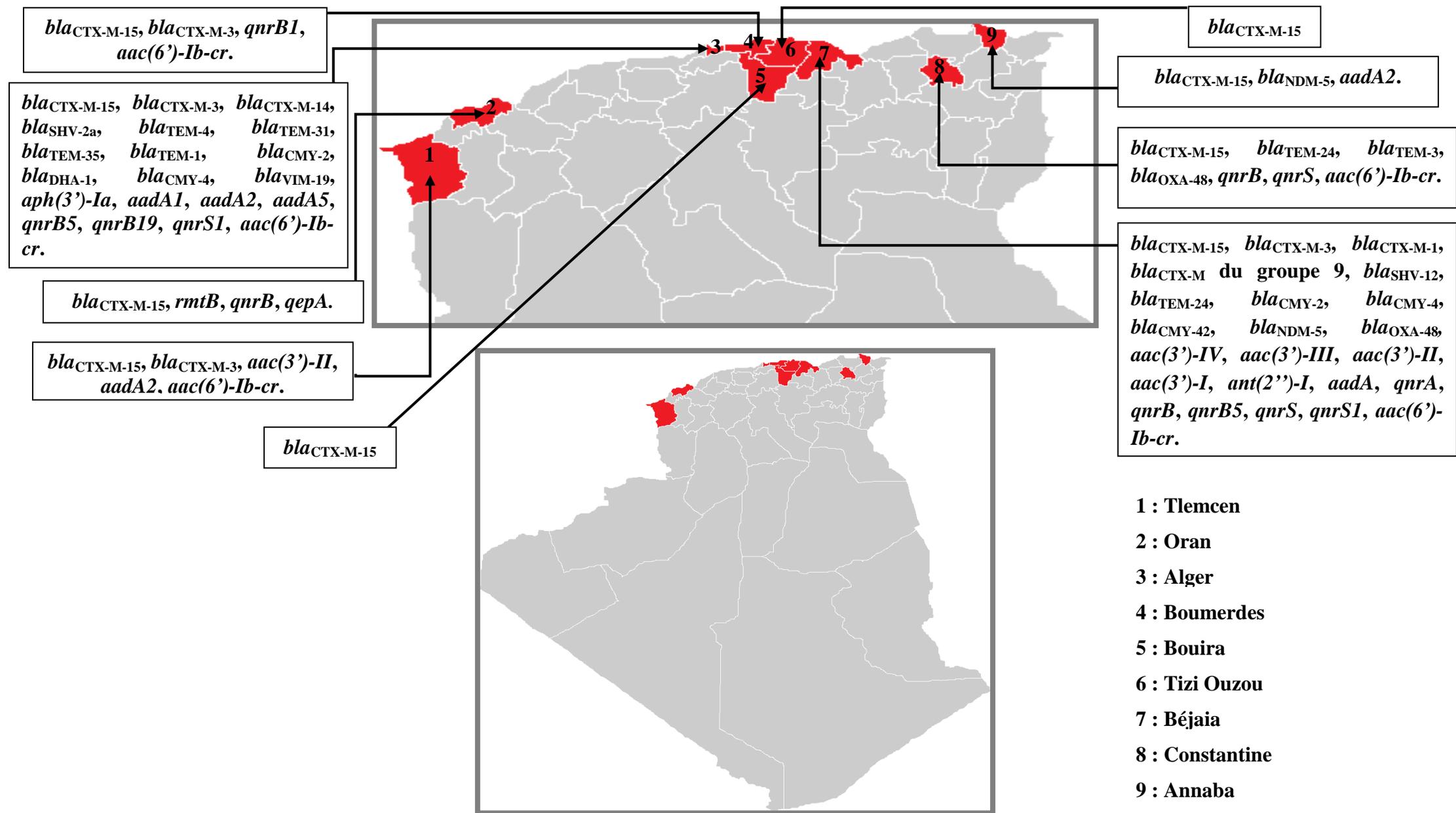


Figure 8. Carte de l'Algérie montrant la localisation géographique des gènes de résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux quinolones décrits chez *E. coli*

Deuxième partie

Matériel & Méthodes

1. Lieu d'étude

Cette étude multicentrique a été réalisée dans trois centres hospitalo-universitaires (CHU) situés dans le Nord-Ouest algérien. Le CHU d'Oran comprenant 2142 lits répartis sur 54 services, le CHU de Tlemcen contenant 800 lits distribués sur 25 services et le CHU de Sidi Bel Abbas disposant de 23 services avec 627 lits.

2. Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués, entre Octobre 2008 et Juin 2012, dans différents services essentiellement les services de réanimation, de chirurgie et de Neurochirurgie. Des prélèvements ont été également réalisés dans les services de médecine interne et ORL aux CHUs de Tlemcen et de Sidi Bel Abbas. Pour ce dernier, d'autres prélèvements ont été effectués au niveau des services d'urgence médicale et chirurgicale (UMC), d'endocrinologie et d'urologie.

Ces prélèvements ont été réalisés à partir de l'environnement par écouvillonnage et à partir de divers sites sur patients hospitalisés (aspiration trachéale, plaie, écouvillonnage rectal, sonde urinaire, sonde gastrique et cathéter), puis acheminés au laboratoire dans du bouillon nutritif (Fluka) pour être incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures.

3. Isolement et identification

Les cultures ont été réalisées sur milieux Mac Conkey (Bio-Rad) et Drigalski (Bio-Rad) à 37°C pendant 24 heures.

L'identification des souches a été réalisée par les galeries API 20E (BioMerieux) et confirmée par le spectromètre de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight) (Ultraflex MALDI-OF, Bruker Daltonik, Allemagne).

3.1 Galerie API 20E

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.

3.2 MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry method)

La spectrométrie de masse est une technique d'identification des bactéries basée sur l'analyse de leurs protéines totales à partir de colonies isolées (Seng *et al.*, 2010). De façon succincte, le spectromètre est composé de trois éléments principaux : une chambre d'ionisation produisant des ions en phase gazeuse, un analyseur séparant les ions selon le rapport masse sur charge (m/z) et un détecteur transformant le courant ionique en courant électrique et générant un spectre de masse caractérisant l'échantillon. Le spectre obtenu est ensuite comparé à une collection de spectres contenus dans des bases de données de façon à identifier la souche bactérienne.

Les résultats d'identification des bactéries sont donnés, sous Biotyper RTC, par un score entre 0 à 3 (Tableau 7). L'identification d'un germe est validée lorsque le score est supérieur à 1,9.

Tableau 7: Score d'identification des bactéries

Score	0-1.7	1.7-1.9	1.9-3
Couleur	Rouge	Jaune	Vert
Identification bactérienne	Aucune	Genre bactérien	Espèce bactérienne

4. Etude de la résistance aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion des disques en milieu solide (Antibiogramme) et par la méthode de dilution en milieu gélosé, Mueller-Hinton, (Bio-Rad) (détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI) selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (www.sfm.asso.fr).

4.1 Antibiogramme

Les géloses Mueller-Hinton ont été ensemencées, à l'aide d'un écouvillon, à partir d'une culture bactérienne jeune (18h à 24h) à 0.5 Mac Farland ($\approx 10^8$ UFC/ml) diluée au 1/100. Les disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface des géloses à l'aide d'un distributeur automatique. Les boîtes ont été ensuite incubées pendant 18 à 24 h à 37°C. À l'aide d'un pied à coulisse, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques ont été mesurés et l'interprétation en bactérie Sensible (S) Intermédiaire (I) ou

Résistante (R) a été effectuée selon les critères définis par le CA-SFM (www.sfm.asso.fr). Vingt antibiotiques (Bio-Rad) ont été testés : amoxicilline (AMX), amoxicilline + acide clavulanique (AMC), ticarcilline (TIC), ticarcilline + acide clavulanique (TCC), pipéracilline (PIP), pipéracilline + tazobactam (TZP), céfoxitine (FOX), céfotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), céfépime (FEP), aztréonam (ATM), ertapénème (ETP) et imipénème (IPM) appartenant à la famille des β -lactamines ; gentamicine (GM), tobramycine (TM), amikacine (AN) et nétilmicine (NET) appartenant à la famille des aminosides ; acide nalidixique (NA), ofloxacine (OFX) et ciprofloxacine (CIP) appartenant à la famille des quinolones et triméthoprim/sulfaméthoxazole (SXT).

4.2 Détermination des CMI

Une série de concentrations d'antibiotiques selon une progression géométrique de raison $\frac{1}{2}$ a été préparée (Annexe 1) pour distribuer 2 ml de chaque dilution dans des boîtes de 18 ml de Mueller Hinton. Une suspension bactérienne jeune (18h à 24h) diluée à 10^7 UFC/ml a été ensemencée par spot de 2 μ l, soit un inoculum de 10^4 UFC/spot. Les boîtes ont été ensuite incubées pendant 18 à 24 h à 37°C. La concentration minimale inhibitrice, est la plus faible concentration d'antibiotique où il n'y a pas de croissance bactérienne visible. La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme souche témoin.

Dix antibiotiques (Bio-Rad) ont été testés : pipéracilline (PIP), pipéracilline + tazobactam (TZP), céfoxitine (FOX), céfotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), céfépime (FEP), aztréonam (ATM), gentamicine (GM), amikacine (AN) et ciprofloxacine (CIP).

Pour la colistine (CS), les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu liquide, Bouillon Mueller-Hinton (Bio-Rad), selon les recommandations du Comité européen de l'antibiogramme (EUCAST) (www.eucast.org).

5. Détection phénotypique des mécanismes de résistance aux β -lactamines

5.1 Test de synergie

La production d'une BLSE a été recherchée à l'aide de test de synergie réalisé sur gélose Mueller-Hinton. Des disques de céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) (céfotaxime et ceftazidime) et céphalosporines de 4^{ème} génération (C4G) (céfépime) ont été placés à 2 cm d'un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (Jarlier *et al.*, 1988). La présence d'une

BLSE a été caractérisée par la description d'une image de synergie en « bouchon de champagne » en raison de l'effet inhibiteur de l'acide clavulanique (Sirot, 1996).

5.2 Test à la cloxacilline

La présence d'une céphalosporinase a été mise en évidence par la détermination des diamètres d'inhibition de la céfoxitine, de la ceftazidime et du céfotaxime sur une gélose Mueller-Hinton additionnée de cloxacilline, inhibiteur de céphalosporinase, à 250 µg/ml (Philippon et Arlet, 2006). Ce test est significatif lorsque le diamètre de la zone d'inhibition au tour des disques d'antibiotiques utilisés augmente d'au moins 8 mm (De champs *et al.*, 2002). Les diamètres autour de la ceftazidime et du céfotaxime restent parfois inchangés dans le cas de production de BLSE associée à la production de céphalosporinase.

5.3 Test d'antagonisme

Le caractère inductible d'une éventuelle céphalosporinase a été étudié par le test d'antagonisme entre des molécules inductrices, comme l'imipénème et la céfoxitine, et une C3G comme le céfotaxime (Philippon et Arlet, 2006). Pour cela, sur une gélose Mueller-Hinton, des disques d'imipénème ont été placés à 2,5 cm et 3 cm d'un disque de céfotaxime et des disques de céfoxitine ont été placés à 1,5 et 2 cm du disque de céfotaxime. Un aplatissement de la zone d'inhibition du céfotaxime au voisinage des disques d'imipénème et de céfoxitine, témoigne d'un phénomène d'induction.

6. Détection et identification des gènes de résistance aux antibiotiques

6.1 Extraction de l'ADN par choc thermique

Une suspension bactérienne en EPPI (eau pour préparation injectable) a été préparée à partir de colonies bactériennes sur milieu Mueller-Hinton puis elle a été centrifugée à 14000 tours/min pendant 5 minutes à 4°C. Le culot repris dans 300 µl d'EPPI a été porté à ébullition pendant 10 min, puis refroidi 10 min dans la glace. Après une dernière centrifugation à 14000 tours/min pendant 5 minutes à 4°C, le surnageant, contenant l'ADN bactérien, a été recueilli et conservé à -20°C.

6.2 Amplification de l'ADN par PCR simple

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une méthode d'amplification génique *in vitro*, qui permet de copier en grand nombre une séquence d'ADN connue présente dans un échantillon même en très faible quantité. Afin de déterminer les gènes de résistance aux antibiotiques, cette technique a été utilisée pour la recherche des gènes codant les β -lactamases (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M} de groupe 1, *bla*_{CTX-M} de groupe 9, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CMY-2} et *bla*_{DHA-1}), des gènes codant la résistance aux aminosides (*armA* et *rmtB*), aux quinolones (*aac6'-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB* et *qnrS*), à la colistine (*mcr-1*) et les intégrons de classe 1. Les amorces utilisées pour la détection de l'ensemble de ces gènes sont listées en tableau 8. Pour toutes les réactions de PCR, des témoins positifs et négatifs ont été utilisés.

Tableau 8. Amorces utilisées pour les réactions de PCR

Gènes cibles	Amorces	Séquences nucléotidiques (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)
<i>bla</i> _{TEM}	TEM- F	CTTATTCCCTTTTTTGCGGC	844
	TEM- R	GGTCTGACAGTTACCAATGC	
<i>bla</i> _{SHV}	SHV- F	GGGTTATTCTTATTTGTCTGC	961
	SHV- R	GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG	
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M-F	ATGTGCAGYACCAGTAA	550
	CTX-M-R	ACCGCRATATCRTTGGT	
<i>bla</i> _{CTX-M} de groupe 1	CTX-M-gr1-F	TCGTCTCTCCAGA	950
	CTX-M-gr1-R	CCGTTTCCGCTATTA	
<i>bla</i> _{CTX-M} de groupe 9	CTX-M-gr9-F	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	850
	CTX-M-gr9-R	ACAGCCCTTCGGCGATGATT	
<i>bla</i> _{CMY-2}	LATCMY-2-F	TCGTTATGCTSCGCTCTG	1190
	LATCMY-2-R	GCTTTTCAAGAATGCGCC	
<i>bla</i> _{DHA-1}	DHA1-F	ACTCACACACGGAAGGTT	1194
	DHA1-R	TATCCGCAGGGGCCTGTT	
<i>armA</i>	armA-F	GTGCGAAAACAGTCGTAG	1016
	armA-R	GAAGTCAGGATACACCAG	
<i>rmtB</i>	rmtB-F	GAGACACCGATGAACATC	790
	rmtB-R	CCTTCTGATTGGCTTATC	
<i>aac6'-Ib-cr</i>	aac(6')-Ib9-F	ACTGAGCATGACCTTGCG	500
	aac(6')-Ib9-R	TGTTTCGCTCGAATGCCTG	
<i>qnrA</i>	qnrA1-F	TCTCACGCCAGGATTTGA	600
	qnrA1-R	CTAATCCGGCAGCACTAT	
<i>qnrB</i>	qnrB-F	TCGTGAAAGCCAGAAAGG	363
	qnrB-R	TTTGCTGCTCGCCAGTCG	
<i>qnrS</i>	qnrS2-F	TTCGACGTGCTAACTTGC	475
	qnrS2-R	GATACCTGATGTATCGAC	
<i>mcr-1</i>	mcr-1-F	GCAGCATACTTCTGTGTGGTAC	554
	mcr-1-R	TATGCACGCGAAAGAACTGGC	
Région variable des intégrons de classe 1	L1	GGCATCCAAGCAGCAAGC	/
	R1	AAGCAGACTTGACCTGAT	

6.2.1 Préparation du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel (50 µL) se compose de (les concentrations finales sont indiquées entre crochets) :

- dNTP [0,2 mM] ;
- MgCl₂ [1,5 mM] ;
- Tampon de Taq polymérase [1X] ;
- Deux amorces (forward et reverse) [0,25 µM chacune] ;
- 2,5 unités (U) de Taq polymérase (Fermentas, France) en PCR classique et 5U en long PCR ;
- 1µl de l'ADN
- EPPI (pour atteindre un volume final de 50 µl)

6.2.2 Conditions d'amplification

La réaction de PCR se fait en plusieurs cycles. Chaque cycle comporte trois étapes : une dénaturation qui consiste à chauffer à une température élevée pour séparer l'ADN à double brin en brisant les liaisons hydrogènes ; une hybridation qui consiste à un refroidissement rapide pour que les amorces se fixent à chaque extrémité complémentaire de l'ADN à simple brin et enfin, une polymérisation ou élongation grâce à la Taq polymérase qui permet la synthèse de nouveaux brins d'ADN.

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur (Biometra, Allemagne). Pour les produits de PCR ayant une taille inférieure à 1 kb, les conditions d'amplification étaient les suivantes : dénaturation initiale à 94°C pendant 10 min, puis 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1min suivie d' hybridation à différentes températures en fonction des amorces utilisées pendant 1 min 30 sec et d'élongation à 72°C pendant 1 min 30 sec et enfin une élongation finale à 72°C pendant 10 min. Pour les PCR détectant les intégrons de classe 1, l'amplification a été réalisée dans les conditions suivantes : dénaturation initiale à 94°C pendant 10 min, puis 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1min suivie d' hybridation à 50°C pendant 1 min 30 sec et d'élongation à 72°C pendant 7 min et enfin une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

6.2.3 Electrophorèse et révélation

Après amplification, les produits de PCR obtenus ont été mélangé au tampon de charge (Bleu de Bromo-phénol) et soumis à une migration à 130 Volts pendant 30 à 40 min dans un gel

d'agarose à 1% en tampon TAE 1X (Tris-acétate- EDTA). Un marqueur de poids moléculaire 100 pb DNA Ladder ou 1 kb DNA Ladder (Biolabs, Angleterre) a été déposé dans le gel en même temps que les échantillons. Le gel d'électrophorèse a été coloré dans un bain de bromure d'éthidium avant révélation aux ultra-violets.

6.3 Séquençage des produits d'amplification

6.3.1 Purification et quantification des produits de PCR

Les produits de PCR positifs ont été purifiés par filtration sur micro-membrane avec le kit Amicon Ultra (Millipore, Irlande) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN a été élué dans 30 µl d'EPPI et il a été conservé à -20°C.

L'ADN purifié a été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop, Labtech, France) et dilué dans de l'EPPI afin d'obtenir 2 ng pour 100 pb nécessaires à la réaction de séquençage.

6.3.2 Réaction de séquençage

Le séquençage consiste à déterminer la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN amplifié. Les produits de PCR purifiés et dilués ont été séquencés selon la méthode décrite par Sanger et ses collaborateurs (Sanger *et al.*, 1977). Il s'agit d'une méthode de séquençage par synthèse. L'élongation des brins d'ADN par la polymérase est stoppée de façon aléatoire suite à l'incorporation d'un didésoxyribonucléotide triphosphate (ddNTP). Chacun des 4 ddNTP, présent en faible proportion par rapport au dNTP correspondant, est marqué par un fluorochrome spécifique.

❖ Mélange réactionnel pour un produit de PCR:

- 3 µl du tampon de BigDye 5X ;
- 2 µl du BigDye v1.1 (dNTP + ddNTP marqués par des fluorochromes spécifiques + ADN polymérase) (Applied Biosystems, USA) ;
- 0,5 µl d'amorce forward ou reverse [0,25 µM] ;
- 1 µl d'ADN purifié et dilué ;
- 13.5 µl d'EPPI.

❖ Conditions d'amplification

- Dénaturation initiale : 1 min à 96°C ;

- Dénaturation : 10 sec à 96°C ;
 - Hybridation : 5 s à 50°C ;
 - Elongation : 4 min à 60°C.
- } 25 cycles

6.3.3 Purification des produits de séquençage

Les produits de séquençage ont été purifiés par ajout de 1/10^{ème} V d'acétate de sodium (3M, pH 5,2), 1/10^{ème} V d'EDTA (125 mM) et 2,5 V d'éthanol absolu glacé. Ce mélange a été incubé 15 min à température ambiante et centrifugé à 13000 tours/min pendant 15 min à 4°C. Les culots obtenus ont été lavés par 70 µl d'éthanol à 70% puis ils ont été à nouveau centrifugés 10 min dans les mêmes conditions et séchés à l'air, à l'abri de la lumière. Enfin, ils ont été repris dans 10 µl de formamide et conservés à -20°C avant passage dans le séquenceur à capillaires ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems, USA).

6.3.4 Analyse des séquences

Les séquences nucléotidiques obtenues ont été présentées sous forme d'un chromatogramme (Figure 9). Elles ont été analysées grâce au logiciel Chromas Lite® 2.01 (Technelysium Pty Ltd) puis comparées aux séquences déposées dans GenBank à l'aide du logiciel BLAST disponible sur le site web du centre national de l'information en biotechnologie (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

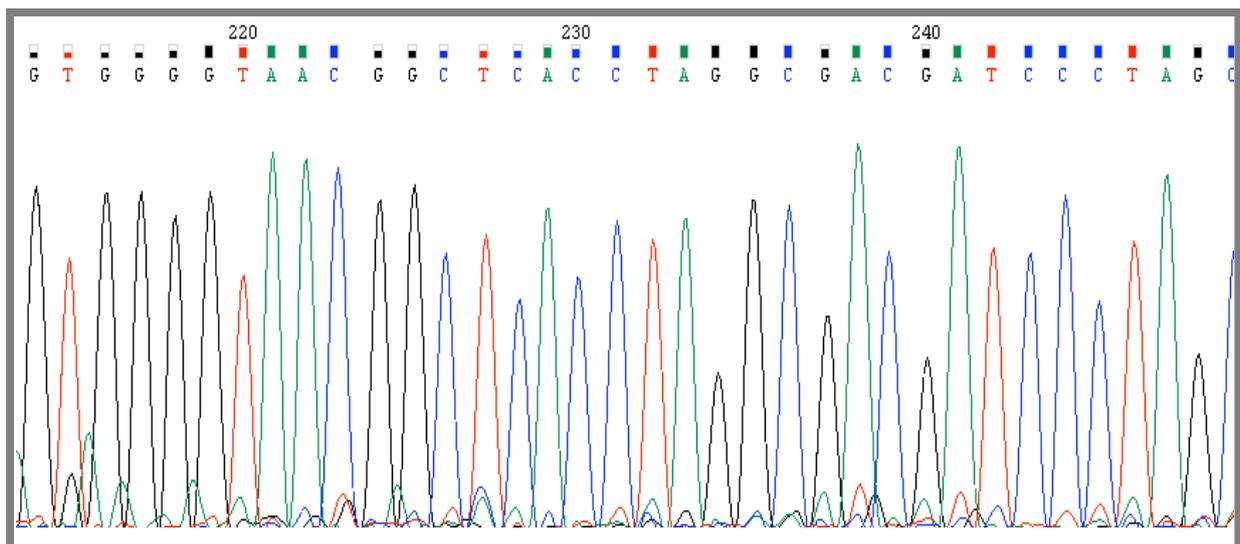


Figure 9. Chromatogramme obtenu par la méthode de séquençage de Sanger (Chaque couleur correspond à l'une des 4 bases)

7. Typage moléculaire des souches d'*E. coli* multirésistantes

Afin de mettre en évidence une éventuelle clonalité entre les souches multirésistantes, deux techniques de typage moléculaire ont été réalisées : l'électrophorèse en champ pulsé et le typage par séquençage multilocus.

7.1 Electrophorèse en champ pulsé (ECP)

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

7.1.1 Préparation des inserts d'ADN

Une suspension bactérienne a été préparée dans 1 ml du tampon Tris-NaCl 1M à partir d'une culture fraîche sur gélose Mueller-Hinton. Le culot obtenu après centrifugation, à 14000 tours/min pendant 5 min à 4°C, a été remis en suspension dans 1 ml du tampon Tris-NaCl 1M. Cette étape a été renouvelée une deuxième fois. La dernière suspension a été ajustée à une densité optique de 1,8 à 1,9 (DO 650 nm) en diluant dans le tampon Tris-NaCl 1M. Après 30 min au bain marie à 60°C, 500 µl de la suspension bactérienne ont été ajoutés à 500 µl d'agarose SeaPlaque® (FMC Corp. Roackland, Maine, Etats-Unis) à 1 % dans du tampon Tris-NaCl 1M. 80 µl de ce mélange ont été placés dans des moules puis laissés 10 min à température ambiante et 30 min à 4°C.

7.1.2 Lyse bactérienne et traitement des inserts

Les inserts ont été démoulés dans 3 ml d'EDTA (0,5M, pH 8) et ils ont été incubés 1h à 37°C. L'EDTA éliminé a été remplacé par 5 ml de solution de lyse (EDTA 0,5M, pH 8, N-

laurylsarcosine 1%) additionnée de 100 µl de protéinase K (50 mg/ml). Les tubes ont été incubés 48h à 56°C. Les inserts ont été ensuite lavés une première fois dans 20 ml du tampon TE (Tampon Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM) contenant 200 µl de phénylméthylsulfonyl fluorure (PMSF) pendant 1h à 37 °C, sous agitation douce. Cette étape a été renouvelée une deuxième fois mais à température ambiante. Puis ils ont été lavés 3 fois avec 20 ml du tampon TE pendant 1h à température ambiante, sous agitation douce. Enfin, les inserts ont été conservés dans 1 ml du tampon TE à 4°C.

7.1.3 Digestion par l'enzyme de restriction *XbaI*

40 U de l'enzyme de restriction *XbaI* (Biolabs, Angleterre), contenues dans 190 µl du tampon de l'enzyme 1X, ont été équilibrées une nuit à 4°C en présence d'un insert. Puis, l'ensemble a été incubé 5h à 37°C afin de réaliser la digestion enzymatique.

7.1.4 Electrophorèse

Les inserts digérés ont été coulés dans un gel d'agarose à 1% en tampon TBE 0,5X (Tris-borate-EDTA). La migration a été réalisée sur l'appareil CHEF-DRII® (BioRad, USA) en TBE 0,5X, selon les conditions suivantes :

- Pulse initial : 50 secondes
- Pulse final : 5 secondes
- Temps de migration : 20 heures
- Voltage : 5,4 V/cm
- Température : 14°C

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

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

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

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

Pour *E. coli*, la technique de MLST a été développée et mise au point par Wirth et *al.* en 2006. Elle est basée sur l'analyse, par séquençage nucléotidique, du polymorphisme de 7 gènes de ménage conservés au cours de l'évolution (Tableau 9). L'extraction de l'ADN, les PCR de détection des gènes de ménage ainsi que leurs séquençages ont été effectués selon les protocoles décrits précédemment (6.1, 6.2 et 6.3). Les séquences types ont été déterminées selon la base de données MLST d'*E. coli* disponible sur internet (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>). Les séquences MLST ont été alignées et regroupées grâce aux logiciels Bio Edit et MEGA6.

Tableau 9. Amorces utilisées pour MLST (Wirth et *al.*, 2006)

Gènes cibles	Amorces	Séquences nucléotidique (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)
<i>adk</i>	adk-F adk-R	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTCGCGTATTT	583
<i>fumC</i>	fumC-F fumC-R	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC GTACGCAGCGAAAAAGATTC	806
<i>gyrB</i>	gyrB-F gyrB-R	TCGGCGACACGGATGACGGC ATCAGGCCTTCACGCGCATC	911
<i>icd</i>	icd-F icd-R	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	878
<i>mdh</i>	mdh-F mdh-R	AGCGCGTTCTGTTCAAATGC CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT	932
<i>purA</i>	purA-F purA-R	CGCGCTGATGAAAGAGATGA CATACGGTAAGCCACGCAGA	816
<i>recA</i>	recA-F recA-R	CGCATTCGCTTTACCCTGACC TCGTTCGAAATCTACGGACCGGA	780

8. Etude de transfert des gènes de résistance aux antibiotiques

8.1 Conjugaison bactérienne

La conjugaison bactérienne est un mécanisme de transfert d'un plasmide conjugatif entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice nécessitant un contact physique entre ces deux bactéries par le biais d'un pili sexuel. La bactérie réceptrice ayant reçu le plasmide est appelée transconjugant. La sélection des transconjugants s'effectue en présence de deux antibiotiques: un correspond à l'une des résistances transférées de la souche donatrice et l'autre à la résistance non transférable de la souche réceptrice.

L'expérience de conjugaison a été réalisée en trois étapes. La souche donatrice et la souche réceptrice, *E. coli* K-12 C600 résistante à la rifampicine, ont été mises en culture séparément dans 5 ml de bouillon cœur cerveau (BHIB) (Fluka) pendant une nuit à 37°C. Puis, un mélange de 1 ml de la culture de la souche donatrice et 10 ml de la culture de la souche réceptrice a été incubé pendant une nuit à 37°C sans agitation (Touati *et al.*, 2006). Les transconjugants ont été sélectionnés sur géloses Drigalski contenant 200 µg/ml de rifampicine et soit 4 µg/ml de céfotaxime, soit 4 µg/ml de ceftazidime, soit 4 µg/ml de gentamicine, soit 30 µg/ml d'amikacine soit 1 µg/ml de colistine. Les transconjugants obtenus ont fait l'objet de contrôle de sensibilité par méthode de diffusion et de réaction de PCR pour détecter les gènes de résistance.

8.2 Typage des plasmides

Les groupes d'incompatibilité permettent de caractériser les plasmides porteurs de gènes de résistance et de suivre leur diffusion. Le développement d'une méthode de PCR multiplex par l'équipe de Carattoli a facilité la détermination des groupes d'incompatibilité majoritaires chez les entérobactéries (Carattoli *et al.*, 2005).

Cette méthode a été appliquée aux souches multirésistantes et leurs transconjugants. L'ADN total a été amplifié au cours de cinq PCR multiplex et de trois PCR simplex faisant intervenir 18 paires d'amorces qui reconnaissent les plasmides HI1, HI2, I1-I, X, L/M, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A/C, T, FIIA, F, K et B/O. Les amorces utilisées sont listées en Tableau 10.

Le mélange réactionnel a été préparé comme décrit ci-dessus (6.2.1). Les PCR ont été réalisées dans les conditions suivantes :

- Dénaturation initiale : 5 min à 94°C ;
 - Dénaturation : 1 min à 94°C ;
 - Hybridation des amorces : 1 min à 60°C ;
 - Elongation : 1 min à 72°C ;
 - Elongation finale : 5 min à 72°C.
- } 30 cycles

Seule la température d'hybridation des amorces pour la PCR simplex IncF est différente : elle est de 52°C.

Toute PCR multiplex positive a été vérifiée en simplex pour chacun des couples d'amorces.

Le produit de PCR a été ensuite séquencé (comme indiqué en 6.3) pour confirmer le résultat.

Tableau 10. Amorces utilisées pour le typage des plasmides (Carattoli *et al.*, 2005)

Gènes cibles	Amorces	Séquences nucléotidiques (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)	
<i>parA-parB</i>	HI1-F HI1-R	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	471	} Multiplex 1
iterons	HI2-F HI2-R	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	644	
<i>RNAI</i>	I1-F I1-R	CGAAAGCCGGACGGCAGAA TCGTGTTCCGCCAAGTTCGT	139	
<i>ori y</i>	X-F X-R	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	376	} Multiplex 2
<i>repA,B,C</i>	L/M-F L/M-R	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785	
<i>repA</i>	N-F N-R	GTCTAACGAGCTTACCGAAG GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	559	
iterons	FIA-F FIA-R	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462	} Multiplex 3
<i>repA</i>	FIB-F FIB-R	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	702	
<i>repA</i>	W-F W-R	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG GGTGCGCGGCATAGAACCGT	242	
<i>repA</i>	Y-F Y-R	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	765	} Multiplex 4
iterons	P-F P-R	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534	
<i>repA2</i>	FIC-F FIC-R	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	262	
<i>repA</i>	A/C-F A/C-R	GAGAACC AAAGACAAAGACCTGGA ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465	} Multiplex 5
<i>repA</i>	T-F T-R	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750	
<i>repA</i>	FII ₅ -F FII ₅ -R	CTGTCGTAAGCTGATGGC CTCTGCCACAAACTTCAGC	270	
<i>RNAI/repA</i>	F _{repB} -F F _{repB} -R	TGATCGTTTAAAGGAATTTTG TGATCGTTTAAAGGAATTTTG	270	Simplex 1
<i>RNAI</i>	K/B-F K-R	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC TCTTTCACGAGCCC GCCAAA	160	Simplex 2
<i>RNAI</i>	B/O-R	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA2	159	Simplex 3

Troisième partie

Résultats & Discussion

1. Résultats

1.1 Prélèvements

Durant la période d'étude, 1200 prélèvements ont été réalisés dont 520 au CHU de Tlemcen, 388 au CHU de Sidi Bel Abbes et 292 au CHU d'Oran (Tableau 11).

Tableau 11. Répartition des prélèvements

Année \ CHU	Tlemcen	Sidi Bel Abbes	Oran	Total
2008/2009	264	72	00	336
2010	37	171	50	258
2011	157	100	188	445
2012	62	45	54	161
Total	520	388	292	1200

1.2 Souches identifiées

Deux cent quarante souches d'*Escherichia coli* ont été isolées au niveau des trois centres hospitalo-universitaires (CHU) du Nord-Ouest algérien, ce qui correspond à une fréquence d'isolement de 20% (240/1200) (Tableau 12). 87 souches ont été isolées au CHU de Tlemcen (87/520), soit 16.7%, 78 au CHU d'Oran (78/292), soit 26.7% et 75 au CHU de Sidi Bel Abbes (75/388), soit 19.3%. La fréquence d'isolement d'*E. coli* était différente en fonction des hôpitaux et des années (Figure 10, Tableau 12). En effet, durant toute la période d'étude les souches d'*E. coli* ont été fréquemment isolées au niveau du CHU d'Oran. De plus, la fréquence d'isolement de cette espèce a atteint sa valeur maximale durant l'année 2010 avec 33.3% de prélèvements positifs.

E. coli représente 18.4% des bacilles à Gram négatif (BGN) isolés durant l'étude. Elle occupe la deuxième place après *Acinetobacter baumannii* qui prédomine parmi les 1302 BGN identifiés. Le classement d'*E. coli* diffère au niveau des CHUs d'Oran et de Sidi Bel Abbes. Pour ce dernier elle représente l'espèce prédominante contrairement au CHU d'Oran où elle

occupe la quatrième place après *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 12. Fréquences d'isolement d'*E. coli*

CHU \ Année	Tlemcen	Sidi Bel Abbes	Oran	Total
	Nombre de souches / Nombre de prélèvements (Fréquence d'isolement %)			
2008/2009	45/264 (17)	9/72 (12.5)	00/00 (00)	54/336 (16.1)
2010	13/37 (35.1)	44/171 (25.7)	29/50 (58)	86/258 (33.3)
2011	21/157 (13.4)	15/100 (15)	38/188 (20.2)	74/445 (16.6)
2012	8/62 (13)	7/45 (15.5)	11/54 (20.4)	26/161 (16.1)
Total	87/520 (16.7)	75/388 (19.3)	78/292 (26.7)	240/1200 (20)

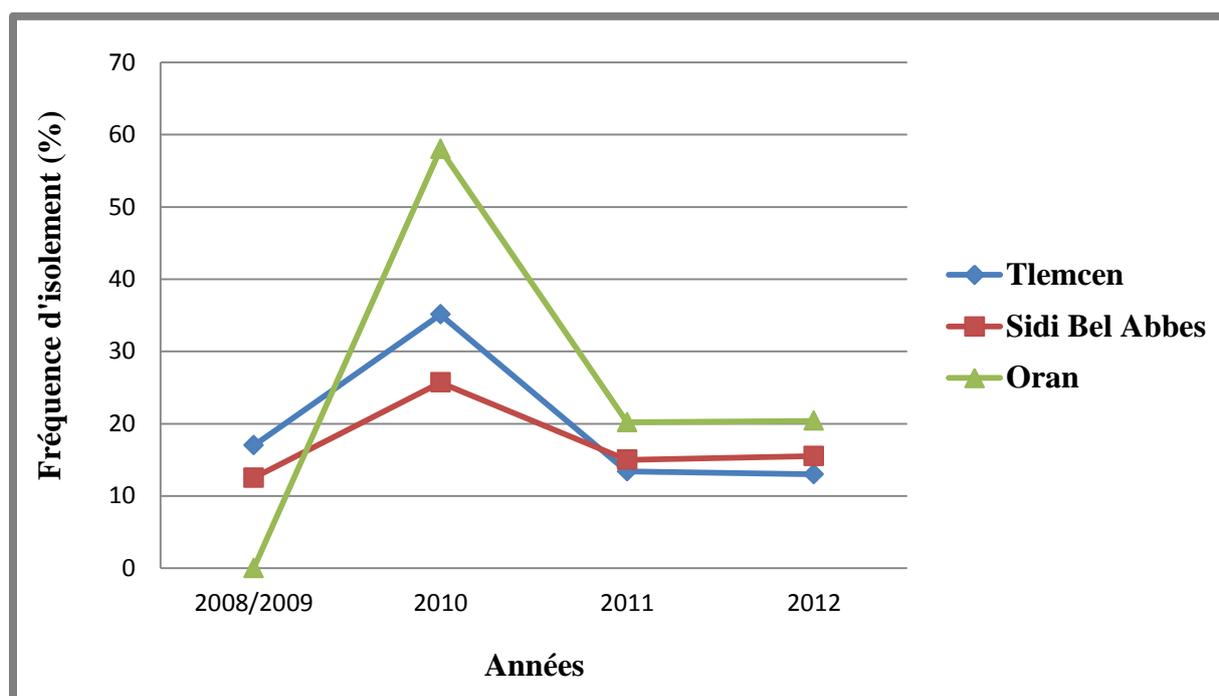


Figure 10. Fréquence d'isolement d'*E. coli* en fonction des hôpitaux et de la période d'étude

Les souches d'*E. coli* ont été essentiellement isolées des services de réanimation avec 112 souches soit 46.7% (112/240) (Tableau 13). Les autres souches ont été collectées à partir des services de chirurgie (20.4%), de neurochirurgie (15.8%), d'urgence (8.3%), de médecine interne (5.4%), d'ORL (1.7%), d'endocrinologie (1,3%) et d'urologie (0.4%).

La répartition des souches étudiées dans les services était différente en fonction des hôpitaux (Tableau 13). En effet, pour les CHUs de Tlemcen et d'Oran les services de réanimation représentaient la source principale des souches d'*E. coli* avec des taux d'isolement de 70.1% (61/87) et 42.3% (33/78) respectivement. Cependant, au niveau du CHU de Sidi Bel Abbas les souches d'*E. coli* provenaient essentiellement des services d'urgence médicale et chirurgicale (26,7%), de réanimation (24%) et de chirurgie (22.7%).

Tableau 13. Répartition des souches d'*E. coli* selon les services

Service \ CHU	Tlemcen (%)	Sidi Bel Abbas (%)	Oran (%)	Total (%)
Réanimation	61 (70.1)	18 (24)	33 (42.3)	112 (46.7)
Chirurgie	10 (11.5)	17 (22.7)	22 (28.2)	49 (20.4)
Neurochirurgie	10 (11.5)	5 (6.6)	23 (29.5)	38 (15.8)
UMC	/	20 (26.7)	/	20 (8.3)
Médecine Interne	5 (5.7)	8 (10.7)	/	13 (5.4)
ORL	1 (1.2)	3 (4)	/	4 (1.7)
Endocrinologie	/	3 (4)	/	3 (1.3)
Urologie	/	1 (1.3)	/	1 (0.4)
Total	87 (100)	75 (100)	78 (100)	240 (100)

UMC : Urgence Médicale et Chirurgicale ; ORL : Oto-Rhino-Laryngologie

Parmi les souches étudiées, 232 soit 96.7% (232/240) ont été isolées à partir de différents sites sur patients hospitalisés, comprenant les plaies (37.5%), les sondes urinaires (21.3%), les aspirations trachéales (17.9%), les prélèvements rectaux (15.8%), les sondes gastriques (3.8%) et les cathéters (0.4%), et 8 soit 3.3% (8/240) ont été isolées à partir de l'environnement (Tableau 14).

La répartition des souches d'*E. coli* selon les sites de prélèvement était différente en fonction des hôpitaux. En effet, au CHU de Sidi Bel Abbas 57.3% de souches ont été isolées à partir de plaies. Au CHU d'Oran, les plaies et les sondes urinaires représentaient les principaux sites d'isolement avec un taux de 29.5% pour chacun. Enfin, au CHU de Tlemcen les souches ont

été essentiellement isolées des prélèvements rectaux et des plaies avec des taux d'isolement de 33.3% et 27.6% respectivement.

Tableau 14. Répartition des souches d'*E. coli* selon les sites de prélèvement

Site de prélèvement \ CHU	Tlemcen (%)	Sidi Bel Abbes (%)	Oran (%)	Total (%)
Plaie	24 (27.6)	43 (57.3)	23 (29.5)	90 (37.5)
Sondes urinaire	12 (13.8)	16 (21.3)	23 (29.5)	51 (21.3)
Sonde gastrique	0 (0)	6 (8)	3 (3.8)	9 (3.8)
Prélèvement rectal	29 (33.3)	0 (0)	9 (11.5)	38 (15.8)
Aspiration trachéale	20 (23)	4 (5.4)	19 (24.4)	43 (17.9)
Cathéter	1 (1.2)	0 (0)	0 (0)	1 (0.4)
Environnement*	1 (1.1)	6 (8)	1 (1.3)	8 (3.3)
Total	87 (100)	75 (100)	78 (100)	240 (100)

*Environnement : poignée de porte, bord de lits, lave mains, chariot, table de bloc chirurgical, mur.

1.3 Résistance aux antibiotiques

Sur l'ensemble des souches étudiées, les résultats de l'antibiogramme et des CMI (Tableau 15) ont révélé une bonne activité des carbapénèmes (ertapénème et imipénème), de la colistine, de l'amikacine, de pipéracilline/tazobactam et de céfoxitine avec respectivement 100%, 97.5%, 92.9%, 87.9% et 87.1% de bactéries sensibles. Pour les autres antibiotiques, des différents taux de résistance ont été observés, ils varient de 20.4% à 70.8%.

La résistance d'*E. coli* aux antibiotiques varie en fonction des hôpitaux (Tableau 15). En effet, les taux de résistance les plus élevés ont été notés au CHU de Tlemcen pour la majorité des antibiotiques testés suivi du CHU d'Oran. Les taux de résistance les plus faibles ont été enregistrés au CHU de Sidi Bel Abbes pour l'ensemble des antibiotiques testés à l'exception des pénicillines associés aux inhibiteurs de β -lactamases et de Triméthoprime/Sulfaméthoxazole où les taux de résistance les plus faibles ont été observés au CHU d'Oran.

Il est nécessaire de préciser que les 6 souches résistantes à la colistine (CMI > 2µg/ml) ont été isolées au CHU de Sidi Bel Abbès.

Tableau 15. Taux de résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli*

Antibiotiques	Taux de résistance (%)			
	Tlemcen n=87	Sidi Bel Abbès n=75	Oran n=78	Total n=240
Amoxicilline	73 (83.9)	45 (60)	52 (66.7)	170 (70.8)
Amoxicilline + acide clavulanique	60 (69)	35 (46.7)	19 (24.4)	114 (47.5)
Ticarcilline	73 (83.9)	45 (60)	52 (66.7)	170 (70.8)
Ticarcilline + acide clavulanique	58 (66.7)	36 (48)	28 (35.9)	122 (50.8)
Pipéracilline	70 (80.5)	42 (56)	52 (66.7)	164 (68.3)
Pipéracilline + tazobactam	21 (24.1)	5 (6.7)	3 (3.8)	29 (12.1)
Ertapénème	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Imipénème	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Céfoxitine	18 (20.7)	6 (8)	7 (9)	31 (12.9)
Céfotaxime	60 (69)	16 (21.3)	22 (28.2)	98 (40.8)
Ceftazidime	56 (64.4)	16 (21.3)	20 (25.6)	92 (38.3)
Céfépime	51 (58.6)	13 (17.3)	20 (25.6)	84 (35)
Aztréonam	57 (65.5)	15 (20)	23 (29.5)	95 (39.6)
Gentamicine	51 (58.6)	13 (17.3)	17 (21.8)	81 (33.8)
Tobramycine	50 (57.5)	15 (20)	17 (21.8)	82 (34.2)
Nétilmicine	29 (33.3)	8 (10.7)	12 (15.4)	49 (20.4)
Amikacine	12 (13.8)	1 (1.3)	4 (5.1)	17 (7.1)
Acide nalidixique	51 (58.6)	25 (33.3)	25 (32)	101 (42.1)
Ofloxacine	49 (56.3)	23 (30.7)	25 (32)	97 (40.4)
Ciprofloxacine	49 (56.3)	19 (25.3)	24 (30.8)	92 (38.3)
Triméthoprim- Sulfaméthoxazole	55 (63.2)	36 (48)	18 (23.1)	109 (45.4)
Colistine	0 (0)	6 (8)	0 (0)	6 (2.5)

n = nombre total de souches.

1.3.1 Phénotypes de résistance aux β -lactamines

L'analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines des souches étudiées (Figure 11) a montré une dominance du phénotype de production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) (Figure 12) avec 94 souches, soit 39.2%. Le phénotype de production de pénicillinase (PASE), induisant une résistance aux pénicillines testées (Figure 13), vient en seconde position avec 73 souches, soit 30.4%, suivi de phénotype sauvage, regroupant les souches n'ayant acquis aucune résistance aux antibiotiques testés, avec 70 souches, soit 29.1%.

Parmi les souches présentant le phénotype majoritaire, BLSE, 27 soit 11,3%, produisaient également des céphalosporinases (Figures 14 et 15). Toutefois, l'hyperproduction de ces enzymes comme seul mécanisme de résistance (CASE) a été observée chez seulement 3 souches isolées au niveau des trois CHUs étudiés, soit 1,3% (Figures 16 et 17).

La répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines diffère selon les hôpitaux (Figure 11). En effet, la prédominance des souches productrices de BLSE seule (48.3%) ou associée à une céphalosporinase (19.5%) est très apparente au CHU de Tlemcen. Par contre, au niveau des CHUs de Sidi Bel Abbes et d'Oran, les phénotypes PASE et sauvage représentent les phénotypes majoritaires avec des proportions presque égales. De plus, les taux d'isolement des souches présentant le phénotype BLSE seul ou associé à une céphalosporinase, au niveau de ces hôpitaux, étaient nettement plus faibles que ceux notés au CHU de Tlemcen.

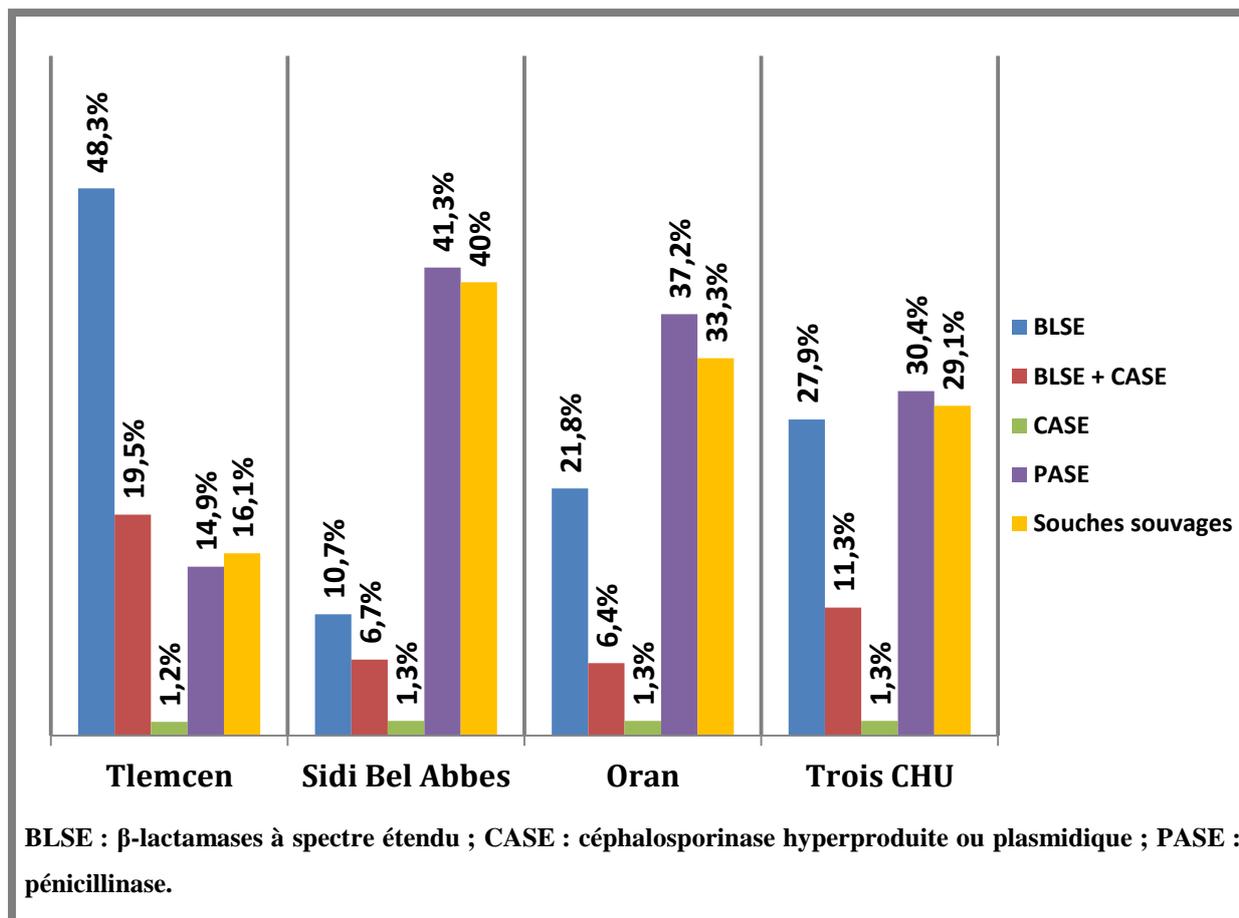


Figure 11. Répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines selon les hôpitaux

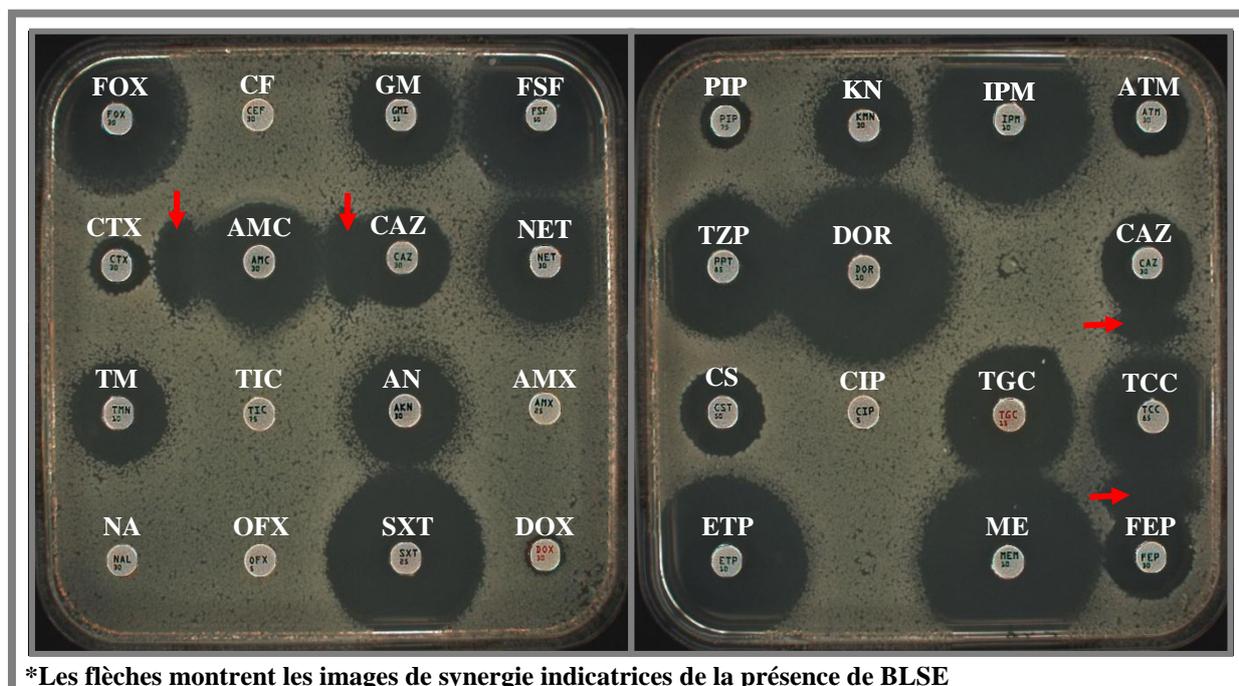
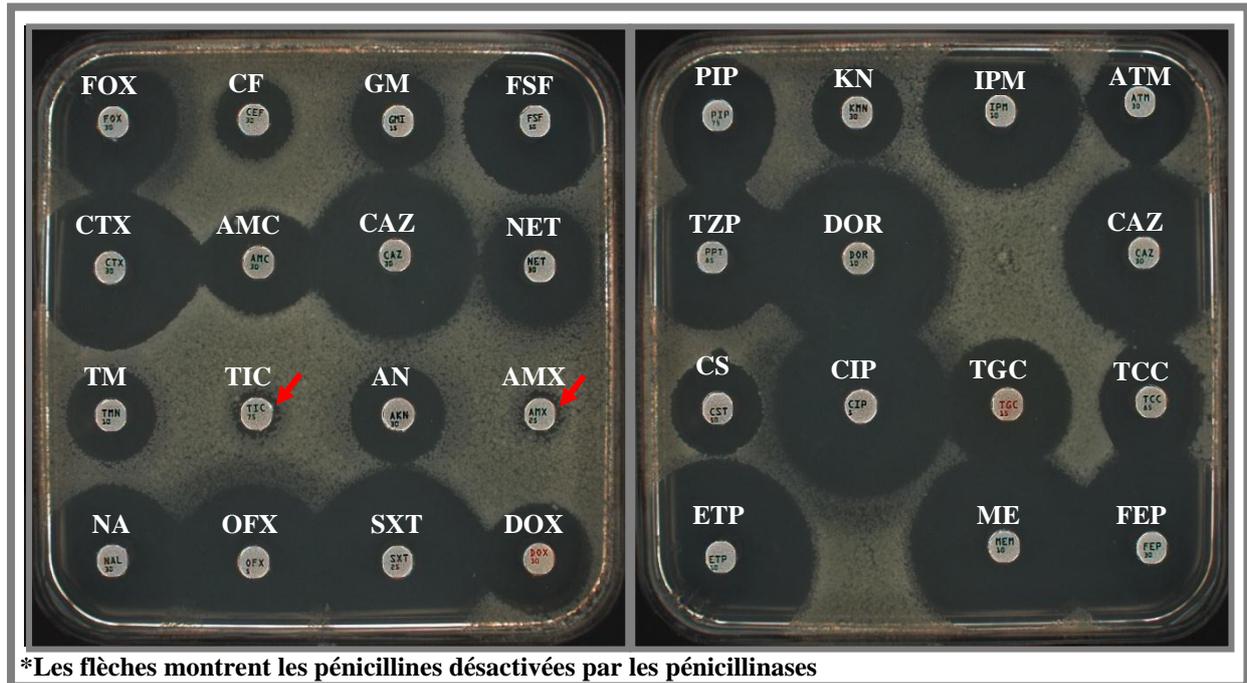
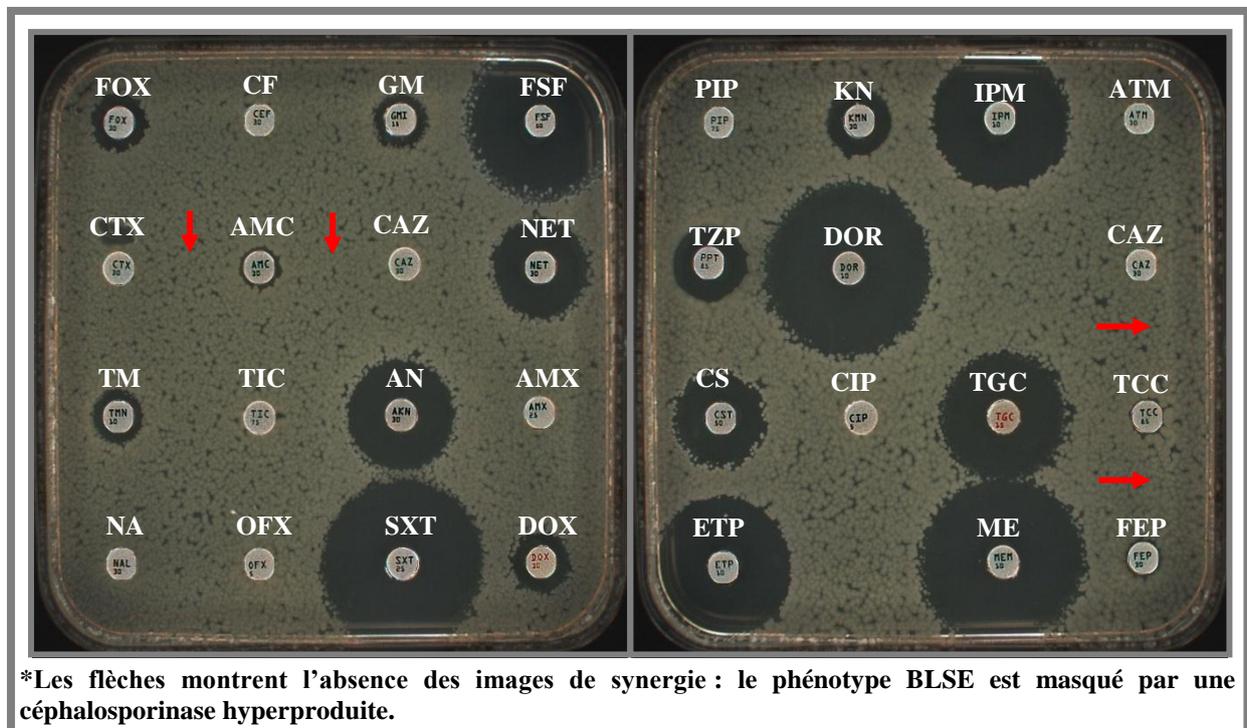


Figure 12. Phénotype BLSE



*Les flèches montrent les pénicillines désactivées par les pénicillinases

Figure 13. Phénotype PASE



*Les flèches montrent l'absence des images de synergie : le phénotype BLSE est masqué par une céphalosporinase hyperproduite.

Figure 14. Phénotype BLSE + CASE

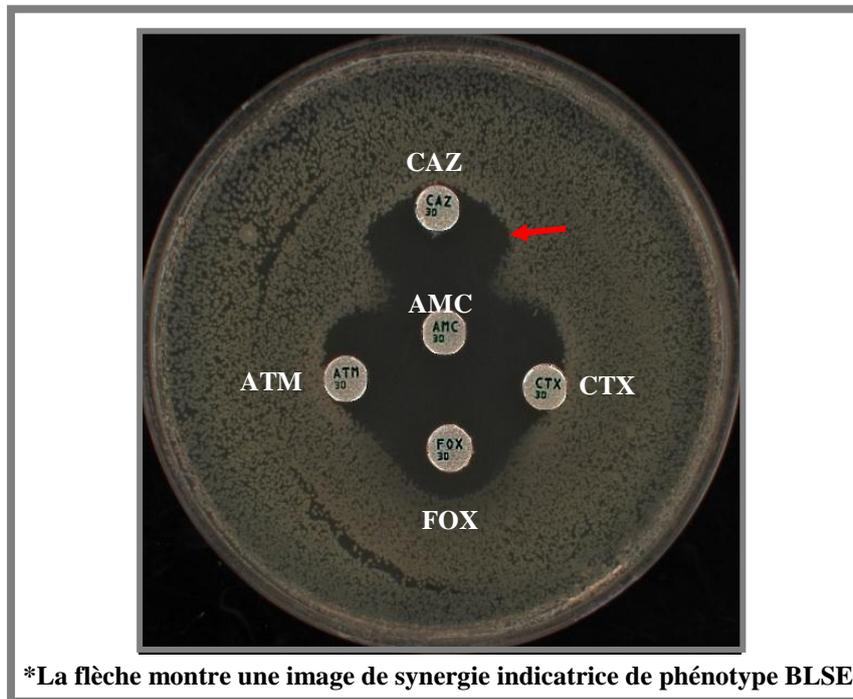


Figure 15. Test de synergie en présence de cloxacilline à 250 µg/ml pour la souche présentant le phénotype BLSE + CASE

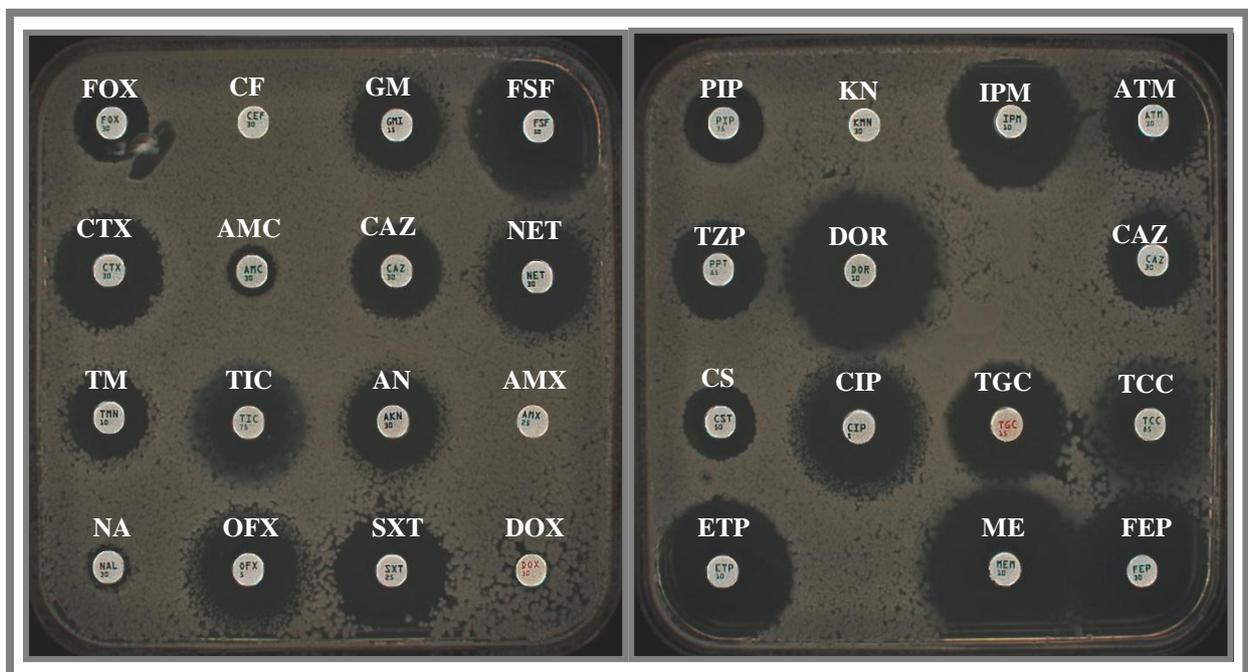


Figure 16. Phénotype CASE

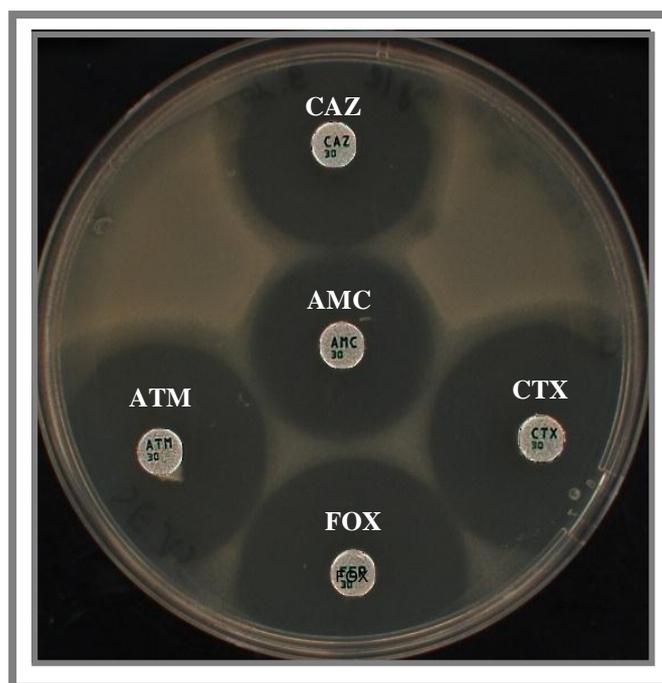


Figure 17. Antibiogramme avec cloxacilline à 250 µg/ml pour la souche présentant le phénotype CASE

La répartition des phénotypes de résistance au β -lactamines diffère en fonction des services (Tableau 16). Les résultats ont montré qu'au niveau des services de réanimation et de médecine interne, les souches présentant le phénotype BLSE étaient prédominantes avec 51.8% (58/112) et 46.1% (6/13) respectivement. Par contre, au niveau des autres services, ce sont les phénotypes sauvage et PASE qui occupent les premières places.

La répartition des phénotypes de résistance aux β -lactamines est également différente en fonction des sites de prélèvement (Tableau 17). En effet, pour les aspirations trachéales et les prélèvements rectaux, les résultats ont révélé que les souches présentant le phénotype BLSE, seul ou associé au céphalosporinases, étaient prédominantes avec respectivement des taux de 65.5% (28/43) et 44.7% (17/38). Par contre, au niveau des plaies chirurgicales, des sondes urinaires et des sondes gastriques, les phénotypes sauvage et PASE représentaient les phénotypes majoritaires. Il est nécessaire de préciser que la souche isolée du cathéter est une souche multirésistante présentant le phénotype BLSE + CASE et que parmi les huit souches isolées de l'environnement, cinq étaient sauvages, une avait le phénotype PASE et deux, isolées à Oran et Sidi Bel Abbas, ont présenté le phénotype BLSE.

Tableau 16. Répartition des phénotypes de résistance aux β-Lactamines des souches d'*E. coli* selon les services

Phénotype / Service	BLSE				BLSE + CASE				CASE				PASE				Souches sauvages			
	Tle	SBA	Oran	Total	Tle	SBA	Oran	Total	Tle	SBA	Oran	Total	Tle	SBA	Oran	Total	Tle	SBA	Oran	Total
Réanimation	26	3	11	40	13	2	3	18	0	0	1	1	11	7	10	28	11	6	8	25
Chirurgie	6	2	2	10	1	1	0	2	0	0	0	0	2	8	9	19	1	6	11	18
Neurochirurgie	5	1	4	10	2	0	2	4	1	0	0	1	0	1	10	11	2	3	7	12
UMC	/	1	/	1	/	2	/	2	/	0	/	0	/	10	/	10	/	7	/	7
Médecine Interne	5	1	/	6	0	0	/	0	0	1	/	1	0	4	/	4	0	2	/	2
ORL	0	0	/	0	1	0	/	1	0	0	/	0	0	1	/	1	0	2	/	2
Endocrinologie	/	0	/	0	/	0	/	0	/	0	/	0	/	0	/	0	/	3	/	3
Urologie	/	0	/	0	/	0	/	0	/	0	/	0	/	0	/	0	/	1	/	1
Total	42	8	17	67	17	5	5	27	1	1	1	3	13	31	29	73	14	30	26	70

Tle : CHU de Tlemcen ; SBA : CHU de Sidi Bel Abbes ; UMC : Urgence Médicale et Chirurgicale ; ORL : Oto-Rhino-Laryngologie.

Tableau 17. Répartition des phénotypes de résistance aux β -Lactamines des souches d'*E. coli* selon les sites de prélèvement

Phénotype Site de prélèvement	BLSE				BLSE + CASE				CASE				PASE				Souches sauvages			
	Tle	SBA	Oran	Total	Tle	SBA	Oran	Total	Tle	SBA	Oran	Total	Tle	SBA	Oran	Total	Tle	SBA	Oran	Total
Plaie	15	4	5	24	3	1	0	4	1	1	0	2	2	19	8	29	3	18	10	31
Sonde urinaire	3	2	4	9	4	3	0	7	0	0	0	0	1	8	12	21	4	3	7	14
Sonde gastrique	/	0	0	0	/	0	2	2	/	0	0	0	/	1	1	2	/	5	0	5
Prélèvement rectal	14	/	1	15	2	/	0	2	0	/	0	0	9	/	4	13	4	/	4	8
Aspiration trachéale	10	1	6	17	7	1	3	11	0	0	1	1	1	2	4	7	2	0	5	7
Cathéter	0	/	/	0	1	/	/	1	0	/	/	0	0	/	/	0	0	/	/	0
Environnement	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	4	0	5
Total	42	8	17	67	17	5	5	27	1	1	1	3	13	31	29	73	14	30	26	70

Tle : CHU de Tlemcen ; SBA : CHU de Sidi Bel Abbes

1.3.2 Résistances associées

Les résistances aux aminosides (gentamicine, tobramycine et nétilmicine), aux quinolones et au triméthoprime/sulfaméthoxazole, étaient plus fréquentes chez les souches produisant des β -lactamases à spectre étendu, seules ou en association avec des céphalosporinases (Tableau 18). Des taux de résistance élevés aux quinolones (acide nalidixique et ofloxacine) (66.6%) ont été également notés chez les souches présentant le phénotype CASE. Pour ces dernières, 100% de souches étaient résistantes au triméthoprime/sulfaméthoxazole, antibiotique qui a présenté une efficacité moyenne contre les souches de phénotype PASE avec un taux de résistance de 45.2%.

Pour l'amikacine, des taux de résistances très faibles ont été notés chez les souches de phénotypes BLSE (6%) et PASE (0%), contrairement à celles produisant des céphalosporinases seules ou associées aux BLSE, dont 33% et 44% de souches étaient respectivement résistantes à cet antibiotique.

Pour la colistine, des taux de résistance très faibles ont été obtenus chez les souches présentant le phénotype BLSE, seul (6%) ou associé aux céphalosporinases (7.4%), alors qu'aucune résistance à cet antibiotique n'a été trouvée chez les souches produisant uniquement des céphalosporinases ou pénicillinases.

Cette étroite association entre la production de β -lactamases et la résistance aux autres antibiotiques, représente un grand risque d'échec thérapeutique.

Tableau 18. Résistances associées d'*E. coli* en fonction des phénotypes de résistance aux β -lactamines

Phénotype (n)	Nombre de souches résistantes (%)								
	GM	TM	NET	AN	NA	OFX	CIP	SXT	CS
BLSE (67)	49 (73.1)	49 (73.1)	31 (46.3)	4 (6)	45 (67.2)	44 (65.7)	43 (64.2)	44 (65.7)	4 (6)
BLSE+CASE (27)	22 (81.5)	21 (77.8)	17 (63)	12 (44.4)	25 (92.6)	25 (92.6)	25 (92.6)	25 (92.6)	2 (7.4)
CASE (3)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	2 (66.6)	2 (66.6)	1 (33.3)	3 (100)	0 (0)
PASE (73)	8 (11)	10 (13.7)	0 (0)	0 (0)	21 (28.8)	19 (26)	16 (21.9)	33 (45.2)	0 (0)
Sauvage (70)	1 (1.4)	1 (1.4)	0 (0)	0 (0)	8 (11.4)	7 (10)	7 (10)	4 (5.7)	0 (0)

n : nombre de souches.

1.3.3 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La détermination des CMI en milieu gélosé a concerné 57 souches dont 40 BLSE, 14 BLSE + CASE et 3 CASE. Les intervalles de CMI observés pour chaque phénotype sont consignés dans le tableau 19. Des niveaux de résistance très élevés à l'ensemble des antibiotiques testés ont été notés. Nous pouvons donc sans doute, parler de souches non seulement multirésistantes mais de hauts niveaux de résistance. En effet, les résultats de CMI ont montré un niveau de résistance très élevé à la pipéracilline pour la plupart des souches étudiées, alors que les niveaux de résistance aux autres β -lactamines testées, aux aminosides et à la fluoroquinolone étaient très variables.

Il est à noter que les niveaux de résistance les moins élevés vis-à-vis de la gentamicine et l'amikacine ont été obtenus chez les souches présentant le phénotype BLSE + CASE au CHU de Sidi Bel Abbes et les souches de phénotype CASE aux CHUs de Tlemcen et de Sidi Bel Abbes. De même, les niveaux de résistance les plus faibles à la ciprofloxacine ont été notés chez les souches présentant le phénotype CASE.

Tableau 19. Intervalles de CMI (µg/ml) observés en fonction des phénotypes de résistance aux β-lactamines

Phénotype	CHU	PIP	TZP	FOX	CTX	CAZ	FEP	ATM	GN	AN	CIP
		≤8 >16	≤8/4 >16/4	≤8 >32	≤1 >2	≤1 >4	≤1 >4	≤1 >8	≤2 >4	≤8 >16	≤0.5 >1
BLSE	Tlemcen	512->512	2-32	2-8	16->512	1-512	32-256	8-128	0.5->512	2->512	0.125->128
	Sidi Bel Abbas	512->512	2-32	0.5-8	32->512	8-128	4-256	16-256	2->512	0.5->512	0.125->64
	Oran	512->512	4-32	4-8	2->512	0.5->256	0.5-512	0.5->512	0.5->512	2->512	0.25->32
BLSE+CASE	Tlemcen	512->512	2-32	16-128	256->512	2->512	4->512	16->512	0.5->512	1->512	0.125->128
	Sidi Bel Abbas	512->512	2-32	16-512	>512	128->512	256-512	256-512	1-64	4-8	32->128
	Oran	512->512	2-8	16-128	256->512	2-512	8-64	4-512	128->512	32->512	>128
CASE	Tlemcen	128	8	64	32	128	1	64	1	2	0.25
	Sidi Bel Abbas	16	8	64	8	16	0.5	8	0.5	1	0.25
	Oran	256	128	64	256	128	1	64	256	64	16

PIP : pipéracilline ; TZP : pipéracilline + Tazobactam ; FOX : céfoxitine ; CTX : céfotaxime ; CAZ : ceftazidime ; FEP : céfépime ; ATM : aztréonam ; GN : gentamicine ; AN : amikacine ; CIP : ciprofloxacine.

1.4 Identification des gènes de résistance aux antibiotiques

Sur l'ensemble des isolats étudiés, 69 souches (35 de Tlemcen, 20 d'Oran et 14 de Sidi Bel Abbès) dont 43 BLSE, 24 BLSE+CASE et 2 CASE (Tableau 21), ont été sélectionnées sur la base de leurs phénotypes de résistance aux antibiotiques et de leurs CMI et ce, pour la recherche des gènes de résistance aux β -lactamines, aux aminosides, aux quinolones, à la colistine et des intégrons de classe 1.

1.4.1 Gènes de résistance aux β -lactamines

Pour les 67 souches présentant les phénotypes BLSE et BLSE+CASE, des PCR ont été réalisées pour la recherche des gènes codant les β -lactamases suivantes : CTX-M du groupe 1, CTX-M du groupe 9, TEM et SHV. Le gène *bla*_{CTX-M} a été détecté chez 64 souches (95.5%) (Figure 18) dont 62 exprimant le gène *bla*_{CTX-M} du groupe 1 (Figure 19) et deux le gène *bla*_{CTX-M} du groupe 9 (Figure 20). Les gènes *bla*_{TEM} (Figure 21) et *bla*_{SHV} (Figure 22) ont été trouvés chez 47 et 2 souches respectivement.

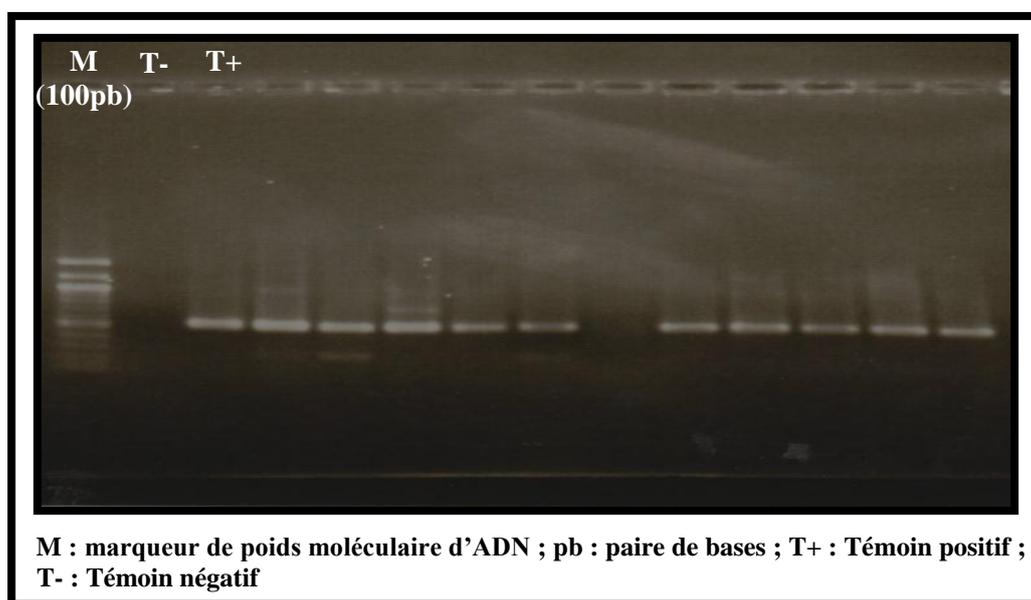


Figure 18. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène *bla*_{CTX-M}

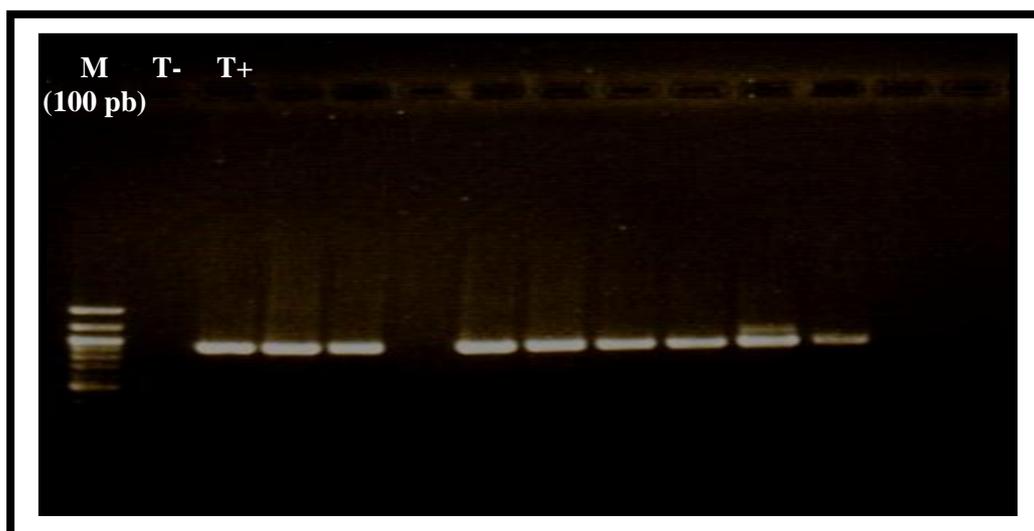


Figure 19. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène *bla*_{CTX-M} du groupe 1

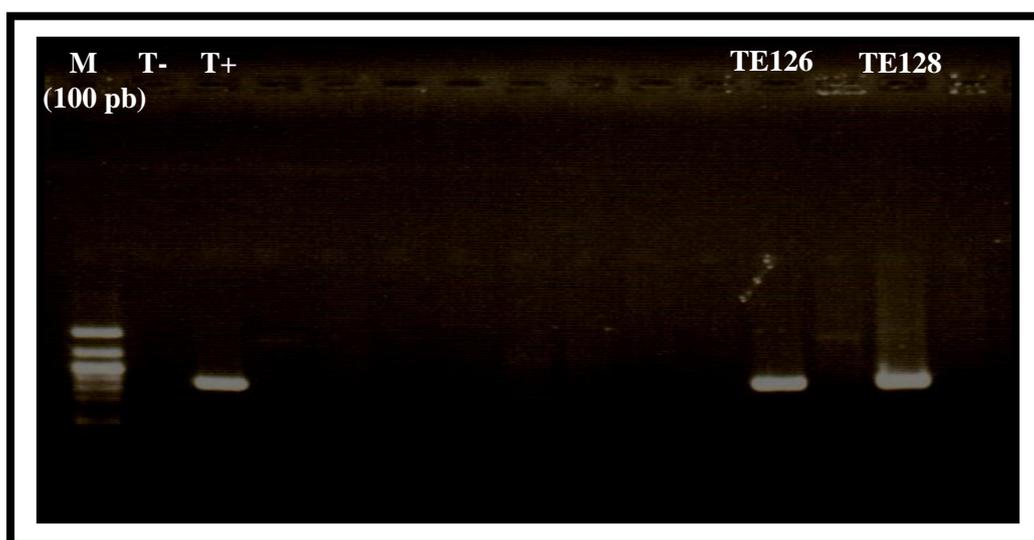


Figure 20. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène *bla*_{CTX-M} du groupe 9

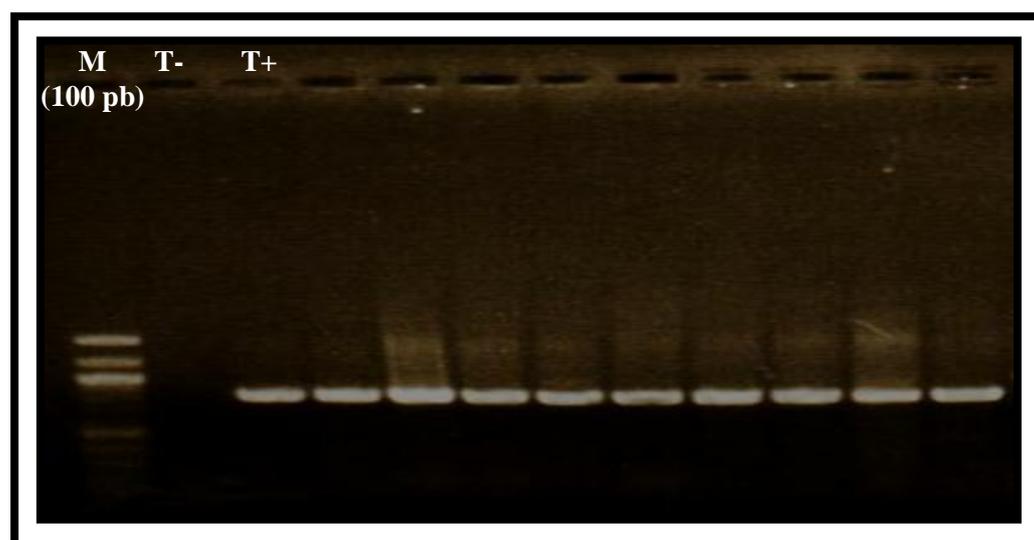


Figure 21. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène *bla*_{TEM}

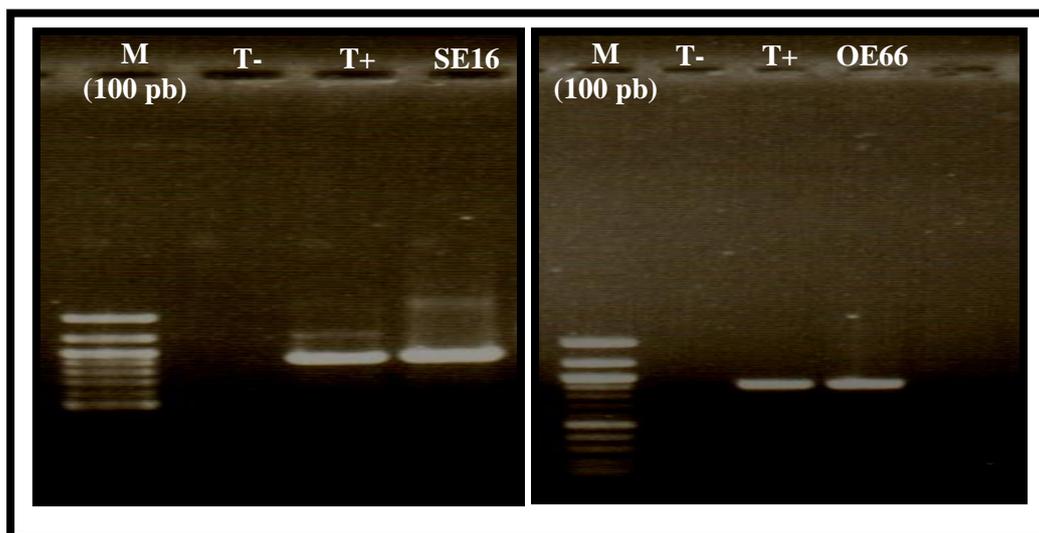


Figure 22. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène *bla_{SHV}*

Le séquençage a permis d'identifier plusieurs gènes codant des β -lactamases à spectre étendu (Tableau 20, Tableau 21). Le gène *bla_{CTX-M-15}* a été détecté chez 52 (77.6%) souches isolées au niveau des trois CHU inclus dans cette étude, le gène *bla_{CTX-M-3}* chez 5 (7.5%) souches isolées à Tlemcen et Sidi Bel Abbès, le gène *bla_{CTX-M-1}* chez 5 (7.5%) souches provenant des trois hôpitaux, le gène *bla_{CTX-M-14}* chez 2 (3%) souches isolées à l'hôpital de Tlemcen, le gène *bla_{SHV-12}* chez 2 (3%) souches isolées à Oran et Sidi Bel Abbès et le gène *bla_{TEM-167}* chez uniquement 1 (1.5%) souche isolée au CHU d'Oran.

Parmi les BLSE décrites dans cette étude, CTX-M-15 représente l'enzyme prédominante au niveau des trois CHUs avec 82.8%, 73.7% et 69.2% de souches productrices, aux CHUs de Tlemcen, Oran et Sidi Bel Abbès respectivement (Tableau 20).

Le gène *bla_{TEM-1}*, codant une pénicillinase, a été également identifié chez 46 isolats parmi les souches produisant les BLSE citées précédemment (Tableau 21).

La recherche des gènes codant les céphalosporinases plasmidiques CMY-2 et DHA-1, a été réalisée pour les souches présentant les phénotypes CASE et BLSE+CASE. Le gène *bla_{CMY-16}* (Figure 23) a été identifié chez uniquement une souche isolée au CHU d'Oran (Tableau 21). Cependant, la PCR effectuée pour le gène DHA-1 s'est avérée négative pour l'ensemble des souches testées. Le phénotype CASE pourrait donc être expliqué par la présence d'autres gènes de céphalosporinases plasmidiques non testés dans cette étude ou par des mutations dans le gène *ampC* codant la céphalosporinase chromosomique.

Tableau 20. Répartition des gènes codant les BLSE selon les hôpitaux

Type de BLSE	Nombre de souches (%)			
	Tlemcen (n=35)	Oran (n=19)	Sidi Bel Abbes (n= 13)	Total (n=67)
CTX-M-15	29 (82.8%)	14 (73.7%)	9 (69.2%)	52 (77.6%)
CTX-M-3	3 (8.6%)	0 (0%)	2 (15.4%)	5 (7.5%)
CTX-M-1	1 (2.9%)	3 (15.8%)	1 (7.7%)	5 (7.5%)
CTX-M-14	2 (5.7%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (3%)
SHV-12	0 (0%)	1 (5.2%)	1 (7.7%)	2 (3%)
TEM-167	0 (0%)	1 (5.2%)	0 (0%)	1 (1.5%)

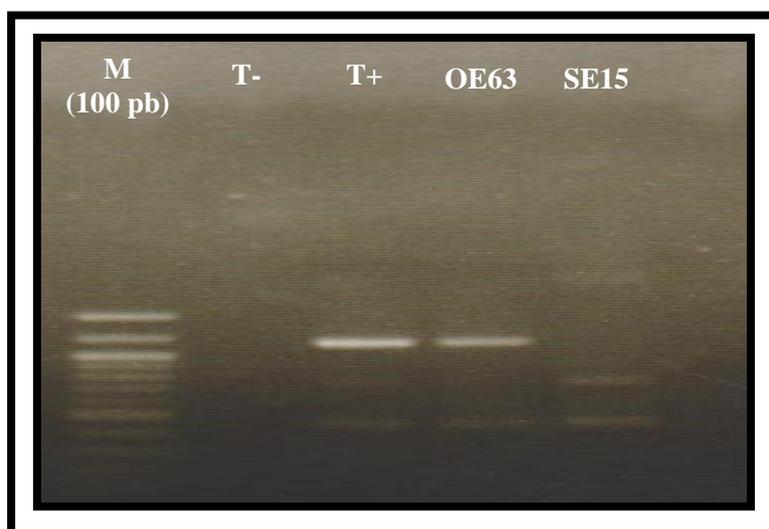


Figure 23. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène *bla*_{CMY-2}

1.4.2 Gènes de résistance aux aminosides

Parmi les souches sélectionnées pour l'analyse moléculaire, 12 ont montré des résistances de haut niveau à l'ensemble des aminosides testés (CMI >512µg/ml, diamètre = 6mm). Les gènes *armA* (Figure 24) et *rmtB* (Figure 25), codant des méthylases de l'ARNr 16S, ont été identifiés chez 4 et 8 souches respectivement. *armA* a été détecté au niveau des trois CHUs parmi les isolats produisant les BLSE de type CTX-M-15, CTX-M-1 et TEM-167, tandis que *rmtB* a été identifié uniquement chez des souches produisant CTX-M-15 et isolées à l'hôpital de Tlemcen. Précisant également que sept souches parmi les 8 produisant l'enzyme RmtB ont été collectées au niveau du service de réanimation (Tableau 21).

1.4.3 Gènes de résistance aux quinolones

Concernant la résistance aux quinolones, le gène *aac(6')-Ib-cr* (Figure 26), conférant aussi une résistance aux aminosides, a été identifié au niveau des trois hôpitaux, chez dix souches ayant également d'autres gènes de résistances aux β-lactamines et/ou aux aminosides (Tableau 21). Les gènes de résistance aux quinolones, *qnrA*, *qnrB* et *qnrS*, n'ont pas été détectés.

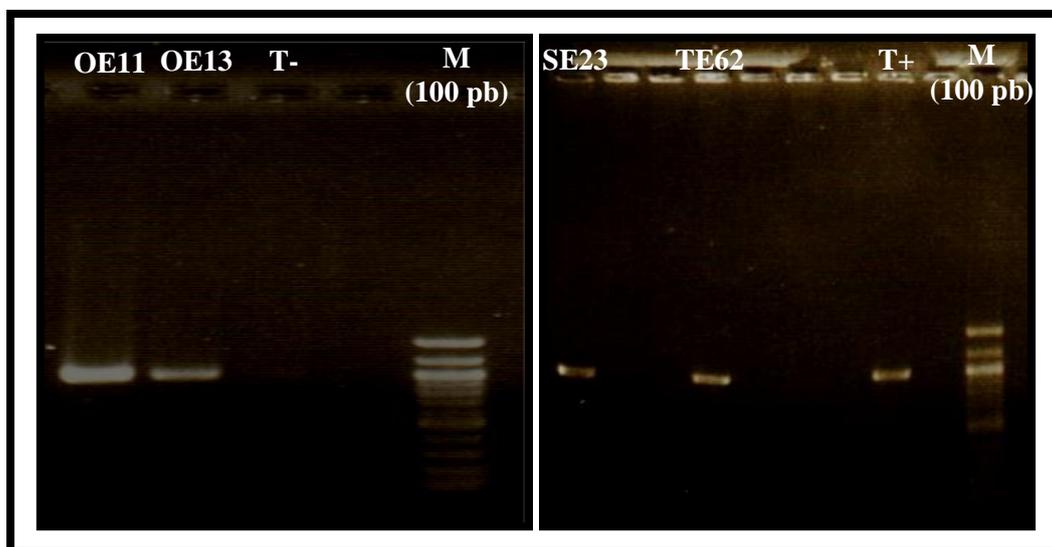


Figure 24. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène *armA*

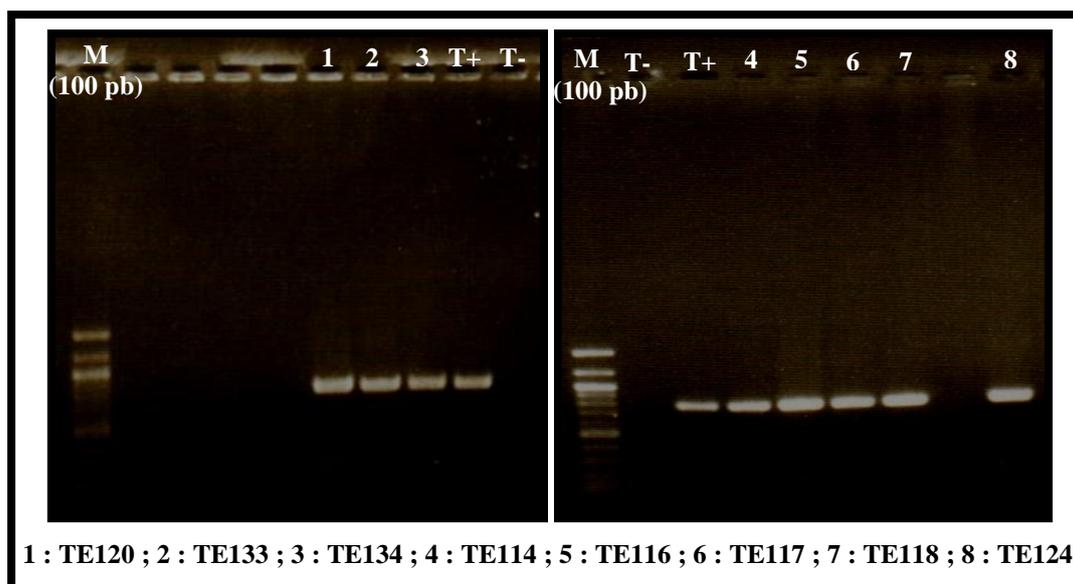


Figure 25. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène *rmtB*

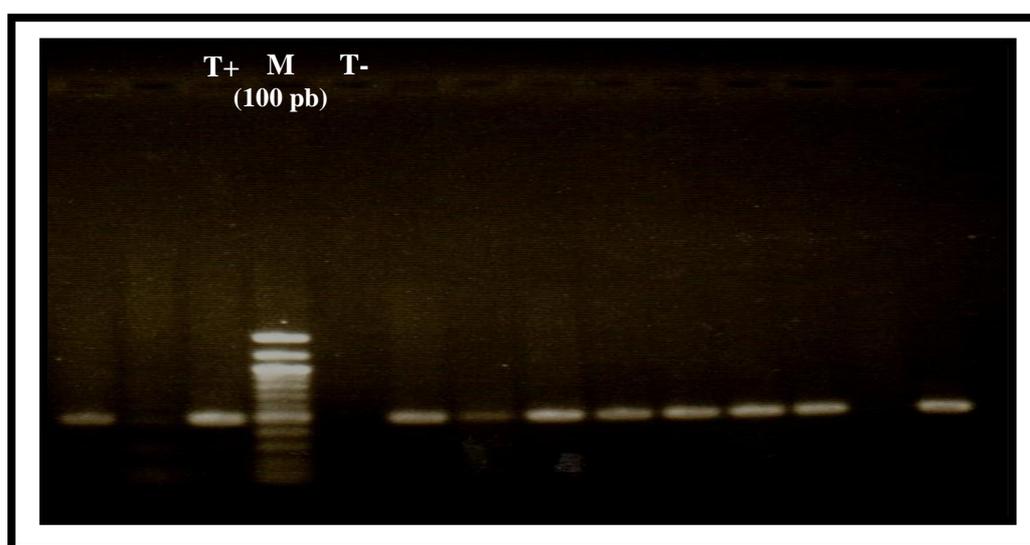


Figure 26. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène *aac(6')-Ib-cr*

1.4.4 Gènes de résistance à la colistine

La PCR pour la recherche du gène *mcr-1*, gène plasmidique conférant une résistance à la colistine, a été effectuée sur 6 souches, isolées au CHU de Sidi Bel Abbes, présentant des valeurs de CMI de la colistine supérieures à 2µg/ml. Cette PCR s'est avérée positive pour uniquement une souche, SE65 (Figure 27, Tableau 21), isolée au niveau du service de réanimation. Le séquençage a permis de confirmer la présence du gène *mcr-1*.

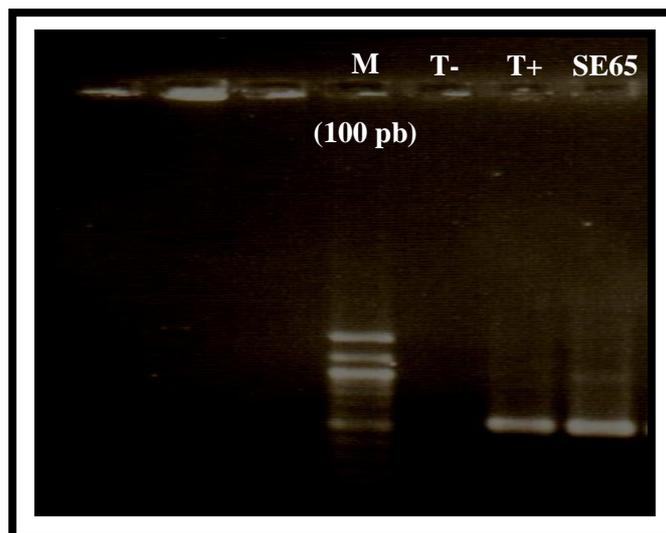


Figure 27. Profil électrophorétique des produits de PCR du gène *mcr-1*

1.4.5 Recherche des intégrons de classe 1

Sur l'ensemble des souches testées, la PCR a révélé la présence des intégrons de classe 1 de différentes tailles (Figure 28) chez 35 isolats (50.7%). Le séquençage des gènes de cassettes a permis d'identifier les combinaisons de gènes suivantes : *dfrA17-aadA5* (11 souches), *aadB-aadA1-cmlA6* (9), *dfrA12-aadA2* (6) et *dfrA1-aadA1* (2). Pour le reste des souches, les gènes *aadA1* (4), *dfrA7* (1), *aac(6')-Ib* (1) et *aac(6')-Ib-cr* (1) ont été détectés tous seuls (Tableau 21). Les gènes *aad* et *aac(6')-Ib*, *dfrA* et *cmlA6* confèrent respectivement une résistance aux aminosides, au triméthoprime et au chloramphénicol.

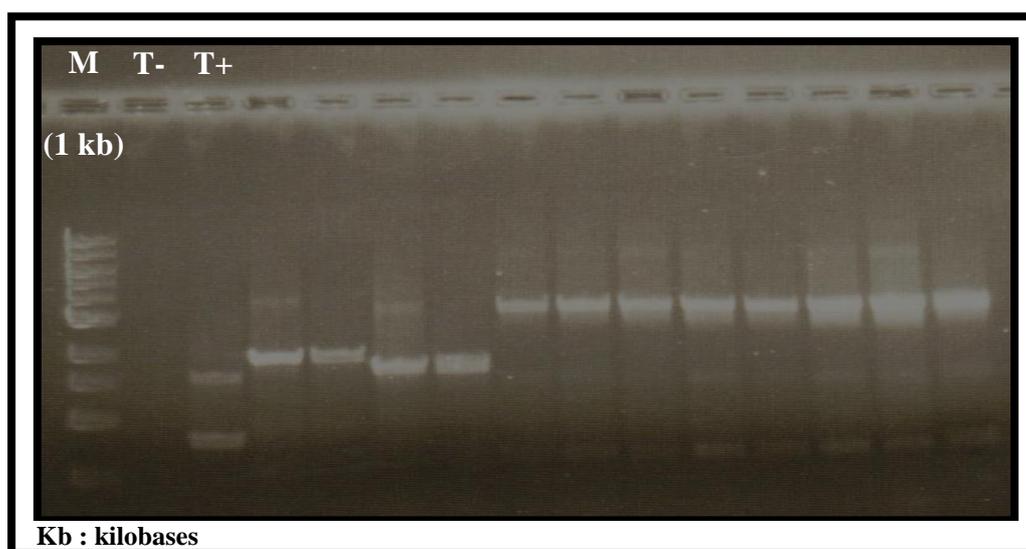


Figure 28. Profil électrophorétique des produits de PCR des Intégrons de classe 1

1.5 Typage moléculaire des souches d'*E. coli*

Le typage moléculaire a été réalisé pour les 69 souches qui ont fait l'objet de la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques.

1.5.1 Electrophorèse en champ pulsé (ECP)

Le typage des souches par ECP a révélé une grande variabilité clonale. En effet, 44 pulsotypes différents ont été détectés parmi les 65 souches analysées (quatre souches ont subi une autodigestion) (Tableau 21, Figure 29).

Le pulsotype 1 représente le pulsotype majoritaire. Il regroupe dix souches isolées à l'hôpital de Tlemcen, dont 8 porteuses des gènes *bla*_{CTX-M-15} et *rmtB* et 7 d'entre elles collectées au niveau du service de réanimation. Les pulsotypes 2 et 11 contiennent chacun trois souches isolées aux CHUs de Tlemcen et d'Oran respectivement. Les pulsotypes 3 à 10 regroupent chacun deux souches. Il est à noter que le pulsotype 10 comporte 2 souches, isolées au CHU d'Oran, porteuses du gène *armA*. Le reste des souches ont présenté des pulsotypes différents.

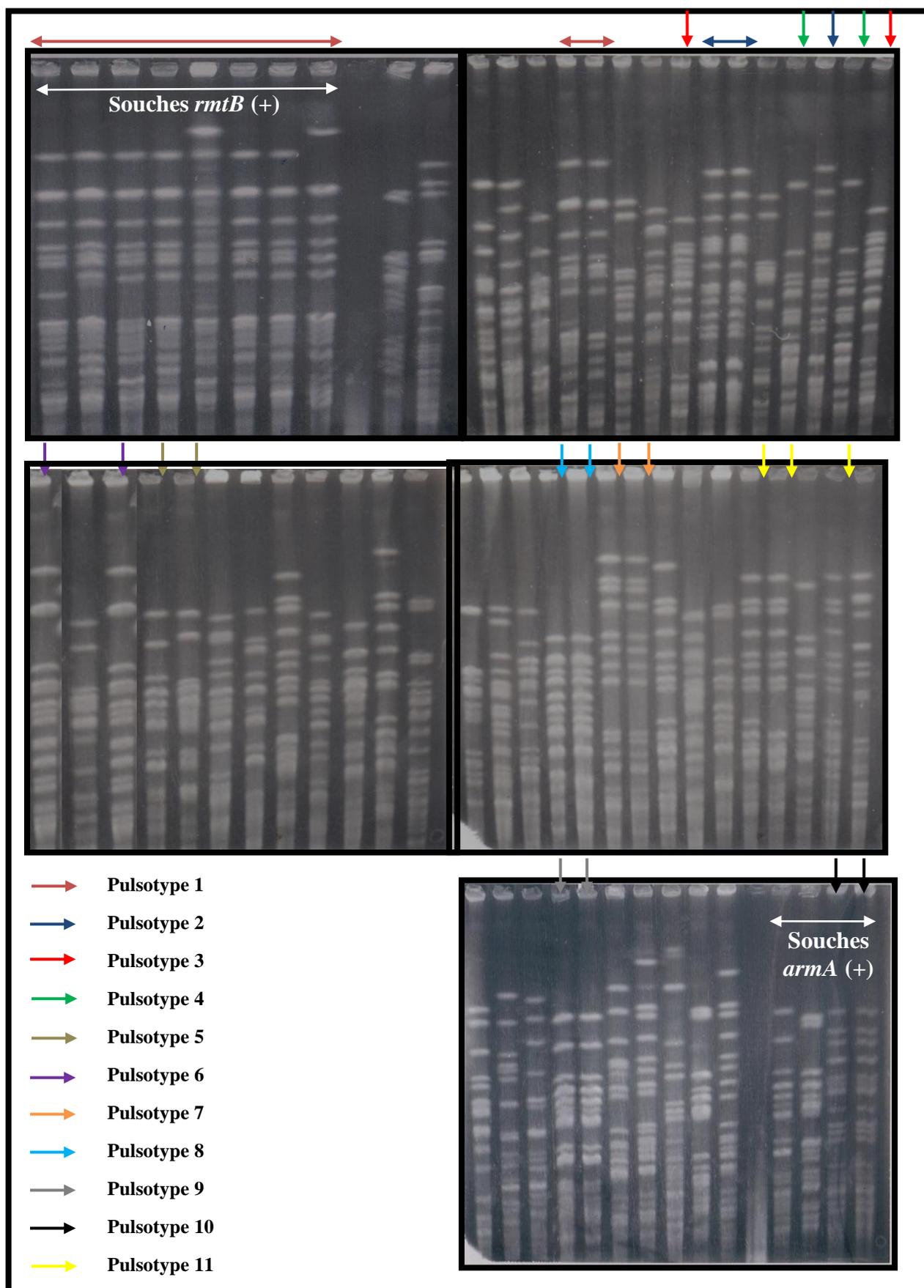


Figure 29. Résultat d'électrophorèse en champ pulsé

1.5.2 Typage par séquençage multilocus (MLST)

La recherche des liens de clonalité entre les souches a été également effectuée par MLST, 7 gènes de ménage de l'espèce *E. coli* (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* et *recA*) ont été amplifiés et séquencés. Les séquences obtenues ont été soumises à la base de données <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>, afin d'accorder pour chaque gène un profil allélique. La combinaison des 7 allèles obtenus a permis de définir une séquence type pour chaque souche. Ces séquences ont été ensuite alignées et regroupées en arbre phylogénétique en utilisant les logiciels Bio Edit et MEGA6 (Figure 30).

Un total de 23 Séquences Types (ST) a été identifié parmi les 69 souches analysées. Les résultats de MLST (Tableau 21, Figure 30) ont montré que quelques séquences types et complexes clonaux (CC) ont été détectés dans au moins deux hôpitaux parmi les trois CHU étudiés. Il s'agit du ST405 (24 souches), ST10 CC ST10 (8), ST167 CC ST10 (4), ST277 CC ST10 (1), ST410 CC ST23 (3), ST88 CC ST23 (1), ST23 CC ST23 (1) et ST69 (2). Par contre, les autres ST n'ont été détectés que dans un seul CHU parmi les trois hôpitaux inclus dans cette étude. Il s'agit du ST117 (4 souches), ST58 (2) et ST354 (1) au CHU d'Oran ; du ST372 (1), ST540 (1) et ST1433 (1) au CHU de Sidi Bel Abbas ; et du ST 131 CC ST131 (4), ST 1410 CC ST131 (1), ST 2020 (3), ST38 (2), ST73 (1), ST359 (1), ST1011 (1) et ST3210 (1) au CHU de Tlemcen.

ST405 représente le clone dominant regroupant 24 souches, dont 11 de Tlemcen, 9 d'Oran et 4 de Sidi Bel Abbas. Il comprend la majorité des souches multirésistantes isolées dans cette étude, y compris les 8 ayant le gène *rmtB* et la souche porteuse du gène *mcr-1*. Cependant, les souches ayant le gène *armA* appartiennent aux différents ST, ST117 (les deux souches d'Oran), ST10 CC ST10 (la souche de Sidi Bel Abbas) et ST167 CC ST10 (la souche de Tlemcen).

Dans cette étude, un nouvel ST à été identifié comprenant une souche, TE119, isolée au CHU de Tlemcen au niveau du service de réanimation (Tableau 21).

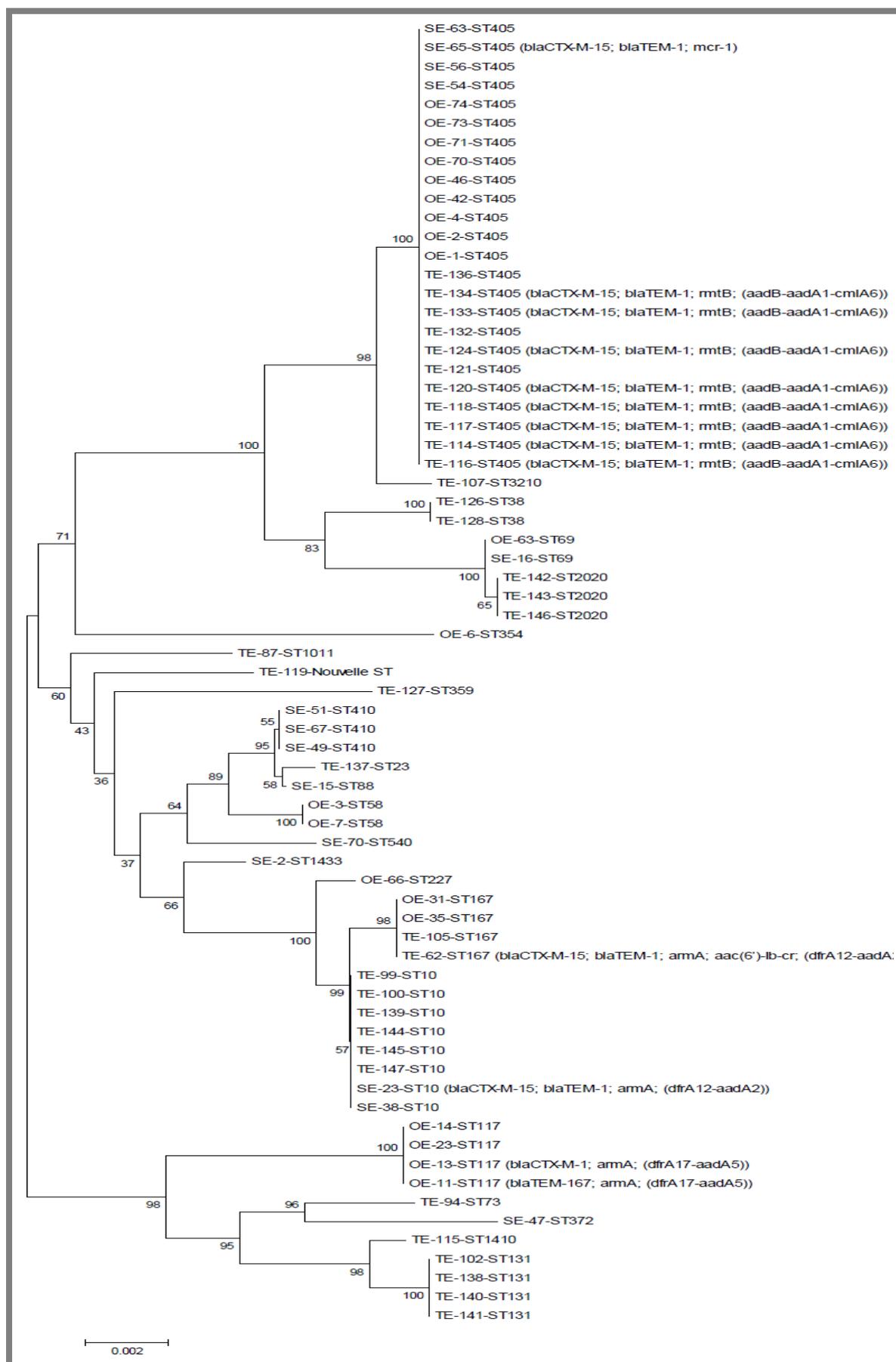


Figure 30. Arbre phylogénétique basé sur les séquences des gènes de ménage de 69 souches d'*E. coli*

Tableau 21. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches multirésistantes d'*E. coli* isolées aux CHUs du Nord-Ouest algérien

Souche	CHU	Service	Date du prélèvement	Origine	Phénotype de résistance aux β -lactamines	Gènes de résistance aux antibiotiques (Gènes de cassettes)	Pulsotype	MLST
OE1	Oran	Réanimation UMC	19/01/2010	chariot	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	11	ST405 (CC ST405)
OE2	Oran	Réanimation UMC	23/03/2010	Aspiration trachéale	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	11	ST405 (CC ST405)
OE3	Oran	Réanimation médicale	29/04/2010	Aspiration trachéale	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> ; (<i>aadA1</i>)	12	ST58 (CC ST155)
OE4	Oran	Réanimation médicale	29/04/2010	Aspiration trachéale	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; (<i>aac(6')-Ib</i>)	11	ST405 (CC ST405)
OE6	Oran	Réanimation infantile	04/11/2010	Prélèvement rectal	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	13	ST354 (CC ST354)
OE7	Oran	Réanimation infantile	25/11/2010	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	14	ST58 (CC ST155)
OE11	Oran	Réanimation UMC	16/12/2010	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{TEM-167} ; <i>armA</i> ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	10	ST117
OE13	Oran	Neurochirurgie	16/12/2010	Sonde gastrique	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-1} ; <i>armA</i> ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	10	ST117
OE14	Oran	Neurochirurgie	06/01/2011	Aspiration trachéale	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	15	ST117
OE23	Oran	Neurochirurgie	25/11/2010	Sonde urinaire	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	16	ST117
OE31	Oran	Chirurgie	20/01/2011	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	9	ST167 (CC ST10)
OE35	Oran	Neurochirurgie	10/02/2011	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	9	ST167 (CC ST10)
OE42	Oran	Neurochirurgie	10/02/2011	Aspiration trachéale	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	17	ST405 (CC ST405)
OE46	Oran	Réanimation UMC	10/02/2011	Aspiration trachéale	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	18	ST405 (CC ST405)
OE63	Oran	Réanimation médicale	14/04/2011	Aspiration trachéale	CASE	<i>bla</i> _{CMY-16} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>aac(6')-Ib-cr</i>)	19	ST69 (CC ST69)

OE66	Oran	Chirurgie infantile	02/05/2011	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{SHV-12} ; (<i>dfrA12-aadA2</i>)	20	ST227 (CC ST10)
OE70	Oran	Réanimation UMC	09/06/2011	Sonde urinaire	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	21	ST405 (CC ST405)
OE71	Oran	Réanimation médicale	01/12/2011	Aspiration trachéale	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	/	ST405 (CC ST405)
OE73	Oran	Réanimation médicale	28/11/2011	Aspiration trachéale	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	/	ST405 (CC ST405)
OE74	Oran	Neurochirurgie	28/11/2011	Sonde gastrique	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	/	ST405 (CC ST405)
SE2	Sidi Bel Abbes	Réanimation	29/10/2009	Sonde urinaire	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	22	ST1433
SE15	Sidi Bel Abbes	Médecine Interne	11/03/2010	Plaie	CASE	/	/	ST88 (CC ST23)
SE16	Sidi Bel Abbes	Médecine Interne	11/03/2010	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{SHV-12} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>dfrA7</i>)	23	ST69 (CC ST69)
SE23	Sidi Bel Abbes	Neurochirurgie	18/03/2010	Pus	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>armA</i> ; (<i>dfrA12-aadA2</i>)	24	ST10 (CC ST10)
SE38	Sidi Bel Abbes	Chirurgie	22/04/2010	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	25	ST10 (CC ST10)
SE47	Sidi Bel Abbes	Chirurgie	29/04/2010	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-1} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	26	ST372
SE49	Sidi Bel Abbes	Réanimation	22/04/2010	Sonde urinaire	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-3} ; <i>bla</i> _{TEM-15} ; (<i>dfrA12-aadA2</i>)	8	ST410 (CC ST23)
SE51	Sidi Bel Abbes	UMC	06/05/2010	Bord de lit	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-3} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>dfrA12-aadA2</i>)	8	ST410 (CC ST23)
SE54	Sidi Bel Abbes	UMC	24/02/2011	Sonde urinaire	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	7	ST405 (CC ST405)
SE56	Sidi Bel Abbes	UMC	24/02/2011	Sonde urinaire	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	7	ST405 (CC ST405)
SE63	Sidi Bel Abbes	Chirurgie	26/05/2011	Plaie	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	27	ST405 (CC ST405)
SE65	Sidi Bel Abbes	Réanimation	26/05/2011	Sonde urinaire	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>mcr-1</i>	28	ST405 (CC ST405)

SE67	Sidi Bel Abbas	Réanimation	14/11/2011	Aspiration trachéale	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>aac(6')-Ib-cr</i>	29	ST410 (CC ST23)
SE70	Sidi Bel Abbas	Réanimation	06/01/2012	Aspiration trachéale	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> ; (<i>dfrA1-aadA1</i>)	30	ST540
TE62	Tlemcen	Neurochirurgie	19/10/2008	Escarre	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>armA</i> ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> ; (<i>dfrA12-aadA2</i>)	31	ST167 (CC ST10)
TE87	Tlemcen	Réanimation	30/03/2009	Prélèvement rectal	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>dfrA12-aadA2</i>)	32	ST1011
TE94	Tlemcen	Réanimation	11/04/2009	Sonde urinaire	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>dfrA1-aadA1</i>)	33	ST73 (CC ST73)
TE99	Tlemcen	Neurochirurgie	25/04/2009	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>aac(6')-Ib-cr</i>	5	ST10 (CC ST10)
TE100	Tlemcen	Réanimation	25/04/2009	Aspiration trachéale	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-3} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	5	ST10 (CC ST10)
TE102	Tlemcen	Réanimation	08/07/2009	Prélèvement rectal	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	34	ST131 (CC ST131)
TE105	Tlemcen	Chirurgie A	07/07/2009	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>aac(6')-Ib-cr</i>	35	ST167 (CC ST10)
TE107	Tlemcen	Réanimation	10/01/2010	Aspiration trachéale	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	36	ST3210
TE114	Tlemcen	Réanimation	01/04/2010	Aspiration trachéale	BLSE+ CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>rmtB</i> ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	1	ST405 (CC ST405)
TE115	Tlemcen	Réanimation	02/05/2010	Sonde urinaire	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	37	ST1410 (CC ST131)
TE116	Tlemcen	Réanimation	02/05/2010	Prélèvement rectal	BLSE+ CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>rmtB</i> ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	1	ST405 (CC ST405)
TE117	Tlemcen	Réanimation	20/05/2010	Aspiration trachéale	BLSE+ CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>rmtB</i> ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	1	ST405 (CC ST405)
TE118	Tlemcen	Réanimation	01/06/2010	Aspiration trachéale	BLSE+ CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>rmtB</i> ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	1	ST405 (CC ST405)

TE119	Tlemcen	Réanimation	06/01/2011	Prélèvement rectal	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-3} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	38	Nouvelle ST
TE120	Tlemcen	Réanimation	06/01/2011	Aspiration trachéale	BLSE+ CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; rmtB ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	1	ST405 (CC ST405)
TE121	Tlemcen	Réanimation	17/02/2011	Sonde urinaire	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	39	ST405 (CC ST405)
TE124	Tlemcen	Réanimation	27/02/2011	Prélèvement rectal	BLSE+ CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; rmtB ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	1	ST405 (CC ST405)
TE126	Tlemcen	Réanimation	10/03/2011	Sonde urinaire	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-14} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	6	ST38 (CC ST38)
TE127	Tlemcen	Réanimation	20/03/2011	Aspiration trachéale	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	40	ST359
TE128	Tlemcen	Réanimation	20/03/2011	Sonde urinaire	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-14} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	6	ST38 (CC ST38)
TE132	Tlemcen	Neurochirurgie	21/04/2011	Plaie	BLSE+ CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	1	ST405 (CC ST405)
TE133	Tlemcen	ORL	26/04/2011	Cathéter	BLSE+ CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; rmtB ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	1	ST405 (CC ST405)
TE134	Tlemcen	Réanimation	21/04/2011	Urine	BLSE+ CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; rmtB ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	1	ST405 (CC ST405)
TE136	Tlemcen	Neurochirurgie	05/05/2011	Plaie	BLSE+ CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	1	ST405 (CC ST405)
TE137	Tlemcen	Chirurgie A	19/05/2011	Sonde urinaire	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-3} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	41	ST23 (CC ST23)
TE138	Tlemcen	Réanimation	19/05/2011	Aspiration trachéale	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; aac(6')-Ib-cr	42	ST131 (CC ST131)
TE139	Tlemcen	Chirurgie	05/11/2011	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>aadA1</i>)	43	ST10 (CC ST10)
TE140	Tlemcen	Réanimation	07/01/2012	Aspiration trachéale	BLSE+CASE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	3	ST131 (CC ST131)
TE141	Tlemcen	Neurochirurgie	07/01/2012	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	3	ST131 (CC ST131)

TE142	Tlemcen	Neurochirurgie	15/02/2012	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	2	ST2020
TE143	Tlemcen	Neurochirurgie	15/02/2012	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	2	ST2020
TE144	Tlemcen	Médecine interne	15/02/2012	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	44	ST10 (CC ST10)
TE145	Tlemcen	Médecine interne	10/03/2012	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>aadA1</i>)	4	ST10 (CC ST10)
TE146	Tlemcen	Médecine interne	20/05/2012	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	2	ST2020
TE147	Tlemcen	Médecine interne	10/06/2012	Plaie	BLSE	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>aadA1</i>)	4	ST10 (CC ST10)

CC : Complexe Clonal

1.6 Transfert des gènes de résistance aux antibiotiques

1.6.1 Conjugaison bactérienne

Afin de déterminer le support des gènes de résistance aux antibiotiques, des expériences de conjugaison ont été réalisées, entre la souche de référence *E. coli* K-12 C600 résistante à la rifampicine et 38 souches d'*E. coli* ayant différents gènes de résistance aux β -lactamines, aux aminosides, aux quinolones et à la colistine (Tableau 22).

Sur l'ensemble des souches étudiées, 15 soit 39.5% ont transféré leurs gènes de résistance aux antibiotiques (Tableau 22). L'analyse des profils d'antibiorésistance des transconjugants obtenus, par la méthode de diffusion en milieu solide, a permis de mettre en évidence le transfert de phénotype BLSE associé à la résistance aux aminosides et/ou au triméthoprim/sulfaméthoxazole (Figure 31). Par contre, le transfert de la résistance aux quinolones n'a pas été observé.

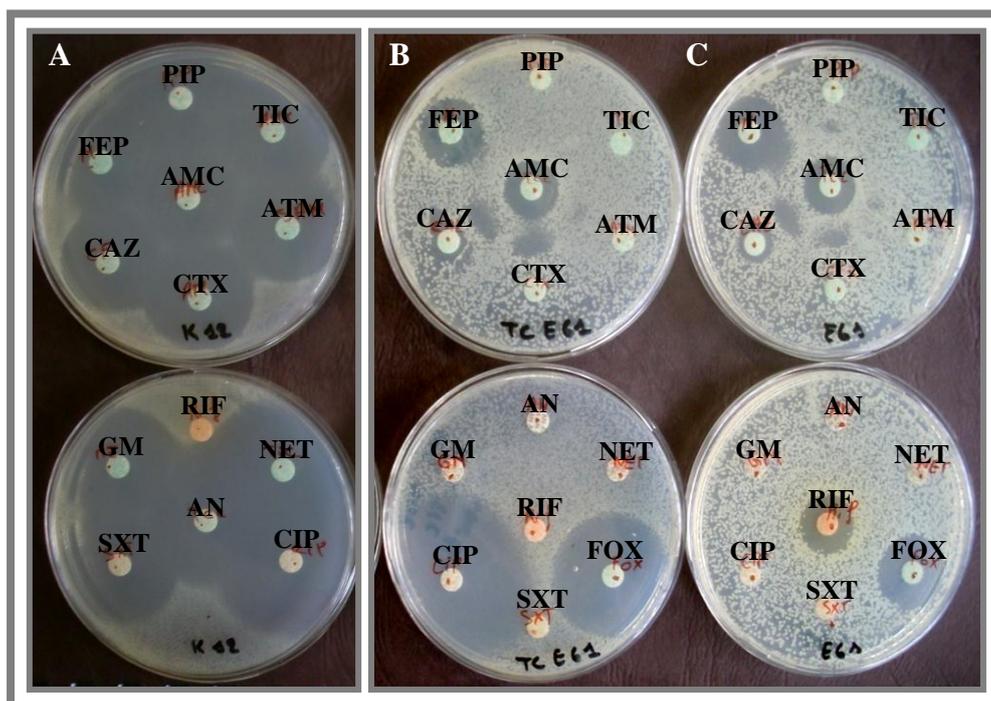


Figure 31. Antibiogramme de la souche réceptrice K12 C600 (A), la souche donatrice (C) et son transconjugant (B)

Pour les souches productrices des céphalosporinases, le transfert de ces enzymes n'a été obtenu qu'avec la souche OE63 productrice de CMY-16, confirmant ainsi la nature plasmidique de cette céphalosporinase.

Les transconjugants ont également fait l'objet de différentes réactions de PCR, qui ont confirmé le transfert des gènes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{TEM-167}, *bla*_{CMY-16}, *armA*, *rmtB* et *mcr-1* (Tableau 22).

Pour les souches TE117 et TE120, deux transconjugants ont été obtenus, le premier ayant le gène *bla*_{CTX-M-15} et le deuxième ayant les gènes *bla*_{CTX-M-15} et *rmtB*. De même, pour la souche OE11 deux transconjugants ont été obtenus, un était positif pour le gène *bla*_{TEM-167} et l'autre était positif pour les gènes *bla*_{TEM-167} et *armA*. De plus, sur l'ensemble des transconjugants obtenus, un seul (TC SE65) n'a pas montré le phénotype BLSE et était positif uniquement pour le gène *mcr-1*, tandis que la souche donatrice SE65 hébergeait les gènes *bla*_{CTX-M-15} et *mcr-1*. Ces résultats suggèrent que pour ces souches les gènes codant les BLSE et les gènes *rmtB*, *armA* et *mcr-1* sont portés par deux plasmides différents.

1.6.2 Analyse des plasmides

Afin de mieux caractériser le support des gènes de résistance, le typage des plasmides a été effectué pour identifier les groupes d'incompatibilité des plasmides chez les souches et leurs transconjugants.

Les résultats, récapitulés dans le tableau 22, montrent la présence des plasmides de différents groupes d'incompatibilité chez les souches testées (Figure 32) avec prédominance des plasmides IncF.

Pour les souches positives pour un seul groupe d'incompatibilité de plasmides et/ou pour lesquelles des transconjugants positifs pour un seul groupe d'incompatibilité de plasmides ont été obtenus (Tableau 22), les suppositions suivantes ont été suggérées : le gène *bla*_{CTX-M-14} chez les souches TE126 et TE128 et le gène *bla*_{CTX-M-15} chez la souche TE132 sont portés par un plasmide IncF, le gène *bla*_{SHV-12} chez la souche SE16 est porté par un plasmide IncN et le gène *bla*_{CMY-16} de la souche OE63 est porté par un plasmide IncA/C.

Pour les souches produisant les méthylases de l'ARNr 16S, ArmA et RmtB, deux techniques plus performantes ont été réalisées par l'équipe de l'INRA de Dijon en France. Il s'agit de la S1-PFGE (électrophorèse en champ pulsé en utilisant l'enzyme de digestion S1-nucléase) pour mettre en évidence la présence des plasmides et déterminer leurs tailles, et de southern blot où les plasmides sont transférés sur une membrane en nylon chargée positivement puis hybridés avec huit sondes marquées à la digoxigénine (*bla*_{CTX-M} du groupe 1, *bla*_{TEM}, *armA*,

rmtB et les groupes d'incompatibilité IncL/M, IncFIA, IncFIB et IncN) pour déterminer la localisation des gènes de résistance (Barton *et al.*, 1995).

L'analyse des résultats de typage des plasmides (Tableau 22) ainsi que les résultats du S1-PFGE suivie de Southern blot (Tableau 23), a montré que chez les 8 souches productrices du RmtB, le gène codant cette enzyme est localisé sur un plasmide du groupe d'incompatibilité IncFIA (100 ou 85 kb), tandis que le gène *bla*_{CTX-M-15} est localisé sur le même plasmide chez 4 isolats et sur un plasmide du groupe d'incompatibilité IncI1 (100kb) chez les autres isolats. Le plasmide IncFIA a été transféré uniquement en présence du plasmide IncI1. Concernant le gène *armA*, il est localisé avec le gène *bla*_{CTX-M-15} sur un plasmide autotransférable du groupe d'incompatibilité IncL/M (55kb) chez les deux souches isolées au CHUs de Tlemcen et de Sidi Bel Abbes, et sur un plasmide du groupe d'incompatibilité IncFIA chez les deux autres souches isolées au CHU d'Oran (pour ces deux isolats les gènes codant les BLSE, CTX-M-1 et TEM-167, sont localisés sur un plasmide IncN de 40kb).

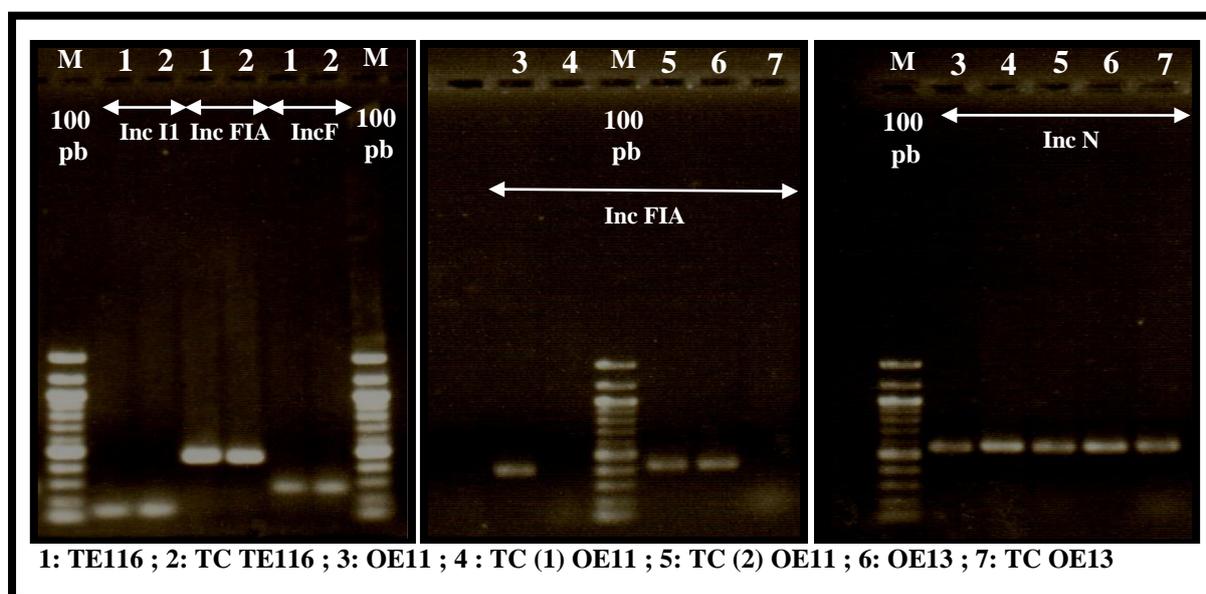


Figure 32. Résultats des PCR multiplex des groupes d'incompatibilité des plasmides

Tableau 22. Résultats de conjugaison bactérienne et de typage des plasmides

Souche	Phénotype de résistance aux β-lactamines	Résistances associées	Gènes de résistance aux antibiotiques	Plasmides (Inc)	Transfert	Phénotype de résistance aux β-lactamines de TC	Résistances cotransférées	Gènes de résistance aux antibiotiques de TC (*)	Plasmides (Inc)
TE62	BLSE	GM, TM, NET, AN, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>armA</i> ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> ; (<i>dfrA12-aadA2</i>)	L/M, FIA, FIB, F	+	BLSE	GM, TM, NET, AN, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>armA</i>	L/M
TE114	BLSE+ CASE	GM, TM, NET, AN, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>rmtB</i> ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	FIA, F	-	/	/	/	/
TE116	BLSE+ CASE	GM, TM, NET, AN, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>rmtB</i> ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	I1, FIA, F	+	BLSE	GM, TM, NET, AN	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>rmtB</i>	I1, FIA, F
TE117	BLSE+CASE	GM, TM, NET, AN, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>rmtB</i> ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	I1, FIA, F	+	BLSE	TC1 : GM, TC2: GM, TM, NET, AN	TC1: <i>bla</i> _{CTX-M-15} TC2: <i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>rmtB</i>	TC1 : I1 TC2 : I1, FIA, F
TE118	BLSE+ CASE	GM, TM, NET, AN, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>rmtB</i> ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	I1, FIA, F	+	BLSE	GM, TM, NET, AN	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>rmtB</i>	I1, FIA, F
TE119	BLSE	GM, TM	<i>bla</i> _{CTX-M-3} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	L/M, K	+	BLSE	GM	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	L/M, K
TE120	BLSE+ CASE	GM, TM, NET, AN, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>rmtB</i> ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	I1, FIA, F	+	BLSE	TC1 : GM, TM TC2: GM, TM, NET, AN	TC1: <i>bla</i> _{CTX-M-15} TC2: <i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>rmtB</i>	TC1 : I1 TC2 : I1, FIA, F
TE121	BLSE+ CASE	NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	ND	-	/	/	/	/
TE124	BLSE+CASE	GM, TM, NET, AN, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>rmtB</i> ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	FIA, F	-	/	/	/	/
TE126	BLSE+ CASE	SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-14} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	F	-	/	/	/	/
TE127	BLSE	NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ND	-	/	/	/	/
TE128	BLSE+ CASE	SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-14} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	F	-	/	/	/	/

TE132	BLSE+ CASE	GM, NA, OFX, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	F	+	BLSE	GN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	F
TE133	BLSE+ CASE	GM, TM, NET, AN, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>rmtB</i> ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	FIA, F	-	/	/	/	/
TE134	BLSE+ CASE	GM, TM, NET, AN, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>rmtB</i> ; (<i>aadB-aadA1-cmlA6</i>)	FIA, F	-	/	/	/	/
TE137	BLSE	NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-3} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	ND	-	/	/	/	/
TE138	BLSE	GM, TM, NET, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>aac(6')-Ib-cr</i>	ND	-	/	/	/	/
TE140	BLSE+ CASE	GM, TM, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	ND	-	/	/	/	/
TE145	BLSE	GM, TM, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>aadA1</i>)	ND	-	/	/	/	/
TE147	BLSE	TM, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>aadA1</i>)	ND	-	/	/	/	/
SE15	CASE	NA, OFX, SXT	/	ND	-	/	/	/	/
SE16	BLSE	GM, TM, NET, SXT	<i>bla</i> _{SHV-12} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>dfrA7</i>)	N, P	+	BLSE	GM, TM	<i>bla</i> _{SHV-12}	N
SE23	BLSE	GM, TM, NET, AN, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>armA</i> ; (<i>dfrA12-aadA2</i>)	L/M, FIA, FIB, F, K	+	BLSE	GM, TM, NET, AN, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>armA</i>	L/M, K
SE47	BLSE	SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-1} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	ND	-	/	/	/	/
SE49	BLSE	GM, TM, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-3} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>dfrA12-aadA2</i>)	L/M, FIB, F	+	BLSE	GM, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	L/M, FIB, F
SE54	BLSE+CASE	GM, TM, NET, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	FIB, F, B/O	+	BLSE	GM, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	FIB, F, B/O
SE63	BLSE+CASE	GM, TM, NET, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	ND	-	/	/	/	/

SE65	BLSE+CASE	NA, OFX, CIP, SXT, CS	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>mcr-1</i>	ND	+	PASE	SXT, CS	<i>mcr-1</i>	ND
SE70	BLSE	GM, TM, NET, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> ; (<i>dfrA1-aadA1</i>)	ND	-	/	/	/	/
OE3	BLSE	GM, TM, NET, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> ; (<i>aadA1</i>)	ND	-	/	/	/	/
OE4	BLSE+CASE	GM, TM, NET, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; (<i>aac(6')-Ib</i>)	ND	-	/	/	/	/
OE6	BLSE	GM, TM, NET, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	ND	-	/	/	/	/
OE11	BLSE	GM, TM, NET, AN, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{TEM-167} ; <i>armA</i> ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	N, FIA, FIB, F	+	BLSE	TC1 : GM, TM, SXT TC2: GM, TM, NET, AN, SXT	TC1: <i>bla</i> _{TEM-167} TC2: <i>bla</i> _{TEM-167} ; <i>armA</i>	TC1: N TC2: N, FIA, FIB, F
OE13	BLSE+CASE	GM, TM, NET, AN, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-1} ; <i>armA</i> ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	N, FIA, FIB, F	+	BLSE	GM, TM, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	N
OE23	BLSE	NA, OFX, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	ND	-	/	/	/	/
OE63	CASE	GM, TM, NET, AN, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CMY-16} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; (<i>aac(6')-Ib-cr</i>)	A/C, FIA, F	+	CASE	GM, TM, NET, AN, SXT	<i>bla</i> _{CMY-16} ; <i>aac(6')-Ib</i>	A/C
OE66	BLSE	NA, SXT	<i>bla</i> _{SHV-12} ; (<i>dfrA12-aadA2</i>)	N, K	-	/	/	/	/
OE73	BLSE	GM, TM, NET, NA, OFX, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>aac(6')-Ib-cr</i> ; (<i>dfrA17-aadA5</i>)	ND	-	/	/	/	/

TC : transconjugant ; Inc : groupe d'incompatibilité ; (*) : les PCR de détection de *bla*_{TEM-1}, *aac(6')-Ib-cr* et des gènes de cassettes n'ont pas été réalisées chez Les transconjugants ; GM : Gentamicine ; TM : Tobramycine ; NET : Nétilmicine ; AN : Amikacine; NA : Acide nalidixique ; OFX : Ofloxacine ; CIP : Ciprofloxacine ; SXT : Triméthoprime/Sulfaméthoxazole ; CS : Colistine ; ND : non déterminé.

Tableau 23. Support des gènes de résistance aux antibiotiques chez les souches productrices de méthylases de l'ARNr 16S

Souche	Gène codant la BLSE (plasmide)	Gène codant la méthylases de l'ARNr 16S (plasmide)
TE62	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (IncL/M 55kb (T+))	<i>armA</i> (IncL/M 55kb (T+))
SE23	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (IncL/M 55kb (T+))	<i>armA</i> (IncL/M 55kb (T+))
OE11	<i>bla</i> _{TEM-167} (IncN 40 kb (T+))	<i>armA</i> (IncFIA taille nd (T+))
OE13	<i>bla</i> _{CTX-M-1} (IncN 40 kb (T+))	<i>armA</i> (IncFIA taille nd (T-))
TE114	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (IncFIA environ 100 kb (T-))	<i>rmtB</i> (IncFIA environ 100 kb (T-))
TE116	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (IncII environ 100 kb(T+))	<i>rmtB</i> (IncFIA environ 85 kb(T+))
TE117	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (IncII environ 100 kb(T+))	<i>rmtB</i> (IncFIA environ 85 kb(T+))
TE118	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (IncII environ 100 kb(T+))	<i>rmtB</i> (IncFIA environ 85 kb(T+))
TE120	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (IncII environ 100 kb(T+))	<i>rmtB</i> (IncFIA environ 85 kb(T+))
TE124	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (IncFIA environ 100 kb (T-))	<i>rmtB</i> (IncFIA environ 100 kb (T-))
TE133	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (IncFIA environ 100 kb (T-))	<i>rmtB</i> (IncFIA environ 100 kb (T-))
TE134	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (IncFIA environ 100 kb (T-))	<i>rmtB</i> (IncFIA environ 100 kb (T-))

T+ : plasmide transféré ; T- : plasmide non transféré ; nd : non déterminée.

2. Discussion

Escherichia coli est le germe le plus fréquemment impliqué en pathologie infectieuse aussi bien en milieu hospitalier qu'en pratique de ville. Elle est caractérisée par une aptitude particulière à acquérir des mécanismes de résistance à des antibiotiques habituellement actifs, pouvant parfois survenir en cours d'antibiothérapie (Lavigne *et al.*, 2002). Une connaissance actualisée sur ces mécanismes est donc indispensable à l'optimisation des schémas thérapeutiques. De ce fait, cette étude a été réalisée pour étudier la résistance aux antibiotiques, ainsi que les mécanismes responsables, chez 240 souches d'*E.coli* isolées au niveau des hôpitaux du Nord-Ouest algérien (CHUs de Tlemcen, Sidi Bel Abbes et Oran).

E. coli représente souvent la bactérie la plus identifiée parmi les bacilles à Gram négatif (BGN) isolés de prélèvements cliniques (El Rhazi *et al.*, 2007 ; Amazian *et al.*, 2010 ; Njall *et al.*, 2013 ; Daoud *et al.*, 2015 ; Nouetchognou *et al.*, 2016). Elle occupe ainsi la deuxième place, après *Acinetobacter baumannii*, parmi les 1302 BGN collectés durant cette étude. Notant également que 20% des prélèvements ont montré la présence des souches d'*E. coli*. Cette fréquence d'isolement obtenue au niveau des CHUs étudiés, est inférieure à celles rapportées au Maroc (32%) en 2008 (Tagajdid *et al.*, 2008) et au Népal (28%) en 2014 (Pokhrel *et al.*, 2014) et supérieure à celle rapportée également au Maroc (9.9%) en 2015 (Moutachakkir *et al.*, 2015). La fréquence d'isolement ainsi que le classement d'*E. coli* parmi les BGN diffèrent selon les hôpitaux, ce qui est apparemment lié aux types de prélèvements pratiqués et à l'écologie bactérienne de ces établissements (Scheftel *et al.*, 1994).

Conformément à d'autres études (Liu *et al.*, 2015 ; Malek *et al.*, 2015), les souches d'*E. coli* ont été essentiellement collectées au niveau des services de soins intensifs, ce qui suggère une transmission manuportée et un problème de maîtrise de l'environnement hospitalier dans cette spécialité clinique. De plus, cette espèce est une bactérie nosocomiale par excellence dans les unités de soins intensifs, sa capacité d'adaptation, la multiplication des manœuvres invasives sur les terrains fragilisés (ventilation assistée, sondage urinaire) et la pression de sélection des antibiotiques sont ainsi des éléments favorisants (Elouennass *et al.*, 2008).

A noter aussi que les plaies chirurgicales et les sondes urinaires étaient les principaux sites d'isolement des souches étudiées. En effet, plusieurs études ont rapporté l'isolement fréquent d'*E. coli* dans les urines (Talon *et al.*, 2004 ; Pokhrel *et al.*, 2014 ; Agabou *et al.*, 2014). Elle représente l'agent principal des infections urinaires (Tagajdid *et al.*, 2008). Cela est en relation avec la physiopathologie de ce type d'infection qui est en général ascendante,

favorisée par la forte colonisation du périnée par les entérobactéries d'origine digestive, en particulier *E. coli* (Larabi *et al.*, 2003).

La présente étude souligne le caractère inquiétant de la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* dans les hôpitaux du Nord-Ouest algérien. Des taux de résistance élevés à la plupart des antibiotiques testés ont été obtenus et semblent être plus importants que ceux rapportés par le réseau algérien de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Rahal *et al.*, 2010 ; 2011 ; 2012 ; 2015) et par une étude réalisées en France (Adjidé *et al.*, 2006). Cependant, ces taux sont plus faibles comparés à ceux rapportés par une étude effectuée à l'hôpital militaire de Constantine dans le Nord-Est de l'Algérie (Agabou *et al.*, 2016). De plus, les taux de résistance étaient plus importants à l'hôpital de Tlemcen par rapport aux CHUs d'Oran et de Sidi Bel Abbès. Ces différences peuvent être expliquées par la variabilité des facteurs épidémiologiques, de la stratégie d'utilisation des antibiotiques et des mesures d'hygiène hospitalière entre les différentes institutions (Mkaouar *et al.*, 2008).

Le phénomène marquant chez les souches étudiées, est leur résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G), en particulier au CHU de Tlemcen. De nombreuses études relatent la progression continue à l'échelle mondiale de ce type de résistance (Coque *et al.*, 2008). Notre étude montre que le taux d'isolement des souches résistantes aux C3G (40.4%) est très supérieur à ceux rapportés dans différents pays à travers le monde (Borg, *et al.*, 2008 ; EARS-Network, 2012 ; Trystram *et al.*, 2013). L'évolution de cette résistance est liée à l'émergence et la diffusion de plusieurs mécanismes, dont l'hyperproduction de céphalosporinases chromosomiques, les céphalosporinases plasmidiques mais le plus important étant la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui a concerné, dans cette étude, 96.9% (94/97) des souches résistantes aux C3G.

La prévalence des souches productrices de BLSE dans l'espèce *E. coli* (EBLSE), ne cesse de progresser en milieu hospitalier. Elle a augmenté d'une façon accentuée en Algérie, de 2.4% en 2006 (Touati *et al.*, 2006) à 29.6% en 2013 (Rahal *et al.*, 2015). Ces pourcentages ainsi que d'autres notés en Asie (36.1%), en Amérique du sud (26.8%), en Europe (7.4%), en Afrique (5.1%) et en USA (2.8%) (Vodovar *et al.*, 2013) restent plus faibles que celui obtenu au cours de cette étude (39,2%). Cela est forcément lié à l'utilisation massive des C3G dans les hôpitaux du Nord-Ouest algérien. En effet, la prévalence des phénotypes de résistance constitue le plus souvent un reflet fidèle des habitudes de prescription des antibiotiques (Bertrand *et al.*, 2003).

Nos résultats révèlent aussi que l'isolement des EBLSE prédomine dans les services de réanimation (51,8%), ce qui peut être expliqué par le fait que les patients admis dans ces services sont particulièrement vulnérables aux infections à des bactéries résistantes, à cause de leurs défenses immunitaires amoindries et de leur exposition fréquente aux antibiotiques (Niederman, 2003).

Jusqu'à la fin des années 1990, la plupart des BLSE des entérobactéries étaient de type TEM ou SHV et les principales espèces productrices étaient *K. pneumoniae* (Bure *et al.*, 1988 ; Winokur *et al.*, 2001) et *E. aerogenes* (Bosi *et al.*, 1999 ; Bertrand *et al.*, 2003). Depuis quelques années, cette situation a radicalement changé. A l'heure actuelle, les souches d'*E. coli* productrices de CTX-M représentent, dans de nombreux pays, la majorité des entérobactéries BLSE. En effet, des études épidémiologiques ont rapporté des situations endémiques des entérobactéries productrices de BLSE, dans la plupart des pays d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Sud, avec des prévalences élevées des CTX-M: de 30 à 90% pour *E. coli* et de 10 à 60% pour *K. pneumoniae* (Cantón et Coque, 2006 ; Livermore *et al.*, 2007). Cela a été également observé au cours de la présente étude. 64 des 67 EBLSE étudiées produisaient des enzymes de type CTX-M, 77.6% d'entre elles, étaient de type CTX-M-15 qui représente l'enzyme dominante aussi bien au CHU de Tlemcen qu'aux CHUs d'Oran et de Sidi Bel Abbes. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études précédentes et confirment la prédominance de CTX-M-15 parmi les BLSE détectées chez *E. coli* dans les hôpitaux algériens (Touati *et al.*, 2006 ; Ramdani-Bougoussa *et al.*, 2006 ; Touati *et al.*, 2012 ; Gharout-Sait *et al.*, 2012 ; Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013 ; Agabou *et al.*, 2014 ; Yahiaoui *et al.*, 2015 ; Medboua-Benbalagh *et al.*, 2017). La même situation est observée en Tunisie (Mamlouk *et al.*, 2006 ; Mnif *et al.*, 2013 ; Lahlaoui *et al.*, 2014) et au Maroc (Bourjilat *et al.*, 2011 ; Girlich *et al.*, 2014), illustrant la diffusion d'*E. coli* productrice du CTX-M-15 dans les pays d'Afrique du Nord. CTX-M-15 constitue aujourd'hui le variant le plus fréquent des BLSE, chez *E. coli* impliquée aussi bien dans des infections communautaires que dans des infections nosocomiales et responsable de diverses épidémies à l'échelle mondiale (Woodford *et al.*, 2004 ; Lahlaoui *et al.*, 2014).

Plusieurs types de BLSE ont été également détectés au cours de cette étude, mais avec une faible fréquence. Il s'agit de CTX-M-3 (5 souches), CTX-M-1 (5 souches), CTX-M-14 (2 souches), SHV-12 (2 souches) et TEM-167 (1 souche). La plupart de ces enzymes, ont été déjà rapportées chez *E. coli* en Algérie (Tableau 4). CTX-M-14 a été détectée plus récemment chez cinq souches cliniques à l'hôpital de Beni-Messous à Alger (Medboua-Benbalagh *et al.*,

2017), CTX-M-3 a été identifiée aussi bien chez des souches cliniques que chez des souches isolées dans une station d'épuration (Ramdani-Bougoussa *et al.*, 2006 ; Gharout-Sait *et al.*, 2012 ; Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013 ; Alouache *et al.*, 2014 ; Medboua-Benbalagh *et al.*, 2017), tandis que CTX-M-1 et SHV-12 ont été exclusivement détectées chez des souches d'origine animale (Yousfi *et al.*, 2016b; Belmahdi *et al.*, 2016). Par contre, il n'y a aucune description de TEM-167 à ce jour, seul le gène *bla*_{TEM-167} est disponible dans GenBank (FJ360884).

Une plus faible proportion des *E. coli* était résistante aux C3G par production de céphalosporinases seules (1.3%) ou associées à des BLSE (11.3%). Cette résistance est due, chez une souche isolée au CHU d'Oran, à la production de la céphalosporinase plasmidique CMY-16. Cette enzyme n'a jamais été détectée en Algérie. Cependant, d'autres variants de CMY ont été déjà rapportés chez *E. coli*, il s'agit de CMY-2, CMY-4 et CMY-42 (Iabadene *et al.*, 2009a ; Robin *et al.*, 2010 ; Gharout-Sait *et al.*, 2015 ; Yousfi *et al.*, 2016a ; Belmahdi *et al.*, 2016 ; Yaici *et al.*, 2016). CMY est le type d'AmpC plasmidiques le plus répandu présentant la plus large distribution géographique (Philippon *et al.*, 2002), contrairement au DHA-1 qui a été souvent signalée en Asie (Yamasaki *et al.*, 2010). Chez *E. coli*, DHA-1 a été identifiée une seule fois, en Algérie, chez une souche isolée à l'Hôpital de Beni-Messous à Alger (Iabadene *et al.*, 2009a). Toutefois, elle n'a pas été détectée parmi les souches, produisant les céphalosporinases, collectées durant la période d'étude. Pour ces dernières, la résistance aux C3G serait due à l'hyperproduction de la céphalosporinase constitutive, par mutations dans le gène chromosomique *ampC*, ou à des céphalosporinases plasmidiques non testées dans cette étude.

La plupart des souches résistantes aux C3G, avaient exprimé une résistance croisée aux aminosides (gentamicine, tobramycine et nétilmicine), aux quinolones et au triméthoprime/sulfaméthoxazole, antibiotiques habituellement actifs sur les entérobactéries, y compris *E. coli* (Mkaouar *et al.*, 2008). Ces corésistances ont été déjà rapportées dans plusieurs études locales et internationales (Coque *et al.*, 2008 ; Leotard et Negrin, 2010 ; Pokhrel *et al.*, 2014 ; Agabou *et al.*, 2014 ; Smaoui *et al.*, 2015 ; Medboua-Benbalagh *et al.*, 2017).

Parmi les aminosides testés, l'amikacine reste la molécule la plus active, ce qui concorde avec les résultats de plusieurs travaux réalisés en Algérie (Touati *et al.*, 2012 ; Agabou *et al.*, 2014), en Tunisie (Smaoui *et al.*, 2015), en France (De Mouy *et al.*, 2007 ; Nicolas-Chanoine

et al., 2008 ; Leotard et Negrin, 2010) et au Nepal (Pokhrel *et al.*, 2014). Les souches résistantes à cet antibiotique ont présenté des CMI ≥ 512 $\mu\text{g/ml}$ à l'ensemble des aminosides testés. Cela est dû à la production de méthylases de l'ARNr 16S, enzymes conférant une résistance de haut niveau aux aminosides les plus utilisés en clinique (Krishnappa *et al.*, 2012). En effet, 12 (18%) souches parmi les 67 EBLSE étudiées produisaient des méthylases de l'ARNr 16S. cette fréquence est plus importante que celles rapportées au Japon (0.03%) (Yamane *et al.*, 2007a), en Turquie (0.7%) (Berçot *et al.*, 2010), en France (1.3%) (Berçot *et al.*, 2008) et en Chine (10%) (Wu *et al.*, 2009).

Deux types de méthylases de l'ARNr 16S ont été détectés, il s'agit de ArmA chez quatre souches productrices de différents types de BLSE (CTX-M-15, CTX-M-1 ou TEM-167) et isolées au niveau des trois CHUs étudiés, et RmtB chez huit souches, productrices de CTX-M-15 et de TEM-1, isolées à l'hôpital de Tlemcen. Ces deux types d'enzymes étant les plus répandus à la surface du globe (Doi et Arakawa, 2007), ils représentent près de 92% des méthylases détectées (Soulier-Chapuis, 2012). Cependant, leur détection chez *E. coli* n'est pas habituelle en Algérie et même en Afrique du Nord. Le gène *armA* n'a jamais été détecté, chez cette espèce, dans cette région. Toutefois, il a été identifié en Algérie chez différentes souches cliniques de bacilles à Gram négatif en association avec plusieurs gènes de résistances aux antibiotiques (Bogaerts *et al.*, 2007 ; Naas *et al.*, 2009 ; Naas *et al.*, 2011 ; Bouzidi *et al.*, 2011 ; Bakour *et al.*, 2014; Belbel *et al.*, 2014; Batah *et al.*, 2015; Khennouchi *et al.*, 2015) ; et en Egypte chez des souches d' *Acinetobacter baumannii* (El-Sayed-Ahmed *et al.*, 2015). Par ailleurs, Trois études uniquement ont rapporté la détection du gène *rmtB*, en Afrique du Nord. Il a été signalé en Egypte chez 3 souches cliniques d'*E. coli* (Helaly *et al.*, 2010), en Tunisie, chez deux souches de *Salmonella enterica* isolées des produits alimentaires pour animaux (Al-Gallas *et al.*, 2013) et plus récemment, en Algérie, chez une souche clinique de *Pseudomonas aeruginosa* en association avec le gène *bla_{VIM-2}* (Meradji *et al.*, 2016).

Cette étude représente la première description d'*E. coli* productrice de méthylases de l'ARNr 16S en Algérie, ainsi que la première description des souches co-exprimant ArmA et CTX-M-1 ou TEM-167. Ces résultats ont coïncidé avec une étude réalisée au CHU d'Oran, en 2011, qui a rapporté l'isolement de deux souches d'*E. coli* hébergeant le gène *rmtB*, gène non détecté à l'hôpital d'Oran durant notre étude, en association avec *bla_{CTX-M-15}*, *qnrB* et *qepA* (Yanat *et al.*, 2016c). Ces constatations peuvent refléter la répartition actuelle des méthylases en Algérie et en Afrique du Nord.

D'autres déterminants de résistance aux aminosides, codant des enzymes modificatrices AME, ont été également détectés parmi les souches résistantes au C3G et même celles co-exprimant les méthylases de l'ARNr 16S. Il s'agit des gènes *aac(6')-Ib*, *aadA* et *aadB*. Ces gènes ont été trouvés dans des cassettes des intégrons de classe I, souvent en association avec d'autres gènes de résistance au triméthopime (*dfra*) ou au chloramphénicol (*cmlA6*). Les intégrons de classe I jouent un rôle important dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif. Ils sont fréquemment trouvés chez les souches d'*E. coli* multirésistantes (Naas *et al.*, 2001 ; Gassama *et al.*, 2004 ; Skurnik *et al.*, 2005). En effet, 50.7% de souches résistantes aux C3G contenaient des Intégrons de classe 1. Cette proportion se rapproche de celles signalées en Algérie (46.7%) (Yahiaoui *et al.*, 2015), en Espagne (46.6%) (Machado *et al.*, 2005) et en Corée (54%) (Yu *et al.*, 2003), mais elle est inférieure à celles trouvées en Chine (67.9%) (Wu *et al.*, 2012) et en Egypte (77.8%) (Malek *et al.*, 2015). Les combinaisons de gènes de cassettes décrites dans cette étude (Tableau 21), ont été également rapportées dans des études antérieures (Machado *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2012 ; Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013 ; Shahcheraghi *et al.*, 2014 ; Malek *et al.*, 2015).

Concernant les quinolones, des taux de résistance très élevés ($\geq 70\%$) ont été obtenus pour les souches résistantes aux C3G et des hauts niveaux de résistance à la ciprofloxacine ($\text{CMI} \geq 128 \mu\text{g/ml}$) ont été notés, limitant ainsi le choix thérapeutique. A l'inverse des autres études algériennes (Tableau 4), aucun allèle *qnr* n'a été identifié dans cette étude tandis que le gène *aac(6')-Ib-cr*, conférant la résistance aux aminosides et réduisant la sensibilité à la ciprofloxacine, a été trouvé chez 10 souches en association avec les gènes, *bla*_{CTX-M-15} (8 souches), *bla*_{CTX-M-15} et *armA* (1) et *bla*_{CMY-16} (1). La plus large dissémination et la dominance de ce gène parmi les déterminants plasmidiques de résistance aux quinolones, ainsi que son association avec la BLSE CTX-M-15, ont été fréquemment rapportées aussi bien en Algérie que dans d'autres pays (Fihman *et al.*, 2008 ; Pitout *et al.*, 2008 ; Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013 ; Ferjani *et al.*, 2014 ; Yahiaoui *et al.*, 2015 ; Agabou *et al.*, 2016 ; Yanat *et al.*, 2016a ; Yanat *et al.*, 2016c ; Medboua-Benbalagh *et al.*, 2017).

La présence du gène *aac(6')-Ib-cr* isolément n'induit qu'une résistance de bas niveau à la ciprofloxacine (Martinez-Martinez *et al.*, 1998 ; Robicsek *et al.*, 2006) et peut passer inaperçue au niveau de l'antibiogramme. Néanmoins, elle favorise la sélection des mutants résistants par des mécanismes de mutation chromosomique (Martinez-Martinez *et al.*, 1998). Ce constat ainsi que les hauts niveaux de résistance à la ciprofloxacine, observés chez les

souches étudiées, suggèrent que la résistance aux quinolones, est due principalement à des mutations dans les gènes codant les gyrases ou les topoisomérases.

On constate ainsi que la corésistance d'*E. coli* aux β -lactamines, aux aminosides et aux quinolones, pose un grand problème au niveau des CHUs du Nord-Ouest algérien, en compliquant la prise en charge thérapeutique. Il est à craindre également que ces hôpitaux ne soient pas restés indemne de la diffusion des mécanismes de résistance à la colistine, antibiotique de la famille des polymyxines, qui reste parfois la seule molécule disponible dans le cas des infections à bacilles à Gram négatif multirésistants (Nation *et al.*, 2015 ; Paterson et Harris, 2016). Récemment, le premier déterminant plasmidique, *mcr-1*, conférant la résistance à la colistine, a été identifié en Chine chez des souches d'entérobactéries d'origine humaine et animale (Liu *et al.*, 2016). Depuis, plusieurs études ont rapporté la diffusion de ce gène en Asie, en Europe, en Amérique du Sud et en Afrique (Rolain et Olaitan, 2016).

Chez *E. coli* isolée en Afrique, le gène *mcr-1* n'a été détecté que chez des souches d'origine animale (Olaitan *et al.*, 2016 ; Grami *et al.*, 2016 ; Perreten *et al.*, 2016). Notre étude rapporte pour la première fois, dans cette région, l'émergence de ce gène parmi les souches d'*E. coli* d'origine humaine. Il a été trouvé chez une souche isolée en 2011, au CHU de Sidi Bel Abbes au niveau du service de réanimation. Une deuxième description d'*E. coli* d'origine humaine productrice de MCR-1, a été rapportée en Algérie durant la même période, chez une souche isolée au CHU d'Oran (Yanat *et al.*, 2016b). Les deux souches produisent également une BLSE de type CTX-M-15 et appartiennent au ST405.

La dissémination des gènes de résistance est souvent associée à la diffusion de souches clonales et/ou de plasmides épidémiques. Les résultats de l'électrophorèse en champ pulsé (ECP) ont montré une variabilité génotypique très importante des souches étudiées, ce qui écarte la possibilité d'une transmission de souches clonales. En revanche, les huit souches productrices du RmtB avaient partagé le même pulsotype. Elles ont été isolées au CHU de Tlemcen dans un intervalle d'une année (du 01/04/2010 au 26/04/2011) et 7 d'entre elles ont été collectées au service de réanimation, suggérant une diffusion d'un clone épidémique hébergeant le gène *rmtB*, liée probablement à un problème d'hygiène du personnels soignants, au niveau de ce service, durant cette période d'étude.

Les résultats de l'ECP ont été consolidés par ceux du MLST, qui viennent confirmer la diversité clonale des souches étudiées. En effet, 23 ST différents ont été détectés, dont 11 déjà rapportés en Algérie (ST10, ST117, ST131, ST167, ST1011, ST38, ST354, ST405, ST69,

ST73 et ST88) (Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013 ; Alouache *et al.*, 2014 ; Agabou *et al.*, 2014 ; Brahmi *et al.*, 2014 ; Yahiaoui *et al.*, 2015 ; Anssour *et al.*, 2016 ; Agabou *et al.*, 2016 ; Belmahdi *et al.*, 2016 ; Yanat *et al.*, 2016a ; Yanat *et al.*, 2016b ; Yanat *et al.*, 2016c). De plus un nouvel ST a été identifié dans cette étude, mais il n'est pas encore déposé dans la base de données MLST d'*E. coli*.

Plusieurs études ont rapporté l'implication du ST131 dans la dissémination des souches d'*E. coli* multirésistantes produisant la BLSE de type CTX-M-15 (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008 ; Clermont *et al.*, 2009 ; Rogers *et al.*, 2011). Dans cette étude, ce clone comprenait uniquement quatre souches et n'a été détecté qu'au CHU de Tlemcen. Cependant, le clone dominant était celui appartenant au ST405 du complexe clonal CC ST405. Il regroupe 24 souches, issues des trois CHUs étudiés, ayant le gène *bla*_{CTX-M-15} en association avec différents gènes de résistance aux antibiotiques (*rmtB*, *aac(6')-Ib-cr* ou *mcr-1*). ST405 a été récemment décrit parmi les principaux clones, des souches d'*E. coli* pathogènes, associés à la diffusion mondiale du gène *bla*_{CTX-M-15} (Ruiz *et al.*, 2011 ; Ewers *et al.*, 2012 ; Matsumura *et al.*, 2013) ainsi que d'autres gènes de résistance aux antibiotiques comme *rmtB* (Tian *et al.*, 2011) et *bla*_{NDM} (Peirano *et al.*, 2013 ; Jakobsen *et al.*, 2014).

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

Un plasmide IncA/C a été trouvé chez la souche produisant la céphalosporinase plasmidique CMY-16 ainsi que chez son transconjugant. La localisation du gène *bla*_{CMY} sur des plasmides du groupe d'incompatibilité IncA/C, a été déjà rapportée en Algérie (Iabadene *et al.*, 2009a ; Gharout-Sait *et al.*, 2015). De plus, l'association du plasmide IncA/C avec la dissémination de l'enzyme CMY a été fréquemment décrite aussi bien chez les humains que chez les animaux (Carattoli, 2009 ; Lindsey *et al.*, 2009).

Les résultats du S1-PFGE et de Southern blot ont permis de mieux caractériser le support des gènes de résistance chez les souches produisant les méthylases de l'ARNr 16S. Concernant les gènes codant les BLSE, *bla*_{CTX-M-15} est localisé sur des plasmides Inc II et IncFIA chez les souches productrices du RmtB et sur un plasmide IncL/M chez les souches productrices de ArmA, tandis que *bla*_{CTX-M-1} et *bla*_{TEM-167} sont localisés chacun sur un plasmide IncN. Quelques études algériennes ont déjà rapporté, chez *E. coli*, la localisation du *bla*_{CTX-M-15} sur des plasmides appartenant aux groupes d'incompatibilité IncF (Gharout-Sait *et al.*, 2012 ; Alouache *et al.*, 2014), IncL/M (Baba Ahmed-Kazi Tani *et al.*, 2013) et IncII (Alouache *et al.*, 2012).

Concernant les gènes codant les méthylases de l'ARNr 16S, *rmtB* est localisé sur un plasmide appartenant au groupe d'incompatibilité IncFIA, tandis que *armA* est porté par deux plasmides différents IncFIA (chez les souches d'Oran) et IncL/M (chez les souches de Tlemcen et Sidi Bel Abbas). La présence des gènes *bla*_{CTX-M-15} et *rmtB* sur un même plasmide conjugatif (IncFIA) ainsi que la localisation des gènes *armA* et *bla*_{CTX-M-15} sur un seul plasmide autotransférable (IncL/M), ont été également observées. Ces résultats ont été aussi trouvés dans des études antérieures. En effet, l'association du *bla*_{CTX-M-15} et *rmtB*, sur un plasmide conjugatif, a été rapportée en USA chez une souche d'*E. coli* appartenant au clone ST405 (Tian *et al.*, 2011). De même, les équipes de Bogaerts et Naas ont déjà rapporté l'association des gènes *armA* et *bla*_{CTX-M-15}, sur des plasmides IncL/M, chez des souches d'entérobactéries isolées des patients algériens (Bogaerts *et al.*, 2007 ; Naas *et al.*, 2011).

Le support plasmidique des gènes de résistance aux antibiotiques favorise la dissémination des souches d'*E. coli* multirésistantes dans les hôpitaux du Nord-Ouest algérien, d'autant plus qu'il favorise leur sélection par l'utilisation de différentes classes d'antibiotiques.

La multirésistance observée chez les souches étudiées, réduit malheureusement l'arsenal thérapeutique et entraîne une utilisation massive des carbapénèmes. Ces molécules étant considérées comme antibiotiques de choix pour le traitement des entérobactéries multirésistantes (Guessennd *et al.*, 2008). En effet, l'ertapénème et l'imipénème ont montré une très bonne activité contre les souches étudiées (100% de souches sensibles), ce qui permet d'éviter l'impasse thérapeutique.

Cependant, depuis 2010, nous assistons à l'émergence des souches d'*E. coli* résistantes aux carbapénèmes dans les hôpitaux algériens (Robin *et al.*, 2010 ; Agabou *et al.*, 2014 ; Sassi *et al.*, 2014), ce qui nécessite une vigilance particulière accordée au suivi de la sensibilité d'*E.*

coli aux carbapénèmes. Ainsi, toute évolution de sensibilité pouvant apparaître lors de prise en charge d'infections à *E. coli* multirésistante par une carbapénème et toute détection d'émergence ou toute introduction de clones résistants à cette molécule, doit pouvoir être identifiée rapidement afin d'engager les mesures prophylactiques et thérapeutiques adéquates (Oteo *et al.*, 2008).

CONCLUSION

La résistance aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique en Algérie et à travers le monde. En effet, ces dix dernières années, nous avons assisté à une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques à l'échelle nationale, en particulier chez les bacilles à Gram négatif (BGN) (Drissi *et al.*, 2008 ; Iabadene *et al.*, 2008 ; Touati *et al.*, 2012 ; Berrazeg *et al.*, 2014).

Cette étude, la première sur la résistance aux antibiotiques et l'épidémiologie de souches cliniques d'*E. coli* dans le Nord-Ouest algérien, souligne la place importante de cette espèce parmi les BGN isolés et révèle l'augmentation de la fréquence des souches d'*E. coli* productrices de BLSE en Algérie. De plus, elle montre que l'épidémiologie des gènes de résistance aux antibiotiques chez *E. coli*, est en perpétuelle évolution dans ce pays. En effet, une grande diversité de gènes de résistance aux β -lactamines a été constatée avec émergence de nouveaux gènes (*bla*_{TEM-167} et *bla*_{CMY-16}) et dominance du gène codant la BLSE CTX-M-15, confirmant la grande diffusion de cette enzyme à l'échelle mondiale.

Nous constatons également, dans cette étude, que l'efficacité des antibiotiques décroît au fil du temps, les bactéries additionnent des résistances à diverses familles d'antibiotiques et deviennent des multirésistants. On rapporte ainsi pour la première fois en Algérie, la détection des gènes de résistance aux aminosides (*armA* et *rmtB*) et à la colistine (*mcr-1*) chez des souches cliniques d'*E. coli*, ainsi que la détection d'autres gènes déjà rapportés en Algérie conférant la résistance aux aminosides (*aac(6')-Ib*, *aadA*, *aadB*), au quinolones (*aac(6')-Ib-cr*) et au triméthoprime (*dfrA*).

La présente étude montre aussi que le risque épidémique du à la dissémination des gènes de résistance au niveau des CHUs de Tlemcen, Sidi Bel Abbas et Oran, en particulier les gènes *bla*_{CTX-15}, *rmtB*, *mcr-1* et *aac(6')-Ib-cr*, est lié principalement à la circulation du clone épidémique ST405, clone à haut risque international et au transfert de plasmides de différents groupes d'incompatibilité, notamment IncFIA, entre souches non reliées génétiquement.

L'augmentation de la fréquence des souches d'*E. coli* productrices de BLSE et la résistance concomitante aux autres classes d'antibiotiques, sont désormais un fait établi au niveau des CHUs du Nord-Ouest algérien. Cette multirésistance ne régresse pas facilement. Le risque d'impasses thérapeutiques est réel, ce d'autant qu'il n'existe pas de perspectives proches de mise sur le marché de nouveaux antibiotiques anti-Gram négatifs et que les carbapénèmes, antibiotiques de dernier recours contre les entérobactéries multirésistantes, commencent à perdre leur place dans l'arsenal thérapeutique.

Il est donc légitime de redouter la dissémination des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques en Algérie et face à cette crainte, nos hôpitaux devraient adopter en urgence un certain nombre de mesures à mettre en œuvre, pour prévenir la dissémination de telles souches et éviter ainsi l'écllosion d'épidémies hospitalières. Cette prévention passe par le renforcement des mesures d'hygiène hospitalière, l'utilisation rationnelle des antibiotiques guidée par les résultats de l'antibiogramme, le dépistage et l'isolement des patients porteurs de bactéries multirésistantes, l'équipement des laboratoires de microbiologie par le matériel approprié pour la détection rapide et fiable des gènes de résistance aux différentes classes d'antibiotiques, la formation et la sensibilisation du personnel soignant et aide soignant sur le problème de la résistance aux antibiotiques et la mise en place des réseaux de surveillance des bactéries multirésistantes. Par ailleurs, la vente et l'usage des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire devraient être mieux réglementés afin de limiter la dissémination des souches multirésistantes dans la communauté et chez les animaux, qui semble être en étroite relation avec la diffusion de ces souches en milieu hospitalier.

Le problème de la résistance aux antibiotiques doit donc être abordé dans une optique pluridisciplinaire où la collaboration entre biologistes, hygiénistes, cliniciens et vétérinaires est indispensable.

Enfin, pour mieux cerner le problème de la multirésistance chez *E. coli* dans Le Nord-Ouest algérien, il est intéressant de connaître l'origine des gènes de résistance. D'autres investigations sont donc indispensables pour répondre aux questions restées en suspens. Ainsi, comme perspectives de ce travail, nous proposons de :

- Réaliser des enquêtes sur la consommation des antibiotiques dans les hôpitaux du Nord-Ouest algérien ;
- Etudier la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* en milieu communautaire ;
- Etudier la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* d'origine animale ;
- Etudier le potentiel de virulence des souches multirésistantes ;
- Etudier l'environnement génétique des gènes de résistance aux antibiotiques pour mieux comprendre leurs mécanismes de diffusion.

Références bibliographiques

- Abd El-Aziz, N.K., and Gharib, A.A. (2015) Coexistence of plasmid mediated quinolone resistance determinants and AmpC-Beta- Lactamases in *Escherichia coli* strains in Egypt. *Cell Mol Biol* **61**: 29–35.
- Abdelaziz, M.O., Bonura, C., Aleo, A., Fasciana, T., Calà, C., and Mammina, C. (2013) Cephalosporin resistant *Escherichia coli* from cancer patients in Cairo, Egypt. *Microbiol Immunol* **57**: 391–5.
- Adjidé, C.C., Biendo, M., Rousseau, F., Hamdad-Daoudi, F., Thomas, D., Laurans, G., *et al.* (2006) Extended-spectrum betalactamases producing *Escherichia coli*: a new health-care associated infection threat? *Pathol Biol* **54**: 510–17.
- Agabou, A., Lezzar, N., Ouchenane, Z., Khemissi, S., Satta, D., Sotto, A., *et al.* (2016) Clonal relationship between human and avian ciprofloxacinresistant *Escherichia coli* isolates in North-Eastern Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **35**: 227-34.
- Agabou, A., Pantel, A., Ouchenane, Z., Lezzar, N., Khemissi, S., Satta, D., *et al.* (2014) First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**: 1641-6.
- AitMhand, R., Soukri, A., Moustouai, N., Amarouch, H., ElMdaghri, N., Sirot, D, *et al.* (2002) Plasmid-mediated TEM-3 extended-spectrum beta-lactamase production in *Salmonella typhimurium* in Casablanca. *J Antimicrob Chemother* **49**: 169-72.
- Al Sheikh, Y.A., Marie, M.A., John, J., Krishnappa, L.G., and Dabwab, K.H. (2014) Prevalence of 16S rRNA methylase genes among β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Saudi Arabia. *Libyan J Med* **9**: 244-32.
- Al-Gallas, N., Abbassi, M.S., Gharbi, B., Manai, M., Ben Fayala, M.N., Bichihi, R., *et al.* (2013) Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and *rmtB* gene in *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* and *Typhimurium* isolated from food-animal products in Tunisia. *Foodborne Pathog Dis* **10**: 813-9.
- Alonso, C.A., Zarazaga, M., Ben Sallem, R., Jouini, A., Ben Slama, K., and Torres, C. (2017) Antibiotic resistance in *Escherichia coli* in husbandry animals. The African perspective. *Lett Appl Microbiol*.
- Alouache, S., Kada, M., Messai, Y., Estepa, V., Torres, C., and Bakour, R. (2012) Antibiotic resistance and extended-spectrum β -lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). *Microbes Environ* **27**: 80-6.
- Alouache, S., Estepa, V., Messai, Y., Ruiz, E., Torres, C., and Bakour, R. (2014) Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microb Drug Resist* **20**: 30-8.

- Alvarez, M., Tran, J.H., Chow, N., and Jacoby, G.A. (2004) Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC β -lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 533–37.
- Amazian, K., Rossello, J., Castella, A., Sekkat, S., Terzaki, S., Dhidah, L., *et al.* (2010) Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region. *East Mediterr Health J* **16**: 1070-1078.
- Ambler, R.P. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**: 321-31.
- Andriole, V.T. (2000) The Quinolones. *Elsevier Science* p517.
- Andriole, V.T. (2005) The quinolones: past, present, and future. *Clin Infect Dis* **41**: 113-9.
- Anssour, L., Messai, Y., Estepa, V., Torres, C., and Bakour, R. (2016) Characteristics of ciprofloxacin-resistant *Enterobacteriaceae* isolates recovered from wastewater of an Algerian hospital. *J Infect Dev Ctries* **10**: 728-34.
- Anssour, L., Messai, Y., Derkaoui, M., Alouache, S., Estepa, V., *et al.* (2014) ESBL, plasmidic AmpC, and associated quinolone resistance determinants in coliforms isolated from hospital effluent: first report of qnrB2, qnrB9, qnrB19, and bla_{CMY-4} in Algeria. *J Chemother* **26**: 74-9.
- Antimicrobial resistance surveillance in Europe. (2012) <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf>.
- Arlet, G., et Philippon, A. (2003) Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Rev Francoph Lab* **352**: 41-55.
- Armas-Freire, P.I., Trueba, G., Proaño-Bolaños, C., Levy, K., Zhang, L., Marrs, C.F., *et al.* (2015) Unexpected distribution of the fluoroquinolone-resistance gene *qnrB* in *Escherichia coli* isolates from different human and poultry origins in Ecuador. *Int Microbiol* **18**: 85-90.
- Aubert, D., Naas, T., Lartigue, M.F., and Nordmann, P. (2005) Novel genetic structure associated with an extended-spectrum beta-lactamase bla_{VEB} gene in a *Providencia stuartii* clinical isolate from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3590-2.
- Baba Ahmed, Z., Ayad, A., Mesli, E., Messai, Y., Bakour, R., and Drissi, M. (2012) CTX-M-15 extended-spectrum- β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in the intensive care unit of Tlemcen Hospital, Algeria. *East Mediterr Health J* **18**: 382–6.
- Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., Decré, D., Genel, N., Boucherit-Otmani, Z., Arlet, G., and Drissi, M. (2013) Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microb Drug Resist* **19**: 185–90.

- Bakour, S., Touati, A., Bachiri, T., Sahli, F., Tiouit, D., Naim, M., *et al.* (2014) First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J Infect Chemother* **20**: 696–701.
- Ball, P. (2000) Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother* **46**: 17-24.
- Barguigua, A., El Otmani, F., Talmi, M., Zerouali, K., and Timinouni, M. (2013) Prevalence and types of extended spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* isolates in Moroccan community. *Microb Pathog* **61–62**: 16–22.
- Barguigua, A., El Otmani, F., Talmi, M., Zerouali, K., and Timinouni, M. (2012) Emergence of carbapenem- resistant enterobacteriaceae isolates in the Moroccan community. *Diagn Microbiol Infect Dis* **73**: 290–1.
- Baron, S., Jouy, E., Larvor, E., Eono, F., Bougeard, S., and Kempf, I. (2014) Impact of third-generation-cephalosporin administration in hatcheries on fecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in broilers and layers. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 5428-34.
- Baroud, M., Dandache, I., Araj, G.F., Wakim, R., Kanj, S., Kanafani, Z., *et al.* (2013) Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents* **41**: 75–9.
- Barton, B.M., Harding, G.P., and Zuccarelli, A.J. (1995) A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* **226**: 235-40.
- Batah, R., Loucif, L., Olaitan, A.O., Boutefnouchet, N., Allag, H., and Rolain, J.M. (2015) Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing ArmA and CTX-M-15 Mediated High Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria. *Microb Drug Resist* **21**: 470–6.
- Bauerfeind, A., Grimm, H., and Schweighart, S. (1990) A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* **18**: 294–8.
- Bauernfeind, A., Chong, Y., and Schweighart, S. (1989) Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* **17**: 316-21.
- Belbel, Z., Chettibi, H., Dekhil, M., Ladjama, A., Nedjai, S., and Rolain, J.M. (2014) Outbreak of an ArmA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian Hospital. *Microb Drug Resist* **20**: 310-5.
- Belmahdi, M., Bakour, S., Al Bayssari, C., Touati, A., and Rolain, J.M. (2016) Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Béjaïa, Algeria. *J Glob Antimicrob Resist* **6**: 108-12.

- Berçot, B., Poirel, L., and Nordmann, P. (2008) Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 4526-7.
- Berçot, B., Poirel, L., Ozdamar, M., Hakko, E., Turkoglu, S., and Nordman, P. (2010) Low prevalence of 16S méthylases among extended-spectrum-b-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from a Turkish hospital. *J Antimicrob Chemother* **65**: 797-798.
- Berrazeg, M., Diene, S.M., Medjahed, L., Parola, P., Drissi, M., Raoul, D., *et al.* (2014) New Delhi Metallo- β -lactamase around the world: An Review using Google Maps. *Euro Surveill* **19**: 20809.
- Bert, F., et Lambert-Zechovsky, N. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* : actualités sur la résistance aux β -lactamines et implications thérapeutiques. *Antibiotiques* **2**: 195-201.
- Bertrand, X., Blasco, G., Belle, E., Boillot, A., Capellier, G., and Talon, D. (2003) *Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units: importance of cross-transmission. *Ann Fr Anesth Reanim* **22**: 505-9.
- Bertrand, X., Hocquet, D., Boisson, K., Siebor, E., Plesiat, P., and Talon, D. (2003) Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamase in a French university-affiliated hospital. *Int J Antimicrob Agents* **22**: 128-33.
- Bidet, P., et Bingen, E. (2011) Bactériologie Médicale. *Elsevier Masson SAS* : 2^{ème} édition **34**: 331-427.
- Birgy, A., Doit, C., Mariani-Kurkdjian, P., Genel, N., Faye, A., Arlet, G., *et al.* (2011) Early detection of colonization by VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and NDM-1-producing *Escherichia coli* in two children returning to France. *J Clin Microbiol* **49**: 3085–7.
- Blattner, F. R., Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., *et al.* (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453–62.
- Blomberg, B., Jureen, R., Manji, K.P., Tamim, B.S., Mwakagile, D.S., Urassa, W.K., *et al.* (2005) High rate of fatal cases of pediatric septicemia caused by Gram-negative bacteria with extended-spectrum β -lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. *J Clin Microbiol* **43**: 745–9.
- Bogaerts, P., Galimand, M., Bauraing, C., Deplano, A., Vanhoof, R., De Mendonca, R., *et al.* (2007) Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* **59**: 459-64.
- Bonnet, R. (2004) Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1-14.
- Bonnet, R. (2006) B-lactamines et entérobactéries. In: Courvalin, P., Leclerck, R., Bingen, E. AntibioGramme. Paris. *ESKA* : 2^{ème} édition **15**: 141-62.

- Bonnet, R. (2012) B-lactamines et entérobactéries. In: Courvalin, P., Leclercq, R. AntibioGramme. *Paris ESKA* **16**: 165-88.
- Bonomo, A.R. (2006) β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitors. In: Yoshikawa, T., and Rajagopalan, S. Antibiotic Therapy for Geriatric Patients. *Taylor & Francis Group LLC* **p**: 141-53.
- Borg, M.A., Van de Sande-Bruinsma, N., Scicluna, E., De Kraker, M., Tiemersma, E., Monen, J., *et al.* (2008) Antimicrobial resistance in invasive strains of *Escherichia coli* from Southern and Eastern Mediterranean laboratories. *Clin Microbiol Infect* **14**: 789–796.
- Borges-Walmsley, M.I., McKeegan, K.S., and Walmsley, A.R. (2003) Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *J Biochem* **376**: 313–38.
- Bosgiraud, C. (2003) Microbiologie générale et santé. *Paris ESKA* **p**: 278.
- Bosi, C., Davin-Regli, A., Bornet, C., Mallea, M., Pages, J.M., and Bollet, C. (1999) Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. *J Clin Microbiol* **37**: 2165-9.
- Boulanger, A., Naas, T., Fortineau, N., Figueiredo, S., and Nordmann, P. (2012) NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 2214–5.
- Bourjilat, F., Bouchrif, B., Dersi, N., Claude, J.D., Amarouch, H., and Timinouni, M. (2011) Emergence of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in community acquired urinary infections in Casablanca, Morocco. *J Infect Dev Ctries* **5**: 850-5.
- Boutet-Dubois, A., Pantel, A., Sotto, A., et Lavigne, J.P. (2012) Les entérobactéries productrices de carbapénémases. *Alin&as* **2**: 1-5.
- Bouzidi, N., Aoun, L., Dekhil, M., Granier, S.A., Poirel, L., Brisabois, A., *et al.* (2011) Co-occurrence of aminoglycoside resistance gene *armA* in *non-Typhi Salmonella* isolates producing CTX-M-15 in Algeria. *J Antimicrob Chemother* **66**: 2180-1.
- Bradford, P.A. (2001) Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* **14**: 933-51
- Brahmi, S., Dunyach-Rémy, C., Touati, A., and Lavigne, J.P. (2014) CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone O25b-ST131 isolated from wild fish in Mediterranean Sea. *Clin Microbiol Infect* **21**: 18-20.
- Brigante, G., Luzzaro, F., Perilli, M., Lombardi, G., Coli, A., Rossolini, G.M., *et al.* (2005) Evolution of CTX-M-type betalactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents* **25**: 157–62.

- Brun-Buisson, C., Legrand, P., Philippon, A., Montravers, F., Ansquer, M., and Duval, J. (1987) Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* **2**: 302-6.
- Bryan, L.E., and Kwan, S. (1983) Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* **23**: 835-45.
- Bryskier, A. (1999) Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongiques. *Paris Ellipses* **p**: 55.
- Bure, A., Legrand, P., Arlet, G., Jarlier, V., Paul, G., and Philippon, A. (1988) Dissemination in five French hospitals of *Klebsiella pneumoniae* serotype K25 harbouring a new transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins and aztreonam. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **7**: 780-2.
- Buruk, C.K., Öztel Ocak, H., Bayramoğlu, G., and Aydın, F. (2016) Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance genes in quinolone-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* isolates from bloodstream infections. *Mikrobiyol Bul* **50**: 186-95.
- Bush, K. (2010) Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care* **14**: 224.
- Bush, K. (2013) Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann N Y Acad Sci* **1277**: 84-90
- Bush, K., and Jacoby, G.A. (2010) Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 969-76.
- Bush, K., Jacoby, G.A., and Meideros, A.A. (1995) A functional classification scheme for beta-lactamase and its correlation with molecular structures. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1211-33.
- Caccamo, M., Perilli, M., Celenza, G., Bonfiglio, G., Tempera, G., and Amicosante, G. (2006) Occurrence of extended spectrum b-lactamases among isolates of *Enterobacteriaceae* from urinary tract infections in southern Italy. *Microb Drug Resist* **12**: 257-64.
- Cantón, R., and Coque, T.M. (2006) The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* **9**: 466-75.
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., *et al.* (2008) Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* **14**: 144-53.
- Cantón, R., Oliver, A., Coque, T.M., Varela, M.C., Pérez-Díaz, J.C., and Baquero, F. (2002) Epidemiology of extended spectrum b-lactamase-producing *enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a twelve-year period. *J Clin Microbiol* **40**: 1237-43.

- Carattoli, A. (2009) Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 2227-38.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., and Threlfall, E.J. (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**: 219–28.
- Caroff, N., Espaze, E., Gautreau, D., Richet, H., and Reynaud, A. (2000) Analysis of the effects of 42 and 32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *J Antimicrob Chemother* **45**: 783–88.
- Carrër, A., Poirel, L., Yilmaz, M., Akan, O.A., Feriha, C., Cuzon, G., *et al.* (2010) Spread of OXA-48- encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 1369-73.
- Cattoir, V. (2004) Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathol Biol* **52**: 607-16.
- Cattoir, V. (2008) LES NOUVELLES BETA-LACTAMASES A SPECTRE ETENDU (BLSE). *Pathol Infect Réa* 203-09.
- Cattoir, V. (2012) Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. *Rev Francoph Lab* **445**: 79-87.
- Cattoir, V., Poirel, L., and Nordmann, P. (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 3801-4.
- Cavallo, J.D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., and Garrabé, E. (2004) Bêtalactamines. *EMC-Mal Infect* **1**: 129–202.
- Chantziaras, I., Boyen, F., Callens, B., and Dewulf, J. (2014) Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J Antimicrob Chemother* **69**: 827-34.
- Chapman, J.S., and Georgopapadokou, N.H. (1988) Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **32**: 438-42.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4555-8.
- Clermont, O., Dhanji, H., Upton, M., Gibreel, T., Fox, A., Boyd, D., *et al.* (2009) Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother* **64**: 274–7.
- Cohen, R., et Rollet, V. (2013) Stratégies de traitement antibiotique des infections à BMR. *Archives de Pédiatrie* **20**: 59-60.
- Conseil scientifique de l'ONERBA. (2005) Bacterial resistance to antibiotics. Data from the National Observatory of Bacterial Resistance Epidemiology (ONERBA). *Med Mal Infect* **35**: 155–69.

- Coque, T.M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., *et al.* (2008) Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* **14**: 195–200.
- Courvalin, P., Denis, F., Ploy, M.C., garilhe, M.P.D., Trieu-Culot, P., and Universalis. (2001) "Antibiotiques". Retrieved 24 Mai, 2013, from <http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/antibiotiques/>.
- Courvalin, P., et Leclercq, R. (2012) Antibiogramme. *Paris ESKA 3ème édition*.
- Courvalin, P., Leclercq, R., et Bingen, E. (2006) Antibiogramme. *Paris ESKA 2ème édition*.
- Crémet, L., Caroff, N., Giraudeau, C., Dauvergne, S., Lepelletier, D., Reynaud, A., *et al.* (2010) Occurrence of ST23 complex phylogroup A *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum AmpC beta-lactamase in a French hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 2216-8.
- Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **8**: 26-38.
- Cuzon, G., Bonnin, R.A., and Nordmann, P. (2010a) First Identification of Novel NDM Carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France. *PLoS ONE* **8**: 4.
- Cuzon, G., Naas, T., and Nordmann, P. (2010b) KPC carbapenemases: what is at stake in clinical microbiology? *Pathol Biol* **58**: 39-45.
- Cuzon, G., Ouanich, J., Gondret, R., Naas, T., and Nordmann, P. (2011) Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 2420-3.
- Daoud, Z., Salem Sokhn, E., Masri, K., Matar, G.M., and Doron, S. (2015) *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections of Lebanese Patients between 2005 and 2012: Epidemiology and Profiles of Resistance. *Front Med* **30**: 26.
- Darfeuille-Michaud, A. (2002) Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int J Med Microbiol* **292**: 185-93.
- Davis, M.A., Baker, K.N.K., Orfe, L.H., Shah, D.H., Besser, T.E., and Call, D.R. (2010) Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 2666-9.
- De Champs, C., Poirel, L., Bonnet, R., Sirot, D., Chanal, C., Sirot, J., *et al.* (2002) Prospective survey of β -lactamases produced by Ceftazidime Resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3031-4.
- De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Bonnet, R., and Sirot, J. (2000) A 1998 survey of extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. The French Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 3177–79.

- De Mouy, D., Fabre, R., Cavallo, J.D., Arzouni, J.P., Baynat, M., Bicart-See, A., *et al.* (2007) Community-acquired urinary tract infections in 15 to 65 years old femal patients in France. Susceptibility of *E. coli* according to history: AFORCOPI-BIO network 2003. *Med Mal Infect* **37**: 594–8.
- Ding, H., Yang, Y., Lu, Q., Wang, Y., Chen, Y., Deng, L., *et al.* (2008) The prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children’s hospitals in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**: 915–21.
- Djahmi, N., Dunyach-Remy, C., Pantel, A., Dekhil, M., Sotto, A., and Lavigne, J.P. (2014) Epidemiology of carbapenemase- producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *Biomed Res Int* 305784.
- Doi, Y., Adams-Haduch, J.M., and Paterson, D.L. (2008) *Escherichia coli* isolate coproducing 16S rRNA Methylase and CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase isolated from an outpatient in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 1204-5.
- Doi, Y., and Arakawa, Y. (2007) 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* **45**: 88-94.
- Doit, C., Mariani-Kurkdjian, P., and Bingen, E. (2010) Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu. *Arch Pédi* **17**: 133-44.
- Donnenberg, M.S. (2002) *Escherichia coli* Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen. *Elsevier Inc p*: XXI-XXV.
- Donnenberg, M.S. (2013) *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of Pathogenesis. *Elsevier Inc: 2^{ème} édition p*: XVII–XXI.
- Dotto, G., Giacomelli, M., Grilli, G., Ferrazzi, V., Carattoli, A., Fortini, D., *et al.* (2014) High prevalence of oqxAB in *Escherichia coli* isolates from domestic and wild lagomorphs in Italy. *Microb Drug Resist* **20**: 118-23.
- Drissi, M., Ahmed, Z.B., Dehecq, B., Bakour, R., Plesiat, P., and Hocquet, D. (2008) Antibiotic susceptibility and mechanisms of β -lactam resistance among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: first report in Algeria. *Med Mal Infect* **38**: 187-91.
- Drlica, K., and Zhao, X. (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 377-92.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J., and Zhao, X. (2008) Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 385-92.
- Durante-Mangoni, E., Grammatikos, A., Utili, R., and Falagas, M.E. (2009) Do we still need the aminoglycosides? *Int J Antimicrob Agents* **33**: 201-205.

- Edlund, T., Grundstroëm, T., and Normark, S. (1979) Isolation and characterization of DNA repetitions carrying the chromosomal β -lactamase gene of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **17**: 115-25.
- El Rhazi, K., Elfakir, S., Berraho, M., Tachfouti, N., Serhier, Z., Kanjaa C., *et al.* (2007) Prevalence and risk factors for nosocomial infections in Hassan II University Hospital, Fes, Morocco. *East Mediterr Health J* **13**: 56-63.
- El-Herte, R.I., Araj, G.F., Matar, G.M., Baroud, M., Kanafani, Z.A., and Kanj, S.S. (2012) Detection of carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 in Lebanon. *J Infect Dev Ctries* **6**: 457–61.
- Elouennass, M., Sahnoun, I., Zrara, A., Bajjou, T., and Elhamzaoui, S. (2008) Epidemiology and susceptibility profile of blood culture isolates in an intensive care unit (2002-2005). *Méd Mal infect* **38**: 18–24.
- El-Sayed-Ahmed, M.A., Amin, M.A., Tawakol, W.M., Loucif, L., Bakour, S., and Rolain, J.M. (2015) High prevalence of *bla*_{NDM-1} carbapenemase-encoding gene and 16S rRNA *armA* methyltransferase gene among *Acinetobacter baumannii* clinical Isolates in Egypt. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 3602-5.
- Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., and Wieler, L.H. (2012) Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect* **18**: 646-55.
- Fendukly, F., Karlsson, I., Hanson, H.S., Kronvall, G., and Dornbusch, K. (2003) Patterns of mutations in target genes in septicemia isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with resistance or reduced susceptibility to ciprofloxacin. *APMIS* **111**: 857-66.
- Ferjani, S., Saidani, M., Quentin, C., Slim Amine, F., Boutiba Ben Boubaker, I., and Dubois, V. (2014) Prevalence and characterization of uropathogenic *Escherichia coli* harboring plasmid-mediated quinolone resistance in a Tunisian university hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* **79**: 247.
- Fihman, V., Lartigue, M.F., Jacquier, H., Meunier, F., Schnepf, N., Raskine, L., *et al.* (2008) Appearance of *aac(6')-Ib-cr* gene among extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in a French hospital. *J Infect* **56**: 454–9.
- Forge, A., and Schacht, J. (2000) Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurootol* **5**: 3-22.
- Fritsche, T.R., Castanheira, M., Miller, G.H., Jones, R.N., and Armstrong, E.S. (2008) Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 1843–5.

- Gaibani, P., Ambretti, S., Berlingeri, A., Cordovana, M., Farruggia, P., Panico, M., *et al.* (2011) Outbreak of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Northern Italy, July to August 2011. *Euro Surveill* **16**: 20027.
- Galimand, M., Courvalin, P., and Lambert, T. (2003) Plasmid-mediated highlevel resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2565-71.
- Garau, J., Xercavins, M., Rodriguez-Caballeira, M., Gomez-Vera, J.R., Coll, I., and Vidal, D. (1999) Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the Community. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2736-41.
- Gassama, A., Aïdara-Kane, A., Chainier, D., Denis, F., and Ploy, M.C. (2004) Integron-associated antibiotic resistance in enteroaggregative and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist* **10**: 27-30.
- Gazouli, M., Tzouveleakis, L.S., Vatopoulos, A.C., and Tzelepi, E. (1998) Transferable class C β -lactamases in *Escherichia coli* strains isolated in Greek hospitals and characterization of two enzyme variants (LAT-3 and LAT-4) closely related to *Citrobacter freundii* AmpC β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* **42**: 419-25.
- Geser, N., Stephan, R., and Hachler, H. (2012) Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res* **8**: 21.
- Gharout-Sait, A., Touati, A., Benallaoua, S., Guillard, T., Brasme, L., Madoux, J., *et al.* (2012) CTX-M from community-acquired urinary tract infections in Algeria. *Afr J Microbiol Res* **6**: 5306-13.
- Gharout-Sait, A., Touati, A., Guillard, T., Brasme, L., and de Champs, C. (2015) Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal *ampC* genes from hospitalized and non-hospitalized patients in Algeria: description of new sequence type in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *braz j infect dis* **19**: 187-95.
- Giani, T., Conte, V., Di Pilato, V., Aschbacher, R., Weber, C., Larcher, C., *et al.*, (2012). *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn1999 transposon derivative. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 2211-3.
- Girlich, D., Bouihat, N., Poirel, L., Benouda, A., and Nordmann, P. (2014) High rate of faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at a university hospital in Morocco. *Clin Microbiol Infect* **20**: 350-4.
- Gniadkowski, M. (2008) Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect* **14**: 11-32.

- González-Zorn, B., Teshager, T., Casas, M., Porrero, M.C., Moreno, M.A., Courvalin, P., *et al.* (2005) *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerging Infect Dis* **11**: 954-6.
- Grami, R., Mansour, W., Mehri, W., Bouallègue, O., Boujaâfar, N., Madec, J.Y., *et al.* (2016) Impact of food animal trade on the spread of *mcr-1* mediated colistin resistance. *Euro Surveill* **21**: 30144.
- Grattard, F. (2007) Electrophorèse en champs pulsé. In Freney, J., Renaud, F., Leclercq, R., and Riegel, P. Précis de bactériologie clinique. *ESKA Paris p*: 291-302.
- Grimont, P. (1987) Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect* **17**: 6-10.
- Guessennd, N., Bremont, S., Gbonon, V., Kacou-NDouba, A., Ekaza, E., Lambert, T., *et al.* (2008) Qnr-type quinolone resistance in extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteria in Abidjan, Ivory Coast. *Pathol Biol* **56**: 439-46.
- Gulmez, D., Woodford, N., Palepou, M.F., Mushtaq, S., Metan, G., Yakupogullari, Y., *et al.* (2008) Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents* **31**: 523-6.
- Hansen, L.H., Jensen, L.B., Sørensen, H.I., and Sørensen, S.J. (2007) Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother* **60**: 145-7.
- Hansen, L.H., Johannesen, E., Burmølle, M., Sørensen, A.H., and Sørensen, S.J. (2004) Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3332-7.
- Harifi Mood, E., Meshkat, Z., Izadi, N., Rezaei, M., Amel Jamehdar, S., and Naderi Nasab, M. (2015) Prevalence of Quinolone Resistance Genes Among Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Mashhad, Iran. *Jundishapur J Microbiol* **8**: 16217.
- Hassan, W.M., Hashim, A., and Domany, R.A.A. (2012) Plasmid mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, and *qepA* in ESBL producing *Escherichia coli* clinical isolates from Egypt. *Indian J Med Microbiol* **30**: 442-7.
- Hawkey, P.M. (2008) Prevalence and clonality of extended-spectrum β -lactamases in Asia. *Clin Microbiol Infect* **14**: 159-65.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., *et al.* (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**: 11-22.

- Heidary, M., Bahramian, A., Hashemi, A., Goudarzi, M., Omrani, V.F., Eslami, G., *et al.* (2016) Detection of *acrA*, *acrB*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* genes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Microbiol Immunol Hung* **12**: 1-7.
- Helaly, G.F., Abou Shleib, H., Fanaki, N.H., Abdel Kader, O., and Ali, G.H. (2010) Potential Co-prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant *qepA* and 16S rRNA Methylase *rmtB* among *E.coli* Clinical Isolates from Alexandria- Egypt. *J Egypt Public Health Assoc* **85**: 247-72.
- Herzer, P.J., Inouye, S., Inouye, M., and Whittam, T.S. (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 6175-81.
- Hiramatsu, K. (2001) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* **1**: 147-55.
- Hooper, D.C. (2001) Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* **7**: 337-41.
- Hooper, D.C., and Rubinstein, E. (2003) Quinolone antimicrobial agents. *Americ Soc Microbiol p*: 485.
- Iabadene, H., Dallenne, C., Messai, Y., Geneste, D., Bakour, R., and Arlet, G. (2009b) Emergence of extended-spectrum beta-lactamase PER-1 in *Proteus vulgaris* and *Providencia stuartii* isolates from Algiers, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 4043-4.
- Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., Alouache, S., Verdet, C., Bakour, R., *et al.* (2009a) Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. *Int J Antimicrob Agents* **34**: 340-2.
- Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., Ramdani-Bougoussa, N., Lounes, S., and Bakour, R., *et al.* (2008) Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J Antimicrob Chemother* **62**: 133-6.
- Jacoby, G.A. (2005) Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin Infect Dis* **41**: 120-6.
- Jacoby, G.A. (2009) AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* **22**: 161-82.
- Jakobsen, L., Hammerum, A.M., Hansen, F., and Fuglsang-Damgaard, D. (2014) An ST405 NDM-4-producing *Escherichia coli* isolated from a Danish patient previously hospitalized in Vietnam. *J Antimicrob Chemother* **69**: 559-60.
- Jana, S., and Deb, J.K. (2006) Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**: 140-50.
- Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G., and Philippon, A. (1988) Extended-broad spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in

- Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* **10**: 867–78.
- Jaurin, B., Grundstroëm, T., and Normark, S. (1982) Sequence elements determining *ampC* promoter strength in *E. coli*. *EMBO J* **1**: 875-81.
- Jaurin, B., Grundstroëm, T., Edlund, T., and Normark, S. (1981) The *E. coli* β -lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature* **290**: 221-25.
- Johnson, J.R., and Russo, T.A. (2005) Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**: 383-404.
- Joly, B., et Reynaud, A. (2007) Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. *Edition Tec et Doc Paris* **p**: 3-182.
- Kao, C.Y., Wu, H.M., Lin, W.H., Tseng, C.C., Yan, J.J., Wang, M.C., *et al.* (2016) Plasmid mediated quinolone resistance determinants in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia in a university hospital in Taiwan, 2001–2015. *Sci Rep* **6**: 32281.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**: 123-40.
- Karim, A., Poirel, L., Nagarajan, S., and Nordmann, P. (2001) Plasmid-mediated extended spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*. *FEMS Microbiol Lett* **201**: 237–41.
- Kattan, J.N., Villegas, M.V., and Quinn, J.P. (2008) New developments in carbapenems. *Clin Microbiol Infect* **14**: 1102-11.
- Kauffmann, F. (1947) The serology of the coli group. *J Immunol* **57**: 71-100.
- Khennouchi, N.C., Loucif, L., Boutefnouchet, N., Alleg, H., and Rolain, J.M. (2015) MALDI-TOF MS as a tool to detect a nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase- and *armA* methyltransferase-producing *Enterobacter cloacae* clinical isolates, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 6477–83.
- Kiiru, J., Kariuki, S., Goddeeris, B.M., Revathi, G., Maina, T.W., Ndegwa, D.W., *et al.* (2011) *Escherichia coli* strains from Kenyan patients carrying conjugatively transferable broad-spectrum β -lactamase, *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and 16S rRNA methyltransferase genes. *J Antimicrob Chemother* **66**: 1639-42.
- Kilic, A., Aktas, Z., Bedir, O., Gumral, R., Bulut, Y., Stratton, C., *et al.* (2011). Identification and characterization of OXA-48 producing, carbapenem-resistant enterobacteriaceae isolates in Turkey. *Ann Clin Lab Sci* **41**: 161–6.
- Kim, H.B., Wang, M., Park, C.H., Kim, E.C., Jacoby, G.A., and Hooper, D.C. (2009) *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 3582-4.

- Kotra, L.P., Haddad, J., and Mobashery, S. (2000) Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 3249-56.
- Krishnappa, L.G., John, J., Marie, M.A.M., Gopalkrishnan, S., Pradeep, C.S., and Rani, S.R.B. (2012) Detection of pan-amino glycoside resistant Gram negative bacteria using a molecular method. *South Asian J Exp Biol* **2**: 256-8.
- Lahlaoui, H., Ben Haj Khalifa, A., and Ben Moussa, M. (2014) Epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). *Méd mal infect* **44**: 400-4.
- Lambert, T. (1997) Etat actuel de la sensibilité des bactéries aux aminosides. *Réan Urg* **6**: 9-16.
- Lambert, T. (2006) Aminosides et bactéries à GRAM négatif. In. Courvalin, P., Leclerck, R., and Bingen, E. *Antibiogramme. Paris ESKA 2ème édition* **19**: 227-46.
- Larabi, K., Masmoudi, A., and Fendri, C. (2003) Bacteriological and susceptibility study of 1930 strains isolated from UTIs in a Tunis university hospital. *Med Mal Infect* **33**: 348–52.
- Laurettil, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., *et al.* (1999) Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1584-90.
- Lavigne, J.P., Sotto, A., Merle, C., Jourdan, J., Soussy, C.J., and Sirot, D. (2002) Enzymatic resistance of *Escherichia coli* to beta-lactams and clinical prevalence. *Pathol Biol* **50**: 388-93.
- Lee, K., Lee, M., Shin, J.H., Lee, M.H., Kang, S.H., Park, A.J., *et al.* (2006) Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Microb Drug Resist* **12**: 44–49.
- Leigue, L., Warth, J.F., Melo, L.C., Silva, K.C., Moura, R.A., Barbato, L., *et al.* (2015) MDR ST2179-CTX-M-15 *Escherichia coli* co-producing RmtD and AAC(6)-Ib-cr in a horse with extraintestinal infection, Brazil. *J Antimicrob Chemother* **70**: 1263-5.
- Leotard, S., and Negrin, N. (2010) Epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamase in GRASSE hospital (2005–2008). *Pathol Biol* **58**: 35-8.
- Leshner, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H., and Brundage, R.P. (1962) 1,8-Naphthyridine Derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem* **91**: 1063-65.
- Levine, C., Hiasa, H., and Marians, K.J. (1998) DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta* **1400**: 29-43.

- Levine, M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**: 377-89.
- Lewis 2nd, J.S., Herrera, M., Wickes, B., Patterson, J.E., and Jorgensen, J.H. (2007) First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 4015–21.
- Lindsey, R.L., Fedorka-Cray, P.J., Frye, J.G., and Meinersmann, R.J. (2009) IncA/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1908–15.
- Literacka, E., Bedenic, B., Baraniak, A., Fielt, J., Tonkic, M., Jajic-Bencic, I., *et al.* (2009) *bla*_{CTX-M} genes in *Escherichia coli* strains from Croatian hospitals are Located in new (*bla*_{CTX-M-3a}) and widely spread (*bla*_{CTX-M-3a} and *bla*_{CTX-M-15}) genetic structures. *Antimicrob Agents Chemother* **4**: 1630-5.
- Liu, H., Wang, Y., Wang, G., Xing, Q., Shao, L., Dong, X., *et al.* (2015) The prevalence of *Escherichia coli* strains with extended spectrum beta-lactamases isolated in China. *Front Microbiol* **6**: 335.
- Liu, J.H., Deng, Y.T., Zeng, Z.L., Gao, J.H., Chen, L., Arakawa, Y., *et al.* (2008) Coprevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA Methylase RmtB-Producing *Escherichia coli* Isolates from Pigs. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 2992-3.
- Liu, X., Liu, H., Li, Y., and Hao, C. (2016) High Prevalence of β -lactamase and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* from Dogs in Shaanxi, China. *Front Microbiol* **7**: 1843.
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., *et al.* (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* **16**: 161–168.
- Livermore, D.M. (1995) Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**: 557-84.
- Livermore, D.M. (2008) Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect* **14**: 3-10.
- Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., *et al.* (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* **59**: 165-74.
- Loli, A., Tzouvelekis, L.S., Tzelepi, E., Carattoli, A., Vatopoulos A.C., Tassios, P.T., *et al.* (2006) Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{VIM-1}. *J Antimicrob Chemother* **58**: 669-72.

- Low, A.S., McKenzie, F.M., Gould, I.M., and Booth, I.R. (2001) Protected environments allow parallel evolution of a bacterial pathogen in a patient subjected to long-term antibiotic therapy. *Mol Microbiol* **42**: 619-30.
- Machado, E., Cantón, R., Baquero, F., Galán, J.C., Rollán, A., Peixe, L., *et al.* (2005) Integron Content of Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 1823-9.
- Machuca, J., Agüero, J., Miró, E., Conejo, M.D., Oteo, J., Bou, G., *et al.* (2016) Prevalence of quinolone resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* producing acquired AmpC β -lactamases and/or carbapenemases in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.
- Magnet, S., and Blanchard, J.S. (2005) "Molecular insights into aminoglycoside action and resistance." *Chem Rev* **105**: 477-98.
- Maiden, M.C. (2006) Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 561-88.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., *et al.* (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3140-5.
- Mainardi, J.L., Mugnier, P., Coutrot, A., Buu-Hoi, A., Collatz, E., and Gutmann, L. (1997) Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents chemother* **41**: 2352-4.
- Malek, M.M., Amer, F.A., Allam, A.A., El-Sokkary, R.H., Gheith, T., and Arafa, M.A. (2015) Occurrence of classes I and II integrons in *Enterobacteriaceae* collected from Zagazig University Hospitals, Egypt. *Front Microbiol* **6**: 601.
- Mamlouk, K., Boutiba-Ben Bakour, I., Gautie, V., Vimont, S., Picard, B., Ben Redjeb, S., *et al.* (2006) Emergence and outbreaks of CTX-M extended spectrum β -lactamase producing *Echerichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital. *J Clin Microbiol* **44**: 4049–56.
- Mammeri, H., Poirel, L., and Nordmann, P. (2007) Extension of the hydrolysis spectrum of AmpC β -lactamase of *Escherichia coli* due to amino acid insertion in the H-10 helix. *J Antimicrob Chemother* **60**: 490–94.
- Mammeri, H., Poirel, L., Fortineau, N., and Nordmann, P. (2006) Naturally occurring extended-spectrum cephalosporinases in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 2573–76.
- Mammeri, H., Nazic, H., Naas, T., Poirel, L., Léotard, S., and Nordmann, P. (2004) AmpC β -lactamase in an *Escherichia coli* clinical isolate confers resistance to expanded spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4050–3.

- Marcadé, G., Deschamps, C., Boyd, A., Gautier, V., Picard, B., Branger, C., *et al.* (2009) Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* **63**: 67–71.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A., and Jacoby, G.A. (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**: 797-9.
- Martinez-Medina, M., Mora, A., Blanco, M., Lopez, C., Alonso, M.P., Bonacorsi, S., *et al.* (2009) Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. *J Clin Microbiol* **47**: 3968-79.
- Mathlouthi, N., Al-Bayssari, C., Bakour, S., Rolain, J.M., and Chouchani, C. (2016) Prevalence and emergence of carbapenemases-producing Gram-negative bacteria in Mediterranean basin. *Crit Rev Microbiol* **7**: 1-19.
- Matsumura, Y., Yamamoto, M., Nagao, M., Ito, Y., Takakura, S., and Ichiyama, S. (2013) Association of Fluoroquinolone Resistance, Virulence Genes, and IncF Plasmids with Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Sequence Type 131 (ST131) and ST405 Clonal Groups. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 4736-42.
- Mavroidi, A., Miriagou, V., Liakopoulos, A., Tzelepi, E., Stefos, A., Dalekos, G.N., *et al.* (2012) Ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Central Greece: mechanisms of resistance and molecular identification. *BMC Infect Dis* **12**: 371-6.
- Mavroidi, A., Miriagou, V., Malli, E., Stefos, A., Dalekos, G.N., Tzouveleki, L.S., *et al.* (2012) Emergence of *Escherichia coli* sequence type 410 (ST410) with KPC-2 β -lactamase. *Int J Antimicrob Agents* **39**: 247–50.
- Medboua-Benbalagh, C., Touati, A., Kermas, R., Gharout-Sait, A., Brasme, L., Mezhoud, H., *et al.* (2017) Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Strains Is Associated with Worse Outcome in Patients Hospitalized in the Pediatric Oncology Unit of Beni-Messous Hospital in Algiers, Algeria. *Microb Drug Resist.*
- Meguenni, N., Le Devendec, L., Jouy, E., Le Corvec, M., Bounar-Kechih, S., Bakour, R., *et al.* (2015) First Description of an Extended-Spectrum Cephalosporin and Fluoroquinolone-Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* Clone in Algeria. *Avian Dis* **59**: 20-3.
- Meradji, S., Barguigua, A., Bentakouk, M.C., Nayme, K., Zerouali, K., Mazouz, D., *et al.* (2016) Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria. *Burns* **42**: 906-18.
- Mérens, A., and Servonnet, A. (2010) Mechanisms and epidemiology of fluoroquinolone resistance in 2010. *Rev Francoph Lab* **422**: 33-41.

- Mesli, E., Berrazeg, M., Drissi, M., Bekkhoucha, S.N., and Rolain, J.M. (2013) Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo β -lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int J Infect Dis* **17**: 739–43.
- Mezhoud, H., Boyen, F., Touazi, L.H., Garmyn, A., Moula, N., Smet, A., *et al.* (2015) Extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in broiler breeding roosters: Presence in the reproductive tract and effect on sperm motility. *Anim Reprod Sci* **159**: 205–11.
- Mitsuyama, J., Itoh, Y., Takahata, M., Okamoto, S., and Yasuda, T. (1992) In vitro antibacterial activities of tosylfloxacin against and uptake of tosylfloxacin by outer membrane mutants of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 2030–6.
- Mkaouar, D., Mahjoubi, F., Mezghani, S., Znazen, A., Ktari, S., and Hammami, A. (2008) Resistance to third generation cephalosporins in Sfax hospitals, Tunisia (1999-2005). *Med Mal infect* **38**: 293–8.
- Mnif, B., Harhour, H., Jdidi, J., Mahjoubi, F., Genel, N., Arlet, G., *et al.* (2013) Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Tunisia and characterization of their virulence factors and plasmid addiction systems. *BMC Microbiol* **13**: 147.
- Mokady, D., Gophna, U., and Ron, E.Z. (2005) Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* **43**: 66–73.
- Monnet, D.L. (2000) Antibiotic use and bacterial resistance. *Ann Fr Anesth Reanim* **19**: 409–17.
- Mora, A., Herrera, A., Lopez, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J.M., *et al.* (2011) Characteristics of the Shiga-toxin producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *Int Microbiol* **14**: 121–41.
- Moremi, N., Manda, E.V., Falgenhauer, L., Ghosh, H., Imirzalioglu, C., Matee, M., *et al.* (2016) Predominance of CTX-M-15 among ESBL Producers from Environment and Fish Gut from the Shores of Lake Victoria in Mwanza, Tanzania. *Front Microbiol* **7**: 1862.
- Moutachakkir, M., Chinbo, M., Elkhoudri, N., and Soraa, N. (2015) Antibiotic resistance of uropathogenic *Enterobacteriaceae* in pediatric wards at the University Hospital of Marrakech. *J Ped Puericult* **28**: 16–22.
- Muir, A., and Weinbren, M.J. (2010) New Delhi metallo- β -lactamase: a cautionary tale. *J Hosp Infect* **75**: 239–40.
- Mulvey, M.R., Bryce, E., Boyd, D., Ofner-Agostini, M., Christianson, S., Simor, A.E., *et al.* (2004) Ambler class A extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1204–14.

- Mulvey, M.R., Bryce, E., Boyd, D.A., Ofner-Agostini, M., Land, A.M., Simor, A.E., *et al.* (2005) Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 358–65.
- Mushtaq, S., Irfan, S., Sarma, J.B., Doumith, M., Pike, R., Pitout, J., *et al.* (2011) Phylogenetic diversity of *Escherichia coli* strains producing NDM-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* **66**: 2002-5.
- Musumeci, R., Rausa, M., Giovannoni, R., Cialdella, A., Bramati, S., Sibra, B., *et al.* (2012) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolated in a teaching hospital of northern Italy. *Microb Drug Resist* **18**: 33-41.
- Naas, T., and Nordmann, P. (1994) Analysis of a carbapenem hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7693–7.
- Naas, T., Bentchouala, C., Cuzon, G., Yaou, S., Lezzar, A., Smati, F., *et al.* (2011) Outbreak of *Salmonella enterica* serotype *Infantis* producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* **38**: 135-9.
- Naas, T., Bentchouala, C., Lima, S., Lezzar, A., Smati, F., Scheffel, J.M., *et al.* (2009) Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* *Senftenberg* isolates from Algeria. *J Antimicrob Chemother* **64**: 866-8.
- Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., and Nordmann, P. (2001) Characterization of In53, a class 1 plasmid and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol* **183**: 235-49.
- Naas, T., Oxacelay, C., and Nordmann, P. (2007) Identification of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 223-30.
- Nakano, R., Okamoto, R., Nakano, Y., Kaneko, K., Okitsu, N., Hosaka, Y., *et al.* (2004) CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC β -lactamase with an *ampR* gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1151–8.
- Nation, R.L., Li, J., Cars, O., Couet, W., Dudley, M.N., Kaye, K.S., *et al.* (2015) Framework for optimization of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *Lancet Infect Dis* **15**: 225–34
- Nauciel, C., et Vildé, J.L. (2005) Bactériologie médicale. 2^{ème} édition p: 45.
- Nelson, E.C., and Elisha, B.G. (1999) Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 957–9.

- Neuwirth, C., Siebor, E., Lopez, J., Pechinot, A., and Kazmierczak, A. (1996) Outbreak of TEM-24-Producing *Enterobacter aerogenes* in an Intensive Care Unit and Dissemination of the Extended-Spectrum β -Lactamase to Other Members of the Family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* **34**: 76–9.
- Nguyen, J.C., and Lambert, T. (2012) Interpretative analysis of aminoglycoside resistance by the antibiogram. *Rev Francoph Lab* **445**: 75-77.
- Nicolas-Chanoine, M.H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M.P., Caniça, M.M., *et al.* (2008) Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* **61**: 273–81.
- Nicolas-Chanoine, M.H., Jarlier, V., and La Collégiale de bactériologie-virologie hygiène hospitalière de l'Assistance publique, Hôpitaux de Paris, France. (2008) Extended-spectrum beta-lactamases in long-term-care facilities. *Clin Microbiol Infect* **14**: 111–6.
- Niederman, M.S. (2003) Appropriate use of antimicrobial agents: challenges and strategies for improvement. *Crit Care Med* **31**: 608–16.
- Nishino, K., and Yamaguchi, A. (2001) Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 5803-12.
- Njall, C., Adio, D., Bit, A., Ateba, N., Sume, G., Kollo, B., *et al.* (2013) Bacterial ecology of nosocomial infection in intensive care unit of Laquintinie hospital Douala, Cameroon. *Pan Afr Med J* **14**: 140.
- Nordmann, P., and Carrer, A. (2010) Carbapenemases in enterobacteriaceae. *Arch Pediatr* **17**: 154-62.
- Nordmann, P., and Mammeri, H. (2007) Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol* **2**: 297-307.
- Nordmann, P., Cuzon, G., and Naas, T. (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* **9**: 228-36.
- Nordmann, P., Dortet, L., and Poirel, L. (2012) Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med* **18**: 263-72.
- Nordmann, P., Naas, T., and Poirel, L. (2011) Global spread of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Emerging Infect Dis* **17**: 1791–8.
- Norman, A., Hansen, L.H., She, Q., and Sørensen, S.J. (2008) Nucleotidesequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* **60**: 59-74.
- Nouetchognou, J.S., Ateudjieu, J., Jemea, B., Mesumbe, E.N., and Mbanya, D. (2016) Surveillance of nosocomial infections in the Yaounde University Teaching Hospital, Cameroon. *BMC Res Notes* **9**: 505.

- Nurizzo, D., Shewry, S.C., Perlin, M.H., Brown, S.A., Dholakia, J.N., Fuchs, R.L., *et al.* (2003) "The crystal structure of aminoglycoside-3'-phosphotransferase-IIa, an enzyme responsible for antibiotic resistance." *J Mol Biol* **327**: 491-506.
- Ochman, H., and Selander, R.K. (1984) Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* **157**: 690-3.
- Olaitan, A.O., Chabou, S., Okdah, L., Morand, S., and Rolain, J.M. (2016) Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* **16**: 147.
- Orskov, F., Orskov, I., Evans, D.J., Sack, R.B., Sack, D.A., and Wadstrom, T. (1976) Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoea in adults and children. *Med Microbiol Immunol* **162**: 73-80.
- Osano, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Horii, T., Ito, H., *et al.* (1994) Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 71-8.
- Oteo, J., Delgado-Iribarren, A., Vega, D., Bautista, V., Cruz Rodriguez, M., Velasco, M., *et al.* (2008) Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. *Int J Antimicrob Agents* **32**: 534-7.
- Papanicolaou, G.A., Medeiros, A.A., and Jacoby, G.A. (1990) Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 2200-9.
- 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. *J Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3953-5.
- Paterson, D.L., and Bonomo, R.A. (2005) Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* **18**: 657-86
- Paterson, D.L., and Harris, P.N.A. (2016) Colistin resistance: a major breach in our last line of defense. *Lancet Infect Dis* **16**: 132-3.
- Payne, D.J., Woodford, N., and Amyes, S.G.B. (1992) Characterization of the plasmid mediated β -lactamase BIL-1. *J Antimicrob Chemother* **30**: 119-27.
- Peirano, G., and Pitout, J.D.D. (2010) Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents* **35**: 316-21.
- Peirano, G., Mulvey, G.L., Armstrong, G.D., and Pitout, J.D. (2013) Virulence potential and adherence properties of *Escherichia coli* that produce CTX-M and NDM β -lactamases. *J Med Microbiol* **62**: 525-30.

- Perichon, B., Courvalin, P., and Galimand, M. (2007) Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 2464-9.
- Perna, N.T., Plunkett III, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., *et al.* (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**: 529-33.
- Perreten, V., Strauss, C., Collaud, A., and Gerber, D. (2016) Colistin Resistance Gene *mcr-1* in avian pathogenic *Escherichia coli* in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 4414-5.
- Peter-Getzlaff, S., Polsfuss, S., Poledica, M., Hombach, M., Giger, J., Böttger, E.C., *et al.* (2011) Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli* : comparison of three phenotypic confirmation assay and genetic analysis. *J Clin Microbiol* **49**: 2924-32.
- Pfeifer, Y., Cullik, A., and Witte, W. (2010) Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* **300**: 371-9.
- Pfeifer, Y., Witte, W., Holfelder, M., Busch, J., Nordmann, P., and Poirel, L. (2011) NDM-1-Producing *Escherichia coli* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 1318-9.
- Philippon, A. (2008) Entérobactéries des bêtalactamines. *Elsevier Masson SAS, Paris, Biologie clinique* **90-05-0145**: 1-18.
- Philippon, A. (2013) Extended-spectrum beta-lactamases. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* **28**: 287-96.
- Philippon, A., and Arlet, G. (2006) Beta-lactamases of Gram negative bacteria: never-ending clockwork! *Ann Biol Clin* **64**: 37-51.
- Philippon, A., Arlet, G., and Jacoby, G.A. (2002) Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1-11.
- Philippon, A., Ben Redjeb, S., Fournier, G., and Ben Hassen, A. (1989) Epidemiology of extended spectrum beta-lactamases. *Infect* **17**: 347-54.
- Piddock, L.J. (1999) Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs* **58**: 11-8.
- Pitout, J., and Laupland, K.B. (2008) Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* **8**: 159-66.
- Pitout, J.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(6')-Ib-cr*. *J Antimicrob Chemother* **61**: 999-1000.

- Pohl, P. (1993) Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Ann Méd Vét* **137**: 325-333.
- Poirel, L., Abdelaziz, M.O., Bernabeu, S., and Nordmann, P. (2013) Occurrence of OXA-48 and VIM-1 carbapenemase-producing *enterobacteriaceae* in Egypt. *Int J Antimicrob Agents* **41**: 90–1.
- Poirel, L., Bernabeu, S., Fortineau, N., Podglajen, I., Lawrence, C., and Nordmann, P. (2011) Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in France. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 4937–8.
- Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., Nordmann, P. (2004) Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 15-22.
- Poirel, L., Lagrutta, E., Taylor, P., Pham, J., and Nordmann, P. (2010) Emergence of Metallo- β -Lactamase NDM-1-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Australia. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 4914-6.
- Poirel, L., Pitout, J.D., and Nordmann, P. (2007) Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* **2**: 501–12.
- Poirel, L., Potron, A., and Nordmann, P. (2012) OXA-48-like carbapenemase: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* **67**: 1597-606.
- Pokhrel, R.H., Thapa, B., Kafle, R., Shah, P.K., and Tribuddharat, C. (2014) Co-existence of beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* from Kathmandu, Nepal. *BMC Res Notes* **7**: 694.
- Poole, K. (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* **56**: 20-51.
- Prescott, L.M., Klein, D.A., et Harley, J.P. (2010) *Microbiologie 3ème édition De Boeck* 1088 pages.
- Putman, M., van Veen, H.W., and Konings, W.N. (2000) Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 672-93.
- Queenan, A.M., and Bush, K. (2007) Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* **20**: 440–58.
- Rahal, K., Belouni, R., Tali-Maamar, H., Boudouane, M., Missoum, M.F.K., Benslimani, A., et al. (2010) Rapport d'évaluation : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.
- Rahal, K., Belouni, R., Tali-Maamar, H., Boudouane, M., Missoum, M.F.K., Benslimani, A., et al. (2011) Rapport d'évaluation : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.

- Rahal, K., Belouni, R., Tali-Maamar, H., Boudouane, M., Missoum, M.F.K., Benslimani, A., *et al.* (2012) Rapport d'évaluation : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.
- Rahal, K., Belouni, R., Tali-Maamar, H., Boudouane, M., Missoum, M.F.K., Benslimani, A., *et al.* (2015) Rapport d'évaluation : Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques.
- Ramdani-Bouguessa, N., Mendonca, N., Leitao, J., Ferreira, E., Tazir, M., and Canica, M. (2006) CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *J Clin Microbiol* **44**: 4584-86.
- Ramirez, M.S., and Tolmasky, M.E. (2010) Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* **13**: 151-71.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S., Mongodin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P., *et al.* (2008) The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol* **190**: 6881-93.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H., *et al.* (2006) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* **12**: 83-88.
- Robin, F., Aggoune-Khinache, N., Delmas, J., Naim, M., and Bonnet, R. (2010) Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 466-70.
- Robin, F., Gibold, L., and Bonnet, R. (2012) Intrinsic or acquired resistant to β -lactams in *Enterobacteriaceae*: How to identify them in clinical practice? *Rev Francoph Lab* **445**: 47-58.
- Rodriguez-Martinez, J.M., Nordmann, P., Fortineau, N., and Poirel, L. (2010) VIM-19, a metallo-beta-lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 471-6.
- Rodriguez-Martinez, J.M., Velasco, C., Garcia, I., Cano, M.E., Martinez- Martinez, L., and Pascual, A. (2007) Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for *Enterobacteriaceae* expressing the plasmid-carried quinolone resistance determinant *qnrA1*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 2236-9.
- Rodriguez-Villalobos, H., and Struelens, M.J. (2006) Extended spectrum β -lactamases mediated bacterial resistance: Implications for the intensivist. *Réanim* **15**: 205-13.
- Rogers, B.A., Sidjabat, H.E., and Paterson, D.L. (2011) *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother* **66**: 1-14.
- Rohde, H., Qin, J., Cui, Y., Li, D., Loman, N.J., Hentschke, M., *et al.* (2011) Open-source genomic analysis of shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. *N Engl J Med* **365**: 718-24.

- Rolain, J.M., and Olaitan, A.O. (2016) Plasmid-mediated colistin resistance: the final blow to colistin? *Int J Antimicrob Agents* **47**: 4-5.
- Rossolini, G.M., D'Andrea, M.M., and Mugnaioli, C. (2008) The spread of CTX-M-type extended spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* **14**: 33-41.
- Ruiz, S.J., Montealegre, M.C., Ruiz-Garbajosa, P., Correa, A., Briceño, D.F., Martinez, E., *et al.* (2011) First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clones causing community-onset infections in South America. *J Clin Microbiol* **49**: 1993-6.
- Ruppé, E. (2010) Epidemiology of expanded-spectrum beta-lactamases: The rise of CTX-M. *Antibiotiques* **12**: 3-16.
- Saenz, Y., Zarazaga, M., Brinas, L., Ruiz-Larrea, F., and Torres, C. (2003) Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother* **51**: 1001-5.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-7.
- Sassi, A., Loucif, L., Gupta, S.K., Dekhil, M., Chettibi, H., and Rolain, J.M. (2014) NDM-5 carbapenemase-encoding gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 5606-8.
- Savageau, M.A. (1983) *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene-control. *Am Nat* **122**: 732-44.
- Scheftel, J.M., Weber, M., et le Groupe Français « USI ». (1994) Résistance à 16 antibiotiques de 3876 bacilles à Gram négatif aérobies isolés dans 39 centres de soins intensifs en France (1991). *Méd Mal Infect* **24**: 255-62.
- Schwartz, D.C., and Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**: 67-75.
- Seng, P., Rolain, J.M., Fournier, P.E., La, S.B., Drancourt, M., and Raoult, D. (2010) MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol* **5**: 1733-54.
- Shah, P.M., and Stille, W. (1983) *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains more susceptible to cefoxitin than to third generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* **11**: 597-8.
- Shahcheraghi, F., Rahmati Ghezelgeh, F., Nobari, S., Torabi, E., Mousavi, S.F., Aslani, M.M., *et al.* (2014) Identification and characterization of class 1 integrons among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children under 5 years of age. *Iran J Microbiol* **6**: 156-62.

- Shakil, S., Khan, R., Zarrilli, R., and Khan, A.U. (2008) Aminoglycosides versus bacteria--a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci* **15**: 5-14.
- Sirot, D., Siro, J., Labia, R., Morand, A., Courvalin, P., Darfeuille-Michaud, A., *et al.* (1987) Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* **20**: 323-34.
- Sirot, J. (1996) Detection of extend-spectrum plasmid mediated betalactamases by disk diffusion. *Clin Microbiol Infect* **2**: 35-9.
- Siu, L.K., Lu, P.L., Chen, J.Y., Lin, F.M., and Chang, S.C. (2003) High-level expression of AmpC β -lactamase due to insertion of nucleotides between 10 and 35 promoter sequences in *Escherichia coli* clinical isolates: cases not responsive to extended-spectrum-cephalosporin treatment. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2138-44.
- Skurnik, D, Le Menac'h, A, Zurakowski, D, Mazel, D., Courvalin, P., Denamur, E., *et al.* (2005) Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3062-5.
- Smaoui, S., Abdelhedi, K., Marouane, C., Kammoun, S., and Messadi-Akrout, F. (2015) Antibiotic resistance of community-acquired uropathogenic *Enterobacteriaceae* isolated in Sfax (Tunisia). *Med Mal Infect* **45**: 335-7.
- Solé, M., Pitart, C., Roca, I., Fàbrega, A., Salvador, P., Muñoz, L., *et al.* (2011) First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 4402-4.
- Soulier-Chapuis, A., (2012) Recherche d'un portage digestif d'entérobactéries productrices de méthylase et caractérisation de ces souches. Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne.
- Soussy, C.J. (2006) Quinolones et bactéries à GRAM négatif. In: Courvalin, P., Leclercq, R., and Bingen, E. Antibiogramme. *Paris ESKA 2ème édition* **21**: 261-77.
- Soussy, C.J., Cavallo, J.D., Courcol, R., Drugeon, H., Fabre, R., Jarlier, V., *et al.* (2000) Antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated in 1998 and 1999: results of a french multicenter study. *Med Mal Infect* **30**: 650-6.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., and Robicsek, A. (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* **22**: 664-89.
- Taber, H.W., Mueller, J.P., Miller, P.F., and Arrow, A.S. (1987) Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev* **51**: 439-57.

- Tagajdid, M.R., Boumhil, L., Iken, M., Adnaoui, M., and Benouda, A. (2008) Resistance to fluoroquinolones and third generation cephalosporin of *Escherichia coli* from urines. *Med Mal Infect* **40**: 70-3.
- Talon, D., Lallemand-De-Conto, S., Thouverez, M., and Bertrand, X. (2004) *E. coli*: resistance to quinolones and β -lactams of clinical strains isolated in the Franche-Comté region of France. *Pathol Biol* **52**: 76–81.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., and Denamur, E. (2010) The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **8**: 207-17.
- Tenover, F.C. (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* **34**: 3–10.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., *et al.* (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**: 2233–9.
- Tian, G.B., Rivera, J.I., Park, Y.S., Johnson, L.E., Hingwe, A., Adams-Haduch, J.M., *et al.* (2011) Sequence type ST405 *Escherichia coli* isolate producing QepA1, CTX-M-15 and RmtB from Detroit, Michigan. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 3966–7.
- Tórtola, M.T., Lavilla, S., Miró, E., González, J.J., Larrosa, N., Sabaté, M., *et al.* (2005) First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3492–4.
- Touati, A., Benallaoua, S., Djoudi, F., Madoux, J., Brasme, L., and de Champs, C. (2007) Characterization of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from hospital environments in Algeria. *Microb Drug Resist* **13**: 85-9.
- Touati, A., Benallaoua, S., Forte, D., Madoux, J., Brasme, L., and De Champs, C. (2006) First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Béjaïa, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* **27**: 397–402.
- Touati, A., Medboua, C., Touati, D., Denine, R., Brasme, L., and de Champs, C. (2012) CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algiers (Algeria). *Int Res J Microbiol* **3**: 181-5.
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., *et al.* (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* **5**: e1000344.
- Tran, J.H., and Jacoby, G.A. (2002) Mechanisms of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 5638–42.
- 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* **19**: 118–25.

- Trystram, D., Chardon, H., Péan, Y., Delarbre, J.M., Costa, Y., Maugat, S., *et al.* (2013) Réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (EARS-NET) : résultats 2001-2010 pour la France et place en Europe. *J Pédiat Puéricult* **26**: 73-78.
- Tzouveleakis, L.S., Tzelepi, E., Tassios, P.T., and Legakis, N.J. (2000) CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* **14**: 137–42.
- Vakulenko, S.B., and Mobashery, S. (2003) Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* **16**: 430-50.
- Vatopoulos, A. (2008) High rates of metallo-beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece – a review of the current evidence. *Euro Surveill* **13** (4).
- Vila, J., Ruiz, J., Marco, F., Barcelo, A., Goni, P., Giralt, E., *et al.* (1994) Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 2477-9.
- Villegas, M.V., Kattan, J.N., Quinteros, M.G., and Casellas, J.M. (2008) Prevalence of extended spectrum β -lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect* **14**: 154–8.
- Vodovar, D., Marcadé, G., Raskine, L., Malissin, I., and Mégarbane, B. (2013) *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum beta-lactamase: Epidemiology, risk factors, and prevention. *Rev Med Interne* **34**: 687-93.
- Wachino, J., and Arakawa, Y. (2012) Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat* **15**: 133–48.
- Wachino, J., Shibayama, K., Kurokawa, H., Kimura, K., Yamane, K., Suzuki, S., *et al.* (2007) Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 4401-9.
- Walsh, C. (2003) Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. *ASM Press* 335 pages.
- Walsh, T.R. (2005) The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **6**: 2-9.
- Walsh, T.R. (2010) Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* **36**: 8–14.
- Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., and Nordmann, P. (2005) “Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm?” *Clin Microbiol Rev* **18**: 306-25.
- Walther-Rasmussen, J., and Hoiby, N. (2007) Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* **60**: 470–82.

- Wang, D., Huang, X., Chen, J., Mou, Y., Li, H., and Yang, L. (2015) Characterization of genetic structures of the *qepA3* gene in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Front Microbiol* **6**: 1147.
- Weill, F.X., Guesnier, F., Guibert, V., Timinouni, M., Demartin, M., Polomack, L., *et al.* (2006) Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* from humans in France (1993 to 2003). *J Clin Microbiol* **44**: 700–8.
- Williamson, D.A., Sidjabat, H.E., Freeman, J.T., Roberts, S.A., Silvey, A., Woodhouse, R., *et al.* (2012) Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing *Enterobacteriaceae* from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents* **39**: 529-33.
- Winokur, P.L., Canton, R., Casellas, J.M., and Legakis, N. (2001) Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis* **32**: 94-103.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., *et al.* (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* **60**: 1136–51.
- Wohlkonig, A., Chan, P.F., Fosberry, A.P., Homes, P., Huang, J., Kranz, M., *et al.* (2010) Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1152-3.
- Woodford, N., Reddy, S., Fagan, E.J., Hill, R.L., Hopkins, K.L., Kaufmann, M.E., *et al.* (2007) Wide geographic spread of diverse acquired AmpC β -lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in the UK and Ireland. *J Antimicrob Chemother* **59**: 102–105.
- Woodford, N., Ward, M.E., Kaufmann, M.E., Turton, J., Fagan, E.J., James, D., *et al.* (2004) Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* **54**: 735–43.
- Wright, G.D. (2008) Mechanisms of Aminoglycoside Antibiotic Resistance. In: Wax, R.G., Lewis, K., Salyers, A.A., and Taber, H. *Bacterial Resistance to Antimicrobials*. *CRC Press Taylor & Francis Group New York 2^{ème} edition* p: 345.
- Wu, K., Wang, F., Suna, J., Wanga, Q., Chenb, Q., Yub, S., *et al.* (2012) Class 1 integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China. *Int J Antimicrob Agents* **40**: 264–7.
- Wu, Q., Zhang, Y., Han, L., Sun, J., and Ni, Y. (2009) Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 271-2.

- Xia, J., Sun, J., Li, L., Fang, L.X., Deng, H., Yang, R.S., *et al.* (2015) First Report of the IncII/ST898 Conjugative Plasmid Carrying *rmtE2* 16S rRNA Methyltransferase Gene i in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 7921-2.
- Yahiaoui, M., Robin, F., Bakour, R., Hamidi, M., Bonnet, R., and Messai, Y. (2015) Antibiotic Resistance, Virulence, and Genetic Background of Community-Acquired Uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. *Microb Drug Resist* **21**: 516-26.
- Yaici, L., Haenni, M., Saras, E., Boudehouche, W., Touati, A., and Madec, J.Y. (2016) *bla*_{NDM-5}-carrying IncX3 plasmid in *Escherichia coli* ST1284 isolated from raw milk collected in a dairy farm in Algeria. *J Antimicrob Chemother* **71**: 2671-2.
- Yamane, K., Wachino, J., Doi, Y., Kurokawa, H., and Arakawa, Y. (2005) Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerging Infect Dis* **11**: 951-3.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., *et al.* (2007b) New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 3354-60.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., *et al.* (2007a) 16S rRNA methylase-producing gram-negative pathogens, Japan. *Emerging Infect Dis* **13**: 642-6.
- Yamasaki, K., Komatsu, M., Abe, N., Fukuda, S., Miyamoto, Y., Hiquchi, T., *et al.* (2010) Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol* **48**: 3267-73.
- Yan, J.J., Wu, J.J., Ko, W.C., Tsai, S.H., Chuang, C.L., Wu, H.M., *et al.* (2004) Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J Antimicrob Chemother* **54**: 1007-12.
- Yanat, B., Rodríguez-Martínez, J.M., and Touati, A. (2016d) Plasmid-mediated quinolone resistance in *Enterobacteriaceae*: a systematic review with a focus on Mediterranean countries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **36**: 421-435.
- Yanat, B., Vinuesa, T., Vinas, M., and Touati, A. (2014) Determinants of quinolone resistance in *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in Bejaia, Algeria. *Asian Pac J Trop Med* **7**: 462-7.
- Yanat, B., Dali Yahia, R., Yazı, L., Machuca, J., Díaz-De-Alba, P., Touati, A., *et al.* (2016c) Occurrence of the Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance *qepA1* Gene in Two Clonal Clinical Isolates of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* from Algeria. *Microb Drug Resist*.
- Yanat, B., Machuca, J., Díaz-De-Alba, P., Mezhoud, H., Touati, A., Pascual, Á., *et al.* (2016a) Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in High-Level

- Quinolone-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates from the Community: First Report of *qnrD* Gene in Algeria. *Microb Drug Resist* **23**: 90-7.
- Yanat, B., Machuca, J., Yahia, R.D., Touati, A., Pascual, Á., and Rodríguez-Martínez, J.M. (2016b) First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate in Algeria. *Int J Antimicrob Agents* **16**: 30260-6.
- Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., *et al.* (2009) Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla_{NDM-1}*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 5046-54.
- Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., and Nakamura, S. (1990) Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 1271-2.
- Yousfi, M., Mairi, A., Bakour, S., Touati, A., Hassissen, L., Hadjadj, L., *et al.* (2015) First report of NDM-5-producing *Escherichia coli* ST 1284 isolated from dog in Bejaia, Algeria. *New Microbes New Infect* **10**: 17-8.
- Yousfi, M., Mairi, A., Touati, A., Hassissene, L., Brasme, L., Guillard, T., *et al.* (2016b) Extended spectrum β -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *J Infect Chemother* **22**: 431-5.
- Yousfi, M., Touati, A., Mairi, A., Brasme, L., Gharout-Sait, A., Guillard, T., *et al.* (2016a) Emergence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Companion Animals in Algeria. *Microb Drug Resist* **22**: 342-6.
- Yu, H.S., Lee, J.C., Kang, H.Y., Ro, D.W., Chung, J.Y., Jeong, Y.S., *et al.* (2003) Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J Clin Microbiol* **41**: 5429-33.
- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., and Cozzarelli, N.R. (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **11**: 2580-92.
- Zhanel, G.G., Hoban, D., Schurek, K., and Karlowsky, J.A. (2004) Role of efflux mechanisms on fluoroquinolones resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents* **24**: 529-35.
- Zong, Z., Partridge, S.R, Thomas, L., and Iredell, J.R. (2008) Dominance of *bla_{CTX-M}* within an Australian extended-spectrum β -lactamase gene pool. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 4198–202.

ANNEXES

Annexe 1. Préparation des solutions d'antibiotiques pour la détermination des CMI en milieu solide (Courvalin *et al.*, 2006)

Solution initiale (µg/ml)	Solution mère (ml)	Eau distillée stérile (ml)	Concentration obtenue (µg/ml)	Concentration finale dans le milieu (µg/ml)
5120	2	2	2560	256
5120	1	3	1280	128
5120	0.5	3.5	640	64
5120	0.5	7.5	320	32
320	2	2	160	16
320	1	3	80	8
320	0.5	3.5	40	4
320	0.5	7.5	20	2
20	2	2	10	1
20	1	3	5	0.5
20	0.5	3.5	2.5	0.25

Annexe 2. Article 1: Occurrence of ArmA and RmtB Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methylases in Extended-Spectrum β -Lactamases Producing *Escherichia coli* in Algerian Hospitals.



Occurrence of ArmA and RmtB Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methylases in Extended-Spectrum β -Lactamases Producing *Escherichia coli* in Algerian Hospitals

Amal Ayad^{1,2,3}, Mourad Drissi⁴, Claire de Curraize¹, Chloé Dupont⁵, Alain Hartmann⁶, Sébastien Solanas⁶, Eñano Siobor⁶, Lucie Amoureux⁶ and Catherine Nouwirth^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Manuela Caricà,
National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, Portugal

Reviewed by:

Jian-Hua Liu,
South China Agricultural University,

China

Laurent Doriel,
Bicêtre Hospital – South Paris
University, France

*Correspondence:

Catherine Nouwirth
cathern.nouwirth@chu-dijon.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 25 February 2016

Accepted: 25 August 2016

Published: 12 September 2016

Citation:

Ayad A, Drissi M, de Curraize C,
Dupont C, Hartmann A, Solanas S,
Siobor E, Amoureux L and
Nouwirth C (2016) Occurrence
of ArmA and RmtB Aminoglycoside
Resistance 16S rRNA Methylases
in Extended-Spectrum β -Lactamases
Producing *Escherichia coli* in Algerian
Hospitals. Front. Microbiol. 7:1409.
doi: 10.3389/fmicb.2016.01409

¹Laboratoire de Bactériologie Médicale, Plateau Technique de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, Dijon, France, ²Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen, Algérie, ³Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Hacène Benbouali, Chlef, Algérie, ⁴Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen, Algérie, ⁵UMR 5569, Equipe Pathogènes hydriques, Santé, Environnement* PhyGE, Université de Montpellier, France, ⁶INRA, UMR 1347 Agrobiologie, Dijon, France

The aim of this study, was to characterize the extended-spectrum- β -lactamases (ESBLs) producing clinical strains of *Escherichia coli* isolated between January 2009 and June 2012 from Algerian hospitals and to determine the prevalence of 16S rRNA methylase among them. Sixty-seven ESBL-producers were detected among the 239 isolates included: 52 CTX-M-15-producers, 5 CTX-M-3-producers, 5 CTX-M-1-producers, 2 CTX-M-14-producers, 2 SHV-12-producers and one TEM-167-producer. Among the ESBL-producing strains twelve harbored 16S rRNA methylase genes: 8 *rmtB* and 4 *armA*. *rmtB* was located on a IncFIA plasmid and *armA* was located either on a IncL/M or a IncFIA plasmid. *RmtB*-producing isolates were genotypically related and belonged to the sequence type ST 405 whereas *ArmA*-producing isolates belonged to ST10, ST 167, and ST 117. This first description of 16S rRNA methylases among *E. coli* in Algerian hospitals pointed out the necessity to establish control measures to avoid their dissemination.

Keywords: *Escherichia coli*, extended-spectrum β -lactamase, 16S rRNA methylase, *armA*, *rmtB*, Algeria

INTRODUCTION

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

in *E. coli*, in most regions of the world (Cantón and Coque, 2006). Another worrisome feature is the emergence of isolates resistant to all clinically important aminoglycosides related to the production of 16S rRNA methylases. In 2003, the first 16S rRNA methylase gene, *armA*, was identified (Galimand et al., 2003). To date eleven 16S rRNA methylases genes (*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtD2*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH*, *armA*, and *spmA*) have been identified, *armA* and *rmtB* being the most frequently described in Enterobacteriaceae (Galimand et al., 2003; Bogaerts et al., 2007; Yamane et al., 2007; Fritsche et al., 2008). As these genes are usually located on plasmids they can easily transfer to other bacteria (Nagasawa et al., 2014).

In Algeria, the first CTX-M enzymes have been reported in 2005 in clinical strains of *Salmonella enterica* from Constantine, East of Algeria (Naas et al., 2005). Since then, several surveys in the north of Algeria have reported the presence of CTX-M-type enzyme and associated resistance to non- β -lactam markers in various species of Enterobacteriaceae (Baba Ahmed-Kazi Tani and Arlet, 2014). Concerning 16S rRNA methylases only *ArmA* has been detected to date. It was identified for the first time in Enterobacteriaceae strains isolated from an Algerian patient transferred to Belgium (Bogaerts et al., 2007). It was subsequently identified in clinical isolates of *S. enterica* in Constantine associated with CTX-M-3 or CTX-M-15 (Naas et al., 2009, 2011) and in clinical strains of *Salmonella non-Typhi* in Annaba associated with CTX-M-15 and CMY-2 (Bouzeid et al., 2011). Recently, it was also described in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, and *Serratia marcescens* (Bakour et al., 2014; Belbel et al., 2014; Batah et al., 2015; Khennouchi et al., 2015).

In this study, we have characterized the ESBL-producing clinical strains of *E. coli* isolated between October 2008 and June 2012 in three hospitals in Western Algeria and determined the prevalence of 16S rRNA methylase genes among them.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains

Two hundred and thirty-nine isolates of *E. coli* collected between October 2008 and June 2012 from three different hospitals located in North-Western Algeria (Tlemcen, Sidi Bel Abbes and Oran) were included. Two hundred and thirty-seven strains were isolated from patients admitted to the intensive care unit (ICU), surgery and neurosurgery wards. Two isolates have been recovered from hospital environment. Identification was performed using the API 20E system (BioMérieux) and/or matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

Antibiotic Susceptibility Testing

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

on Antimicrobial Susceptibility Testing¹. Detection of ESBL production was performed by double disk synergy test (Jarlier et al., 1988).

Bacterial DNA Preparation, Gene Amplification, and Sequencing

Bacterial DNA preparation, gene amplification, sequencing, and nucleotide sequence analysis were performed as previously described (Siebor and Neuwirth, 2011). The primers used for the PCRs are listed in Table 2. All the isolates were analyzed for the presence of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TIM}, and *bla*_{SHV}. The resistant strains to all aminoglycosides tested were further analyzed for the presence of *armA* and *rmtB*.

Genotyping of the Isolates Producing 16S rRNA Methylase

The strains were submitted to genotypic analysis by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multilocus sequence typing (MLST). PFGE was performed following DNA digestion by *Xba*I as already described (Neuwirth et al., 1996). Restriction patterns were interpreted according to Tenover's criteria (Tenover et al., 1995), and the isolates have been classified into different pulsotypes. Pulsotypes were compared by calculation of the Dice correlation coefficient with DendroUPGMA software² and were clustered into a dendrogram by UPGMA. Strains were defined as having a clonal relationship at a criterium of 85% similarity (Ejmaes et al., 2006). MLST was performed using seven conserved housekeeping genes of *E. coli* (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *malt*, *purA*, and *recA*) as previously described (Wirth et al., 2006). The sequences types were determined by referring to the open-source software freely available at MLST Databases at the EBI, University College Cork website³.

Mating Experiments and Plasmids Analysis

Mating experiments to attempt to transfer resistance genes were carried out using rifampicin resistant *E. coli* K-12 C600 recipient strain as described previously (Chen et al., 2007). Transconjugants were selected on Drigalski agar plates containing amikacin (4 mg/L), gentamicin (4 mg/L), and rifampicin (200 mg/L), on Drigalski agar plates containing cefotaxime (4 mg/L) and rifampicin (200 mg/L), on Drigalski agar plates containing gentamicin (4 mg/L) and rifampicin (200 mg/L) and on Drigalski agar plates containing amikacin (30 mg/L) and rifampicin (200 mg/L).

Identification of plasmids by PCR-based replicon typing was performed on the donor strains and their transconjugants as described previously (Carattoli et al., 2005). Plasmid sizes were determined by digestion of whole-genome DNA with *S1* endonuclease to linearize the plasmids and PFGE to separate them. Plasmids obtained were transferred to nylon membranes and hybridized with digoxigenin-labeled specific

¹ www.eurosurv.org

² <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>

³ <http://mlst.scr.ic.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>

TABLE 1 | Antimicrobial resistance of extended-spectrum- β -lactamases producing *Escherichia coli* isolated from three hospitals in Algeria.

Antimicrobial agents	Resistance rate (%)			
	Tlemcen (n = 35)	Sidi Bel Abbes (n = 13)	Oran (n = 19)	Total (n = 67)
Ampicillin	100	100	100	100
Ampicillin-clavulanic acid	82.8	82.3	42.1	73.1
Ticarcillin	100	100	100	100
Ticarcillin-clavulanic acid	87.1	100	89.5	95.5
Piperacillin	100	100	100	100
Piperacillin-tazobactam	40	15.4	0	23.9
Ertapenem	0	0	0	0
Imipenem	0	0	0	0
Colistin	40	38.5	26.3	35.8
Ceftazidime	100	100	84.7	95.5
Ceftazidime	81.4	82.3	84.2	86.5
Cefepime	100	82.3	89.5	95.5
Aztreonam	100	100	100	100
Kanamycin	80	46.1	57.9	58.7
Gentamicin	77.1	76.9	63.2	73.1
Tobramycin	77.1	76.9	63.2	73.1
Amikacin	25.71	7.7	15.8	18.4
Netilmicin	48.6	61.5	57.9	53.7
Nalidixic acid	68.6	53.8	89.5	71.6
Ofloxacin	68.6	61.5	89.5	73.1
Ciprofloxacin	68.6	61.5	84.2	71.6
Colistin	0	0	0	0
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	80	84.6	57.9	74.6

probes [*bla*_{CTX-M group 1}, *bla*_{TEM}, *armA*, *rmlB*, and replicon groups (*IncI/M*, *IncFIA*, *IncFIB*, and *IncN*)] (Barton et al., 1995).

RESULTS

ESBL Producers

Sixty-seven ESBL-producing isolates have been detected: 35 from Tlemcen hospital, 13 from Sidi Bel Abbes hospital and 19 from Oran hospital. Isolates were mainly recovered from ICU (58.2%), followed by 26.9% from surgery department. Eighteen strains (26.9%) were recovered from wound pus, 17 (25.4%) from tracheal aspirate, 17 (25.4%) from urine and urinary catheters, 7 (10.4%) from rectal swabs, 4 (6%) from bedsores, 1 (1.5%) from catheter, 1 (1.5%) from gastric tube, and 2 (3%) from hospital environment. Among these strains 64 isolates (95.5%) carried *bla*_{CTX-M} (52 *bla*_{CTX-M-15}, 5 *bla*_{CTX-M-3}, 5 *bla*_{CTX-M-1}, 2 *bla*_{CTX-M-14}), while 2 carried *bla*_{SHV-12} and 1 *bla*_{TEM-167}.

All the ESBL-producing isolates remained susceptible to imipenem, ertapenem, and colistin and most of them to piperacillin-tazobactam (76%), ceftazidime (64.2%),

TABLE 2 | Primers used for PCRs.

Amplified DNA	Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F ₁	ATAAAATTCCTTGAAGACGAAA
	TEM-R	CTTATTCOCCTTTTGGGGG
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	GGGTATTCCTTATTTGTGGG
	SHV-R	GTTAGCGTTGGCAGTGTCTGG
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M-F	ATGTGGAGYACGAGTAA
	CTX-M-R	ACGGCRATATCCTTTGGT
<i>bla</i> _{CTX-M group I}	CTX-M-gr1-F	TOGTCCTCTCCAGA
	CTX-M-gr1-R	COGTTTCGGGTATTA
<i>bla</i> _{CTX-M group B}	CTX-M-grB-F	ATGGTGACAAGAGAGTGGCA
	CTX-M-grB-R	ACAGGCGCTTGGGGGATGATT
<i>armA</i>	armA-F	GTGGGAAACAGTGGTGG
	armA-R	GAAGTCAGGATACACCG
<i>rmlB</i>	rmlB-F	GAGACACCGATGACATC
	rmlB-R	CCCTCTGATGGCTTATC

and amikacin (80.6%). However most of the strains were resistant to all other antibiotics tested (>53%) (Table 1).

Characterization of 16S rRNA Methylase-Producers (Table 3; Supplementary Figure S1)

Twelve isolates were resistant to all aminoglycosides tested of which four strains harbored *armA* and 8 *rmlB*. *ArmA* was detected among CTX-M-15, CTX-M-1, and TEM-167-producers whereas *rmlB* was detected only among CTX-M-15-producers (Table 3). The eight *rmlB*-producing strains all originated from Tlemcen hospital belonged to pulsotype A and to ST 405. A wider diversity was observed among the four *ArmA*-producers that belonged to three different pulsotypes (B, C, and D) and three different ST: ST10 (one isolate from Sidi Bel Abbes hospital), ST167 (one from Tlemcen hospital), and ST117 (two isolates from Oran hospital).

In the eight isolates, *rmlB* was located on a *IncFIA* plasmid. In four cases *bla*_{CTX-M-15} was located on the same plasmid while it was located on a *IncII* plasmid in the other four cases. *IncFIA* was transferred only in the presence of *IncII*. *armA* was located either on a transferable *IncI/M* plasmid (with *bla*_{CTX-M-15}) or on a *IncFIA* plasmid (in these two cases *bla*_{CTX-M-1} or *bla*_{TEM-167} were located on a *IncN* plasmid).

DISCUSSION

Our results are in accord with previous studies and confirm that CTX-M-15 is the predominant ESBL encountered among *E. coli* in Algerian hospitals (Ramdani-Bouguessa et al., 2006; Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2013). The same situation is also observed in Tunisia (Mamlouk et al., 2006) and Morocco (Girlich et al., 2014) illustrating the large spread of CTX-M-15-producing *E. coli* in the north African countries.

TABLE 3 | Characterization of the 16S rRNA methylase producing *E. coli* strains isolated in Tlemcen, Sidi Bel Abbès, and Oran hospitals, Algeria.

Strain	Hospital	Ward	Isolate date	Sample	ESBL (plasmid)	16S rRNA methylase (plasmid)	PFGE pulsedtypes	MLST
TE02	Tlemcen	Neurosurgery	10/10/2009	Blood	Δ bla _{TEM-1} -1 (Inc L/M) 85 kb (7+)	arr68 (Inc Inc L/M) 85 kb (7+)	D	ST167
S-020	Sidi Bel Abbès	Neurosurgery	18/03/2010	Pulv	Δ bla _{TEM-1} -1 (Inc L/M) 85 kb (7+)	arr68 (Inc Inc L/M) 85 kb (7+)	D	ST10
O011	Oran	ICU ¹	10/12/2010	Infectious wound	Δ bla _{TEM-1} -1 (Inc M) 40 kb (7+)	arr68 (Inc PA size ref) (7+)	B	ST117
O013	Oran	Neurosurgery	16/11/2010	Gastro tube	Δ bla _{TEM-1} -1 (Inc M) 40 kb (7+)	arr68 (Inc PA size ref) (7+)	B	ST117
TE014	Tlemcen	ICU	01/04/2010	Tachéal aspirate	Δ bla _{TEM-1} -1 (Inc PA) About 100 kb (7-)	arr18 (Inc Inc PA) About 100 kb (7-)	A	ST-405
TE016	Tlemcen	ICU	02/05/2010	Rectal mimb	Δ bla _{TEM-1} -1 (Inc II) About 100 kb (7+)	arr18 (Inc PA) About 85 kb (7+)	A	ST-405
TE017	Tlemcen	ICU	26/05/2010	Tachéal aspirate	Δ bla _{TEM-1} -1 (Inc II) About 100 kb (7+)	arr18 (Inc PA) About 85 kb (7+)	A	ST-405
TE018	Tlemcen	ICU	04/06/2010	Tachéal aspirate	Δ bla _{TEM-1} -1 (Inc II) About 100 kb (7+)	arr18 (Inc PA) About 85 kb (7+)	A	ST-405
TE020	Tlemcen	ICU	06/09/2011	Tachéal aspirate	Δ bla _{TEM-1} -1 (Inc II) About 100 kb (7+)	arr18 (Inc PA) About 85 kb (7+)	A	ST-405
TE024	Tlemcen	ICU	27/03/2011	Rectal mimb	Δ bla _{TEM-1} -1 (Inc PA) About 100 kb (7-)	arr18 (Inc Inc PA) About 100 kb (7-)	A	ST-405
TE030	Tlemcen	ENT ²	24/04/2011	Catheter	Δ bla _{TEM-1} -1 (Inc PA) About 100 kb (7-)	arr18 (Inc Inc PA) About 100 kb (7-)	A	ST-405
TE034	Tlemcen	ICU	28/04/2011	Urine	Δ bla _{TEM-1} -1 (Inc PA) About 100 kb (7-)	arr18 (Inc Inc PA) About 100 kb (7-)	A	ST-405

ICU, intensive care unit; ENT, ear, nose and throat surgery; 7+, combination of transconjugant; 7-, not transconjugant; ¹ref, non-determined.

Nevertheless, the CTX-M-1, CTX-M-14, SHV-12, and TEM-167 ESBLs also detected in our study had never been reported to date among *E. coli* strains in Algeria. There is a single description of CTX-M-14-producing *S. enterica* collected from Draz-El-Mizan hospital, east of Algeria (Tabadene et al., 2009) whereas SHV-12 has already been detected in clinical isolates of *K. pneumoniae* and *E. cloacae* in Algeria (Baba Ahmed-Kazi Tani and Arlet, 2014). There is no description of TEM-167 to date, only bla_{TEM-167} is available in GenBank (FJ360884).

Our study further highlights the emergence of 16S rRNA methylase enzymes among ESBL-producing *E. coli* strains in the west of Algeria. Among our collection, the prevalence rate of 16S rRNA methylase determinants was 18%, which is very high compared to those reported in Japan (0.03%) (Yamane et al., 2007), in Turkey (0.7%) (Bercot et al., 2010), in France (1.3%) (Bercot et al., 2008), and in China (10%) (Wu et al., 2009). The detection of RmTB-producing *E. coli* is an interesting finding of our study. Indeed the RmTB enzyme has never been reported in Algeria. The eight isolates producing RmTB were genotypically related and belonged to ST405. Interestingly ST405 associated or not with production of CTX-M-15 ESBL is increasingly reported worldwide and belongs to the high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance (Woodford et al., 2011). The association of bla_{CTX-M-15} and rmtB on a conjugative plasmid (also carrying the plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene qepA) in one ST405 *E. coli* isolate has been reported in the United States (Tan et al., 2011) but the plasmid was not typed by PCR-based replicon.

All RmTB-producers have been recovered in Tlemcen Hospital and seven of them were collected in ICU suggesting patient cross contamination in this ward.

Therefore there is a need to reinforce the compliance of health-care workers with the infection control measures. The epidemiological results concerning ArmA-producers is quite different: the four isolates recovered in three hospitals in Western Algeria belonged to three different pulsotypes suggesting horizontal spread of the resistance determinants among *E. coli*. There are several reports of ArmA-producers among different species of Enterobacteriaceae and also *A. baumannii* from Algerian Hospitals (Bogaerts et al., 2007; Naas et al., 2009, 2011; Bouzidi et al., 2011; Bakour et al., 2014; Belbel et al., 2014; Batah et al., 2015; Khennouchi et al., 2015). The production of 16S rRNA methylase together with the production of ESBL observed in our study (RmTB plus CTX-M-15 or ArmA plus CTX-M-15) corresponds to an emerging and threatening combination reported worldwide (Bogaerts et al., 2007; Khennouchi et al., 2015). To our best knowledge two combinations detected in our study were not reported before: ArmA plus CTX-M-1 and ArmA plus TEM-167 in two isolates clonally related (OE11 and OE13) recovered simultaneously from Oran's hospital.

Our data indicated that the diversity of ESBL among *E. coli* is growing in Algerian hospitals (CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-15, TEM-167, and SHV-12) and that new mechanisms are emerging (16S rRNA methylases). In our study 11 out

of 12 isolates that co-produced ESBL and methylase were resistant to all antibiotics tested except carbapenems and colistin, making of them the only available therapeutic option for these strains. Therefore the public health impact is potentially important.

CONCLUSION

There is a need for implementation of antimicrobial stewardship programs in Algerian hospitals to make the best use of the available antibiotics and to avoid as much as possible the unreasonable use of broad-spectrum molecules leading to the emergence of resistant isolates. Also strict control measures have to be elaborated to avoid the spread of multiresistant organisms such as those described here that co-produced ESBL and 16S rRNA methylase.

REFERENCES

- Ibba Ahmed-Kari Tari, Z., and Arlet, G. (2014). News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. *Pathol. Biol.* 62, 169–178. doi: 10.1016/j.puho.2014.01.005
- Ibba Ahmed-Kari Tari, Z., Derré, D., Gerd, N., Bouchéri-Otmani, Z., Arlet, G., and Driat, M. (2013). Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microb. Drug Resist.* 19, 185–190. doi: 10.1089/mdr.2012.0161
- Bakour, S., Touati, A., Bacht, Y., Sahli, F., Touati, D., Naim, M., et al. (2014). First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J. Infect. Chemother.* 20, 696–701. doi: 10.1016/j.jicm.2014.07.010
- Barton, B. M., Harding, G. P., and Zaccarelli, A. J. (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* 226, 235–240. doi: 10.1006/abio.1995.1220
- Batah, R., Loucif, L., Ouhalla, A. O., Boutefrouche, N., Alleg, H., and Rolain, J. M. (2015). Outbreak of *Serratia marcescens* coproducing ArmA and CTX-M-15 mediated high levels of resistance to aminoglycoside and extended-spectrum beta-lactamase, Algeria. *Microb. Drug Resist.* 21, 470–476. doi: 10.1089/mdr.2014.0240
- Belbel, Z., Chetoui, H., Dekhal, M., Ladjani, A., Nedjat, S., and Rolain, J. M. (2014). Outbreak of an armA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian Hospital. *Microb. Drug Resist.* 20, 310–315. doi: 10.1089/mdr.2013.0193
- Bercot, B., Poirel, L., and Nordmann, P. (2008). Plasmid-mediated 16S rRNA methylase among extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4525–4527. doi: 10.1128/AAC.00882-08
- Bercot, B., Poirel, L., Ouderm, M., Hakko, E., Turkoğlu, S., and Nordmann, P. (2010). Low prevalence of 16S methylase among extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from a Turkish hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 797–798. doi: 10.1093/jac/dkq003
- Bogaerts, P., Galmard, M., Bausing, C., Deplano, A., Vanhoof, R., De Mendonça, E., et al. (2007). Emergence of ArmA and RmlB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylase in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 458–464. doi: 10.1093/jac/dkz327
- Bouaidi, N., Assou, L., Dekhal, M., Granier, S. A., Poirel, L., Brinabou, A., et al. (2011). Co-occurrence of aminoglycoside resistance gene armA in non-Typh1 *Salmonella* isolates producing CTX-M-15 in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2180–2181. doi: 10.1093/jac/dkr257
- Cantón, R., and Cosque, T. M. (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 466–475. doi: 10.1016/j.cmi.2006.08.011
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. I., and Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63, 219–228. doi: 10.1016/j.jmimet.2005.03.018
- Chen, L., Chen, Z. L., Liu, J. H., Zeng, Z. L., Ma, J. Y., and Jiang, H. X. (2007). Emergence of RmlB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 880–885. doi: 10.1093/jac/dkm065
- Ejmsen, E., Sandberg, D., Lundgren, B., Ferry, S., Holm, S., Mönzer, T., et al. (2005). Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Escherichia coli* strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1776–1781. doi: 10.1128/JCM.44.5.1776-1781.2006
- Fritsche, T. R., Cantanheira, M., Miller, G. H., Jones, B. N., and Armstrong, E. S. (2008). Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1843–1845. doi: 10.1128/AAC.01477-07
- Galmard, M., Courvalin, P., and Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2565–2571. doi: 10.1128/AAC.47.8.2565-2571.2003
- Gerlich, D., Boufhal, N., Poirel, L., Benoudia, A., and Nordmann, P. (2014). High rate of faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase and CTX-M-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at a University hospital in Morocco. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 350–354. doi: 10.1111/1469-0691.12325
- Tabouene, H., Bakour, R., Messai, Y., Du Costa, A., and Arlet, G. (2009). Detection of blaCTX-M-14 and aac(3)-II genes in *Salmonella enterica* serotype Kedougou in Algeria. *Med. Mal. Infect.* 39, 806–807. doi: 10.1016/j.medmal.2008.04.003
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fourrier, G., and Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10, 867–878. doi: 10.1093/ridd/10.4.867
- Kherouchi, N. C., Loucif, L., Boutefrouche, N., Alleg, H., and Rolain, J. M. (2015). MALDI-TOF MS as a tool to detect a nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase- and ArmA methyltransferase-producing *Enterobacter cloacae* clinical isolates in Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6477–6483. doi: 10.1128/AAC.00615-15
- Marrlouk, K., Boutiba-Ben Bakour, L., Gaudin, V., Vintoni, S., Picard, B., Redjeh, S. B., et al. (2006). Emergence and outbreaks of CTX-M extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4048–4056. doi: 10.1128/JCM.01076-06
- Nava, T., Benichouala, C., Cuzon, G., Yvon, S., Luzzati, A., Smati, F., et al. (2011). Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis producing ArmA 16S rRNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 38, 135–139. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.04.012

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AA: Selected the isolates, performed the characterization of the ESBL, of the methylase, the analysis by PFGE, the MLST analysis and manuscript preparation. MD: Designed the study. CdC and LA: Participated to genotyping and interpretation. ES: Sequence analysis and manuscript preparation. AH and SS: Performed plasmid analysis. CD: Performed PFGE analysis (dendrogram). CN: Choice of the isolates, choice of the tools, interpretation of the results and manuscript preparation.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01409>

- Niao, T., Benichouala, C., Urra, S., Lecoz, A., Smati, F., Scheffel, J. M., et al. (2009). Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* Serflinberg isolates from Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 866–868. doi: 10.1093/jac/dkp312
- Niao, T., Lecoz, A., Benichouala, C., Smati, F., Scheffel, J. M., Moriciel, H., et al. (2005). Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Serflinberg isolates producing CTX-M beta-lactamase from Constantine, Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 439–440. doi: 10.1093/jac/dkz216
- Nagaura, M., Kaku, M., Kuroki, K., Shibayama, K., Arakawa, Y., Yamaguchi, K., et al. (2014). Loop-mediated isothermal amplification assay for 16S rRNA methylase genes in Gram-negative bacteria. *J. Infect. Chemother.* 20, 635–638. doi: 10.1016/j.jic.2014.08.013
- Neuwirth, C., Sieber, E., Lopez, J., Pacheco, A., and Esmerencak, A. (1996). Outbreak of TEM-24-Producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit and dissemination of the extended-spectrum beta-lactamase to other members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 76–79.
- Pitout, J. D. D., and Laupland, K. B. (2004). Extended-spectrum-beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis.* 4, 159–166. doi: 10.1016/S1473-3099(04)70041-0
- Randani-Bougassou, N., Mendonça, N., Leïba, J., Ferreira, E., Tazi, M., and Carica, M. (2006). CTX-M-3 and CTXM-15 extended-spectrum beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4584–4586. doi: 10.1128/JCM.01445-06
- Sieber, E., and Neuwirth, C. (2011). The new variant of *Salmonella* genomic island 1 (SGI1-V) from a *Proteus mirabilis* French clinical isolate harbours blaVIB-6 and *qnrA1* in the multiple antibiotic resistance region. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2313–2320. doi: 10.1093/jac/dkr335
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Penning, D. H., et al. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoretic criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239.
- Tian, G. B., Rivera, J. L., Park, Y. S., Johnson, L. E., Hingee, A., Adams-Haduch, J. M., et al. (2011). Sequence type ST405 *Escherichia coli* isolate producing QepA1, CTX-M-15, and *RmlB* from Detroit, Michigan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3966–3967. doi: 10.1128/AAC.00652-11
- Wirh, T., Falush, D., Lan, R., Collier, F., Merona, P., Wicker, L. H., et al. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60, 1136–1151. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x
- Woodford, N., Turton, J. F., and Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *PLoS Microbiol. Res.* 33, 736–755. doi: 10.1111/j.1574-6978
- Wu, Q., Zhang, Y., Han, L., Sun, J., and Su, Y. (2008). Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 271–272. doi: 10.1128/AAC.00744-08
- Yamase, K., Wadhwa, J., Suzuki, S., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., et al. (2007). 16S rRNA methylase-producing gram-negative pathogens, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 642–646. doi: 10.3201/eid1304.060201

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Ayad, Driou, de Courtois, Dupont, Harimour, Soliman, Sieber, Amourah and Neuwirth. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 3. Article 2: First detected human case in Algeria of *mcr-1* plasmid mediated colistin resistance: a 2011 *Escherichia coli* isolate.



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

Meryem Bernazag,^a Linda Hadjadj,^a Amal Ayad,^b Mourad Driss,^c Jean-Marc Rolain^a

Aix-Marseille Université, Unité de Recherche en Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE), UM63, CNRS 7378, RD 168, INSERM 1085, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Marseille, France^a; Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologiques (LAFSAB), Faculté des Sciences de la Nature, de la Vie, de la Terre, et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid—Tlemcen, Tlemcen, Algeria^b; Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature, de la Vie, de la Terre, et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid—Tlemcen, Tlemcen, Algeria^c

The *mcr-1* gene, a transferable plasmid-mediated colistin resistance gene, was recently detected in *Escherichia coli* isolates from animals, food, and patients in China (1). This gene spread rapidly beyond China into southern Asia, Europe, South America, and Africa, mirroring the emerging NDM-1-like scenario (2–7). In Algeria, Olafitan et al. confirmed the presence of *mcr-1* in poultry (8), but to the best of our knowledge, no human case has yet been reported. In response to this potential clinical problem, we retrospectively genotyped six colistin-resistant (breakpoint for resistance, >2 µg/ml) *E. coli* isolates collected between October 2009 and December 2011 from Sidi Belabess University Hospital for the presence of the *mcr-1* gene using a previously described PCR method (1). The *mcr-1* gene was detected in one isolate (SB65). This isolate was obtained from a urine sample of an 18-year-old polytrauma man hospitalized in May 2011 with no history of traveling abroad. The characteristics of SB65 are shown in Table 1. Multilocus sequence typing (MLST) indicated that SB65 belonged to sequence type 405 (ST405), which differs from the STs identified in clinical *E. coli* isolates harboring *mcr-1* from Denmark (ST744) (2), Egypt (ST1011) (5), and Cambodia (ST354) (9). Colistin resistance was successfully transferred to the *E. coli* J53 (F⁺ *mcr-pro* *Aad*^r) strain via a conjugation experiment. The presence of *mcr-1* in the transconjugant suggested that this gene was located on a transferable plasmid. This result confirms the finding that the *mcr-1* gene is mobilized on plasmids that have spread to different *Enterobacteriaceae* (7, 10). We notice also a small reduction of ciprofloxacin's diameter of inhibition in the transconjugant strain, but this occurs without any change in the interpretation of susceptibility testing results.

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

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

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

Antibiotic(s)	Diam of zone of inhibition (mm) of indicated strain (resistance gene(s); MIC [µg/ml] of colistin)		
	<i>E. coli</i> SB65 (<i>mcr-1</i> <i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>r</i> :4)	Transconjugant (<i>mcr-1</i> :4)	<i>E. coli</i> J53 (none:0.125)
Azoxycillin	6	6	27
Azoxycillin-clavulanate	6	9	20
Ticarcillin-clavulanate	6	11	25
Colistin	6	28	28
Ceftriaxone	6	27	27
Cefepime	6	28	28
Aztreonam	9	31	31
Imipenem	31	27	27
Ertapenem	22	30	30
Gentamicin	23	25	25
Aerobicin	22	28	27
Ciprofloxacin	6	26	32
Tetrahaptin-millamethazole	6	6	20
Rifampin	10	9	10
Fusidic acid	31	31	17
Colistin	15	16	19

^a Antibiotic susceptibility testing was performed according to CLSI recommendations.

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

Accepted manuscript posted online 29 August 2016

Citation: Bernazag M, Hadjadj L, Ayad A, Driss M, Rolain J-M. 2016. First detected human case in Algeria of *mcr-1* plasmid-mediated colistin resistance in a 2011 *Escherichia coli* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 60:6996–6997. doi:10.1128/AAC.01174-16.

Address correspondence to J.-M. Rolain, jean-marc.rolain@univ-amu.fr.

M.B. and L.H. contributed equally to this work.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

REFERENCES

- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer I, et al. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16:161–168. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
- Haasman H, Hammerum AM, Hansen F, Hendriksen ES, Olesen B, Agerso Y, et al. 2015. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill* 20.
- Aravella MS, van Hattem JM, Matamoros S, Melles DC, Penders I, de Jong MD, et al. 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:147–149. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00541-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00541-1).
- Webb HE, Grant SA, Marault M, Millmann Y, den Bakker HC, Nightingale KK, et al. 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:144–145. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00538-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00538-1).
- Elshahry SS, Khalifa HO, Soliman AM, Ahmed AM, Moustafa AH, Shtmanoto T, et al. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate from Egypt. *Antimicrob Agents Chemother* 60:3249–3250. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00269-16>.
- Tse H, Yuen KY. 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:145–146. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00532-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00532-0).
- Olaitan AO, Chabou S, Okoh I, Morand S, Rolain JM. 2016. Plasmid-mediated colistin resistance: the final blow to colistin? *Int J Antimicrob Agents* 47:4–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.11.009>.
- Olaitan AO, Chabou S, Okoh I, Morand S, Rolain JM. 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:147. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00540-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00540-X).
- Stoesser N, Mathers AJ, Moore CE, Day NP, Crook DW. 2016. Colistin resistance gene *mcr-1* and pHNSHP45 plasmid in human isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet Infect Dis* 16:285–286. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00010-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00010-4).
- Du H, Chen L, Tang YW, Kretzschmar BN. 2016. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Lancet Infect Dis* 16:287–288. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00056-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00056-6).
- Skov RL, Mørrset DL. 2016. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill* 21.
- Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. 2016. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. *Int J Antimicrob Agents* 47:1–3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.11.009>.
- Galani I, Kontopidou F, Souli M, Ekelatrou PD, Korantzis E, Delibolanti I, et al. 2008. Colistin susceptibility testing by E-test and disk diffusion methods. *Int J Antimicrob Agents* 31:434–439. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.011>.
- Nordmann P, Jayol A, Poirel L. 2016. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant gram negatives. *J Clin Microbiol* 54:1395–1399. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00446-16>.

ملخص

Escherichia coli هو ممرض انتهازى ذو احتمالية وباء مرتفعة و غالبا ما يكون مسؤول عن الالتهابات المكتسبة في المستشفيات. ارتفع وانتشار مقاومة هذه البكتيريا للمضادات الحيوية ، هو مشكلة صحية رئيسية في جميع أنحاء العالم. والهدف من هذه الدراسة متعددة المراكز هو تقييم الوضع الحالي لمقاومة *E. coli* للمضادات الحيوية في مستشفيات شمال غرب الجزائر .

مجموع 240 عينة من نوع *E. coli* تم عزلها، في الفترة الممتدة ما بين أكتوبر 2008 و جوان 2012، على مستوى مختلف الوحدات بالمستشفيات الجامعية لكل من ولاية تلمسان ، سيدي بلعباس و وهران. دراسة حساسية هذه الجراثيم ل 22 مضاداً حيوي منهم 13 بيتاكتامين، 4 أمينوزيد، 3 كينولون، تغيثوبريم/سلفاميثوكسازول والكولستين، كشفت معدلات مقاومة عالية لمعظم المضادات الحيوية التي تم اختبارها. تم الكشف عن العديد من جينات مقاومة بيتاكتامين مع هيمنة الجين التي تشفر البييتاكتاماز ذو المدى الواسع (BLSE) من نوع CTX-M-15 و مع ظهور جينات جديدة *bla*_{TEM-167} و *bla*_{CMY-16}. جينات أخرى لمقاومة الأمينوزيد (*armA*, *rmtB*, *aac(6')-Ib*, *aadA*, *aadB*) ، الكينولون-*Ib(6')* (*aac(6')-Ib-cr*)، تغيثوبريم/سلفاميثوكسازول (*dfrA*) و الكولستين (*mcr-1*) تم أيضا الكشف عنها. انتشار جينات المقاومة في المستشفيات المدرجة في هذه الدراسة يرتبط بانتشار ST405، نسخة دولية خطيرة و بنقل بلازميدات مختلفة (IncF, IncFIA, IncL/M, IncII, IncA/C , IncN) بين سلالات غير متصلة جينياً.

في هذه الدراسة نكشف لأول مرة في الجزائر، عن جينات مقاومة الأمينوزيد (*armA* و *rmtB*) و الكولستين (*mcr-1*) في سلالات *E. coli* جمعت من المستشفى، مسلطين الضوء عن زيادة نسبة السلالات المقاومة للمضادات الحيوية في المستشفيات الجزائرية الأمر الذي يتطلب اتخاذ تدابير الرقابة لمنع انتشارها .

الكلمات المفتاحية: *E. coli*، مقاومة المضادات الحيوية، علم الأوبئة، الجزائر، BLSE، *armA*، *rmtB*، *mcr-1*

Résumé

Escherichia coli est un pathogène opportuniste, à fort potentiel épidémique, fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales. L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez cette espèce, représente un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. L'objectif de cette étude multicentrique est de faire le point sur l'état actuel de la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* dans les hôpitaux du Nord-Ouest algérien.

Un total de 240 souches d'*E. coli* a été collecté, entre Octobre 2008 et Juin 2012, à partir de différents services des centres hospitalo-universitaires de Tlemcen, Sidi Bel Abbes et Oran. L'étude de la sensibilité aux 22 antibiotiques, dont 13 β-lactamines, 4 aminosides, 3 quinolones, le triméthoprim/sulfaméthoxazole et la colistine, a révélé des taux de résistance élevés pour la plupart des antibiotiques testés. Différents gènes de résistance aux β-lactamines ont été détectés avec dominance du gène codant la β-lactamase à spectre élargi (BLSE) CTX-M-15 et émergence de nouveaux gènes *bla*_{TEM-167} et *bla*_{CMY-16}. D'autres gènes de résistance aux aminosides (*armA*, *rmtB*, *aac(6')-Ib*, *aadA* et *aadB*), aux quinolones (*aac(6')-Ib-cr*) au triméthoprim/sulfaméthoxazole (*dfrA*) et à la colistine (*mcr-1*) ont été également détectés. La dissémination des gènes de résistance, au niveau des CHUs étudiés, est liée principalement à la circulation du clone épidémique ST405, clone à haut risque international et au transfert de plasmides de différents groupes d'incompatibilité (IncF, IncFIA, IncL/M, IncII, IncA/C et IncN) entre souches non reliées génétiquement.

Dans cette étude on rapporte pour la première fois en Algérie, la détection des gènes de résistance aux aminosides (*armA* et *rmtB*) et à la colistine (*mcr-1*) chez des souches cliniques d'*E. coli*, soulignant ainsi l'augmentation de la fréquence des souches multirésistantes, dans cette espèce, dans les hôpitaux algériens, ce qui nécessite d'établir des mesures de contrôle pour éviter leur diffusion.

Mots clés : *E. coli*, résistance aux antibiotiques, épidémiologie, Algérie, BLSE, *armA*, *rmtB*, *mcr-1*.

Abstract

Escherichia coli is an opportunistic pathogen with a high epidemic potential, frequently involved in nosocomial infections. The increase and dissemination of antibiotic resistance in this species is a major public health concern worldwide. The aim of this multicentric study is to make the point on the current situation of antibiotic resistance in *E. coli* in hospitals of North-Western Algeria.

A total of 240 strains of *E. Coli* was collected, between October 2008 and June 2012, from various wards of the university hospitals of Tlemcen, Sidi Bel Abbes and Oran. The study of susceptibility to 22 antibiotics, including 13 β-lactams, 4 aminoglycosides, 3 quinolones, trimethoprim/sulfamethoxazole and colistin, revealed high levels of resistance for most of the antibiotics tested. Different β-lactam resistance genes were detected with dominance of gene encoding the extended spectrum β-lactamase (ESBL) CTX-M-15 and the emergence of new genes *bla*_{TEM-167} and *bla*_{CMY-16}. Other genes of resistance to aminoglycosides (*armA*, *rmtB*, *aac(6')-Ib*, *aadA* and *aadB*), quinolones (*aac(6')-Ib-cr*), trimethoprim/sulfamethoxazole (*dfrA*) and colistin (*mcr-1*) were also detected. The dissemination of resistance genes, in the hospitals included in this study, is mainly linked to the circulation of the high-risk international clone ST405 and the transfer of plasmids belonging to different incompatibility groups (IncF, IncFIA, IncL/M, IncII, IncA/C and IncN) between strains unrelated genetically.

In this study we report for the first time in Algeria, the detection of aminoglycosides resistance genes (*armA* and *rmtB*) and colistin resistance gene (*mcr-1*) in clinical strains of *E. coli*, pointed out the increase of the frequency of multiresistant strains, in this species, in algerian hospitals, which requires the establishment of control measures to avoid their spread.

Keywords: *E. coli*, Resistance to antibiotics, epidemiology, Algeria, ESBL, *armA*, *rmtB*, *mcr-1*.