



HAL
open science

**EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DES
ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES DE β -
LACTAMASES A SPECTRE ELARGI RESISTANTES
AUX AMINOSIDES ET AUX FLUOROQUINOLONES
DANS LE DISTRICT D'ABIDJAN, CÔTE D'IVOIRE**

Victoire Gadou

► **To cite this version:**

Victoire Gadou. EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DES ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES DE β - LACTAMASES A SPECTRE ELARGI RESISTANTES AUX AMINOSIDES ET AUX FLUOROQUINOLONES DANS LE DISTRICT D'ABIDJAN, CÔTE D'IVOIRE. Bactériologie. Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire); N° ORDRE 2186/2019, 2019. Français. NNT: . tel-02417084

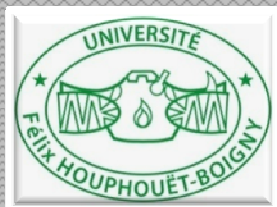
HAL Id: tel-02417084

<https://theses.hal.science/tel-02417084>

Submitted on 18 Dec 2019

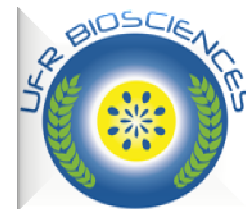
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique



Laboratoire de Pharmacodynamie-
Biochimique

Année Universitaire
2018-2019

THESE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de
L'Université Félix HOUPHOUET BOIGNY

Spécialité : Biologie Fonctionnelle et Moléculaire

Numéro d'ordre
2186/2019

Mlle GADOU VICTOIRE

EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DES ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES DE β - LACTAMASES A SPECTRE ELARGI RESISTANTES AUX AMINOSIDES ET AUX FLUOROQUINOLONES DANS LE DISTRICT D'ABIDJAN, CÔTE D'IVOIRE

Soutenue publiquement
Le, 29/03/2019

Commission du jury

Mme FAYE-KETTE Hortense	Professeur Titulaire	UFHB	Président
M. DJAMAN Allico Joseph	Professeur Titulaire	UFHB	Directeur
Mme GUESSENND K. Nathalie	Directeur de recherche	UFHB	Co-Directeur
Mme KOUSSEMON Marina	Professeur Titulaire	UNA	Rapporteur
Mme M'BENGUE Gbonon Valerie	Maitre de Recherche	IPCI	Examineur



DEDICACES

Je dédie cette thèse,

A mon père, le Pasteur Gadou O. Désiré, pour son soutien permanent dans ma vie et dans mes études, sa confiance en moi, ses encouragements et son amour. Que Dieu te récompense.

A la mémoire de ma mère qui nous a quittés trop tôt mais qui reste à jamais dans mon cœur.

A mes frères et sœurs: le Pasteur Gadou Daniel, Gadou Ruth Dorcas, Gadou Emmanuel, Gadou Anne-Parfaite Désirée pour leur soutien moral, spirituel, leur chaleur et leur amour.

A ma nièce adorée Gadou Noura Eslie Mael pour son enthousiasme et sa joie de vivre.

A mon fiancé Kouassi Blé Séverin Tardy pour ses encouragements, sa disponibilité, son soutien et son amour.

A mes pères spirituels les Pasteurs Ayé Touali et Séri Mogador pour toutes leurs ferventes prières à mon endroit et leurs encouragements.

A la grande famille Gadou qui ne cesse de m'encourager tout le temps.

A tous mes parents maternels.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes vifs remerciements

A M. ABOU KARAMOKO

Président de l'Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody. Merci Professeur pour m'avoir acceptée dans l'Université que vous dirigez.

A M. KOUAMELAN Paul Essetchi

Directeur de l'UFR Biosciences. Merci Professeur pour avoir accepté mon inscription en thèse et facilité les démarches administratives tout au long de ma formation, ainsi que la collaboration avec l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

A Mme DOSSO Mireille

Professeur Titulaire de Bactériologie-Virologie, Directrice de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci Professeur de m'avoir accueillie au sein de votre Institution où j'ai pu effectuer mes travaux de master et de thèse. Votre passion pour la Microbiologie, votre implication dans le développement de la recherche scientifique et dans la formation des chercheurs est remarquable. Mon souhait est que vous ayez toujours la santé afin de continuer ce dynamique travail que vous effectuez au sein de la communauté scientifique.

A Mon Maître et Directeur de thèse

M. DJAMAN Allico Joseph

Professeur Titulaire de Biochimie-Parasitologie, Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique à l'UFR Biosciences, Chef du département de Biochimie Médicale et Fondamentale à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Chercheur associé à l'UPR 3294, Université Paris-Sud, Orsay (France). Cher Maître, merci de m'avoir encadrée depuis le master jusqu'à la thèse. Vous êtes un modèle dans le travail, une bibliothèque vivante. La qualité de votre enseignement, votre rigueur dans le travail et tous les efforts déployés pour la formation de vos étudiants sont à saluer. Veuillez recevoir cher Maître, mes sincères et profonds remerciements.

A Mon Maitre et Co-Directeur de thèse

Professeur GUESSENND Kouadio Nathalie

Directeur de recherche, chef de l'unité des Antibiotiques, des Substances naturelles et de la Surveillance de la Résistance des Micro-organismes aux anti-infectieux (ASSURMI) à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci Professeur de m'avoir accueillie sans aucune hésitation dans votre unité. Votre gentillesse, votre disponibilité, vos conseils, vos encouragements dans le travail, votre simplicité m'ont beaucoup marquée, veuillez recevoir mes profonds remerciements.

Au **Professeur FAYE-KETTE Hortense**, Professeur Titulaire de Microbiologie, Responsable du département Suivi et Evaluation de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci Professeur pour avoir honoré ce travail en l'évaluant et en acceptant de présider le jury.

Au **Professeur KOUSSEMON Marina**, Professeur Titulaire de Microbiologie et Vice-doyen de l'UFR des Sciences et Technologies des Aliments de l'Université Nangui Abrogoua. Merci Professeur pour m'avoir fait l'honneur d'instruire ma thèse en tant que rapporteur et d'y avoir apporté des remarques pertinentes afin d'en améliorer la qualité.

Au **Docteur M'BENGUE Gbonon Valérie**, Maître de recherche, chef d'unité adjoint à l'ASSURMI et Responsable de l'Unité de Réception, d'Accueil et de Prélèvements (URAP) de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci Docteur pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ma thèse.

J'adresse mes vifs remerciements par ailleurs :

A M. BAHY Calixte

Maître de conférences à l'Université Félix Houphouët Boigny de Cocody. Merci Docteur d'avoir guidé mes premiers pas universitaires. Votre passion pour la Biochimie en particulier et pour le travail en général m'ont beaucoup encouragée dans mon parcours.

A M. Jean-Marc ROLAIN

Professeur des Universités, Praticien hospitalier des disciplines pharmaceutiques. Responsable d'une équipe de recherche spécialisée dans l'étude de la résistance aux agents antimicrobiens et sur l'émergence des maladies infectieuses au sein de l'Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Tropicales Emergentes (URMITE) d'Aix-Marseille Université (France). Editeur en Chef de la revue "International Journal of Antimicrobial Agents". Merci Professeur pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser une partie de ma thèse dans votre laboratoire. J'ai pu bénéficier de vos conseils, vos critiques pour améliorer la qualité de mon travail.

A M. TIEKOURA Konan Bertin

Attaché de recherche à l'unité ASSURMI de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci Docteur de m'avoir intégrée très vite dans l'équipe, de m'avoir encouragée et orientée dans le travail. Votre disponibilité dans l'encadrement des stagiaires de l'ASSURMI est à saluer.

A M. KONAN Fernique

Attaché de recherche à l'unité ASSURMI de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci Docteur de m'avoir assistée tout au long de ce travail. Votre amour pour le travail et votre disponibilité m'ont beaucoup aidé.

A M. TOTY Abalé

Attaché de recherche à l'unité ASSURMI de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci Docteur pour votre disponibilité, votre aide précieuse dans la rédaction et vos encouragements.

A M. OUATTARA Mohamed Baguy

Attaché de recherche à l'unité UPIL de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci Docteur pour votre assistance, vos remarques et votre aide dans la rédaction.

Aux Techniciens Supérieurs de l'ASSURMI

M. FOFANA Kouakou

M. KOUAKOU A. Alexandre

Mme N'GUESSAN Rose Sylvestre

Merci pour votre aide si précieuse, vos encouragements et votre disponibilité pendant mes travaux.

A Mon Amie et Sœur N'CHOTT Sopi Michèle épouse YERE

Tu es une bonne coéquipière tant dans le domaine académique que dans la vie active. Nous sommes devenues au fil du temps inséparables, merci pour tout.

A mes amis doctorants de l'unité ASSUMRI :

KOUADIO Innocent, TAHOU Eric, GBA KOSSIA Karine

Merci pour ce temps très enrichissant que nous avons passé ensemble, l'entraide les uns envers les autres, je vous souhaite une bonne carrière de chercheur.

A Linda HADJADJ, technicienne à l'Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Tropicales Emergentes (URMITE) d'Aix-Marseille Université (La Timone)

Merci d'avoir été très disponible et de m'avoir aidée afin que j'effectue mes travaux de recherche à l'URMITE.

Au groupe Africa-Marseille de l'URMITE composé de

N'GAIGANAM Edgarthe Priscille (Centrafrique)

KOUDOKPON Charles (Benin)

M'PELE Landry Fils (Congo)

Nous nous sommes rencontrés un jour et nous sommes devenus inséparables. Merci de m'avoir aidée dans mes travaux à l'URMITE et d'avoir rendu agréable mon séjour à Marseille. Je vous souhaite une bonne carrière de chercheur.

**AU PERSONNEL ENSEIGNANT DU LABORATOIRE DE
PHARMACODYNAMIE-BIOCHIMIQUE DE L'UFR BIOSCIENCES QUI A
CONTRIBUE A MA FORMATION :**

ENSEIGNANTS CHERCHEURS

Professeurs titulaires

M. DJAMAN Allico Joseph : Directeur de Laboratoire
M. BIDIE Alain Dit Philippe
M. COULIBALY Adama : Chef d'unité
M. N'GUESSAN Jean David : Chef d'unité
M. YAPI Houphouët Félix
M. YAPO Adou Francis : Responsable pédagogique

Maîtres de conférences

M. BAGRE Issa
M. BAHY Calixte
M. BLA Kouakou Brice
M. COULIBALY Founzegué Amadou
M. KRA Adou Matthieu
M. OUATTARA Karamoko
M. TREBISSOU Johnson Noël
M. YEO Dodéhé

Maîtres-assistants

M. AHUA Maximin
M. DJYH Bernard
Mme THES Péhé Marie Épse SOUMAHORO
M. OUATTARA Sitapha
M. KOUASSI Kouakou Serge

Assistants

Mme AGRE Josette Épse KOUADIO
M. PAKORA Gilles Ales
M. KONAN KOUAKOU

CHERCHEURS

Chargés de Recherche

M. KIPRE G. Rolland
M. AKAPO-AKUE Joël
Mme ASSOHOU A. Constance Épse LUTTY

DOCTEUR-INGENIEUR

M. DAGNOGO Oléfongo

ENSEIGNANT DETACHE (PROFESSEUR CERTIFIE)

Mme KONE Salimata Épse COULIBALY

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIERES	IX
LISTE DES ABREVIATIONS	XIX
LISTE DES FIGURES	XXIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XXVI
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1- Entérobactéries	6
1-1 Caractères biochimiques	6
1-1-1 Réaction d'oxydase	6
1-1-2 Utilisation du Citrate de Simmons	6
1-1-3 Recherche de l'uréase.....	6
1-1-4 Recherche de la production d'indole.....	7
1-1-5 Recherche de la lysine décarboxylase et de la lysine désaminases.....	7
1-1-6 Fermentation des sucres, production du sulfure d'hydrogène et de gaz	7
1-1-7 Utilisation du malonate	7
1-1-8 Milieu au Citrate de Christensen	7
1-1-9-Recherche de l'acétoïne ou Réaction de Voges-Proskauer.....	8
1-1-10 Recherche de la galactosidase	8
1-2 Caractères cultureux	8
1-3 Caractères morphologiques	8
1-4 Différentes espèces des entérobactéries.....	10
1-4-1 <i>Escherichia coli</i>	10

1-4-1-1	Caractères bactériologiques	10
1-4-1-2	Caractères biochimiques	10
1-4-1-3	Caractères antigéniques.....	10
1-4-1-4	Pouvoir pathogène.....	12
1-4-1-4-1	<i>Escherichia coli</i> pathogènes intestinaux.....	12
1-4-1-4-1-1	<i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes.....	12
1-4-1-4-1-2	<i>Escherichia coli</i> entéro-pathogènes	12
1-4-1-4-1-3	<i>Escherichia coli</i> entéroinvasifs	13
1-4-1-4-1-4	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques	13
1-4-1-4-1-5	<i>Escherichia coli</i> entéroaggrégants.....	13
1-4-1-4-1-6	<i>Escherichia coli</i> entéroadhérents ou à adhésion diffuse	13
1-4-1-4-2	<i>Escherichia coli</i> pathogènes extra-intestinaux	14
1-4-1-4-2-1	<i>Escherichia coli</i> uropathogènes.....	14
1-4-1-4-2-2	Facteurs de virulence des <i>Escherichia coli</i> uropathogènes.....	14
1-4-1-4-2-3	<i>Escherichia coli</i> associé à la méningite néonatale	15
1-4-1-4-2-4	<i>Escherichia coli</i> pathogènes aviaires	15
1-4-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
1-4-2-1	Caractères bactériologiques	16
1-4-2-2	Caractères biochimiques	16
1-4-2-3	Caractères antigéniques.....	16
1-4-2-4	Facteurs de pathogénicité de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
1-4-2-4-1	Antigènes de surface.....	16
1-4-2-4-2	Adhésines.....	16

1-4-2-4-3 Sidérophores	17
1-4-2-4-4 Ilot de pathogénicité	17
1-4-2-4-5 Elément d'intégration et de conjugaison	17
1-4-2-5 Pouvoir pathogène.....	18
1-4-3 <i>Enterobacter cloacae</i>	18
1-4-3-1 Caractères bactériologiques	18
1-4-3-2 Caractères biochimiques	18
1-4-3-3 Pouvoir pathogène.....	18
1-4-4 <i>Citrobacter freundii</i>	19
1-4-4-1 Caractères bactériologiques	19
1-4-3-2 Caractères biochimiques	19
1-4-3-3 Pouvoir pathogène.....	19
1-4-5 <i>Morganella morganii</i>	19
1-4-5-1 Caractères bactériologiques	19
1-4-5-2 Caractères biochimiques	19
1-4-5-3 Pouvoir pathogène.....	19
2-Antibiotiques.....	20
2-1 Définition.....	20
2-2 Quelques familles des antibiotiques	20
2-2-1 β -lactamines.....	20
2-2-1-1 Classification des β -lactamines.....	20
2-2-1-2 Mécanisme d'action des β -lactamines	22
2-2-2 Aminosides.....	22

2-2-2-1 Classification des aminosides	23
2-2-2-2 Mécanisme d'action des aminosides.....	23
2-2-3 Quinolones/ Fluoroquinolones	25
2-2-3-1 Classification des quinolones.....	25
2-2-3-2 Mécanisme d'action des fluoroquinolones	25
2-2-4 Rifampicine	27
2-2-4-1 Classification.....	27
2-2-4-2 Spectre d'action de la rifampicine	27
2-2-4-3 Mécanisme d'action de la rifampicine	27
3-Mécanismes de résistance des entérobactéries aux antibiotiques.....	27
3-1-Différents modes de transferts horizontaux.....	29
3-1-1 Transformation	29
3-1-2 Transduction.....	29
3-1-3 Conjugaison.....	30
3-2 Mécanismes de résistance des entérobactéries aux β -lactamines.....	30
3-2-1 Diminution de la perméabilité membranaire.....	30
3-2-2 Excrétion de l'antibiotique par des systèmes d'efflux.....	31
3-2-3 Modification des protéines de liaison à la pénicilline	31
3-2-4 Inactivation de l'antibiotique par production de β -lactamases.....	31
3-2-4-1 Classification des β -lactamases.....	31
3-2-4-1-1 β -lactamases de classe A	33
3-2-4-1-2 β -lactamases de classe B.....	33
3-2-4-1-3 β -lactamases de classe C.....	33

3-2-4-1-4 β -lactamases de classe D	33
3-2-4-2 β -lactamases à spectre élargi.....	33
3-2-4-2-1 Différents types de β -lactamases à spectre élargi.....	34
3-2-4-2-1-1 β -lactamases à spectre élargi de type Temoneira	34
3-2-4-2-1-2 β -lactamases à spectre élargi de type Sulfhydryl variable	34
3-2-4-2-1-3 β -lactamases à spectre élargi de type Cefotaximase-Munich.....	35
3-2-4-2-1-4 Autres types de β -lactamases à spectre élargi	35
3-2-4-3 Epidémiologie des β -lactamases à spectre élargi.....	35
3-3 Mécanismes de résistance des entérobactéries aux aminosides	36
3-3-1 Inactivation enzymatique	36
3-3-2 Réduction de l'accumulation intra-cytoplasmique.....	37
3-3-3 Piégeage de l'antibiotique.....	37
3-3-4 Modification de la cible.....	37
3-4 Mécanismes de résistance des entérobactéries aux fluoroquinolones	39
3-4-1 Résistance chromosomique	39
3-4-1-1 Modification de la cible enzymatique.....	39
3-4-1-2 Perméabilité membranaire réduite	39
3-4-1-3 Pompes à efflux.....	42
3-4-2 Résistance plasmidique aux fluoroquinolones	42
3-4-2-1 Gènes de résistance aux fluoroquinolones.....	42
3-4-2-2 Pompes à efflux plasmidiques.....	42
3-5 Diffusion de la résistance à la rifampicine	43
4- Typage moléculaire des souches par le Multi-locus sequence typing	44

MATERIEL ET METHODES	45
1- Matériel.....	46
1-1 Type, période et cadre de l'étude.....	46
1-2 Matériel biologique.....	46
1-3 Critères d'inclusion.....	46
1-4 Matériel technique	47
1-4-1 Matériel et réactifs pour la caractérisation phénotypique des souches	47
1-4-1-1 Matériel pour la revivification et l'isolement des souches	47
1-4-1-2 Matériel et réactifs pour la ré-identification et la confirmation de l'identité des souches.....	47
1-4-1-3 Matériel et réactifs pour la réalisation de l'antibiogramme	47
1-4-2 Matériel et réactifs pour la caractérisation moléculaire des souches	49
1-4-2-1 Matériel et réactifs pour la recherche des gènes de résistance.....	49
1-4-2-2 Matériel pour le séquençage	49
1-4-2-3 Matériel pour l'expérience de Conjugaison.....	49
2-Méthodes.....	55
2-1 Caractérisation phénotypique des souches	55
2-1-1 Revivification des souches bactériennes	55
2-1-2 Ré-identification des souches bactériennes.....	55
2-1-2-1 Mise en évidence de la production du cytochrome C oxydase	55
2-1-2-2 Identification par le portoir réduit de Le Minor.....	55
2-1-2-2-1 Utilisation du citrate de Simmons comme seule source de carbone.....	55
2-1-2-2-2 Détermination de la production d'uréase et d'indole	55
2-1-2-2-3 Détermination de la production d'hydrogène sulfuré, de gaz, de	

la fermentation du lactose et du glucose	55
2-1-2-2-4 Détermination de la lysine décarboxylase et de la lysine désaminase.....	56
2-1-3 Confirmation de l'identité des souches bactériennes par la spectrométrie de	
masse MALDI TOF	56
2-1-3-1 Préparation de la matrice.....	56
2-1-3-2 Dépôt des souches, lecture et interprétation des résultats	56
2-1-4 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	57
2-1-4-1-1 Préparation de l' <i>inoculum</i> bactérien	57
2-1-4-1-2 Ensemencement de la gélose Mueller-Hinton	57
2-1-5 Recherche de la production de β -lactamases à spectre élargi	57
2-1-6 Détermination de la concentration minimale inhibitrice par E-test	60
2-2 Caractérisation moléculaire de la résistance des souches aux antibiotiques	60
2-2-1 Extraction d'ADN total bactérien	60
2-2-2 Réaction de polymérisation en chaîne réalisée en temps réel	60
2-2-3 Réaction de polymérisation en chaîne.....	61
2-2-4 Electrophorèse sur gel d'agarose	61
2-2-4-1 Préparation du gel d'agarose	62
2-2-4-2 Migration des produits d'amplification et révélation	62
2-2-5 Séquençage.....	62
2-2-5-1 Purification des produits de la PCR conventionnelle.....	62
2-2-5-2 PCR Big Dye.....	63
2-2-5-3 Purification des produits de PCR Big-Dye par le Sephadex.....	63
2-2-5-4 Analyse des séquences ADN	64

2-2-6 Conjugaison.....	64
2-2-7 Typage moléculaire des souches par le Multi-locus sequence typing.....	65
2-2-7-1 Réaction de polymérisation en chaîne	65
2-2-7-2 Electrophorèse des produits de PCR.....	67
2-2-7-3 Séquençage.....	67
2-2-7-3-1 Purification	67
2-2-7-3-2 PCR-Big Dye et purification des produits de PCR.....	67
2-2-7-3-3 Analyse des séquences.....	67
RESULTATS.....	68
1- Caractères phénotypiques des souches étudiées	69
1-1 Confirmation de l'identité des souches.....	69
1-2- Entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi.....	69
1-2-1- Répartition des souches selon les produits biologiques	69
1-2-2 Répartition des souches selon la source de provenance	69
1-3 Résistance des souches aux antibiotiques.....	74
1-3-1 Résistance des souches aux β -lactamines.....	74
1-3-2 Résistance des souches aux aminosides	74
1-3-3 Résistance des souches aux fluoroquinolones.....	74
1-3-4 Résistance des souches aux autres antibiotiques.....	74
1-4 Résistance des différentes souches productrices de BLSE aux antibiotiques	75
1-4-1 Résistance des souches de <i>Escherichia coli</i> aux antibiotiques.....	75
1-4-2 Résistance des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	75
1-4-3 Résistance des souches de <i>Enterobacter cloacae</i> aux antibiotiques	75
2- Caractères génotypiques des souches étudiées	79

2-1 Gènes de résistances aux β -lactamines détectés	79
2-2 Coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines	79
2-3 Gènes de résistance aux aminosides détectés	83
2-4 Coexpression des gènes de résistance aux aminosides.....	83
2-5 Coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines et aux aminosides.....	83
2-6 Gènes de résistance aux fluoroquinolones détectés.....	88
2-7 Coexpression des gènes de résistance aux fluoroquinolones	88
2-8 Coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines et aux fluoroquinolones	88
2-9 Coexpression des gènes de résistance aux trois familles d'antibiotiques.....	88
2-10 Coexpression des gènes de résistance selon la source de provenance des souches.....	88
3- Gènes de résistance identifiés après séquençage	91
3-1- Mise en évidence des différentes mutations dans les séquences protéiques	91
3-1-1 Alignement des séquences protéiques des β -lactamases de type Temoneira.....	91
3-1-2 Alignement des séquences protéiques des β -lactamases de type Sulfhydryl variable .	95
3-1-2-1 Alignement des séquences protéiques SHV-1 et SHV-89.....	95
3-1-2-2 Alignement des séquences protéiques SHV-2 et SHV-12.....	95
3-1-2-3 Alignement des séquences protéiques SHV-2 et SHV-27.....	99
3-1-2-4 Alignement des séquences protéiques SHV-2 et SHV-100.....	99
3-1-2-5 Alignement des séquences protéiques SHV-2 et SHV-106.....	99
4- Transfert de la résistance par conjugaison.....	103
5- Identification de gènes de résistance à la rifampicine	103
DISCUSSION	109
CONCLUSION	119
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123

ANNEXES.....i
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....xiii

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AMC	: Amoxicilline + acide clavulanique
AMP	: Adénosine monophosphate
AMPC	: Ampicilline-céphalosporinase
APEC	: <i>Escherichia coli</i> pathogènes aviaires
ATP	: Adénosine triphosphate
ATM	: Aztréonam
ARG-ANNOT	: Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation
ARN	: Acide ribonucléique
BCC	: Bouillon cœur cervelle
BGN	: Bacille à Gram Négatif
BLSE	: Bêta-lactamase à spectre élargi
BMR	: Bactéries multi-résistantes
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
CTX-M	: Céfotaximase-Munich
CTX	: Céfotaxime
CRO	: Ceftriaxone
C ₃ G	: Céphalosporines de troisième génération
C ₄ G	: Céphalosporines de quatrième génération
CC	: Citrate de Christensen
CS	: Citrate de Simmons
CASFM	: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
DAEC	: Diffusely-adhering <i>Escherichia coli</i>

EAggEC :	: Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EBLSE	: Entérobactéries productrices de Bêta-lactamases à spectre élargi
EMB	: Eosine Methylen Blue
EHEC	: Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
EIEC	: Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	: Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
ETEC	: Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
Fe ³⁺	: Ions ferriques
H ₂ S	: Sulfure d'Hydrogène
IPCI	: Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
kDa	: Kilo Dalton
LCR	: Liquide céphalo-rachidien
LPS	: Lipopolysaccharides
MH	: Müeller Hinton
MLST	: Multi-locus sequence typing
NMEC	: <i>Escherichia coli</i> associées à la méningite néonatale
ONPG	: Ortho-nitrophenyl β-D galactopyranoside
OXA	: Oxacilline
PDA	: Phénylalanine désaminase
PCR	: Polymerase chain reaction
PLP	: Protéines liant la penicilline
QNR	: Quinolone resistance
QRDR	: Quinolone Resistance Determining Region

RT-PCR	: Real-time polymerase chain reaction
RTX	: Repeats-In-ToXin
SHV	: Sulfhydryl Variable
ST	: Sequence Type
TEM	: Temoneira
TFA	: Trifluorate acetic acid
TBE	: Tris-Borate-EDTA
UPEC	: Uropathogenic <i>Escherichia. coli</i>
UTI	: infections des voies urinaires
VP	: Voges-Proskauer

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structures de quelques β -lactamines.....	21
Figure 2 : Structure de quelques aminosides: le cycle central DOS est indiqué en bleu.....	24
Figure 3 : Structure de quelques fluoroquinolones	26
Figure 4 : Structure de la rifampicine	28
Figure 5 : Réaction d'hydrolyse du noyau β -lactame par une β -lactamase	32
Figure 6 : Inactivation enzymatique des aminosides	38
Figure 7 : Site-A de la sous-unité ribosomale 30 S	40
Figure 8 : Distribution mondiale des gènes de méthylation.....	41
Figure 9 : Disposition des antibiotiques sur la gélose Müller Hinton.....	59
Figure 10 : Disposition des souches sur le milieu sélectif	66
Figure 11 : Profil de résistance aux antibiotiques d'une souche de <i>Escherichia coli</i>	70
Figure 12 : Répartition des souches productrices de BLSE et non productrices de BLSE	71
Figure 13 : Courbes représentant les gènes de résistantes aux β -lactamines détectés par la PCR en temps réel	80
Figure 14 : Profil électrophorétique des amplicons du gène <i>bla_{TEM}</i>	81
Figure 15 : Profils électrophorétiques des amplicons des gènes <i>aac (6)-I</i> , <i>aad</i> et <i>ant (2'')-I</i>	85
Figure 16 : Mutation dans la séquence protéique TEM 104.....	94
Figure 17 : Mutation dans la séquence protéique TEM 191	96
Figure 18 : Mutations dans la séquence protéique SHV-89	97
Figure 19 : Mutations dans la séquence protéique SHV-12	98
Figure 20 : Mutations dans la séquence protéique SHV-27	100
Figure 21 : Mutations dans la séquence protéique SHV-100	101

Figure 22 : Mutation dans la séquence protéique SHV-106	102
Figure 23 : Sélection de souches transconjugantes sur le milieu Müller Hinton modifié.....	104
Figure 24 : Antibiogrammes des souches donatrice, réceptrice et transconjugante	105
Figure 25 : Profil électrophorétique des amplicons des gènes <i>aac(6)-Ib</i> et <i>bla_{CTX-MI}</i>	106
Figure 26 : Profil électrophorétique des amplicons du gène <i>arr 2</i>	107
Figure 27 : Profil électrophorétique des amplicons des 7 gènes de ménage de <i>E. coli</i> et de <i>K. pneumoniae</i>	108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principaux caractères biochimiques de certaines entérobactéries.....	9
Tableau II : Différents groupes des entérobactéries.....	11
Tableau III : Liste des antibiotiques utilisés dans cette étude (EUCAST-CASFM, 2013).....	48
Tableau IV : Amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance aux β -lactamines par la PCR en temps réel.....	50
Tableau V : Amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance aux β -lactamines par PCR classique	51
Tableau VI : Amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance aux fluoroquinolones, aux aminosides et à la rifampicine par PCR classique.....	52
Tableau VII : Amorces utilisées pour la détection des 7 gènes de ménage de <i>Escherichia coli</i>	53
Tableau VIII : Amorces utilisées pour la détection des gènes de ménage de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	54
Tableau IX : Scores et niveaux d'identification des souches bactériennes	58
Tableau X : Répartition des souches selon les produits biologiques et dispositif invasif.....	72
Tableau XI : Répartition des souches selon la source de provenance.....	73
Tableau XII : Taux de résistance aux antibiotiques des souches de <i>Escherichia coli</i> productrices de BLSE	76
Tableau XIII : Taux de résistance aux antibiotiques des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrices de BLSE.....	77
Tableau XIV : Taux de résistance aux antibiotiques des souches de <i>Enterobacter cloacae</i> productrices de BLSE	78
Tableau XV : Répartition des gènes de résistance aux β -lactamines entre les souches productrices de BLSE	82

Tableau XVI : Coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines chez les EBLSE	84
Tableau XVII : Coexpression des gènes de résistance aux aminosides	86
Tableau XVIII : Coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines et aux aminosides chez les souches productrices de BLSE	87
Tableau XIX : Coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines et aux fluoroquinolones ...	89
Tableau XX : Coexpression des gènes de résistance aux trois familles d'antibiotiques	90
Tableau XXI : Coexpression des gènes de résistance selon la source de provenance	92
Tableau XXII : Répartition des gènes de résistance aux β -lactamines identifiés selon les espèces	93

INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques au début du XX^e siècle a constitué une véritable révolution dans le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne. C'est en 1928, qu'Alexander Fleming a découvert la pénicilline et son excellent pouvoir bactéricide (**Rolinson, 1998**). Dès la fin des années 1940 et jusqu'aux années 1970, de nombreux antibiotiques d'origine naturelle et d'autres synthétisés ont été découverts. Il s'agit entre autres des β -lactamines, des aminosides, des quinolones, des cyclines (**Livermore, 1995**). Cependant, leur utilisation abusive et incontrôlée a conduit à une antibiorésistance et à une augmentation du taux de morbidité et de mortalité (**Gassama, 2004**).

Selon les données de l'OMS, les maladies infectieuses d'origine bactérienne font partir des 10 principales causes de mortalité dans le monde. En effet, les infections des voies respiratoires étaient à l'origine de 3 millions de décès dans le monde en 2016 tandis que le taux de mortalité imputable aux affections diarrhéiques s'élevait à 1,4 million de décès en 2015. Au cours de cette période, la tuberculose a causé le décès d'environ 1,3 million de personnes (**anonyme, 2016**).

La lutte contre les maladies infectieuses est une priorité de santé dans les pays en voie de développement. Toutefois, cette lutte est aujourd'hui compromise par certaines pratiques récurrentes dans nos sociétés. Ce sont, la forte pression de sélection des antibiotiques, l'automédication et la vente anarchique de médicaments en dehors des structures légales qui favorisent l'émergence et la dissémination de bactéries multirésistantes (BMR) (**Belbel, 2014**).

Parmi ces BMR, sont incluses les entérobactéries, constituées d'un ensemble important de bactéries dont certaines sont pathogènes (**Souna, 2011**). Leur pathogénicité est exacerbée par leur résistance aux antibiotiques, notamment aux β -lactamines, par la production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE), qui est souvent associée à la résistance à certaines familles d'antibiotiques comme les aminosides et les fluoroquinolones (**Iabadene et al., 2010**).

L'émergence et la dissémination des bactéries résistantes sont dues à leur pouvoir d'adaptation qui se manifeste par leur capacité à s'approprier de nouvelles propriétés. Elle se fait soit par modification de leur génome, soit par acquisition d'informations génétiques par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles que sont les plasmides et les éléments transposables (**Carattoli, 2008 ; Leverstein et al., 2011**).

Par ailleurs, plusieurs mécanismes de résistance des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (EBLSE) aux antibiotiques ont été décrits, parmi lesquels l'inactivation enzymatique des antibiotiques, l'altération ou la modification des cibles auxquelles se lie l'antibiotique et l'expulsion de l'antibiotique par des systèmes d'efflux (**Gassama, 2004**).

Dans la résistance des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi aux aminosides, l'inactivation enzymatique par 3 classes d'enzymes que sont les acétyltransférases, les nucléotidyltransférases et les phosphotransférases a été le mécanisme principalement développé par les bactéries (**Shaw *et al.*, 1993**). Toutefois, la méthylation de l'ARN ribosomique 16S (ARNr) a récemment émergé comme un nouveau mécanisme de résistance qui confère une résistance de haut niveau à tous les aminosides (**Doi *et al.*, 2004**). Les gènes codant pour ces méthyltransférases sont généralement situés sur des plasmides dont certains (59%) portent également d'autres gènes de résistance tels que les gènes *qnr*, *AmpC* (**Hidalgo *et al.*, 2013**).

En outre, la résistance des EBLSE aux fluoroquinolones est quant à elle soit chromosomique soit plasmidique (**Robicsek *et al.*, 2005**). La résistance chromosomique se manifeste principalement par la modification de la cible enzymatique des fluoroquinolones que sont l'ADN-gyrase et la topoisomérase IV, par la diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique qui se fait par réduction de la production de porines ou par modification de l'activité de diverses pompes à efflux (**Jacoby, 2005**). L'un des déterminants génétique de la résistance plasmidique des entérobactéries aux fluoroquinolones est le gène *qnr* dont la caractéristique principale est d'être portée par un intégron de classe 1 extrêmement mobile entre différents plasmides. La particularité de ce support génétique est son caractère transférable et sa capacité à accélérer la diffusion de la résistance aux fluoroquinolones par le biais du transfert de gènes plasmidiques (**Robicsek *et al.*, 2005**). Ce nouveau mécanisme fait redouter une diffusion extrêmement rapide de type épidémique de la résistance aux fluoroquinolones (**Paauw *et al.*, 2004 ; Robicsek *et al.*, 2005**).

En Côte d'Ivoire, la résistance des bactéries aux antibiotiques et l'émergence des entérobactéries productrices de BLSE sont devenues un véritable problème de santé publique (**Dadié *et al.*, 2003 ; Akoua-koffi *et al.*, 2004 ; Gbonon *et al.*, 2007**).

Certains travaux ont rapporté la présence et la diffusion des souches productrices de BLSE chez les entérobactéries d'origine humaine (**Guessennd *et al.*, 2008a ; Yao *et al.*, 2010**) de même que chez des souches d'origine animale et environnementale (**Ouattara *et al.*, 2014**). Et les BLSE de type TEM, SHV, CTX-M ont été décrits chez des entérobactéries d'origine humaine (**Guessennd *et al.*, 2008b ; Toty *et al.*, 2016**).

De plus, depuis plusieurs années, certaines études ont fait cas de l'augmentation du taux de résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones chez les entérobactéries productrices de BLSE en Côte d'Ivoire, qui serait responsable des impasses thérapeutiques (**Akoua-Koffi *et al.*, 2004 ; Guessennd *et al.*, 2008b ; Ouattara, 2014 ; Cissé *et al.*, 2017**).

Ainsi, face à l'émergence des souches résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones, la question qui ressort est de savoir si les gènes codant pour les acétyltransférases, les nucléotidyltransférases, les phosphotransférases et les protéines QNR sont-ils impliqués dans la résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones chez les entérobactéries productrices de BLSE à Abidjan, en Côte d'Ivoire ?

Pour répondre à cette question de recherche, l'objectif principal de cette étude est de caractériser des gènes de résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones codant pour les acétyltransférases, les nucléotidyltransférases, les phosphotransférases et les protéines QNR chez des entérobactéries productrices de BLSE dans le district d'Abidjan.

Des objectifs spécifiques ont été fixés afin d'atteindre cet objectif principal. Il s'est agi de :

- 1 Détecter les gènes de résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones pour les souches retenues pour l'étude,
- 2 Analyser les mutations conférant la résistance à ces antibiotiques
- 3 Etudier la possibilité de transfert de la résistance entre les bactéries
- 4 Déterminer les profils de résistance des souches à étudier vis à vis des antibiotiques

Ce manuscrit s'articule autour de 4 parties : la première partie portera principalement sur la revue bibliographique concernant la description des entérobactéries, les antibiotiques, leur mode d'action et les mécanismes de résistance des entérobactéries aux antibiotiques. La deuxième partie présentera le matériel et les méthodes expérimentales utilisées. La troisième partie portera sur l'ensemble des résultats obtenus et la discussion qui en découle. Une quatrième partie sera consacrée à la conclusion, aux perspectives de recherche à venir et aux recommandations.

**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

1- Entérobactéries

Le nom "entérobactérie" fait référence à la localisation d'une famille de microorganismes dans le tube digestif et principalement dans le côlon de l'homme et des animaux (**Avril et al., 2000**). Ces microorganismes sont très hétérogènes pour ce qui est de leur pathogénicité et de leur écologie. Les espèces qui composent la famille des entérobactéries sont en effet soit parasites (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*), soit saprophytes (*Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*) (**Avril et al., 2000 ; Joly et Reynaud., 2007**).

1-1 Caractères biochimiques

La distinction entre les genres et les espèces se fait par l'étude des caractères biochimiques que sont l'utilisation du citrate de Simmons comme seule source de carbone, la production d'uréase, la capacité à fermenter le glucose, la capacité à réduire les nitrates en nitrite, la fermentation du lactose, la production d'indole, la production d'acétoïne, la désamination du tryptophane (**Avril et al., 2000**).

1-1-1 Réaction d'oxydase

La mise en évidence de la production du cytochrome C oxydase à partir du test d'oxydase est essentielle pour orienter l'identification des bacilles à Gram négatif. Il permet de différencier dans le grand groupe des bacilles à Gram négatif, la famille des entérobactéries de celles des Pseudomonaceae et des Vibrionaceae (**Niang, 2003**). Le test d'oxydase est souvent réalisé à l'aide des disques d'oxydase imprégnés du réactif chlorhydrate ou d'oxalate de N-diméthyl paraphénylène diamine ou PDA. Si une bactérie possède l'enzyme respiratoire cytochrome C oxydase, la forme oxydée rose violacée du PDA est produite à partir de la forme réduite incolore.

1-1-2 Utilisation du Citrate de Simmons

L'utilisation du Citrate de Simmons (CS) comme seule source de carbone par les bactéries se traduit par une alcalinisation du milieu qui correspond au virage de l'indicateur coloré du vert au bleu (**Avril et al., 2000**).

1-1-3 Recherche de l'uréase

Les bactéries possédant une uréase active scindent l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniac. Ceux-ci en se combinant donnent du carbonate d'ammonium. Le carbonate d'ammonium formé alcalinise le milieu, ce qui se traduit par le virage de l'indicateur coloré de l'orange au rose (**Avril et al., 2000**).

1-1-4 Recherche de la production d'indole

Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une tryptophanase. Il se forme de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac. L'indole est apolaire et réagit fortement avec le para-diméthyl-amino-benzaldéhyde (réactif de Kovacs) en milieu acide pour donner un anneau rouge qui remonte en surface (**Drame, 2001**).

1-1-5 Recherche de la lysine décarboxylase et de la lysine désaminases

Le milieu lysine de fer est un milieu qui contient la lysine, du glucose, du fer. Les réactions se déroulent en anaérobiose (dans le culot) et en aérobiose (au niveau de la pente) avec production de désaminases. Ces désaminases sont des enzymes induites qui agissent sur les acides aminés en entraînant la formation des acides cétoniques correspondants. Les acides cétoniques formés ont la propriété de donner des complexes colorés avec les ions ferriques (Fe^{3+}). Le virage de la pente du violet au jaune traduit la production d'une lysine désaminase par la bactérie. Par contre, l'absence de virage du culot traduit la production d'une lysine décarboxylase par la bactérie (**Bakhoum, 2004**).

1-1-6 Fermentation des sucres, production du sulfure d'hydrogène et de gaz

Le milieu Kligler-Hajna est un milieu de culture permettant la recherche simultanée de la fermentation du glucose, du lactose; la production du sulfure d'hydrogène (H_2S) et la production de gaz. La fermentation du glucose par la bactérie est mise en évidence par le virage du culot du rouge au jaune tandis le virage de la pente au jaune indique la fermentation du lactose. Par ailleurs, la production de sulfure d'hydrogène est mise en évidence par une coloration noire dans le culot et la présence de bulles d'air ou le décollement du culot indique la production de gaz (**Avril et al., 2000**).

1-1-7 Utilisation du malonate

Le malonate inhibe le cycle de Krebs (inhibition de la succinate déshydrogénase). Seules les bactéries qui peuvent utiliser le cycle glyoxalique sont capables de se développer sur un milieu au malonate. L'utilisation du malonate s'accompagne d'une libération d'ions hydroxyl (OH^-) alcalinisant (**Avril et al., 2000**).

1-1-8 Milieu au Citrate de Christensen

A la différence du Citrate de Simmons, le milieu Citrate de Christensen (CC) contient une faible quantité de glucose, d'extrait de levure et une source d'azote organique. Dans ces conditions, certaines bactéries qui n'utilisent pas le citrate de Simmons sont capables d'utiliser le citrate de Christensen. La formation d'ions hydroxyle (OH^-) alcalinise le milieu (virage du jaune au rose) (**Joly et Reynaud., 2007**).

1-1-9-Recherche de l'acétoïne ou Réaction de Voges-Proskauer

La formation de l'acétyl-méthyl carbinol (AMC) ou acétoïne se fait soit à partir de deux molécules d'acide pyruvique, soit à partir du glucose. En présence d'une base forte, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné (oxydation en diacétal) (Avril *et al.*, 2000).

1-1-10 Recherche de la galactosidase

Le test à l'Ortho-NitroPhényl β -D-Galactopyranoside (ONPG) permet la recherche de la β -galactosidase qui est une enzyme qui intervient dans le métabolisme du lactose. L'utilisation du lactose par la bactérie requiert deux enzymes à savoir le lactose perméase qui permet au lactose de pénétrer dans la bactérie et la β -galactosidase qui catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose. La β -galactosidase est une enzyme inductible, c'est-à-dire qu'elle n'est synthétisée par la bactérie que lorsque celle-ci est en présence de son substrat. L'ONPG est un substrat synthétique, de structure proche du lactose, capable de pénétrer dans la bactérie sans perméase (Avril *et al.*, 2000).

Les caractères biochimiques différentiels de certaines entérobactéries sont illustrés dans le **Tableau I**.

1-2 Caractères cultureux

Les entérobactéries se développent facilement sur les milieux ordinaires en 24 heures à 37°C en aérobie et en anaérobie (Freney *et al.*, 2000). Sur les milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S). Cet aspect peut évoluer après des cultures successives pour donner des colonies à surface sèche rugueuse (type « rough » ou R). En milieu liquide, les entérobactéries occasionnent un trouble uniforme du bouillon (Avril *et al.*, 2000).

1-3 Caractères morphologiques

Les entérobactéries sont polymorphes avec des tailles variant de 2 à 3 μm de long sur 0,4 à 0,6 μm de large. Les espèces mobiles, les plus nombreuses, le sont grâce à une ciliature péritriche tandis que certaines sont immobiles (Abbott, 2007). Quelques unes possèdent une capsule visible au microscope et la plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des *fimbriae* ou *pili* qui sont des facteurs d'adhésion (Drame, 2001 ; Bakhom, 2004).

Tableau I : Principaux caractères biochimiques de certaines entérobactéries

	<i>Esch</i>	<i>Citro</i>	<i>Entero</i>	<i>Kleb</i>	<i>Serr</i>	<i>Salm</i>	<i>Shig</i>	<i>Prot</i>	<i>Prov</i>	<i>Yers</i>	<i>Morg</i>
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	+	-
Indole	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+	+/-	+
VP	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Citr	-	+	+	+	+	+/-	-	+/-	+	-	-
Mob.	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Urée	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
TDA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
H ₂ S	-	+/-	-	-	-	+	-	+/-	-	-	+

ONPG = Ortho NitroPhényl Galactoside ; VP = Voges Proskauer ; Citr = citrate ; Mob = mobilité ; TDA = Tryptophane désaminase ; H₂S = Hydrogène sulfureux ; *Esch* = *Escherichia* ; *Citro* = *Citrobacter* ; *Entero* = *Enterobacter* ; *Kleb* = *Klebsiella* ; *Serr* = *Serratia* ; *Salm* = *Salmonella* ; *Shig* = *Shigella* ; *Prot* = *Proteus* ; *Prov* = *Providencia* ; *Yers* = *Yersinia* ; *Morg* = *Morganella* ; (+) = positif ; (+/-) = variable ; (-) = négatif (**Decoster et Lahieu, 2006**)

1-4 Différentes espèces des entérobactéries

La famille des entérobactéries se compose d'environ 40 genres et plus de 100 espèces dont les plus isolées en bactériologie clinique appartiennent aux genres : *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Hafnia*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* (Avril *et al.*, 2000). Les entérobactéries sont classées en quatre groupes par rapport à leur résistance naturelle aux β -lactamines (Tableau II). Pour la suite du travail, il semble nécessaire de rappeler brièvement quelques caractères de certaines entérobactéries fréquemment rencontrés en pathologie humaine et qui posent des problèmes de résistance.

1-4-1 *Escherichia coli*

Isolée pour la première fois par Escherich en 1885, *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée pour des travaux de physiologie et de génétique. Elle représente l'espèce type du genre *Escherichia*. Appelée communément « colibacille », cette espèce possède certains caractères bactériologiques (Avril *et al.*, 2000).

1-4-1-1 Caractères bactériologiques

Escherichia coli se présente sous forme de bacille de 2 à 3 μm de long sur 0,5 μm de large, généralement polymorphes. La plupart des souches de *E. coli* se multiplient rapidement entre 18 et 24 h sur les milieux de culture sélectifs. Les colonies sont rondes, plates et à bords réguliers. Ce sont des bactéries mésophiles car la température optimale de croissance est de 37 °C et le pH optimal est compris entre 7,2-7,4 (Hanes, 2003).

1-4-1-2 Caractères biochimiques

E. coli possède des caractères biochimiques particuliers permettant de le différencier des autres espèces (Farmer *et al.*, 2007), ce sont : absence d'uréase, fermentation de lactose, absence de production d'oxydase, production d'indole, absence de croissance sur le citrate et pas de production de H_2S (Minor et Richard, 1993).

1-4-1-3 Caractères antigéniques

E. coli possède des antigènes associés à quatre types de structures. Les antigènes de paroi (somatiques) ou antigènes O correspondent aux polysides fixés sur les lipopolysaccharides (LPS). Les antigènes de flagelles ou antigènes H de nature protéique qui sont constitués de flagellines. les antigènes de surface de type F présents chez les souches ayant des propriétés d'adhésion et les antigènes d'enveloppe K qui sont de nature polysaccharidiques (Kaper *et al.*, 2004).

Tableau II : Différents groupes des entérobactéries

Groupe de β-lactamines	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Principaux genres d'entérobactéries rencontrées en milieu hospitalier.	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i>	<i>Klebsiella</i> <i>Citrobacter</i> <i>koseri</i>	<i>Enterobacter</i> <i>Serratia</i> <i>Morganella</i> <i>Providencia</i> <i>Citrobacter freundii</i>	<i>Yersinia</i>
Aminopénicillines	S	R	R	R
Carboxypénicillines	S	R	S	R
Uréidopénicillines	S	I/ R	S	I/ R
Céphalosporines de première génération	S	S	R	R
Céphalosporines de troisième génération	S	S	S	S
Carbapénèmes	S	S	S	S
Mécanismes de résistances	Absence de β-lactamases	Pénicillinase à bas niveau	Céphalosporinase à bas niveau	Pénicillinase + Céphalosporinase

S : sensible ; I : intermédiaire ; R : résistant (Lagha, 2015)

1-4-1-4 Pouvoir pathogène

Escherichia coli est l'une des espèces bactériennes le plus souvent rencontrée en pathologie humaine. Elle regroupe des souches commensales de l'intestin de l'homme et des animaux de même que des souches responsables de pathologies intestinales comme les diarrhées aiguës (**Freney et al., 2000**). Certaines souches de *E. coli* sont impliquées dans plusieurs infections extra-intestinales importantes de l'homme telles que les infections urinaires, abdominales et méningées (**Fauchère et Avril, 2002**). *E. coli* est le micro-organisme le plus fréquemment impliqué dans plusieurs infections urinaires acquises en ville. Il est également responsable d'infections nosocomiales, notamment des infections des plaies chirurgicales et des bactériémies (**Alain et Bernard, 2002**). Les souches de *E. coli* pathogènes peuvent être séparés en deux grands groupes en fonction du type d'infection dont elles sont à l'origine. Le premier groupe nommé *E. coli* pathogènes intestinaux (IntEC) est à l'origine de syndromes diarrhéiques et comprend six groupes pathogènes ou pathovars. Il s'agit des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), des *E. coli* entéroagréatifs (EAEC), des *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), des *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et des *E. coli* entéroinvasifs (EIEC). Le deuxième groupe, nommé ExPEC pour *E. coli* pathogènes extra-intestinaux, comprend les souches à l'origine d'infections du tractus urinaire (Uropathogenic *E. coli* ou UPEC), les souches à l'origine de méningites et de septicémies (neonatal meningitis *E. coli* ou NMEC) et le pathovar animal aviaire (APEC) (**Nataro et Kaper, 1998**).

1-4-1-4-1 *Escherichia coli* pathogènes intestinaux

1-4-1-4-1-1 *Escherichia coli* entérotoxigènes

Ils sont responsables de diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement de la zone intertropicale et représentent l'un des principaux agents de la diarrhée du voyageur (**Levine et al., 1993 ; Hoque et al., 1994**). Le pouvoir entéropathogène des *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC) repose d'une part sur l'élaboration de facteurs d'adhésion qui permettent la colonisation de l'intestin grêle et d'autre part sur la sécrétion d'entérotoxines. Les entérotoxines des ETEC sont des protéines qui sont soit de haut poids moléculaire et de type thermolabile, soit de bas poids moléculaire et de type thermostable. Elles n'altèrent pas la cellule mais déclenchent une fuite hydroélectrolytique en perturbant les systèmes de contrôle de la sécrétion entérocytaire. Il s'en suit une diarrhée aqueuse riche en électrolytes (**Black, 1990 ; Dupont et Ericsson, 1993**).

1-4-1-4-1-2 *Escherichia coli* entéropathogènes

Les souches de *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont responsables de diarrhées infantiles persistantes souvent épidémiques particulièrement chez les enfants de 0 à 5 ans.

Ce pathovar est rarement responsable de diarrhée chez l'adulte (**Scaletsky et al., 2002**). Le pouvoir pathogène des EPEC est dû à leur capacité à adhérer aux entérocytes des cellules de l'intestin grêle et à produire des lésions histopathologiques au niveau de la bordure en brosse des entérocytes (**Gassama, 2004**).

1-4-1-4-1-3 *Escherichia coli* entéroinvasifs

Les souches de *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) sont responsables de syndromes dysentériques proches de la shigellose. Le pouvoir pathogène des EIEC est caractérisé par leur capacité à envahir et à se développer dans les cellules épithéliales du colon. Le phénomène d'invasion est sous la dépendance de facteurs chromosomiques et plasmidiques (**Gassama, 2004**).

1-4-1-4-1-4 *Escherichia coli* entérohémorragiques

Ils ont été identifiés lors d'épidémies de colites hémorragiques pouvant évoluer vers un syndrome hémolytique urémique (SHU), une insuffisance rénale ou un purpura thrombopénique. Les souches de *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) ont été à l'origine de plusieurs épidémies de grande ampleur avec une létalité importante et posent un problème de sécurité alimentaire dans les pays industrialisés. Actuellement, trois sérotypes d'EHEC sont identifiés, ce sont O:157; O:26; O:111. Leur pouvoir pathogène est caractérisé par une forte adhérence à la surface de l'iléon distal du cæcum et du colon droit et à la production de Shiga toxine (Stx) (**Bell et al., 1994**).

1-4-1-4-1-5 *Escherichia coli* entéroaggrégants

Les souches de *E. coli* entéroaggrégants (EaggEC) sont responsables de diarrhées persistantes aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. EAggEC est suspecté d'être responsable de la diarrhée du voyageur au même titre que ETEC, qui lui est souvent associé (**Schultz et al., 2000 ; Adachi et al., 2002**). La forte prévalence des EAggEC chez les patients infectés par le VIH le classe parmi les pathogènes opportunistes (**Germani et al., 1998**). La plupart des souches d'EaggEC hébergent un plasmide de 60 à 65 Mda appelé pAA codant pour les facteurs AAF/I et AAF/II, une entérotoxine EAST1 proche de la toxine thermostable de *E. coli*, deux sérines protéases Pet responsable des effets cytotoxiques et Pic une protéine impliquée dans la colonisation intestinale (**Piva et al., 2003**).

1-4-1-4-1-6 *Escherichia coli* entéroadhérents ou à adhésion diffuse

Les souches de *E. coli* entéroadhérents ou à adhésion diffuse (DAEC) sont impliquées dans les diarrhées infantiles. La virulence des DAEC est liée à leur capacité à adhérer aux cellules épithéliales.

Deux familles de gènes codant pour cette adhésion ont été identifiées ce sont: F1825 et AIDA-I. Actuellement, deux nouveaux pathotypes sont proposés sur la base de l'identification des cytokines; il s'agit de: *E. coli* producteurs de cytokines léthales par distention cellulaire (CLDT) également retrouvés chez *Shigella spp* et *Campylobacter spp* et *E. coli* producteurs d'hémolysines alpha détectées par leur capacité à détacher un tapis de cellules HeLa ou Hep-2 en culture (Gassama, 2004).

1-4-1-4-2 *Escherichia coli* pathogènes extra-intestinaux

1-4-1-4-2-1 *Escherichia coli* uropathogènes

Les souches de *E. coli* uropathogènes (UPEC) sont responsables de 80 % des infections des voies urinaires (UTI), soit environ 150 millions de personnes par an dans le monde. Les infections dues aux UPEC sont retrouvées particulièrement chez les femmes de tout âge. Les UTI se produisent lorsqu'il y a contamination de la région urogénitale par la flore fécale. Les bactéries peuvent atteindre la vessie et provoquer une cystite aiguë ou infecter les reins et provoquer une pyélonéphrite aiguë. Dans certains cas, les UTI peuvent mener à une septicémie. Ces septicémies causent en moyenne 40000 morts par année aux États-Unis. Les UTI reposent sur la présence de plusieurs facteurs de virulence. La présence ou non de ces facteurs influence la sévérité de l'UTI (Nataro et Kaper, 1998).

1-4-1-4-2-2 Facteurs de virulence des *Escherichia coli* uropathogènes

➤ Fimbriae

Les fimbriae aussi connu sur le nom de pili sont des hétéropolymères d'environ 1µm de longueur et de diamètre allant de 5 à 10 nm (Kaper *et al.*, 2004). Les UPEC expriment plusieurs fimbriae, tels que des fimbriae de type 1, des fimbriae de type P, des fimbriae F1C et des fimbriae S. Ils sont nécessaires à la bactérie pour promouvoir la colonisation des surfaces. Chaque souche peut exprimer différents types de fimbriae selon leur contenu génétique et les phases où la bactérie se trouve (High, 1988).

➤ Autotransporteurs

Les autotransporteurs sont une famille de protéines capables de s'autosécréter à travers la membrane d'une bactérie à Gram négatif grâce à un mécanisme appelé sécrétion de type V. Il existe différents autotransporteurs dont des toxines, des hémagglutinines, des cytotoxines et les SPATEs (Serine Protease AutoTransporters of Enterobacteriaceae (Restieri *et al.*, 2007).

➤ Hémolysine

L'hémolysine est une toxine 'Repeats-In-ToXin' (RTX). Les toxines RTX sont produites par des bactéries à Gram négatif et sont caractérisées par des répétitions dans la séquence protéique ainsi que par un système de sécrétion de type 1 (T1SS). Les fragments des séquences répétées sont riches en aspartate et glycine. Ils se situent en C-terminal, ce qui facilite le transport par le système de sécrétion. Les toxines RTX sont composées d'un regroupement de gènes comprenant la toxine RTX, une acyltransférase permettant l'activation de la toxine et les protéines du système de sécrétion de type 1. Ces gènes sont typiquement localisés sur des îlots de pathogénicité (**Smith et al., 2015**).

➤ Sidérophores

Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire (500 à 1500 Daltons) ayant une forte affinité pour le fer ferrique (fer oxydé). Ce sont des chélateurs de fer qui permettent l'obtention de fer par la bactérie pour ses besoins physiologiques. Les sidérophores sont des facteurs de virulence essentiels dans la plupart des bactéries pathogènes à Gram négatif. Le fer est nécessaire à la bactérie, cependant il est difficile d'accès. Le fer ferreux (Fe²⁺) étant toxique et le fer ferrique (Fe³⁺) insoluble, il n'y a que très peu de fer libre disponible chez l'hôte infecté. Les bactéries sont donc en compétition entre elles pour le capturer, mais aussi en compétition avec les systèmes de défense de l'hôte tels que la transferrine et la lactoferrine (**Holden et Bachman, 2015**).

1-4-1-4-2-3 *Escherichia coli* associé à la méningite néonatale

Les souches de *E. coli* associées à la méningite néonatale (NMEC) provoquent des méningites chez les nouveau-nés, 15 à 40 % des nouveau-nés atteints décèdent. Bon nombre des survivants souffrent de défauts neurologiques graves. Les bactéries sont transportées par les voies hématogènes (voies sanguines) (**Kaper et al., 2004**).

1-4-1-4-2-4 *Escherichia coli* pathogènes aviaires

Les souches de *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) affectent les voies respiratoires de la volaille. Elles peuvent aussi causer des péricardites et des septicémies. Ces pathogènes sont responsables d'importantes pertes économiques (**Kaper et al., 2004**).

1-4-2 *Klebsiella pneumoniae*

Connue autrefois sous le nom de pneumobacille de Friedlander, *K. pneumoniae* est un Bacille Gram Négatif (BGN), immobile, commensale de l'intestin et des voies respiratoires (**Freney et al., 2000**).

1-4-2-1 Caractères bactériologiques

K. pneumoniae se développe sur les milieux de culture d'isolement pour entérobactéries à savoir Drigalski, Hektoen, Mac Conkey, Eosine bleu de méthylène (EMB), après une incubation de 18 à 24 h à 37 °C. Ce sont des bactéries à Gram négatif, immobiles. Sur gélose, les colonies de type mucoïde ont un aspect caractéristique. Elles sont volumineuses avec un diamètre de 3 à 4 mm, bombées, brillantes, opaques et parfois filantes à l'anse de platine. En milieu liquide (bouillon nutritif, eau peptonée), elles forment un dépôt muqueux et une colorette visqueuse en surface (Freney *et al.*, 2000).

1-4-2-2 Caractères biochimiques

K. pneumoniae une bactérie aéro-anaérobie facultative qui fermente le glucose avec production de gaz et ne possède pas d'oxydase (Abbott, 2007).

1-4-2-3 Caractères antigéniques

K. pneumoniae possède des antigènes communs avec ceux portés par les autres entérobactéries excepté l'antigène flagellaire du fait de son immobilité. Les antigènes présents sont les antigènes O ou somatiques, les antigènes capsulaires (K) et les antigènes d'adhérence appelés aussi fimbriae (Avril *et al.*, 2000).

1-4-2-4 Facteurs de pathogénicité de *Klebsiella pneumoniae*

Cinq types de facteurs sont retrouvés chez *K. pneumoniae* (Podschun et Ullmann, 1998).

1-4-2-4-1 Antigènes de surface

Deux types d'antigènes sont exprimés à la surface de *K. pneumoniae*. Ces deux antigènes contribuent à la pathogénie de cette bactérie. Le premier est l'antigène "O" qui est le composant du liposaccharide (LPS) et dont 8 types ont été identifiés. Le second est l'antigène capsulaire (K), un polysaccharide capsulaire dont 82 ont été décrits et 77 caractérisés (Dabernat *et al.*, 1997).

1-4-2-4-2 Adhésines

Les adhésines sont des molécules qui jouent un rôle essentiel dans la première étape du processus infectieux (Dabernat *et al.*, 1997).

Les propriétés d'adhésion des entérobactéries sont généralement médiées par différents types de pili ou fimbriae. Les pili ou fimbriae sont des structures protéiques non flagellaires et filamenteuses formant des appendices à la surface des bactéries qui ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes (Gassama, 2004).

Ils sont formés de différentes sous-unités. Les deux types de fimbriae les plus rencontrés chez *K. pneumoniae* sont le type 1 et le type 3 (**Gassama, 2004**).

- Les fimbriae de type 1 sont les mieux connus et sont présents chez la majorité des entérobactéries. Ils ont la plus grande capacité d'adhésion et sont impliqués dans la colonisation des tractus respiratoire et urinaire (**Struve, 2008**).
- Les propriétés des fimbriae de type 3 sont moins connues. Ils sont impliqués dans l'adhésion de *K. pneumoniae* à différents types cellulaires, par exemple aux épithéliums urinaires et respiratoires. Leur rôle comme facteur de virulence reste hypothétique dans plusieurs modèles d'infections (urinaire, pulmonaire). Néanmoins, du fait que ces structures semblent faciliter l'adhésion à des supports inertes et avoir un rôle dans la formation de biofilm, elles pourraient participer à la physiopathologie des infections urinaires sur sonde (**Sebghati, 1998**).

1-4-2-4-3 Sidérophores

Les sidérophores sont des structures particulières qui permettent aux bactéries de capter le fer environnant qui est associé à des glycoprotéines telles que la transferrine et la lactoferrine. En effet, le fer est essentiel à la croissance et à la réplication *in vivo* des bactéries et joue un rôle dans l'installation et la progression de l'infection (**Dabernat *et al.*, 1997**).

1-4-2-4-4 Ilot de pathogénicité

C'est un grand fragment chromosomique d'ADN de 35 à 45 kb qui porte les gènes de virulence, en particulier le locus de la yersiniabactine indispensable à l'expression du phénotype hyper-virulent de *Yersinia sp.* Il s'insère au niveau de la terminaison 3' du gène de l'ARN de transfert. Cet îlot contient de nombreux gènes dont le locus de la yersiniabactine qui a pour fonction essentielle de capter les molécules de fer nécessaires à la croissance et à la dissémination de la bactérie (**Carniel, 1999**).

1-4-2-4-5 Elément d'intégration et de conjugaison

Le transfert horizontal de gènes intra-espèces et inter-espèces joue un rôle essentiel dans l'évolution et la capacité d'adaptation des bactéries (**De la Cruz et Davies, 2000**).

Trois mécanismes principaux permettent aux souches bactériennes d'acquérir des gènes par transfert horizontal et de répondre ainsi rapidement aux défis et stress environnementaux. Il s'agit de : la transformation, la transduction et la conjugaison (**Hacker et Kaper, 2000**).

1-4-2-5 Pouvoir pathogène

K. pneumoniae est un pathogène opportuniste responsable d'infections communautaires et d'infections nosocomiales. Parmi les infections communautaires, *K. pneumoniae* est responsable d'infections broncho-pulmonaires incluant les pneumonies lobaires nécrosantes, les abcès pulmonaires, les pleurésies purulentes (**Carpenter, 1990**). Cette espèce est également responsable d'infections intra-abdominales et est isolée du mal perforant plantaire. *K. pneumoniae* est surtout un agent d'infections nosocomiales (**Podschn et Ullmann, 1998**), responsable d'infections urinaires sur sonde, de bactériémies, de pneumonies, d'infections de sites opératoires et d'infections néonatales (**Stone et al., 2003**). Il occupe une place importante dans la pathologie infectieuse du nouveau-né et les infections nosocomiales à *K. pneumoniae* dans les services de néonatalogie sont fréquentes, notamment dans les unités de soins intensifs et chez les prématurés (**Sahly et al., 2004**).

1-4-3 Enterobacter cloacae

E. cloacae est l'espèce la plus fréquemment isolée au sein du genre *Enterobacter* (**Souna, 2015**).

1-4-3-1 Caractères bactériologiques

E. cloacae est un BGN anaérobie facultatif mesurant 0,6 à 1 µm de diamètre et 1,2 à 3 µm de longueur. Il se déplace grâce à des flagelles péritriches et est doté de pilus de classe 1 (**Hart, 2006**). Sur gélose nutritive, *E. cloacae* forme des colonies rondes avec un diamètre de 2 mm et légèrement plates avec des bords irréguliers (**Grimont et Grimont, 2006**).

1-4-3-2 Caractères biochimiques

E. cloacae produit un acide à partir de la fermentation du glucose, donne une réaction négative à l'épreuve au rouge de méthyle et une réaction positive au test de Voges-Proskauer ; la température optimale de sa croissance est de 30 °C (**Hart, 2006**).

1-4-3-3 Pouvoir pathogène

E. cloacae est fréquemment impliquée dans les infections nosocomiales et colonise généralement la flore intestinale endogène des patients hospitalisés, mais peut également se trouver comme source d'épidémie ou de diffusion de patient à patient (**Qureshi et al., 2011**).

Les infections surviennent principalement chez des patients ayant reçu un traitement antibiotique ainsi que ceux en unités de soins intensifs (**Qureshi et al., 2011**). *E. cloacae* est une bactérie pathogène opportuniste responsable en milieu hospitalier d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses (**Ibadene et al., 2010**).

Elle peut causer également de nombreux types d'infections telles que les abcès cérébraux, les septicémies, des infections de plaies, des infections de la cavité abdominale ou des intestins (Farmer *et al.*, 2007).

1-4-4 *Citrobacter freundii*

1-4-4-1 Caractères bactériologiques

Citrobacter freundii est un bacille ou de coccobacille Gram négatif qui mesure 0,3 à 1 µm de diamètre et de 0,6 à 6 µm de longueur (Abbott, 2007). C'est un anaérobie facultatif dont la mobilité est assurée par des flagelles péritriches (Holmes et Aucken, 1998 ; Knirel *et al.*, 2002).

1-4-3-2 Caractères biochimiques

Ces bactéries fermentent le mannitol, produisent du H₂S et sont aussi capables d'utiliser le citrate de Simmons comme unique source de carbone (Knirel *et al.*, 2002).

1-4-3-3 Pouvoir pathogène

C. freundii est un agent pathogène nosocomial opportuniste qui entraînent des infections des voies urinaires, des bactériémies, des sepsis abdominaux, des abcès cérébraux, des pneumonies et d'autres infections néonatales comme la méningite, le sepsis néonatal, l'infection articulaire (Doran, 1999; Pepperell *et al.*, 2002 ; Ryan, 2004). Les infections du système nerveux central (SNC) sont plus courantes chez les nourrissons de moins de 2 mois que chez les enfants plus âgés et les adultes immunodéprimés (Holmes et Aucken, 1998 ; Ryan, 2004).

1-4-5 *Morganella morganii*

1-4-5-1 Caractères bactériologiques

Morganella morganii est un BGN mobile qui se présente sous forme de colonies plates et qui mesure 0,6 à 1 µm de diamètre et 1 à 3µm de longueur (Del Mar Tavio *et al.*, 2000).

1-4-5-2 Caractères biochimiques

Les *Morganella* ont la capacité de produire l'uréase et la tryptophane désaminase. Elles fermentent le glucose, réduise le nitrate en nitrite, métabolise le tryptophane en indole (Del Mar Tavio *et al.*, 2000).

1-4-5-3 Pouvoir pathogène

Morganella morganii est impliquée dans les infections des voies urinaires, des voies hépatobiliaires, les infections de la peau et des tissus mous.

Elle occasionne des infections opportunistes chez des patients immunodéprimés telles que les infections extra-intestinales ou encore les infections materno-fœtales (**Falagas et al., 2006**). *M. morgani* se trouve dans l'environnement et dans les voies intestinales des humains, des mammifères et des reptiles par conséquent, la plupart des cas de bactériémie à *M. morgani* sont des infections opportunistes acquises dans la communauté (**Lee et al., 2006**).

2-Antibiotiques

2-1 Définition

Un antibiotique peut être défini comme étant tout composé chimique d'origine naturelle, semi synthétique ou synthétique qui en solution très dilué est capable de détruire les microorganismes ou d'inhiber leur croissance (**Van Bambeke et Tulkens, 2008**). Il doit avoir une toxicité sélective envers l'agent infectieux sans toutefois affecter l'organisme hôte infecté par les germes pathogènes (**Gautier, 2007**). La spécificité d'action des antibiotiques s'appuie sur les différences métaboliques et structurales existantes entre les cellules procaryotes et eucaryotes. L'ensemble des bactéries affecté par un antibiotique donné est appelé le spectre d'activité de cet antibiotique. Les antibiotiques efficaces contre de nombreuses bactéries Gram positif et négatif sont dits à "large spectre", tandis que ceux actifs uniquement contre certaines bactéries Gram positif ou Gram négatif sont dits à "spectre étroit" (**Walsh, 2003**).

2-2 Quelques familles des antibiotiques

2-2-1 β -lactamines

Les β -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leur indication en thérapeutique (**Livermore, 1995**). Cette famille, qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames, est caractérisée par la présence constante du cycle β -lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables (**Bryskier, 1999**), **Figure 1**. La grande variété de leur mode d'administration, leur large spectre d'activité antibactérien associé à une action bactéricide, une bonne diffusion tissulaire, une bonne tolérance et un faible nombre d'interactions médicamenteuses expliquent l'importance de leur utilisation seule ou en association (**Cavallo et al., 2004**).

2-2-1-1 Classification des β -lactamines

Les β -lactamines sont classées en quatre groupes (**Gautier, 2007**):

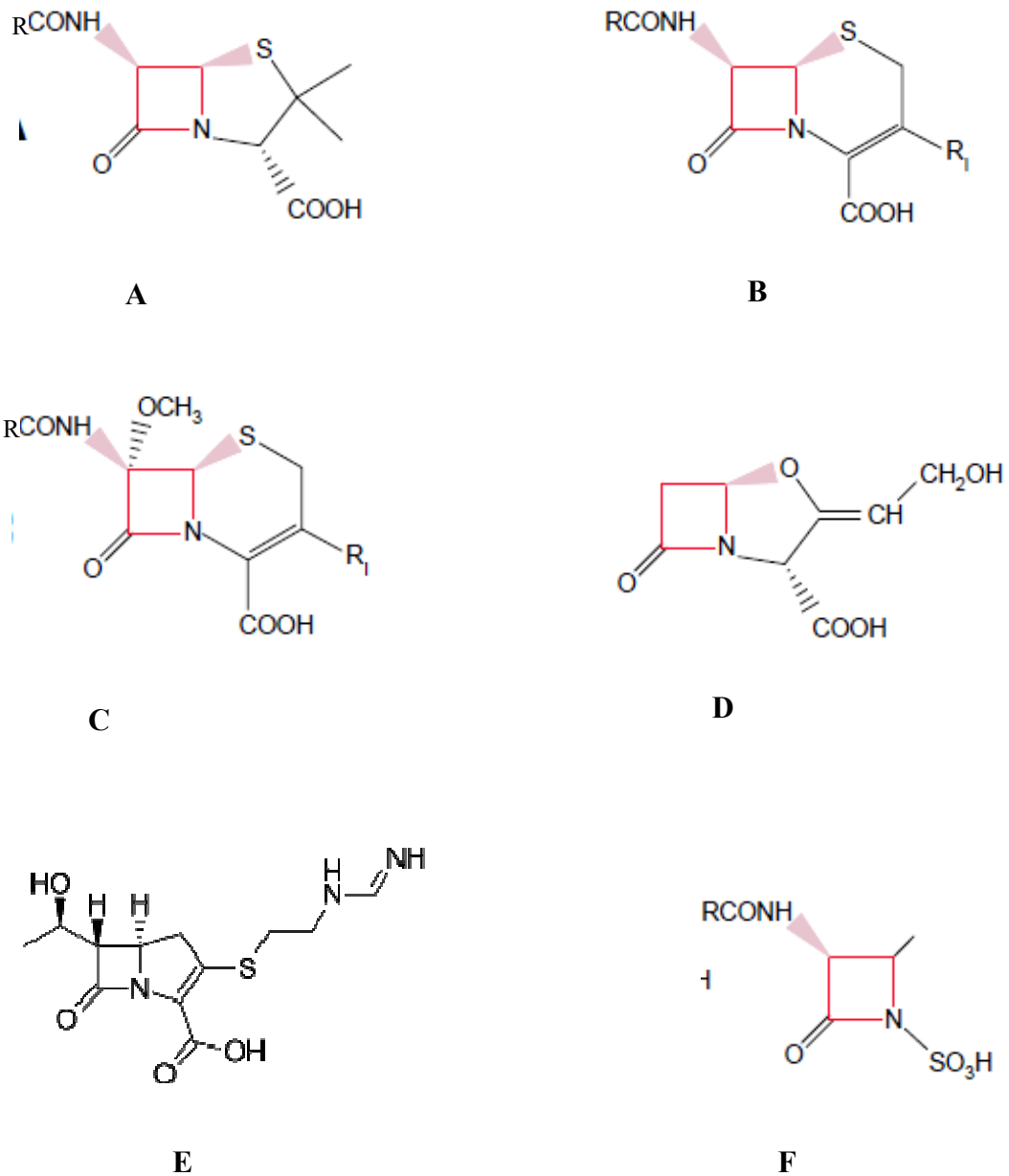


Figure 1 : Structures de quelques β -lactamines

(Bryskier, 1999)

A : pénicillines ; **B :** céphalosporines ; **C :** céphamycines ; **D :** acide clavulanique ; **E :** imipénème ;
F : monobactames

- Les pénicillines (noyau pénème) dont font partie la pénicilline G, la méticilline et les isoxazolylpénicillines (oxacilline et cloxacilline), les amino-benzylpénicillines (ampicilline et amoxicilline), les uréido-pénicillines (pipéracilline), les carboxy-pénicillines (ticarcilline) et les amidino-pénicillines (mécillinam).
- Les céphalosporines (noyau céphème) de première (céfalotine, céfaloridine), deuxième (céfamandole, céfoxitine), troisième (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et de quatrième génération (céfépime, cefpirome).
- Les monobactames (noyau azétidine) représentés par l'aztréonam.
- Les carbapénèmes (noyau carbapénème) qui sont les plus efficaces actuellement (imipénème, méropénème, ertapénème, doripénème).

2-2-1-2 Mécanisme d'action des β -lactamines

Les β -lactamines traversent la paroi bactérienne et se fixent sur des protéines cibles que sont les Protéines liant les Pénicillines (PLP). Ces PLP sont un groupe d'enzymes regroupant les transpeptidases, transglycosylases et carboxypeptidases, impliquées dans la synthèse et le remodelage du peptidoglycane, constituant principal de la paroi bactérienne. La fixation des β -lactamines sur les PLP est facilitée parce que 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 (**Stratton, 2000**).

En se fixant sur les PLP, les β -lactamines vont subir l'ouverture de leur cycle et bloquer le fonctionnement de ces enzymes. L'inactivation principalement des transpeptidases déclenche un ensemble de réaction qui aboutit à l'inactivation des inhibiteurs des autolysines bactériennes. Et, ce sont ces autolysines qui vont alors dégrader le peptidoglycane, entraînant finalement la lyse bactérienne et l'effet d'auto-suicide (**Stratton, 2000**).

2-2-2 Aminosides

Les aminosides, également appelés aminoglycosides sont des molécules naturelles produites par des actinomycètes ou obtenus par hémisynthèse. Elles sont constituées de deux ou plusieurs sucres aminés liés par une fonction glycosidique à un noyau hexose. Ce sont des oligosaccharides basiques, polaires et hydrophiles qui sont d'un point de vue structural, organisés autour d'un cycle central caractéristique de type aminocyclitol sur lequel sont greffés divers sucres aminés (**Mingeot-Leclercq et al., 1999**).

Les aminosides ont un large spectre antibactérien particulièrement contre les bactéries Gram négatif, peu sensibles aux pénicillines et aux sulfamides.

Elles sont majoritairement bactéricides avec une action rapide et dose dépendante qui constitue l'un de leurs grands avantages thérapeutiques (**Vakulenko et Mobashery, 2003**).

2-2-2-1 Classification des aminosides

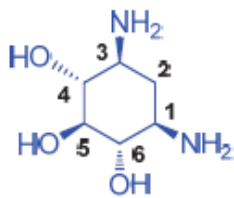
Le cycle central des aminosides est la désoxystreptamine (DOS) qui peut être substituée pour donner les différentes classes des aminosides (**Poole, 2005**) **Figure 2**.

- ❖ Les désoxystreptamines monosubstituée en position 4: Néamine, Paromamine,
- ❖ Les désoxystreptamines bisubstituées 4-5 qui comprennent: Néomycine B ou C, Paromomycine, Lividomycine A ou B, Ribostamycine, Framycétine,
- ❖ Les désoxystreptamines bisubstituées 4-6 qui comprennent: Kanamycine A, B, C et dérivés, Amikacine, Tobramycine, Dibékacine, Gentamicine, Sisomycine, Nétilmicine,
- ❖ Les molécules naturelles ou semi-synthétiques: Streptomycine, Streptidine, Spectinomycine.

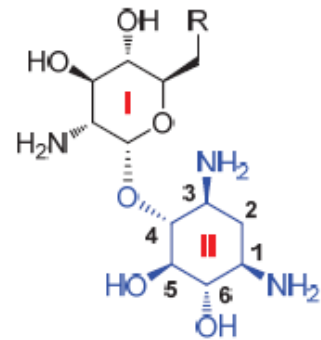
2-2-2-2 Mécanisme d'action des aminosides

L'action des aminosides se déroule en 3 étapes:

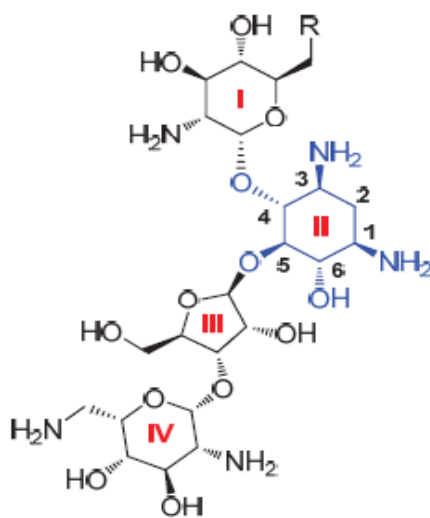
- La première étape est un passage passif qui permet la traversée de la membrane externe à travers les porines, puis la traversée du peptidoglycane. Les aminosides se concentrent alors au niveau de la membrane cytoplasmique (**Changeur et Cherruault, 2009**).
- La deuxième étape requiert la production d'énergie pour le transport des aminosides. Cette énergie est fournie par des métabolismes oxydatifs (**Bryskier, 1999**).
- Au cours de la troisième étape, la plus rapide, les aminosides se fixent sur le ribosome spécifiquement au site A de l'ARN ribosomal 16S qui compose le ribosome bactérien 30S et provoquent la fixation d'un ARN transfert incorrect sur l'ARN messager. La reconnaissance codon-anticodon est perturbée, ce qui induit la synthèse de protéines erronées (**Touati, 2013**).



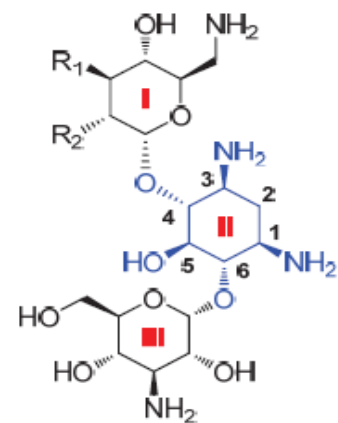
A



B



C



D

Figure 2 : Structure de quelques aminosides: le cycle central DOS est indiqué en bleu

(Poole, 2005)

A : Desoxystreptamine (DOS); **B :** Paromamine (R = OH); Néamine (R = NH₂); **C :** Paromomycine (R = OH); Néomycine (R = NH₂); **D :** Kanamycine (R₁ = OH, R₂ = OH); Tobramycine (R₁ = H, R₂ = NH₂)

2-2-3 Quinolones/ Fluoroquinolones

Les quinolones doivent leur découverte à la recherche sur la chloroquine. Des chercheurs du « *the Sterling-Winthrop laboratories in Rochester, NY* » ont accidentellement découvert un produit dérivé de sa synthèse et doué de vertus antibactériennes : la 7-chloroquinoléine. Cette molécule a été développée pour donner l'acide nalidixique (**Sarkozy, 2001**). Ce dernier a été grandement utilisé, depuis pour le traitement des infections urinaires. De façon générale, les quinolones sont caractérisées par un large spectre d'activité, une bonne biodisponibilité orale, une bonne pénétration tissulaire (**Larouche, 2001**). Quant aux fluoroquinolones, ils sont caractérisés par la présence d'un atome de fluor en position 6 et d'un cycle azoté, le plus souvent une pipérazine, en position 7 (**Courvalin et al., 2006**) **Figure 3**.

2-2-3-1 Classification des quinolones

Les quinolones sont classées en quatre générations basées sur leur activité et leur spectre d'action (**Ball, 2000**).

- Les quinolones de première génération : l'acide nalidixique et l'acide oxolinique,
- Les quinolones de deuxième génération qui sont des fluoroquinolones comme la ciprofloxacine, la norfloxacine, l'ofloxacine et la fluméquine,
- Les fluoroquinolones de troisième génération qui comprennent la gatifloxacine, la grepafloxacine, la levofloxacine, la moxifloxacine ou la sparfloxacine, la danofloxacine, l'enrofloxacine, la difloxacine, l'orbifloxacine, l'ibafloxacine ou la marbofloxacine,
- Les fluoroquinolones de quatrième génération : la gémifloxacine et la trovafloxacine.

2-2-3-2 Mécanisme d'action des fluoroquinolones

Les enzymes bactériennes ADN gyrase ou topoisomérase II et la topoisomérase IV sont les cibles principales des fluoroquinolones (**Muylaert et Mainil, 2013**). Les fluoroquinolones interagissent avec le complexe ADN-enzyme c'est-à-dire avec l'ADN gyrase liée à ADN bactérien ou avec la topoisomérase IV liée à l'ADN bactérien pour créer des changements de conformation qui aboutissent à l'inhibition de l'activité enzymatique. Le nouveau complexe fluoroquinolone-enzyme-ADN bloque la progression de la fourche de réplication inhibant ainsi la synthèse normale de l'ADN (**Hooper, 2000 ; Cambau et Guillard, 2012**).

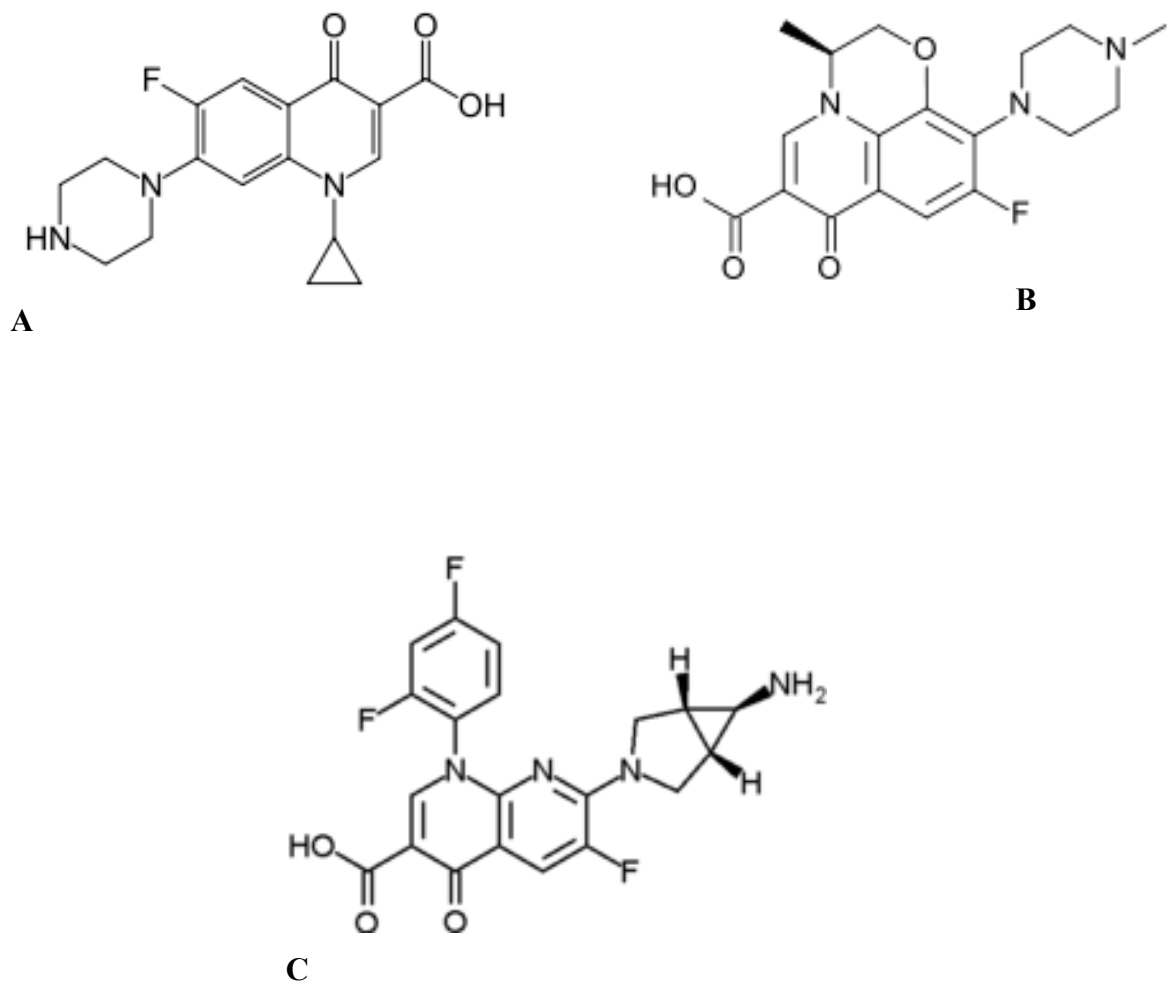


Figure 3 : Structure de quelques fluoroquinolones

(Ball, 2000)

A : Ciprofloxacin ; **B** : Levofloxacin ; **C** : Trovafoxacin

2-2-4 Rifampicine

2-2-4-1 Classification

La classe des rifamycines a été découverte en Italie en 1957. Le chef de file de la famille, la rifamycine B, est une molécule naturelle isolée de *Nocardia mediterranei*. La rifamycine B a été transformée à partir de la solution aqueuse en une molécule plus active, la rifamycine S, elle-même transformée en rifamycine SV. Cette dernière est un antibiotique très actif et plus soluble, mais non absorbable par voie orale. En 1965 était synthétisé un dérivé le 3-4-méthyl-pipérazinyl-iminométhyle administrable par voie orale, appelé rifampicine, qui est devenu le principal composant de la famille (**Figure 4**) (**Taha et al., 2006**).

2-2-4-2 Spectre d'action de la rifampicine

Le spectre antibactérien de la rifampicine est large et comprend les mycobactéries les staphylocoques et les streptocoques. Utilisé dans le traitement de la tuberculose et des maladies méningococcies, sa pharmacocinétique est marquée par sa forte pénétration tissulaire et cellulaire (**Baysarowich et al., 2008**).

2-2-4-3 Mécanisme d'action de la rifampicine

L'action bactéricide de la rifampicine se situe au niveau du génome bactérien et se traduit par un blocage transcriptionnel. En effet, la rifampicine se lie de façon covalente à la sous-unité bêta de l'ARN polymérase codée par le gène *rpoB*. Cette liaison inhibe l'initiation de la transcription de l'ADN bactérien et la formation de l'ensemble des ARN messagers, des ARN de transferts et des ARN ribosomiaux (**Xu et al., 2005**).

3-Mécanismes de résistance des entérobactéries aux antibiotiques

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique quand elle est capable de se multiplier en présence de cet antibiotique (**Lavigne, 2007**). Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques : la résistance intrinsèque et la résistance acquise.

La résistance intrinsèque (ou naturelle) est une résistance qui apparaît chez tous les représentants d'une même espèce de façon naturelle pour un antibiotique donné, indépendamment de la présence de ce dernier (**Skurnik et Andremont, 2006**). A l'inverse, la résistance acquise n'est présente que chez certaines souches de la même espèce ou du même genre.

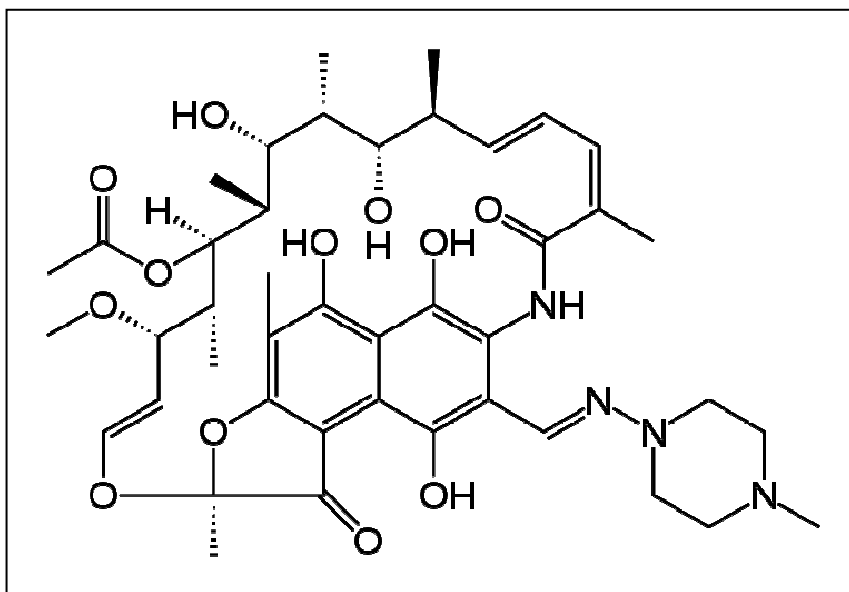


Figure 4 : Structure de la rifampicine

(Taha *et al.*, 2006).

Dans certains cas, elle peut concerner la grande majorité de ces souches comme par exemple la production de pénicillinase chez le staphylocoque qui intéresse plus de 90 % des souches (Courvalin, 2008).

Sur le plan génétique, la résistance peut être acquise par deux voies totalement distinctes, soit par des mutations affectant des gènes présents sur le chromosome, soit par l'acquisition de gènes étrangers. Ces gènes peuvent provenir du chromosome d'une autre souche de la même espèce ou même d'une espèce voire d'un genre différent (Fauchère et Avril, 2002). Le transfert de gènes par l'intermédiaire des éléments génétiques mobiles d'une bactérie à une autre (transfert horizontal) est le principal mécanisme responsable de la dissémination des gènes de résistance au sein du monde bactérien et concerne 80 % des cas de résistances aux antibiotiques (Ploy *et al.*, 2005). Les différents modes de transferts horizontaux sont : la transformation, la transduction et la conjugaison.

3-1 Différents modes de transferts horizontaux

3-1-1 Transformation

Il s'agit d'un mécanisme d'acquisition d'ADN libre par certaines espèces bactériennes capables au cours de leur cycle cellulaire de présenter un état physiologique (état de compétence) nécessaire à la fixation et l'absorption d'ADN par ces bactéries. La transformation nécessite la présence dans le milieu environnant d'ADN libre provenant d'une cellule lysée, cet ADN libéré est ensuite fixé et absorbé par une bactérie réceptrice en phase de compétence. Dans cette bactérie, l'ADN exogène subit une recombinaison génétique afin de s'intégrer de façon stable au génome et d'être transmis aux cellules filles (Schwarz et Chalus-Dancla, 2001). La transformation joue un rôle limité dans le transfert de gènes de résistance car l'ADN libre doit d'une part présenter une importante similarité avec l'ADN de la cellule réceptrice et d'autre part l'ADN libre dans l'environnement est rapidement dégradé. De plus, les espèces bactériennes naturellement compétentes sont peu nombreuses (Schwarz et Chalus-Dancla, 2001).

3-1-2 Transduction

La transduction est un processus qui consiste en un transfert de matériel génétique (ADN bactérien) d'une bactérie donneuse à une bactérie réceptrice par l'intermédiaire d'un bactériophage. Le bactériophage infecte une première bactérie (bactérie donneuse) et y injecte son ADN viral à travers la paroi de la cellule. De nouveaux phages s'y développent, et certains intègrent une partie du génome bactérien dans leur capsid de phage (la taille du fragment d'ADN bactérien doit être proche de celle de l'ADN phagique). Lors de la libération des phages, ceux-ci vont infecter d'autres bactéries. Les phages comportant une partie d'ADN bactérien vont l'injecter dans une nouvelle bactérie (bactérie réceptrice (Davison, 1999)).

3-1-3 Conjugaison

La conjugaison est une technique utilisée par les bactéries pour échanger des informations génétiques. Elle consiste en une transmission d'éléments génétiques d'une bactérie donatrice à une bactérie receptrice. La conjugaison nécessite un contact étroit entre la bactérie donatrice et la bactérie receptrice par l'intermédiaire d'un pont cytoplasmique permettant un transfert unidirectionnel. La bactérie receptrice 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 receptrice. De nombreux éléments génétiques, comme les plasmides et les transposons qui représentent les différents supports mobiles des gènes de résistance aux antibiotiques sont transférables par conjugaison (**Davison, 1999**).

3-2 Mécanismes de résistance des entérobactéries aux β -lactamines

Il existe quatre principaux mécanismes de résistance aux β -Lactamines:

- la diminution de la perméabilité membranaire
- l'excrétion de l'antibiotique par des systèmes d'efflux
- la modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP)
- l'inactivation de l'antibiotique par production de β -lactamases (**Courvalin et al., 2006**).

3-2-1 Diminution de la perméabilité membranaire

Les entérobactéries possèdent une membrane externe composée de lipopolysaccharide (LPS) estimés chez *E. coli* à 3,5 millions et couvrant 75 % de la surface cellulaire et de phospholipides (PP) qui forment une barrière empêchant la pénétration des antibiotiques hydrophobes entraînant ainsi une résistance naturelle aux antibiotiques (**Paolozzi et Liébart, 2015**).

Les substances hydrophiles comme les β -lactamines peuvent traverser cette barrière en passant par les porines qui permettent des échanges par diffusion passive de nutriments et d'autres substances entre le périplasme et le milieu extérieur (**Benz, 2004**).

L'altération des porines par mutation est à l'origine des résistances acquises aux β -lactamines, soit par une modification structurale d'une porine essentielle (ce qui a été décrit chez *E. coli*), soit par une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (**Kumar et Schweizer, 2005**). Bien que plus rare, la suppression des porines provoque l'augmentation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de certaines β -lactamines comme cela a été mis en évidence chez certaines entérobactéries telles que *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli* et chez *Pseudomonas aeruginosa* (**Nikaido, 2000**).

3-2-2 Excrétion de l'antibiotique par des systèmes d'efflux

Les entérobactéries possèdent différents canaux protéiques impliqués dans le transport d'une grande variété de composés.

Parallèlement aux porines qui permettent aux nutriments de pénétrer dans la cellule, les bactéries utilisent des pompes à efflux pour réduire la concentration intracellulaire de composés toxiques comme les médicaments, les détergents et sont donc impliqués dans le contrôle de la sensibilité aux antibiotiques. La résistance par efflux est souvent couplée à une diminution de la perméabilité membranaire. L'association de ces deux mécanismes peut entraîner une résistance de haut niveau constituant ainsi de véritables systèmes de multi-résistance (**Nishino et Yamaguchi, 2001**).

3-2-3 Modification des protéines de liaison à la pénicilline

Plusieurs facteurs interviennent dans la résistance par modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP). Ce sont : les mutations dans les gènes chromosomiques codant pour les PLP entraînant la perte d'affinité des protéines de liaison à la pénicilline pour les β -lactamines, l'acquisition de gènes ou fragments de gènes codant pour des PLP d'affinité diminuée ou l'hyperproduction de PLP normales (**Nikaido, 1994**).

3-2-4 Inactivation de l'antibiotique par production de β -lactamases

La production de β -lactamases est le mécanisme majeur de résistance aux β -lactamines. Ces enzymes sont localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries Gram négatif (**Livermore, 2003**). Elles catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse du pont amide de l'anneau β -lactame des pénicillines, des céphalosporines, des monobactames et des carbapénèmes pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (**Barrial et Scotet, 2006**), **figure 5**.

3-2-4-1 Classification des β -lactamases

Les classifications d'Ambler et de Bush-Jacoby-Medeiros sont considérées comme étant les plus pertinentes.

La classification de Bush a été établie selon les propriétés fonctionnelles de l'enzyme, définies par son substrat préférentiel et son profil d'hydrolyse (**Bush et al., 1995**). Les enzymes sont divisées en quatre groupes (1 à 4) avec plusieurs sous-groupes. Cette classification phénotypique des β -lactamases pose un certain problème puisque différentes mutations ponctuelles peuvent influencer leur sensibilité aux substrats et inhibiteurs (**Jacoby et Medeiros, 1991**).

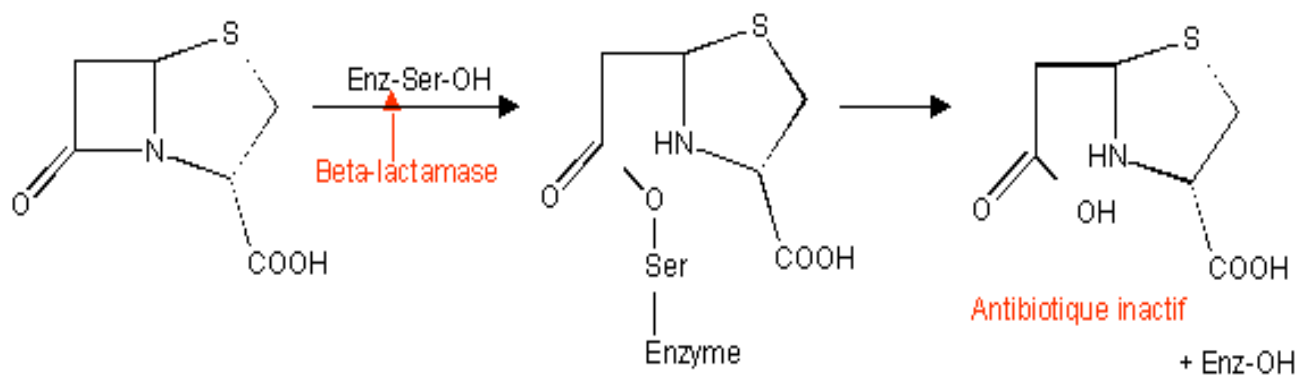


Figure 5 : Réaction d'hydrolyse du noyau β -lactame par une β -lactamase

(Barrial et Scotet, 2006)

La classification d'Ambler quant à elle, repose sur la similarité des séquences entre les différents membres des β -lactamases. De plus, elle reflète les relations fondamentales de chaque β -lactamase et ne change pas à cause des mutations. Cette nomenclature se compose de quatre groupes qui sont les β -lactamases de classe A, B, C et D (**Jacoby et Munoz-Price, 2005**).

3-2-4-1-1 β -lactamases de classe A

D'origine chromosomique ou plasmidique, elles se caractérisent par leur capacité à hydrolyser l'amide cyclique lié à la molécule de β -lactame. Cette activité hydrolytique, assurée par une sérine conservée (Ser-70) induit la formation d'acide penicilloïque pour la pénicilline et d'acide céphalosporoïque pour les céphalosporines. (**Knox, 1995 ; Livermore, 1995**).

3-2-4-1-2 β -lactamases de classe B

Les β -lactamases de classe B sont des métallo- β -lactamases qui utilisent les ions Zn^{2+} comme cofacteur permettant ainsi la décomposition de l'anneau β -lactame (**Barrial et Scotet, 2006**). Ces enzymes ont émergé d'abord chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*, ensuite chez les entérobactéries. L'importance clinique des métallo- β -lactamases est liée au fait qu'elles hydrolysent les carbapénèmes, composés qui échappent à l'activité des β -lactamases à sérine active. (**Bebrone, 2007**).

3-2-4-1-3 β -lactamases de classe C

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

3-2-4-1-4 β -lactamases de classe D

Les β -lactamases de classe D se distinguent par leur capacité à hydrolyser l'oxacilline (OXA), la méticilline et sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique. Elles sont retrouvées fréquemment chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp et peu chez les entérobactéries (**Paterson et Bonomo, 2005**). De plus, certains membres de cette famille, dont OXA-10 et OXA-11 possèdent un large spectre d'activité assurant une forte résistance aux céphalosporines de troisième génération dont le céfotaxime, le céfoperazone et la ceftazidime (**Hall et al., 1993 ; Livermore, 1995**).

3-2-4-2 β -lactamases à spectre élargi

Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) sont des β -lactamases de classe A selon la classification d'Ambler (à l'exception des BLSE de type OXA classe D), capables d'hydrolyser les pénicillines, céphalosporines de première (C₁G), deuxième (C₂G), troisième (C₃G), quatrième génération (C₄G) et l'aztréonam (**Livermore, 1995**).

Cependant, les souches productrices de BLSE restent généralement sensibles aux céphamycines et aux carbapénèmes (imipénème). Les BLSE de classe A sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique (**Livermore, 1995**).

3-2-4-2-1 Différents types de β -lactamases à spectre élargi

Les BLSE sont classées selon leurs différences moléculaires et les plus fréquentes sont les BLSE de types TEM, SHV et CTX-M (**Jacoby et Munoz-Price, 2005**).

3-2-4-2-1-1 β -lactamases à spectre élargi de type Temoneira

La première β -lactamase plasmidique de type Temoneira (TEM-1) a été isolée en 1965 en Grèce, à partir d'une souche de *E.coli* isolée chez une patiente nommée Temoneira d'où la nomination (**Jacoby et Munoz-Price, 2005**). La majorité des BLSE de ce type dérivent par quatre à sept mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM-2). Les substitutions les plus courantes sont le glutamate en lysine en position 104, l'arginine en sérine en position 164, la glycine en sérine en position 238 et le glutamate en lysine en position 240 (**Bradford, 2001**).

Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser les C₃G mais les rend plus vulnérable à l'action des inhibiteurs comme l'acide clavulanique. Cependant, d'autres mutations peuvent conférer la résistance aux inhibiteurs. Ces variantes sont appelées TRI (TEM Résistantes aux Inhibiteurs). Les enzymes dérivées par mutations permettant d'hydrolyser à la fois les C₃G et les inhibiteurs sont de plus en plus fréquentes (**Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006**).

3-2-4-2-1-2 β -lactamases à spectre élargi de type Sulfhydryl variable

Les BLSE de type Sulfhydryl variable (SHV) dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1 qui correspond à un gène *bla_{SHV}* de pénicillinase chromosomique de *K. pneumoniae* (**Brisse et Verhoef, 2001 ; Haeggman et al., 2004**). Actuellement, plus de 180 variantes BLSE de type SHV ont été décrits. La majorité des BLSE de type SHV est caractérisée par la substitution d'acides aminés Glycine en Sérine à la position 238 et Glutamine en lysine à la position 240. Le résidu sérine à la position 238 est indispensable pour l'hydrolyse efficace du céfotaxime de même que le résidu lysine pour l'hydrolyse efficace de la ceftazidime (**Elhani, 2012**).

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

3-2-4-2-1-3 β -lactamases à spectre élargi de type Cefotaximase-Munich

Ces enzymes représentent à l'heure actuelle les BLSE les plus fréquentes au niveau mondial après leur diffusion rapide depuis les années 1990 (Bonnet, 2004 ; Livermore *et al.*, 2007). Les BLSE de type Cefotaximase-Munich (CTX-M) confèrent à l'origine, chez les entérobactéries, un plus haut niveau de résistance à la céfotaxime, au ceftriaxone, au céfépime et à l'aztréonam (Arlet et Philippon, 2003 ; Bonnet, 2004). Certaines ont évolué par mutation ponctuelle générant un haut niveau de résistance à la ceftazidime (Bonnet, 2004). La dissémination horizontale des gènes codant pour les enzymes CTX-M s'effectue par des plasmides conjugatifs mais aussi par d'autres éléments génétiques comme les intégrons et les séquences d'insertion ISEcp1 (Bradford, 2001). Actuellement, plus de 150 variants CTX-M ont été décrits et classés en 6 groupes phylogénétiques à savoir: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 et CTX-M-45 (Carrer et Nordmann, 2011).

3-2-4-2-1-4 Autres types de β -lactamases à spectre élargi

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

3-2-4-3 Epidémiologie des β -lactamases à spectre élargi

Les BLSE de type CTX-M, TEM et SHV ont largement été diffusées dans le monde avec des prévalences variables selon les pays. Ces variations dépendent de plusieurs facteurs parmi lesquels la détection de ces enzymes, la mesure de surveillance des maladies infectieuses, l'utilisation abusive des antibiotiques (Touati, 2013).

Aux Etats-Unis, la prévalence des EBLSE a varié de 0 à 25 % avec une moyenne nationale de 3 %. Jusque dans les années 2007, les enzymes de type CTX-M étaient considérées comme rares. Les enzymes prédominantes étant TEM et SHV (Castanheira *et al.*, 2008). Depuis les enzymes CTX-M ont été détectées dans 38,8 % des souches cliniques productrices de BLSE, avec comme déterminants génétiques prédominants, CTX-M-14 et CTX-M-15 (Castanheira *et al.*, 2008). En Europe, la prévalence de ces souches est variable en fonction des pays. Une étude récente portant sur *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Enterobacter spp* a montré que la prévalence de souches BLSE était de 4,7 % en Europe du Nord contre 13,5 % au Sud de l'Europe (Bouchillon *et al.*, 2004).

En France, le changement de bactérie hôte a vu les BLSE émerger des espèces nosocomiales épidémiques classiques *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.* vers *E. coli*. De plus, une augmentation très nette des infections communautaires (notamment urinaires) dues aux bactéries productrices de BLSE a été observée (Nordmann *et al.*, 2009). En Afrique, l'émergence des EBLSE a été signalée dans certains pays avec des taux variables : 12 % au Cameroun, 15 % en Afrique du Sud, et 38,5 % en Egypte (Bouchillon, 2004 ; Gangoué-Pieboji *et al.*, 2005). En Côte d'Ivoire, la prévalence des EBLSE a augmenté significativement de 9 à 56,2% de 2005 à 2016 (Guessennd *et al.*, 2008b ; Toty *et al.*, 2016).

3-3 Mécanismes de résistance des entérobactéries aux aminosides

Plusieurs mécanismes confèrent une résistance aux aminosides, ce qui permet d'expliquer la résistance de plus de 95 % des souches d'entérobactéries (Perichon *et al.*, 2008).

3-3-1 Inactivation enzymatique

Les aminosides possèdent des groupements aminés et des groupements hydroxyles nécessaires à leur activité. Ces groupements peuvent être la cible de trois classes d'enzymes (Gassama, 2004) :

- ❖ Les nucléotidyltransférases ou adénylyltransférase (ANT ou AAD) agissent par adénylation des groupements hydroxyles. Il y' a quatre isozymes ANT (6), ANT (4'), ANT (3"), et ANT (2 "). Le gène codant pour l'ANT (2") est retrouvé dans la majorité des bactéries à Gram négatif.
- ❖ Les acétyltransférases ou AAC catalysent l'acétylation des groupements aminés dans la molécule d'aminoside en utilisant le coenzyme A d'acétyle en tant que substrat donneur.

La famille des aminoglycosides acétyltransférases est constituée de 4 isozymes : soit les AAC (1), AAC (3), AAC (2') et AAC (6).

- ❖ Les phosphotransférases ou APH catalysant le transfert du groupement AMP du substrat donneur (ATP) à un groupe hydroxyl dans la molécule d'aminoside.

Il y a sept classes d'isozymes qui catalysent la phosphorylation des aminosides : l'APH (3'), APH (2''), APH (3''), APH (4), APH (7''), APH (6) et l'APH (9). L'enzyme la plus étudiée de cette famille est l'APH (3'). Toutes ces enzymes sont codées par des gènes plasmidiques ou des transposons. Lorsqu'un aminoside est modifié par ces enzymes sa fixation sur l'ARN ribosomal 16S peut être affectée et se traduire par la perte de son activité (**Lambert, 2007 ; Ramirez et Tolmasky, 2010**). La **figure 6** met en évidence l'inactivation des aminosides par les enzymes modificatrices.

3-3-2 Réduction de l'accumulation intra-cytoplasmique

La pénétration des aminosides dans les bactéries est un phénomène de diffusion passive à travers des porines de la membrane externe et de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne (**Durante-Mangoni et al., 2009**). Les entérobactéries disposent de systèmes actifs d'efflux dont certains sont exprimés de façon constitutive, d'autres sont contrôlés et exprimés par différents systèmes de régulation et enfin plusieurs sont encore inductibles par diverses mutations (**Wang et al., 2001**). Les systèmes d'efflux au niveau des entérobactéries entraînent une diminution de l'accumulation des aminosides à l'intérieur de la cellule (**Durante-Mangoni et al., 2009**).

3-3-3 Piégeage de l'antibiotique

Une enzyme modificatrice peut parfois neutraliser l'action d'un aminoside par une liaison affine sans pour autant modifier sa structure. Le piégeage de l'antibiotique a été proposé comme mécanisme responsable du phénotype de résistance à la kanamycine et à la tobramycine alors que la gentamicine et la nétilmicine restent actives.

Lorsque la bactérie produit une grande quantité de phosphotransférase qui reconnaît la tobramycine sans la modifier celle-ci peut être piégée dans un complexe enzyme-substrat fonctionnellement inactif (**Menard et al., 1993**).

3-3-4 Modification de la cible

La modification de la cible se fait par mutation dans l'ARN ribosomal 16S (**Doi et Arakawa, 2007**). La méthylation de l'ARNr 16S au sein de la sous-unité ribosomale 30S des espèces bactériennes par les gènes de méthylation a récemment émergé comme un mécanisme de haut niveau de résistance aux aminosides tels que l'amikacine, la tobramycine, la gentamicine, la kanamycine et la nétilmicine (**Doi et al., 2004**).

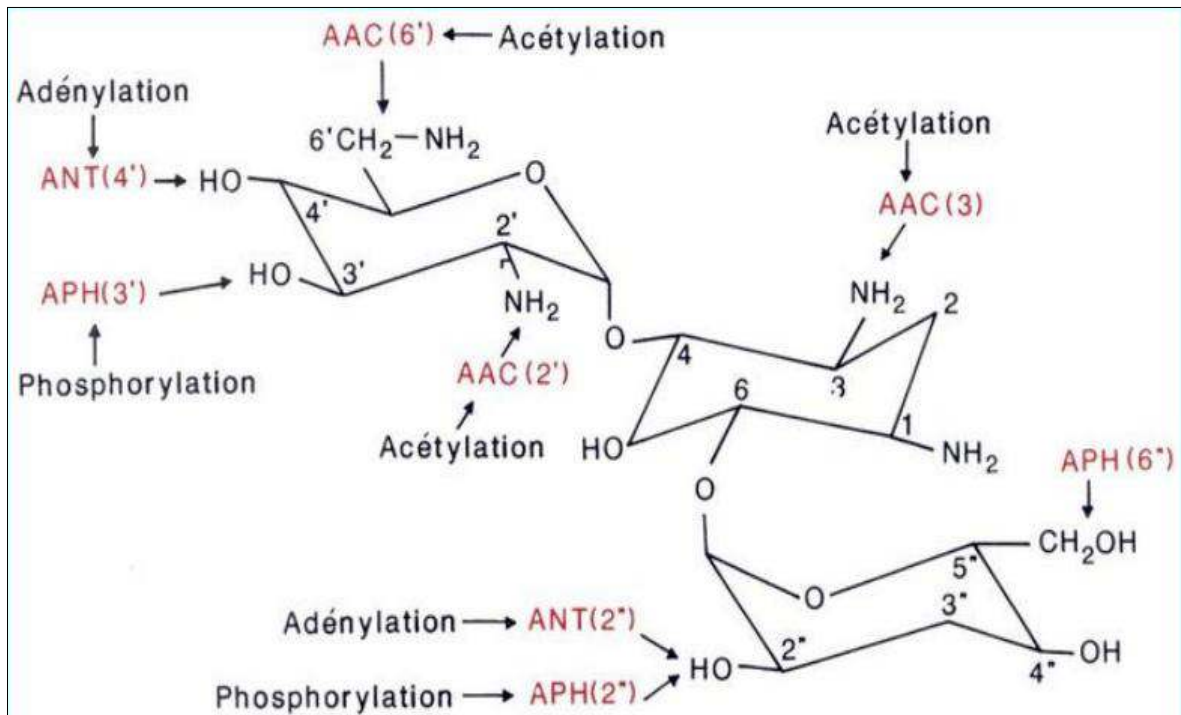


Figure 6 : Inactivation enzymatique des aminosides

(Courvalin *et al.*, 2006)

Deux activités de méthylation de l'ARN 16S modifient le site A aux positions G1405 (N7) et A1408 (N1) (**Belbel, 2014**), **figure 7**. Dix gènes de méthylation ont été décrits *arm A*, *rmt A*, *rmt B*, *rmt C*, *rmt D*, *rmt E*, *rmt F*, *rmt G*, *rmt H* et *npm A* (**Deng et al., 2013**) avec prédominance du genre *arm A* et *rmt B* (**Wachino et Arakawa, 2012**). Le gène *Arm A* a été détecté pour la première fois en 2003 en France chez une souche de *K. pneumoniae* montrant un haut niveau de résistance à tous les aminosides cliniquement très actifs (**Galimand et al., 2003**). Le gène *rmt B* a été largement répandu chez les entérobactéries de l'Asie orientale, de l'Europe et de l'Amérique (**Fritsche et al., 2008 ; Kang et al., 2008**). La **figure 8** montre la distribution mondiale des gènes de méthylation (**Wachino et Arakawa, 2012**). La plupart des gènes de méthylation sont situés sur des plasmides transférables, et peuvent être facilement transférés à d'autres espèces bactériennes, ce qui a favorisé leur propagation qui devient actuellement une préoccupation mondiale (**Hidalgo et al., 2013**).

3-4 Mécanismes de résistance des entérobactéries aux fluoroquinolones

3-4-1 Résistance chromosomique

3-4-1-1 Modification de la cible enzymatique

Chez les entérobactéries, l'ADN gyrase est plus sensible à l'inhibition médiée par les fluoroquinolones et les mutations responsables de résistance surviendront d'abord au niveau de la sous-unité *gyr A*. Ces mutations impliquent des substitutions en acides aminés qui apparaissent dans une région particulière nommée QRDR pour *Quinolone Resistance Determining Region* (**Muylaert et Mainil, 2013**). Ainsi, le domaine QRDR de la sous unité *Gyr A* de *E. coli* se situe entre les acides aminés 67 et 106, avec des mutations au niveau des acides aminés en positions 83 et 87. Cette région QRDR est proche de la tyrosine 122 impliquée dans la liaison covalente de l'enzyme aux groupements phosphate de l'ADN (**Hooper, 2003 ; Rodriguez- Martinez et al., 2010**).

3-4-1-2 Perméabilité membranaire réduite

La plupart des fluoroquinolones traversent de manière passive la membrane externe des Bactéries Gram Négatif par les porines bien que certaines molécules soient capables de diffuser directement à travers la bicouche phospholipidique (**Jacoby, 2005**). Les mutations intervenant dans les gènes codant pour ces porines sont responsables de résistance de bas niveau et permet d'expliquer les différences d'efficacité observées parfois entre certains composés de la famille des quinolones (**Okusu et al., 1996**). Par exemple, chez *E. coli*, la dé-répression du loci de régulation *mar A* pour «*multiple antibiotic resistance*» conduit à une diminution de la sensibilité aux fluoroquinolones via une sur-expression de la pompe à efflux AcrAB-TolC (**Okusu et al., 1996**) et une sous-expression des porines OmpF (**Muylaert et Mainil, 2013**).

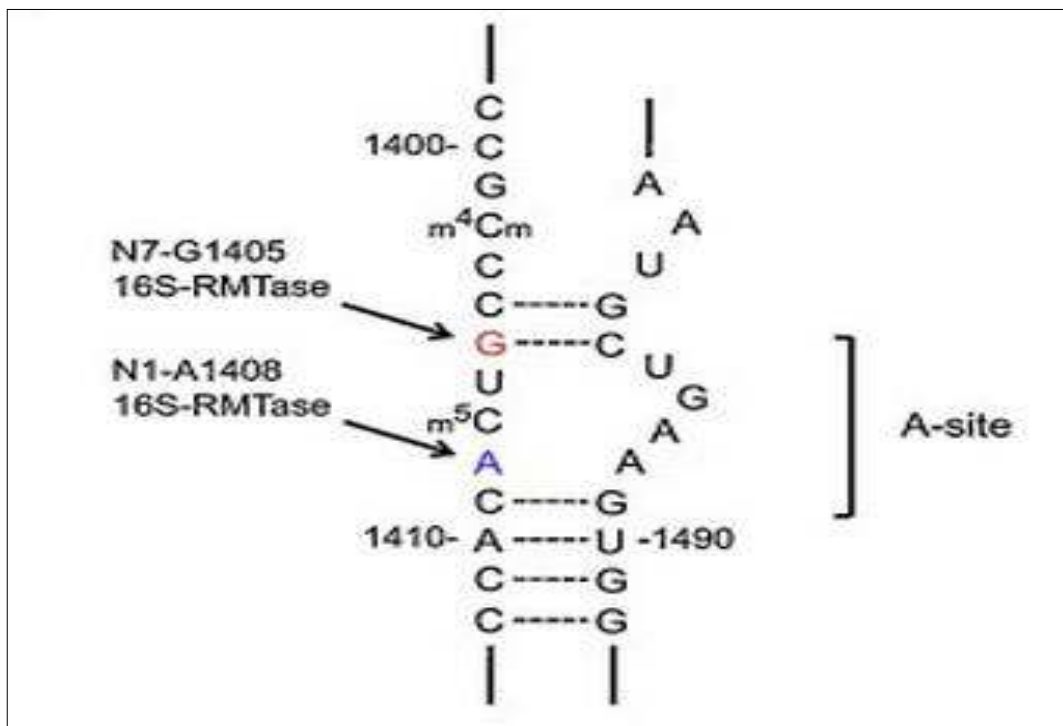


Figure 7 : Site-A de la sous-unité ribosomale 30 S

(Belbel, 2014)

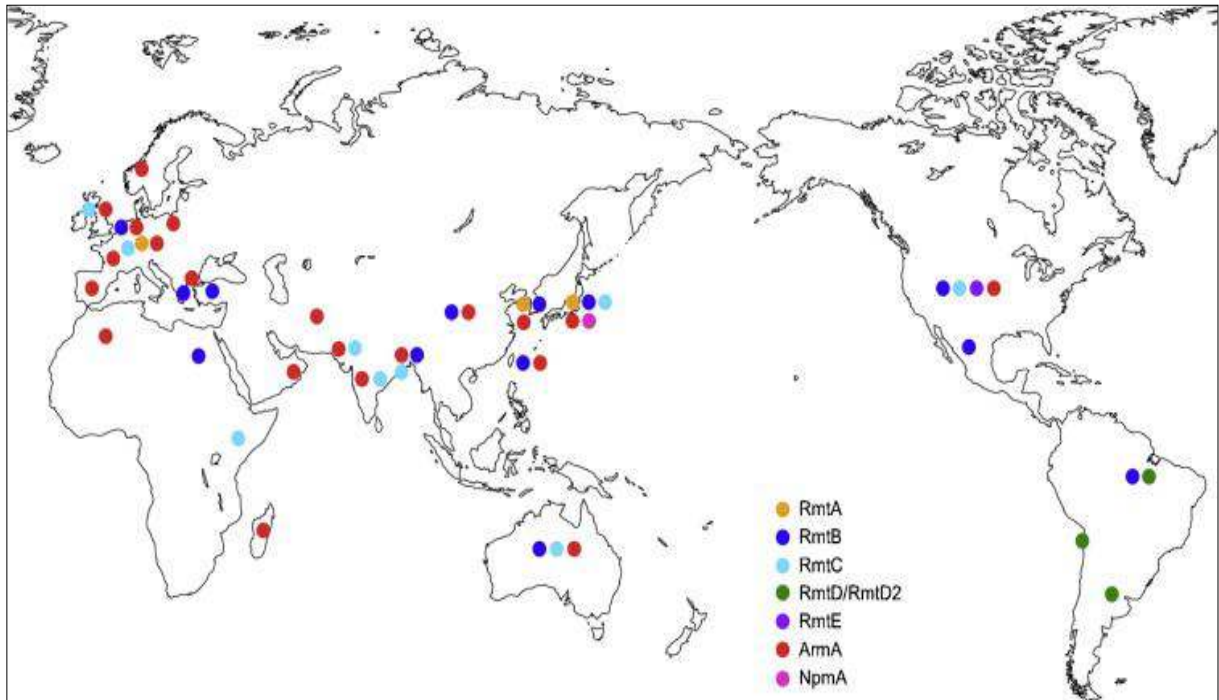


Figure 8 : Distribution mondiale des gènes de méthylation

(Wachino et Arakawa, 2012)

3-4-1-3 Pompes à efflux

Chez les bactéries, il existe des pompes présentes uniquement chez les Gram négatifs, c'est le cas de la Pompe RND, alors que chez les gram positifs ce sont les pompes MFS et ABC qui sont les plus répandues. Le mécanisme de résistance par le système des efflux réside dans l'excrétion active de l'antibiotique par les pompes à protons, il s'agit là d'un mode de résistance intrinsèque des bactéries (Schumacher *et al.*, 2006).

Chez *E. coli*, la pompe à efflux AcrAB-TolC, sous contrôles multiples, joue un rôle majeur dans la résistance par efflux aux fluoroquinolones. Les mutations survenant dans le gène *acrR* (répresseur d'*acrAB*) augmentent l'activité de la pompe (Wang *et al.*, 2001). *E. coli* possède pas moins de vingt pompes à efflux responsables de résistances à de multiples antibiotiques (Nishino et Yamaguchi, 2001).

3-4-2 Résistance plasmidique aux fluoroquinolones

Le support de la résistance aux fluoroquinolones était supposé être uniquement chromosomique jusqu'en 1998 où Martinez-Martinez *et al.* ont décrit chez la première souche *K. pneumoniae* UAB1, un plasmide transférable noté pMG252 comme le support génétique de la résistance. Le déterminant génétique de cette résistance est le gène *qnr* (quinolone résistance) dont la caractéristique est d'être porté par différents types d'intégrons (Muylaert et Mainil, 2013).

3-4-2-1 Gènes de résistance aux fluoroquinolones

Le gène *qnr* code pour une protéine QNR de 218 acides aminés appartenant à la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés. L'importance de ce support génétique est sa transférabilité et sa capacité à accélérer la diffusion de la résistance aux fluoroquinolones.

Les gènes *qnr* ont été identifiés chez différentes souches d'entérobactéries et souvent associés à la production de BLSE (Muylaert et Mainil, 2013). Ce sont les gènes *qnr A*, *qnr B*, *qnr S*, *qnr C*, *qnr D* (Guillard *et al.*, 2009). Les protéines sont capables de se fixer sur les topoisomérases II et IV en compétition avec l'ADN. La réduction du nombre des complexes binaires topoisomérases-ADN diminue la fixation ultérieure des fluoroquinolones sur les topoisomérases (Tran *et al.*, 2005).

Les souches porteuses du gène *qnr* appartenant le plus souvent aux espèces *E. coli*, *K. pneumoniae* et récemment *E. cloacae* qui sont toutes multi-résistantes en particulier résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération par production de BLSE (Honoré *et al.*, 2006).

3-4-2-2 Pompes à efflux plasmidiques

En 2002, au Japon, une nouvelle pompe à efflux, nommée Qep A, est découverte. Elle est codée par un gène situé sur un plasmide de résistance d'une souche clinique isolée de prélèvement d'urine (Cattoir *et al.*, 2008). Le gène *qep A* code pour une protéine de 511 acides aminés qui est une pompe à efflux du type 14-TMS (transmembrane segment) de la famille des transporteurs MFS (major facilitator superfamily) (Cattoir *et al.*, 2008).

Cette pompe à efflux confère une résistance de bas niveau en produisant une augmentation de la concentration inhibitrice minimale (CMI) de fluoroquinolones hydrophiles comme la ciprofloxacine, l'enrofloxacine et la norfloxacine de 32 à 64 fois. Depuis la découverte du gène *qep A*, un variant de ce gène, nommé *qep A2*, qui présente deux substitutions en acides aminés a été mis en évidence. Ce variant confère un phénotype de résistance similaire à *qepA*, renommé depuis *qepA1* (Muylaert et Mainil, 2013). Le gène *qepA1* localisé sur un plasmide conjugatif du groupe IncFI se trouve sur un transposon composite encadré de deux séquences d'insertion IS26 et comprenant le gène *rmt B*, codant pour une résistance de haut niveau aux aminosides d'usage thérapeutique (Yamane *et al.*, 2007 ; Périchon *et al.*, 2008 ; Park *et al.*, 2009).

3-5 Diffusion de la résistance à la rifampicine

La rifampicine est un antibiotique utilisé dans le traitement de la tuberculose et la lèpre depuis plusieurs décennies et la durée du traitement allant de 2 à 4 semaines ou plus a favorisé l'émergence des bactéries résistantes. Cette résistance se traduisait principalement par des mutations. En effet, la résistance à la rifampicine chez les souches cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae* était principalement due à des mutations dans le gène *rpoB* codant pour la sous unité bêta de l'ARN polymérase, ce qui diminuerait la liaison de l'ARN polymérase à la rifampicine (Williams *et al.*, 1994). Toutefois, plusieurs autres mécanismes de résistance ont été identifiés. Ce sont les systèmes d'efflux (Chandrasekaran et Lalithakumari, 1998), l'inactivation de la rifampicine par décomposition (Dabbs *et al.*, 1995), la glucosylation (Tanaka *et al.*, 1996), la phosphorylation (Yazawa *et al.*, 1994) et la ribosylation (Quan *et al.*, 1997). Plus tard, la résistance à la rifampicine a été décrite chez *Mycobacterium smegmatis* par l'acquisition horizontale du gène *arr-1* codant pour les ADP-ribosyltransférases, responsables de l'inactivation de l'antibiotique (Arlet *et al.*, 2001).

Les souches cliniques de *Corynebacterium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* étaient incapables autrefois d'inactiver la rifampicine (Dabbs *et al.*, 1995). Cependant, des mécanismes de résistance à la rifampicine ont été identifiés chez *Pseudomonas spp* qui se traduisaient par des systèmes d'efflux et par l'acquisition du gène *arr-2* codant pour les ADP-ribosyltransférases (Dabbs *et al.*, 1995 ; Chandrasekaran et Lalithakumari, 1998).

Par la suite, la résistance à la rifampicine médiée par le gène *arr-2* a été retrouvée chez diverses entérobactéries de l'Asie du Sud-Est produisant la β -lactamase à spectre élargi VEB-1 (Girlich *et al.*, 2001 ; Naas *et al.*, 2001). Egalement, les gènes *arr-2* et *arr-3* ont été décrits comme cassettes de gènes dans les intégrons de classe 1 présents chez les bacilles Gram négatif d'Europe et d'Asie (Arlet *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2005 ; Mammeri *et al.*, 2005).

En Afrique, particulièrement en Côte d'Ivoire et au Burkina faso, la résistance à la rifampicine chez *Mycobacterium tuberculosis* due à des mutations dans le gène *rpoB* a été décrite dans les travaux de N'guessan *et al.* en 2014 et dans ceux de Miotto *et al.* en 2009. Cependant aucune étude n'a mis en relief la transmission de la résistance à la rifampicine de *Mycobacterium* vers les entérobactéries en Côte d'Ivoire.

4- Typage moléculaire des souches par le Multi-locus sequence typing

Le typage moléculaire des souches par le Multi-locus sequence typing (MLST) est une technique standardisée et discriminante, actuellement appliquée dans des études macro-épidémiologiques (internationales) ou phylogénétiques qui fournit des données claires et utiles pour caractériser les relations génétiques entre les souches bactériennes. Le MLST compare les séquences de gènes codant pour des enzymes métaboliques afin d'établir une relation clonale entre les différentes souches (Belbel, 2014).

La technique de MLST des souches de *Klebsiella pneumoniae* a été développée et mise au point par Diancourt *et al.* en 2005. Cette méthode est basée sur le séquençage de 7 gènes de ménage importants dans le métabolisme de la bactérie. Ces gènes de ménage sont stables dans le temps, le taux de mutation est faible et les allèles sont caractéristiques à chaque espèce.

Pour *Escherichia 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.

L'alignement des séquences d'un locus donné permet de repérer les allèles différents entre eux par des mutations et/ou recombinaisons pour chaque souche bactérienne. La combinaison des allèles obtenus à partir de chaque locus sélectionné permet de définir une séquence type (ST), représentant un génotype multi-locus. Ces séquences types avec les allèles qu'elles définissent sont consultables dans les bases de données des sites web spécialisés (Belbel, 2014).

MATERIEL ET METHODES

1- Matériel

1-1 Type, période et cadre de l'étude

Ce travail est une étude expérimentale portant sur les échantillons bactériens préalablement obtenus lors d'une précédente étude. La sélection des souches et leur ré-identification se sont déroulées au sein du département de bactériologie et virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) site Cocody, précisément à l'unité des antibiotiques, des substances naturelles et de la surveillance de la résistance bactérienne aux anti-infectieux (ASSURMI) et, au centre national de référence des antibiotiques de l'IPCI site Adiopodoumé, de janvier 2016 à juillet 2016. La confirmation de l'identité des souches, l'antibiogramme et les techniques de biologie moléculaire ont été réalisés à l'unité de recherche sur les maladies infectieuses tropicales émergentes (URMITE) de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université d'Aix-Marseille en France, de janvier 2017 à juillet 2017.

1-2 Matériel biologique

Le matériel biologique a été constitué de 153 souches bactériennes d'origine humaine responsables d'infections et isolées à partir de divers échantillons biologiques chez des patients hospitalisés ou non dans la période de 2012 à 2015. Les 153 souches bactériennes étaient constituées de 71 souches de *Escherichia coli*, 57 souches de *Klebsiella pneumoniae*, 22 souches de *Enterobacter cloacae*, 2 souches de *Citrobacter freundii* et 1 souche de *Morganella morganii*. Les échantillons biologiques et dispositif invasif d'où ont été isolées les souches ont été les urines (n= 72), les suppurations (n= 32), le sang (n= 20), les bouts de sonde (n= 10), le crachat (n= 3), les écouvillons (n= 3), le liquide d'ascite (n= 1), l'aspiration sur cathéter (n= 1), l'expectoration (n= 1), le liquide péritonéal (n= 1), le liquide pleural (n= 1), le prélèvement nasal (n= 1), le liquide céphalo-rachidien (n= 1), le prélèvement ORL (n= 1).

Ces entérobactéries provenaient de différents services hospitaliers des CHU de Cocody (n= 87), Yopougon (n= 36), du centre national de référence des antibiotiques de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (n= 24) et des cliniques membres du réseau de l'Observatoire de la Résistance des Microorganismes aux anti-Infectieux en Côte d'Ivoire (ORMICI) (n= 6). Toutes ces souches étaient conservées soit dans du bouillon cœur cerveau additionné du glycérol, soit dans des géloses profondes au Centre de Ressources Biologiques (CeReB) de l'IPCI situé sur le site d'Adiopodoumé

1-3 Critères d'inclusion

En utilisant la base de données ADAGIO[®] de l'unité ASSURMI, les entérobactéries ont été sélectionnées de 2012 à 2015 en fonction des critères suivants :

- Entérobactéries productrices de BLSE ou non et résistantes aux aminosides,
- Entérobactéries productrices de BLSE ou non et résistantes aux fluoroquinolones,
- Entérobactéries productrices de BLSE ou non mais résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones.

1-4 Matériel technique

1-4-1 Matériel et réactifs pour la caractérisation phénotypique des souches

1-4-1-1 Matériel pour la revivification et l'isolement des souches

Les bouillons tels que le bouillon cœur cerveau (BCC) et le bouillon BBL™Trypticase™ (Becton Dickinson, USA) ont été utilisés pour la revivification des souches. Les milieux de culture Eosine bleu de méthylène (EMB), Mac Conkey (bioMérieux SA, France) et Trypto-caséine soja (TSA) de Becton Dickinson, USA ont été utilisés pour l'isolement des souches.

1-4-1-2 Matériel et réactifs pour la ré-identification et la confirmation de l'identité des souches

Les milieux de culture citrate de Simmons, Kligler-Hajna, lysine-fer de même que les disques d'oxydase (Bio-Rad®, France), l'urée (Bio-Rad®, France) et le réactif de Kovacs (bioMérieux, France) ont été utilisés pour la ré-identification des souches bactériennes. L'automate MALDI-TOF MS® (Brucker), une plaque métallique ou cible MALDI (Brucker Microflex), un soniqueur (Fischer Scientific), une centrifugeuse (Sigma), la poudre α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma®), l'acétonitrile (Baker Chemical), le Trifluoracétate (Sigma®) et l'eau HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Fisher Scientific SAS) ont été utilisés pour la confirmation de l'identité des souches.

1-4-1-3 Matériel et réactifs pour la réalisation de l'antibiogramme

La gélose Müeller-Hinton (BioMérieux SA, France), la solution NaCl 0,85 % Medium 2 mL (BioMérieux, France), le Densitomètre (ATB 1550), une étuve (Hera Therm), un applicateur manuel de disques (Becton Dickinson), des écouvillons (Dutscher), un vortex (Velp Scientifica) ont servi à la réalisation de l'antibiogramme et un pied à coulisse pour la lecture manuelle des zones d'inhibition et l'interprétation a été faite en utilisant l'EUCAST-CASFM,2013. Des bandelettes E-test (bioMérieux, France) et un panel de 16 antibiotiques (SirScan Discs, France) de différentes familles ont été également utilisés dans cette étude (**Tableau III**).

Tableau III : Liste des antibiotiques utilisés dans cette étude (EUCAST-CASFM, 2013)

Familles	Antibiotiques	Charge des disques (μg)	Diamètres critiques (mm)	
			S	R
Pénicillines	Amoxicilline	25	≥ 21	< 16
	Amoxicilline-acide clavulanique	20/10	≥ 21	< 16
	Tircalline-acide clavulanique	75/10	≥ 24	< 22
Céphalosporines	Céfotaxime	30	≥ 26	< 23
	Ceftriaxone	30	≥ 26	< 23
	Cefoxitine	30	≥ 22	< 15
Aminosides	Amikacine	30	≥ 17	< 15
	Gentamicine	15	≥ 18	< 16
Carbapénèmes	Imipénème	10	≥ 24	< 17
	Ertapénème	10	≥ 28	< 26
Quinolones	Ciprofloxacine	5	≥ 25	< 22
Sulfamides	Triméthoprime- Sulfaméthoxazole	23,75/1,25	≥ 16	< 13
Mono-bactame	Aztréonam	30	≥ 27	< 21
Acides fosfoniques	Fosfomycine	50	≥ 14	< 14
Polymyxines	Colistine	50	≥ 15	< 15
Rifamycines	Rifampicine	30	≥ 19	< 14

1-4-2 Matériel et réactifs pour la caractérisation moléculaire des souches

1-4-2-1 Matériel et réactifs pour la recherche des gènes de résistance

L'automate EZ1 Advanced XL[®] et le kit d'extraction d'ADN (EZ1 DNA Tissue, Qiagen, Germany) comprenant le tampon G2, des cartouches de réactifs (**Annexe 1**) et des tubes Eppendorf ont servi à extraire l'ADN des souches bactériennes. Les thermocycleur (CFX-Bio-Rad[®] et Labnet International Multigene Optimax), des plaques pour PCR (Dutscher), des amorces spécifiques et sondes (Life technologies) (**Tableaux IV, V, VI**), le Quantitect Probe PCR Master Mix (Thermo Scientific[®]), l'eau ultra pure (Invitrogen) ont été utilisés pour l'amplification des gènes.

La poudre d'agarose (Binder), une bouteille en verre stérile, une balance à précision (Kern EWN[®]), du Tris-Borate-EDTA (Sigma), du SYBR Safe (Invitrogen), du Blue Juice (Invitrogen), un marqueur de poids moléculaire (BenchTop pGEM[®] DNA Markers Cat.# G7521, Promega, France), une cuve d'électrophorèse (Dutscher[®]) et un transilluminateur (Chemidoc[®]) ont été utilisés pour visualiser les fragments d'ADN amplifiés.

1-4-2-2 Matériel pour le séquençage

Un séquenceur ABI 3130 xl (Genetic Analyzer[®]), la poudre Sephadex G-50 DNA Grade (Dutscher), le kit de séquençage Big Dye (Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) une pompe à vide (KNF[®], France), un vibreur automatique de plaques (Heidolph[®]), des plaques à filtre (AcroPrep[™] Advance), des microplaques de filtration pour séquençage (Dutscher) et une centrifugeuse (Sigma[®]) ont été utilisés pour séquencer les fragments d'ADN. Des amorces spécifiques ont été utilisées pour séquencer les gènes de ménage pour les espèces *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* (**Tableaux VII et VIII**).

1-4-2-3 Matériel pour l'expérience de Conjugaison

Les antibiotiques céfotaxime (Panpharma) et amikacine (Mylan) en poudre, la gentamicine liquide (Panpharma), l'azide de sodium en poudre, un incubateur avec agitation (VWR collection[®]) ont été utilisés pour la conjugaison.

Tableau IV : Amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance aux β -lactamines par la PCR en temps réel

Nom du gène	Contrôle Positif	Nom de l'amorce	Séquences des amorces (5'→3')	Taille de l'amplicon (pb)	Références
<i>bla_{TEM}</i>	Kpnasey numéro d'Accession Genbank KJ939560.1	TEM-F TEM-R TEM-Sonde	TTCTGCTATGTGGTGCGGTA GTCCTCCGATCGTTGTCAGA AACTCGGTCGCCGCATACA CTATTCTCAGA	213	Essack <i>et al.</i>, 2001
<i>bla_{CTXM}</i>	Kpnasey numéro d'Accession Genbank JQ397665.1	CTXM-F CTXM-R CTXM - Sonde	CGGGCRATGGCGCARAC TGCRCGGTSGTATTGCC CCARCGGGCGCAGYTGGTG AC	105	Birkett <i>et al.</i>, 2007
<i>bla_{SHV}</i>	Kpnasey numéro d'Accession Genbank AF124984.1	SHV-F SHV-R SHV-Sonde	TCCCATGATGAGCACCTTTA AA TCCTGCTGGCGATAGTGGA T TGCCGGTGACGAACAGCTG GAG	105	Yagi <i>et al.</i>, 2000
<i>bla_{OXA48}</i>	<i>E. coli</i> CMUL64 numéro d'Accession Genbank AY236073	OXA48_F OXA48_R OXA48_Sonde	TCTTAAACGGGCGAACCAA G GCGTCTGTCCATCCCCTTA 6-FAM- AGCTTGATCGCCCTCGATT GG-TAMRA	125	Pitart <i>et al.</i>, 2011

Tableau V : Amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance aux β -lactamines par PCR classique

Nom du gène	Contrôle positif	Nom de l'amorce	Séquences des amorces (5'→3')	Taille des amplicons (pb)	Références
<i>bla_{TEM}</i>	Kpnasey- numéro- d'accension Genbank KJ939560.1	TEM_F TEM_R	ATGAGTATTCAACATTTCCG TG TTACCAATGCTTAATCAGTG AG	861	Essack <i>et al.</i>, 2001
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	Kpnasey numéro- d'accension Genbank JQ397665.1	CTXM1_F CTXM1_R	CCCATGGTTAAAAAATCAC TGC CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG	944	Birkett <i>et al.</i>, 2007
<i>bla_{CTX-M-9}</i>	Cette étude	CTX-M9_F CTX-M9_R	GCGCATGGTGACAAAGAGA GTGCAA GTTACAGCCCTTCGGCGAT GATTC	876	Birkett <i>et al.</i>, 2007
<i>bla_{SHV}</i>	Kpnasey numéro- d'accension Genbank AF124984.1	SHV_F SHV_R	ATTTGTCGCTTCTTTACTCG C TTTATGGCGTTACCTTTGAC C	1051	Yagi <i>et al.</i>, 2000

Tableau VI : Amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance aux fluoroquinolones, aux aminosides et à la rifampicine par PCR classique

Nom du gène	Contrôle positif	Nom de l'amorce	Séquences des amorces (5'->3')	Taille des amplicons (pb)	Références
<i>qnr A</i>	Cette étude	QnrA_F QnrA_R	GATAAAGTTTTTCAGCAAG AGG ATCCAGATCGGCAAAGGTT	542	Touati et al., 2008
<i>qnr B</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> 483	QnrB_F QnrB_R	GACAGAAACAGGTTACCCG GT CAAGACGTTCCAGGAGCAA CG	594	Touati et al., 2008
<i>aac(6')-Ib</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> 483	Aac6-1B_F Aac6-1B_R	TATGAGTGGCTAAATCGAT CCCGCTTTCTCGTAGCA	524	Noppe-Leclercq et al., 1999
<i>aac(3)-Ia</i>	<i>A. baumannii</i> 451	aac3-1A_F aac3-1A-R	GACATAAGCCTGTTCGGTT CTCCGAACTCACGACCGA	303	Noppe-Leclercq et al., 1999
<i>aph(3)-VI</i>	<i>A. baumannii</i> 980	aph(3)-VI_F aph(3)-VI_R	CGGAAACAGCGTTTTAGA TTCCTTTTGTGTCAGGTC	699	Noppe-Leclercq et al., 1999
<i>ant(2'')-I</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> 980	Ant(2'')-I_F Ant(2'')-I_R	GACACAACGCAGGTCACAT T CGCATATCGCGACCTGAAA GC	394	Kim et al., 2008
<i>aad</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> 610	Aad_F Aad_R	TTGTACGGCTCCGCAGTG CCCAATTTGTGTAGGGCTTA	812	Belbel, 2014
<i>arr2</i>	<i>Escherichia coli</i> 725YO	arr2_F arr2_R	AATTACAAGCAGGTGCAAG GA TTCAATGACGTGTAAACCA CG	393	LabJMR

Tableau VII : Amorces utilisées pour la détection des 7 gènes de ménage de *Escherichia coli*

(Sara *et al.*, 2005)

Nom du gène	Séquences des amorces (5'->3')	Taille des amplicons (pb)
<i>adk</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG (F) CCGTCAACTTTCGCGTATTT (R)	583
<i>fumC</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC (F) GTACGCAGCGAAAAAGATTC (R)	806
<i>icd</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA (F) GGACGCAGCAGGATCTGTT (R)	878
<i>purA</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA (F) CATACGGTAAGCCACGCAGA (R)	816
<i>gyrB</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC (F) ATCAGGCCTTCACGCGCATC (R)	911
<i>recA</i>	CGCATTTCGCTTTACCCTGACC (F) TCGTCGAAATCTACGGACCGGA (R)	780
<i>mdh</i>	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG (F) TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT (R)	932

adk : adenylate kinase

fumC : fumarate hydratase

icd : isocitrate/isopropylmal ate déshydrogénase

purA : adenylosuccinate déshydrogénase

gyrB : DNA gyrase

recA : ATP/GTP binding motif

mdh : malate déshydrogénase

Tableau VIII : Amorces utilisées pour la détection des gènes de ménage de *Klebsiella pneumoniae*

(Diancourt *et al.*, 2005)

Nom du gène	Séquences des amorces (5'→3')	Tailles des amplicons (pb)
<i>rpoB</i>	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCCGAAATGGCWGAGAACC A (F)	501
	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCTTCGAAGTTGTAACC (R)	
<i>gapA</i>	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACTCCACTCAC GG (F)	450
	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCCTTCAGAAGCGGCTTTGATGGC TT (R)	
<i>mdh</i>	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACCCAACCTCGCTTCAGGTTCA G (F)	477
	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTCCCAGCAGCAG (R)	
<i>pgi</i>	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAACCTGCCTGTACT GCTGGC (F)	432
	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCACGCTTTATAGCGGTT AAT (R)	
<i>phoE</i>	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCGACTT CTTCGG (F)	420
	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAACTGGTAGGTGAT (R)	
<i>infB</i>	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTCGCTGCTGGACTATATTC G (F)	318
	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTTCAGCTCAAGAACTTC (R)	
<i>tonB</i>	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTTTATACTCGGTACATCA GGTT (F)	414
	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG (R)	

rpoB : beta-subunit of RNA polymerase

gapA : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

mdh : malate dehydrogenase

pgi : phosphoglucose isomerase

phoE : phosphorine E

infB : translation initiation factor 2

tonB : periplasmic energy transducer

2-Méthodes

2-1 Caractérisation phénotypique des souches

2-1-1 Revivification des souches bactériennes

Le bouillon cœur cervelle (BCC) a été utilisé pour revivifier les souches conservées dans les géloses profondes. En effet, par une piqûre profonde, une partie de la gélose contenant les souches a été prélevée et introduite dans le BCC qui a été ensuite incubé à 37 °C pendant 24 h. Puis, en utilisant une pipette Pasteur stérile, le BCC a été ensemencé sur le milieu sélectif EMB qui a été également incubé à 37 °C pendant 24 h.

2-1-2 Ré-identification des souches bactériennes

2-1-2-1 Mise en évidence de la production du cytochrome C oxydase

Pour mettre en évidence la production du cytochrome C oxydase, une colonie bactérienne a été prélevée à partir d'une culture sur le milieu EMB et étalée sur le disque d'oxydase préalablement humidifiée avec de l'eau distillée stérile. Après quelques secondes, le résultat a été obtenu et se traduisait soit par l'apparition d'une coloration violette (réaction positive) ou par l'absence de coloration (réaction négative : cas des entérobactéries).

2-1-2-2 Identification par le portoir réduit de Le Minor

2-1-2-2-1 Utilisation du citrate de Simmons comme seule source de carbone

Une colonie bactérienne a été ensemencée sur le milieu citrate de Simmons par stries longitudinales sur la pente et le milieu a été incubé à 37 °C pendant 24 h. La présence de colonies sur la pente et le virage du milieu du vert au bleu indique que la bactérie est capable d'utiliser le citrate de Simmons comme seule source de carbone pour sa croissance.

2-1-2-2-2 Détermination de la production d'uréase et d'indole

Afin de déterminer la production d'uréase, une colonie bactérienne a été ensemencée dans le milieu urée qui a été incubé par la suite à 37 °C pendant 24 h. La production d'uréase a été mise en évidence par le virage du milieu de l'orange au rouge. Puis, la recherche de la production d'indole a été effectuée en ajoutant quelques gouttes du réactif Kovacs dans le milieu pré-incubé. La formation d'un anneau rouge en surface indique la production d'indole.

2-1-2-2-3 Détermination de la production d'hydrogène sulfuré, de gaz, de la fermentation du lactose et du glucose

A partir du milieu urée, l'ensemencement du milieu Kligler-Hajna a été effectué par piqûre centrale dans le culot et par stries longitudinales sur la pente.

Puis le milieu a été incubé à 37°C pendant 24 h. La production de sulfure d'hydrogène a été mise en évidence par une coloration noire dans le culot tandis que la présence de bulles d'air ou le décollement du culot a mis en évidence la production de gaz. La fermentation du glucose a été démontrée par le virage du culot du rouge au jaune tandis le virage de la pente au jaune indiquait la fermentation du lactose.

2-1-2-2-4 Détermination de la lysine décarboxylase et de la lysine désaminase

A partir du milieu urée, l'ensemencement du milieu lysine-fer a été effectué par piqûre centrale dans le culot et par stries longitudinales sur la pente puis le milieu a été incubé à 37 °C pendant 24 h. Le virage de la pente du violet au jaune a traduit la production d'une lysine désaminase par la bactérie. Par contre, l'absence de virage du culot traduisait la production d'une lysine décarboxylase par la bactérie.

2-1-3 Confirmation de l'identité des souches bactériennes par la spectrométrie de masse MALDI TOF

L'identification des souches par la spectrométrie de masse MALDI-TOF est une technique basée sur le profil protéique des souches, qui permet en quelques minutes (une à deux minutes pour l'identification d'une souche) et avec une haute précision leurs identifications (Seng *et al.*, 2010). Elle s'est déroulée en différentes étapes :

2-1-3-1 Préparation de la matrice

La matrice permet de minimiser la dégradation de la souche provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser incident du MALDI-TOF (Belbel, 2014).

A 2g de la poudre α -cyano-4-hydroxycinnamic acid mis dans un tube Eppendorf, 500 μ L d'acétonitrile, 250 μ L de TFA et 475 μ L d'eau HPLC ont été ajoutés. Le mélange a été homogénéisé au vortex pendant quelques secondes et soniqué pendant 10 min. Ce mélange a été centrifugé pendant 5 min à 13000 tours/minute. Le surnageant qui constitue la matrice (prête à l'emploi) a été transféré dans un autre tube Eppendorf stérile.

2-1-3-2 Dépôt des souches, lecture et interprétation des résultats

Le plan de la cible MALDI a été rempli en indiquant les références des souches à identifier.

Ainsi, à partir d'une colonie bactérienne de chaque souche, 4 spots ont été faits sur la cible selon le plan défini en utilisant des cônes fins. Ces spots ont été recouverts de 1,5 μ L de la matrice précédemment préparée. La plaque a été laissée au repos pendant 5 min sous le poste de sécurité microbiologique (PSM) afin de permettre la cristallisation des échantillons bactériens, puis elle a été introduite dans l'automate pour l'identification des souches.

Le résultat d'identification par MALDI-TOF a été donné avec le logiciel MALDI Biotyper par un score compris entre zéro et trois. Une bactérie est identifiée de façon fiable lorsque le score d'identification est supérieur à 1,9 (**Tableau IX**).

2-1-4 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

Le test de sensibilité des souches aux antibiotiques a été réalisé selon la méthode de diffusion des disques sur la gélose Müller-Hinton en tenant compte des recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (EUCAST/CA-SFM, 2013). Ces recommandations concernent la préparation du milieu de culture Müller-Hinton, de l'*inoculum* bactérien, du choix et de la disposition des disques d'antibiotiques. Et la souche de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 a été utilisée pour le contrôle de la qualité.

2-1-4-1-1 Préparation de l'*inoculum* bactérien

L'*inoculum* bactérien a été préparé en utilisant une ou deux colonies bactériennes qui ont été émulsionnées dans la solution NaCl 0,85%. Cette dernière a été homogénéisée à l'aide d'un vortex et la suspension a été calibrée à l'échelle 0,5 Mac Farland.

2-1-4-1-2 Ensemencement de la gélose Müller-Hinton

La gélose Müller-Hinton a étéensemencée par écouvillonnage en utilisant l'*inoculum* bactérien et 16 disques d'antibiotiques de différentes familles ont été disposés sur la gélose à l'aide d'un applicateur (**Figure 9**). Les boîtes ont été ensuite incubées à 37 °C pendant 24 h. A 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 a été effectuée selon les termes Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistante (R) en fonction des critères définis par l'EUCAST/CA-SFM, 2013.

2-1-5 Recherche de la production de β -lactamases à spectre élargi

La confirmation phénotypique des souches productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) a été effectuée en recherchant les images en bouchon de champagne ou en entonnoir qui peuvent apparaître entre les disques d'antibiotiques d'amoxicilline-acide-clavulanique, de cefotaxime, de ceftriaxone et d'aztréonam disposés sur la gélose Müller-Hinton pré-ensemencée (**Bakour et al., 2014**).

Tableau IX : Scores et niveaux d'identification des souches bactériennes

Score	Description	Symboles	Couleur
2,300 ... 3,000	identification des espèces hautement probable	(+++)	vert
2,000 ... 2,299	identification sécurisée du genre, identification probable des espèces	(++)	vert
1,700 ... 1,999	identification probable du genre	(+)	jaune
0,000 ... 1,699	identification non fiable	(-)	rouge

Source : Bases de données du logiciel MALDI Biotyper (Brucker)

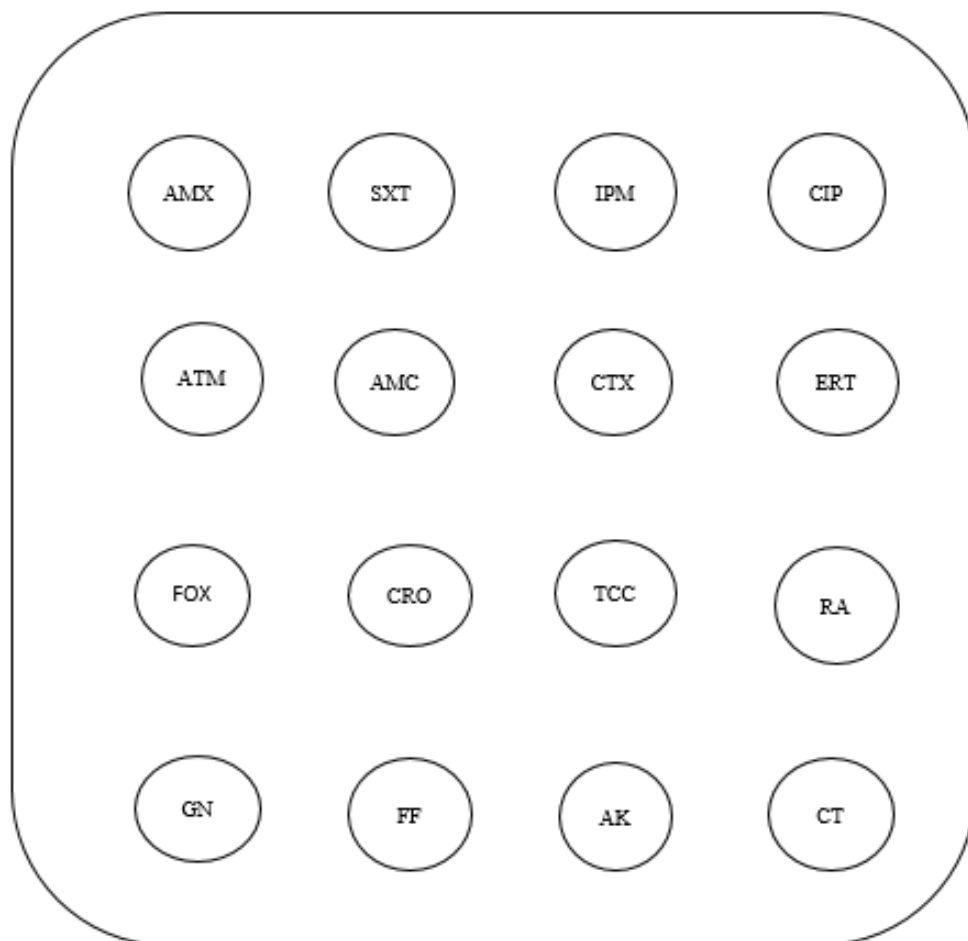


Figure 9 : Disposition des antibiotiques sur la gélose Müller Hinton

AMX : Amoxicilline ; SXT : Triméthoprim- Sulfaméthoxazole ; IPM : Imipénème ; CIP : Ciprofloxacine ; ATM : Aztréonam. AMC : Amoxicilline-acide clavulanique ; CTX : Céfotaxime ; ERT : Ertapénème ; FOX : Cefoxitine ; CRO : Ceftriaxone ; TIM : Tircalline-acide clavulanique ; RA : Rifampicine ; GN : Gentamicine ; FF : Fosfomycine ; AK : Amikacine ; CT : Colistine

2-1-6 Détermination de la concentration minimale inhibitrice par E-test

Le E-test est constitué d'une bande en plastique, non poreuse, calibrée par un gradient préétabli de concentration d'antibiotiques, couvrant 15 dilutions afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) en $\mu\text{g/ml}$ d'une souche testée en milieu gélosé. Le gradient couvre une rangée de concentrations allant 0,002 à 32 $\mu\text{g/ml}$ selon l'antibiotique (Thiam, 2008 ; BelBel, 2014).

Pour déterminer la CMI, un *inoculum* bactérien a été préparé en émulsionnant une colonie jeune de 24 h dans du NaCl 0,85%. La densité optique de l'*inoculum* a été ajustée à 0,5 Mac Farland et ce dernier a été ensemencé par stries serrées sur la gélose Mueller Hinton coulée en boîtes de Pétri. Les bandelettes E-test et les disques d'antibiotiques correspondants ont été posés à la surface de la gélose et les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 h.

2-2 Caractérisation moléculaire de la résistance des souches aux antibiotiques

2-2-1 Extraction d'ADN total bactérien

Le principe est basé sur l'utilisation d'un tampon de lyse contenant un détergent qui sert à décomposer les membranes cellulaires et une protéase pour la digestion des composants cellulaires protéiques. Pour extraire l'ADN total bactérien, une colonie jeune de 24 h a été introduite dans un tube contenant 200 μL du tampon G2 du kit d'extraction d'ADN EZY-1, puis le mélange a été homogénéisé au vortex. Les cartouches de réactifs du kit ont été introduites dans l'automate de même que les tubes Eppendorf qui ont servi à recueillir l'ADN. Après 20 min d'incubation l'ADN a été recueilli puis conservé pour les réactions d'amplification.

2-2-2 Réaction de polymérisation en chaîne réalisée en temps réel

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR, en utilisant des sondes fluorescentes. La mesure de la fluorescence permet de déterminer en temps réel si le fragment recherché (amplicon) est effectivement présent et donc amplifié sans avoir besoin de faire une électrophorèse. De plus, la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN (Bustin, 2000).

Les gènes recherchés au cours de cette réaction étaient les gènes codant pour les β -lactamases, c'est-à-dire les gènes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} et *bla*_{OXA}. Pour ce faire, un mélange réactionnel de 15 μL a été préparé en utilisant 10 μL d'un mix prêt à l'emploi composé de la taq ADN polymérase et des dNTP, 2 μL d'amorce sens et anti-sens, 1 μL de sonde spécifique et 2 μL d'eau ultra pure.

Ce mélange a été déposé dans chaque puits d'une plaque de PCR et 5 µL d'ADN bactérien y ont été ajoutés. L'amplification a consisté en une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 5 min à 95 °C. Cette étape a été suivie de 35 cycles d'amplification de la séquence d'ADN d'intérêt comprenant une dénaturation à 95°C pendant 5 s, une hybridation et une élongation à 60°C pendant 35 s.

2-2-3 Réaction de polymérisation en chaîne

Le principe de la technique consiste à réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en oeuvre deux amorces ou primers (séquences nucléotidiques courtes) qui définissent alors, en bornant, la séquence à amplifier. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN pour séparer les deux brins complémentaires qui le composent, puis une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée et enfin une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois afin d'obtenir une multiplication de la séquence d'ADN cible à la fin de la réaction (**Bustin, 2000**).

Pour ce faire, un mélange réactionnel de 20 µL a été préparé en utilisant 12,5 µL de Quantitect Probe PCR Master Mix, 1µL d'amorce sens et anti-sens et 6,5 µL d'eau ultra pure. Ce mélange a été déposé dans chaque puits de la plaque de PCR et 5 µL d'ADN bactérien y ont été ajoutés. L'amplification a consisté en une étape de dénaturation initiale de l'ADN pendant 15 min à 94 °C. Cette étape a été suivie de 35 cycles d'amplification comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 1 min, une hybridation à 55 °C pendant 50 s, une élongation à 72 °C pendant 2 min et une étape d'élongation finale de 7 min à 72 °C. La PCR conventionnelle a été réalisée pour chaque gène à l'aide d'amorces spécifiques à chacun de ces gènes (gènes de résistance aux β-lactamines, aux aminosides, aux fluoroquinolones et à la rifampicine).

2-2-4 Electrophorèse sur gel d'agarose

La visualisation du fragment d'ADN recherché se fait lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose. Cette étape de la réaction de PCR est basée sur la migration des bandes d'ADN chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique.

Les fragments d'ADN de petites tailles se déplacent plus rapidement que ceux de grandes tailles et migrent plus loin. Plus les fragments sont longs, plus la migration est lente; ainsi la durée de la migration et le voltage employé sont fonction de la taille du fragment d'ADN amplifié (**Ouattara, 2016**).

2-2-4-1 Préparation du gel d'agarose

Pour préparer le gel d'agarose 1,5%, 6 g de la poudre d'agarose ont été introduits d'abord dans une bouteille en verre stérile et 400 mL du tampon TBE 0,5 % y ont été ajoutés. La préparation a été portée ensuite au four à micro-ondes pour fondre le gel et obtenir un mélange homogène. Ce mélange a été laissé au repos quelques minutes sous la hotte chimique et 15 µL de SYBR Safe y ont été ajoutés. Enfin, le gel a été coulé dans des moules contenant des peignes.

2-2-4-2 Migration des produits d'amplification et révélation

Après refroidissement du gel, les peignes ont été retirés et le gel placé dans une cuve d'électrophorèse préalablement remplie de tampon TBE 0,5 %. Un volume de 4 µL d'amplicons mélangés à une goutte du tampon de charge (blue juice) ont été déposés dans les différents puits laissés par les peignes en commençant par le deuxième puits. Le premier puits a été rempli par 4 µL du marqueur de poids moléculaire. La cuve d'électrophorèse a été recouverte et la migration a été effectuée pendant 20 min sous une tension de 135V. Le temps écoulé, le gel a été retiré de la cuve et exposé aux rayons ultra-violets d'un transilluminateur afin de visualiser les bandes d'ADN.

2-2-5 Séquençage

Le séquençage a été réalisé selon la méthode de Sanger, en utilisant le kit Big Dye Terminator v3.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et le séquenceur Automate ABI 3730 (Applied Biosystems), selon les recommandations du constructeur. Le séquençage a pour but de déterminer la séquence nucléotidique de l'ADN isolé. La technique du séquençage utilise, en plus des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), des didésoxyribonucléotides (ddNTP) qui diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3' et dont l'incorporation aléatoire va bloquer la réaction de polymérisation (**Freney *et al.*, 2000**). Les gènes de résistance aux β-lactamines *bla_{CTXMI}* (n=95), *bla_{CTXM9}* (n=5), *bla_{TEM}* (n=84), *bla_{SHV}* (n=40), aux aminosides *aad* (n=15) et aux fluoroquinolones *qnrA* (n=4) et *qnrB* (n=54) ont été séquencés en suivant les différentes étapes :

2-2-5-1 Purification des produits de la PCR conventionnelle

La purification des produits de la PCR conventionnelle a été effectuée en utilisant des plaques de filtration 96 puits AcroPrep™ Advance constitué d'une membrane exclusive à base de silice. Cette membrane permet d'éliminer efficacement les amorces, les dNTP, les nucléotides non incorporés, les enzymes et les sels de PCR sur un équipement automatisé.

Pour purifier les produits de PCR, 100 μ L d'eau ultra-pure ont été ajoutés dans la plaque de PCR contenant ces produits et le mélange obtenu a été transféré dans une plaque à filtre pour une filtration sous une pompe à vide pendant 20 min. Après ce temps, un autre volume de 50 μ L d'eau ultra-pure a été ajouté dans la plaque à filtre et celle-ci a été déposée sur un vibreur automatique de plaques (Heidolph) pendant 20 min.

2-2-5-2 PCR Big Dye

La PCR Big Dye est une PCR classique comprenant les étapes de dénaturation de l'ADN, d'hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée et d'élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase. La particularité de cette PCR est la préparation du mélange réactionnel avec un seul type d'amorce, ce qui équivaut à deux mélanges réactionnels à préparer pour un gène donné. Pour réaliser la PCR Big Dye, deux mélanges réactionnels de 20 μ L ont été préparés avec un seul type d'amorce (amorce sens dans l'un et amorce anti-sens dans l'autre). Ces mélanges ont été composés de 3 μ L du tampon Big Dye, 2 μ L de mix Big Dye, 10 μ L d'eau, 4 μ L produits de PCR purifié et 1 μ L d'amorce sens ou anti-sens. L'amplification a consisté en une étape de dénaturation initiale de l'ADN pendant 5 min à 96 °C. Cette étape a été suivie de 25 cycles d'amplification comprenant une dénaturation à 96 °C pendant 10 s, une hybridation à 50 °C pendant 5 s, une élongation à 60 °C pendant 3 min.

2-2-5-3 Purification des produits de PCR Big-Dye par le Sephadex

Cette méthode est basée sur la purification par chromatographie d'exclusion pour piéger des ddNTP libres en excès qui sont de bas poids moléculaires sur une colonne. Ainsi, dans une microplaque de filtration remplie de la poudre Sephadex G-50 DNA Grade (Dutscher), 300 μ L d'eau ultra pure ont été ajoutés et le mélange a été laissé au repos pendant 3 h. Le temps écoulé, une nouvelle plaque a été placée en dessous de la première contenant le Sephadex et l'ensemble a été centrifugé à 1300 tours/min pendant 2 min à 10 °C. L'eau recueillie dans la plaque en dessous a été éliminée. Puis, les produits de la PCR Big Dye ont été ajoutés dans la microplaque contenant le Sephadex et une seconde plaque pour séquençage a été placée en dessous pour une autre centrifugation afin de récupérer l'ADN destiné au séquençage. Les fiches pour séquençage ont été remplies et la plaque pour le séquençage a été mise sur le support et introduite dans le séquenceur ABI 3130 xl (Genetic Analyzer) pour analyse.

2-2-5-4 Analyse des séquences ADN

Les séquences nucléotidiques obtenues ont été analysées et corrigées en utilisant le logiciel Chromas-Pro et le site internet spécialisé de bioinformatique NCBI. Après correction, les séquences ont été analysées dans la banque de données ARG-ANNOT pour l'identification des gènes.

En effet, la banque de données ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation) est un nouvel outil bioinformatique qui a été créé pour détecter les nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques dans les génomes bactériens. ARG-ANNOT utilise un programme local BLAST dans le logiciel Bio-Edit, cela permet à l'utilisateur d'analyser des séquences sans interface Web (Gupta *et al.*, 2014).

Afin de rechercher d'éventuelles mutations, les séquences nucléotidiques ont été traduites en séquences protéiques en utilisant le site [www.Expasy-Translate tool. org](http://www.Expasy-Translate.tool.org). Les séquences protéiques des gènes *bla_{TEM}* obtenues dans cette étude ont été comparées avec la séquence protéique du gène *bla_{TEM-1}* avec laquelle elles ont eu 99 % d'homologie. Concernant les séquences protéiques des gènes *bla_{SHV}* obtenus dans ce travail, elles ont été comparées avec les séquences protéiques des gènes *bla_{SHV-1}* et *bla_{SHV-2}* qui sont les têtes de file des deux sous-groupes auxquels ces gènes appartiennent (Liakopoulos *et al.*, 2016).

2-2-6 Conjugaison

La conjugaison bactérienne est un mécanisme de transfert d'éléments génétiques 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 dont l'un correspond à la résistance transférée par la souche donatrice et l'autre à la résistance non transférable de la souche réceptrice (Davison, 1999).

Pour ce faire, trois souches de *Escherichia coli* résistantes au céfotaxime et à la gentamicine et qui portent les deux gènes de résistance aux β -lactamines et aux aminosides que sont les gènes *bla_{CTX-M-1}* et *aac(6')-Ib* ont été utilisées comme souches donatrices ce sont *E. coli* 1417C/12, *E. coli* 1253C/13 et *E. coli* 1282Y/13. Par ailleurs, la souche de référence *E. coli* J 53, sensible à tous les antibiotiques et résistante uniquement à l'azide de Sodum a été utilisée comme souche réceptrice. La sélection des transconjugants a été faite sur le milieu de culture Müeller Hinton additionné de l'azide de sodium, de la gentamicine, de l'amikacine et du cefotaxime selon la méthode décrite par Belbel (2014).

L'expérience a été réalisée en cinq jours et a consisté au premier jour, à repiquer séparément sur le milieu Mac Conkey la souche réceptrice *E. coli* J 53 et les souches donatrices, ensuite, à les incuber à 37 °C pendant 24 h pour avoir des cultures jeunes le lendemain.

Au deuxième jour, une colonie de la souche réceptrice et une colonie de chaque souche donatrice ont étéensemencées séparément dans du bouillon BBL et incubées sous agitation à 37 °C pendant 4 h. Après incubation, un mélange donatrice-réceptrice a été réalisé dans un rapport 1/5 c'est-à-dire 0,5 mL de culture de la bactérie donatrice additionné à 4,5 mL de culture de la bactérie réceptrice afin d'optimiser le contact. Ce mélange a été incubé sans agitation à 37 °C pendant 24 h.

Au troisième jour, des milieux sélectifs ont été préparés en incorporant à la gélose Müller Hinton, l'azide de sodium, le céfotaxime, la gentamicine, l'amikacine à des concentrations finales respectives de 200 µg/mL, 16 µg/mL, 10 µg/mL et 100 µg/mL. Le mélange souche donatrice et souche réceptrice a étéensemencé par épuisement sur la moitié des boîtes de sélection et sur l'autre moitié la souche donatrice et la souche réceptrice ont étéensemencées par dépôt de 4 µL à l'aide d'une micropipette (**Figure 10**). Les milieux ont été par la suite incubés à 37 °C pendant 24 h.

Au quatrième jour, les milieux de cultures ont été retirés de l'étuve pour vérifier s'il y a croissance des transconjugants. Puis, l'identification des souches transconjugantes a été effectuée par la spectrométrie de masse MALDI-TOF ainsi que les antibiogrammes des souches transconjugante, donatrice et réceptrice.

Le cinquième jour, le transfert de la résistance entre la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice a été vérifié en comparant les deux antibiogrammes et en réalisant une PCR conventionnelle pour la recherche des gènes *bla_{CTX-M-1}* et *aac(6')Ib* codant respectivement pour la résistance aux β-lactamines et aux aminosides.

2-2-7 Typage moléculaire des souches par le Multi-locus sequence typing

Le typage moléculaire par le MLST a été réalisé pour les espèces *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* en suivant les différentes étapes.

2-2-7-1 Réaction de polymérisation en chaîne

Pour cette réaction, 7 mélanges réactionnels ont été préparés par espèce afin de détecter les 7 gènes de ménage présents chez chaque espèce. Chaque mélange était composé de 12,5 µL de Quantitect Probe PCR Master Mix, 6,5 µL d'eau ultra pure, 5 µL d'ADN de la souche à étudier et 1µL d'un couple d'amorce sens et anti-sens. L'amplification a consisté en une étape de dénaturation initiale de l'ADN pendant 15 min à 94 °C. Cette étape a été suivie de 35 cycles d'amplification comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 1 min, une hybridation à 55 °C pendant 50 s, une élongation à 72 °C pendant 2 min et une étape d'élongation finale de 7 min à 72 °C.

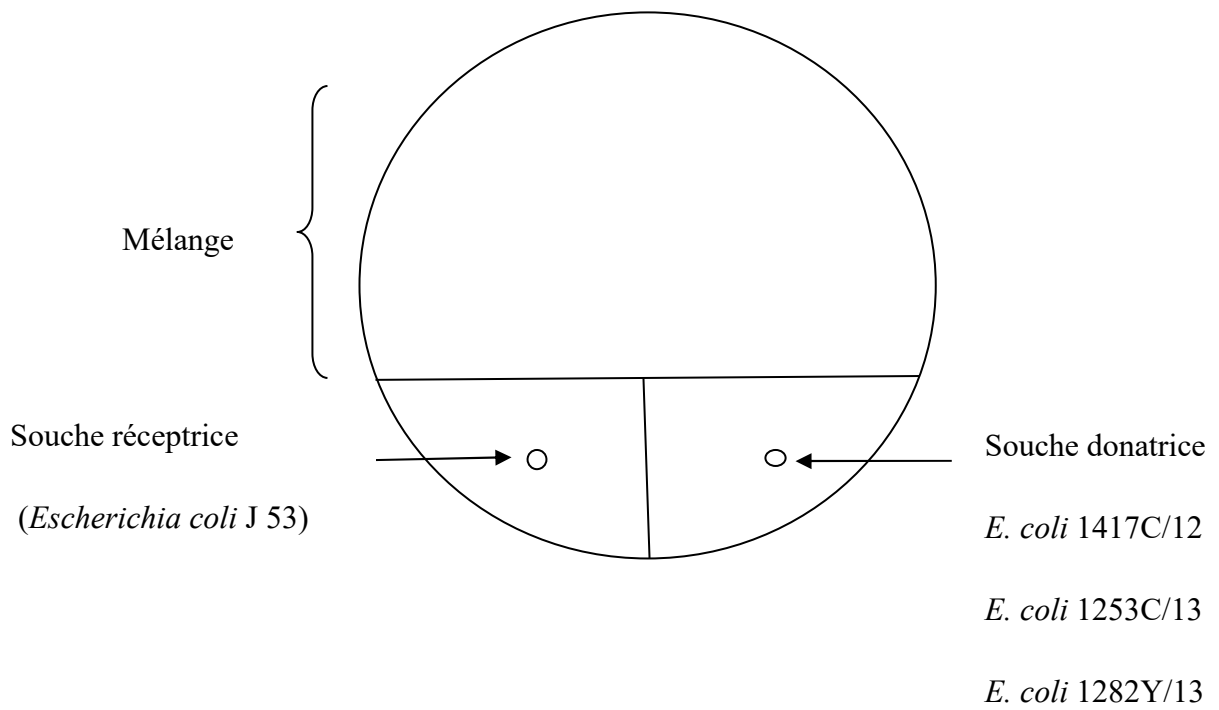


Figure 10 : Disposition des souches sur le milieu sélectif

2-2-7-2 Electrophorèse des produits de PCR

Les amplicons obtenus ont été déposés sur un gel d'agarose 1,5 % dans une cuve à électrophorèse contenant du Tris-Borate-EDTA (TBE) 5%. Après 20 min de migration sous une tension de 135V, le gel a été retiré de la cuve et exposé aux rayons ultra-violetts d'un transilluminateur afin de visualiser les fragments d'ADN.

2-2-7-3 Séquençage

2-2-7-3-1 Purification

Pour purifier les produits de PCR, 100 µL d'eau ultra-pure ont été ajoutés dans la plaque de PCR contenant les amplicons et le mélange obtenu a été transféré dans une plaque à filtre pour une filtration sous une pompe à vide pendant 20 min.

Un autre volume de 50 µL d'eau ultra-pure a été ajouté dans la plaque à filtre et celle-ci a été déposée sur le vibreur automatique de plaques (Heidolph) pendant 20 min.

2-2-7-3-2 PCR-Big Dye et purification des produits de PCR

Pour réaliser la PCR-Big Dye, des amorces de séquençage universelles ayant les séquences suivantes amorce sens F_ GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA et amorce anti-sens R_ TTGTGAGCGGATAACAATTTC ont été utilisées.

L'amplification a consisté en une étape de dénaturation initiale de l'ADN pendant 5 min à 96°C. Cette étape a été suivie de 25 cycles d'amplification comprenant une dénaturation à 96 °C pendant 10s, une hybridation à 50°C pendant 5 s, une élongation à 60 °C pendant 3 min. Les produits de PCR ont été purifiés en utilisant du Sephadex G-50 DNA Grade (Dutscher) et le séquençage a été effectué dans le séquenceur ABI 3130 xl (Genetic Analyzer).

2-2-7-3-3 Analyse des séquences

Les sites web <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/> et <http://bigsdbs.web.pasteur.fr/klebsiella/> spécialisés pour l'analyse MLST ont été utilisés afin de déterminer les différentes séquences types des espèces étudiées.

RESULTATS

1- Caractères phénotypiques des souches étudiées

1-1 Confirmation de l'identité des souches

Les différentes techniques d'identification utilisées ont permis de confirmer l'identité des 153 souches bactériennes dans les proportions suivantes: 71 souches de *Escherichia coli* (46,4%), 57 souches de *Klebsiella pneumoniae* (37,2%), 22 souches de *Enterobacter cloacae* (14,4%), 2 souches de *Citrobacter freundii* (1,3%) et 1 souche de *Morganella morganii* (0,6%).

1-2- Entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi

La production phénotypique de β -lactamases chez les entérobactéries a été mise en évidence par la synergie (bouchon de champagne) entre les disques d'amoxicilline/acide-clavulanique, d'aztréonam et de céfotaxime (**figure 11**). Parmi les 153 entérobactéries testées, 90 ont été productrices de β -lactamases à spectre élargi, ce qui représente un taux de 58,8 % (**figure 12**). Les souches productrices de BLSE ont été au nombre 44 souches de *E. coli*, 31 souches de *K. pneumoniae* et 15 souches de *E. cloacae*.

1-2-1- Répartition des souches selon les produits biologiques

Les souches bactériennes étudiées ont été isolées de plusieurs produits biologiques tels que les urines, le sang, le liquide pleural, le liquide céphalo-rachidien, le liquide d'ascite, le liquide péritonéal, la salive, les pus, les prélèvements ORL ainsi que de certains dispositifs invasifs tels que les bouts de sonde. La répartition de l'ensemble des souches et de celles qui étaient productrices de β -lactamases à spectre élargi (EBLSE) selon les différents produits biologiques et dispositifs invasifs a été résumée dans le **tableau X**. Il ressort du tableau que les souches isolées du liquide d'ascite, du liquide pleural et du prélèvement ORL ont été toutes des souches productrices de BLSE.

1-2-2 Répartition des souches selon la source de provenance

Les souches bactériennes provenaient de plusieurs services hospitaliers. Le service d'où provenait le plus grand nombre des souches productrices de BLSE a été le service de diabetologie (100%) suivi du service d'urologie (81,8%). La répartition des souches selon la source de provenance a été résumée dans le **tableau XI**.

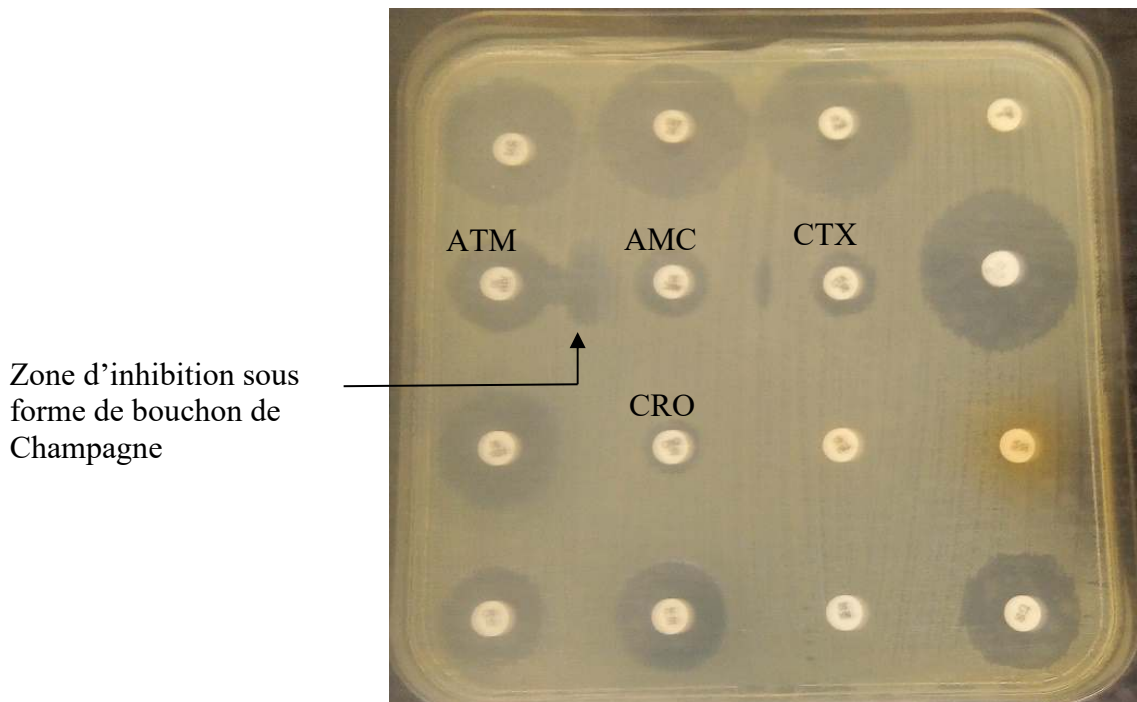


Figure 11 : Profil de résistance aux antibiotiques d'une souche de *Escherichia coli*

ATM : aztréonam ; AMC : amoxicilline-acide clavulanique ; CTX : céfotaxime ; CRO : ceftriaxone

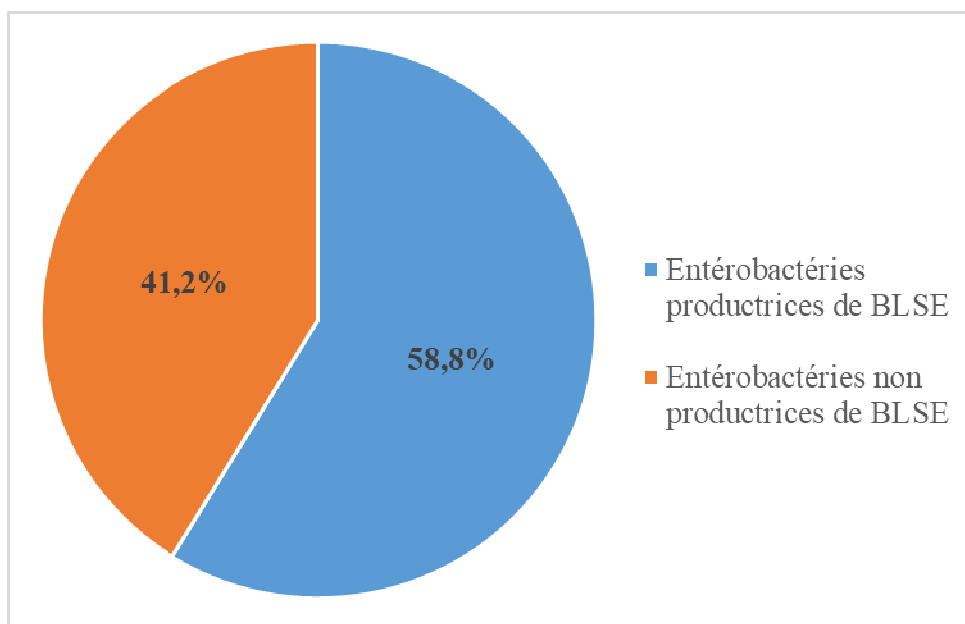


Figure 12 : Répartition des souches productrices de BLSE et non productrices de BLSE

Tableau X : Répartition des souches selon les produits biologiques et dispositif invasif

Produits biologiques et dispositif invasif	Entérobactéries testées (N)	Entérobactéries productrices de BLSE (n)	% Entérobactéries productrices de BLSE (n/N)*100
Urines	72	46	63,9
Suppurations	32	18	56,2
Sang	20	16	80
Bout de sonde	10	6	60
Crachat	3	1	33,3
Liquide d'ascite	1	1	100
Liquide pleural	1	1	100
Prélèvement ORL	1	1	100
Ecouvillons	3	-	-
Aspiration sur cathéter	1	-	-
Expectoration	1	-	-
Liquide péritonéale	1	-	-
Prélèvement nasal	1	-	-
Liquide céphalo-rachidien	1	-	-
Données non disponibles	5	-	-

(-) : pas de souches productrices de BLSE

Tableau XI : Répartition des souches selon la source de provenance

Source de provenance	Entérobactéries testées (N)	Entérobactéries productrices de BLSE (n)	% Entérobactéries productrices de BLSE (n/N)*100
Consultation externe	37	22	59,5
Pédiatrie	17	10	58,8
Urologie	11	9	81,8
Neurologie	10	8	80
Chirurgie	10	5	50
Réanimation	7	5	71,4
Maternité	7	3	42,8
Pneumologie	7	2	28,6
Médecine interne	6	4	66,7
Néphrologie	4	2	50
Traumatologie	4	2	50
Rhumatologie	3	2	66,7
Urgences	3	2	66,7
Orl	3	2	66,7
Obstétrique-gynécologie	3	2	66,7
Diabétologie	2	2	100
Données non disponibles	19	8	42,1

1-3 Résistance des souches aux antibiotiques

1-3-1 Résistance des souches aux β -lactamines

Sur l'ensemble des souches testées, le test de sensibilité a montré une résistance élevée aux céphalosporines respectivement au céfotaxime 85,6 %, au ceftriaxone 81 % et au ceftiofène 80,4 %. De plus, toutes les souches ont été résistantes à l'amoxicilline et à l'association amoxicilline/acide clavulanique. Le taux de résistance à l'ertapénème a été de 26,8 % et le E-test à l'imipénème effectué sur la souche de *Morganella morganii* qui avait présenté un diamètre d'inhibition de 22 mm a donné une CMI égale à 1mg/L. Ce résultat montre la sensibilité de la souche et par conséquent définit l'imipénème comme le carbapénème le plus actif sur l'ensemble des souches testées.

Concernant le taux de résistance des souches productrices de BLSE aux céphalosporines, il a été de 96,7 % au ceftriaxone, 95,6% à la céfotaxime et de 72,2 % à la ceftiofène. Le taux de résistance aux carbapénèmes principalement à l'ertapénème a été de 31,1 % chez les EBLSE.

1-3-2 Résistance des souches aux aminosides

Concernant la résistance à la famille des aminosides, elle était la plus élevée pour la gentamicine (80,4 %) et la plus faible pour l'amikacine (8,5 %) chez l'ensemble des souches testées. Le phénotype sauvage ou sensible à tous les aminosides a représenté 20,3 % de l'ensemble des souches. Parmi les souches productrices de BLSE, 81 souches ont été résistantes à la gentamicine soit un taux de 90 % tandis que 9 souches productrices de BLSE ont été résistantes à l'amikacine soit un taux de 10 %. Le phénotype KGTNt qui correspond à la résistance croisée à la Kanamycine, gentamicine, tobramycine et nétilmicine a été obtenu chez 48,9% des souches productrices de BLSE

1-3-3 Résistance des souches aux fluoroquinolones

La ciprofloxacine a été la seule fluoroquinolone utilisée au cours de cette étude. Parmi les 153 entérobactéries testées, 124 souches ont été résistantes à cet antibiotique, ce qui représente un taux de 81 %. Par ailleurs, parmi les souches productrices de BLSE, 78 (86,7 %) ont été résistantes à la ciprofloxacine.

1-3-4 Résistance des souches aux autres antibiotiques

Toutes les souches testées ont été sensibles à la colistine tandis que 25, 132 et 153 souches ont été résistantes respectivement à la fosfomycine, au cotrimoxazole et à la rifampicine.

Toutes les souches résistantes à la fosfomycine étaient des BLSE soit un taux de 27,8 % et toutes les souches productrices de BLSE ont été résistantes à la rifampicine. Le taux de résistance des EBLSE au cotrimoxazole a été de 88,9 %.

1-4 Résistance des différentes souches productrices de BLSE aux antibiotiques

1-4-1 Résistance des souches de *Escherichia coli* aux antibiotiques

L'analyse des résultats du test de sensibilité aux antibiotiques a montré que pour les antibiotiques de la famille des β -lactamines, 100 % des souches de *E. coli* ont été résistantes à l'association amoxicilline-acide clavulanique. Le taux de résistance aux céphalosporines était de 63,6 %, 98 % et 100 % respectivement pour la céfoxitine, la cefotaxime et le ceftriaxone. Toutes les souches ont été sensibles à l'imipénème mais 27,3 % des souches ont été résistantes à l'ertapénème. Concernant la famille des aminosides, le taux de résistance à l'amikacine a été de 13,8 % tandis que 91 % des souches ont été résistantes à la gentamicine. Le taux de résistance à la ciprofloxacine a été de 95,4 % (**tableau XII**).

1-4-2 Résistance des souches de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques

Le taux de résistance des souches de *K. pneumoniae* a été de 71 % pour la céfoxitine et 96,8 % pour la cefotaxime et le ceftriaxone respectivement. Dans cette espèce également, toutes les souches ont été sensibles à l'imipénème ; cependant 35,5 % des souches ont été résistantes à l'ertapénème. Le taux résistance des souches de *K. pneumoniae* a été de 100 % à l'amoxicilline-acide clavulanique. Concernant la famille des aminosides, le taux de résistance à l'amikacine a été de 6,4 % et celui à la gentamicine a été de 96,8 %. Par ailleurs, le taux de résistance à la ciprofloxacine a été de 74,2 % (**tableau XIII**).

1-4-3 Résistance des souches de *Enterobacter cloacae* aux antibiotiques

Le taux de résistance des souches de *E. cloacae* a été 100 % pour l'amoxicilline-acide clavulanique et la céfoxitine tandis que 86,7 % des souches ont été résistantes à la céfotaxime et au ceftriaxone. Toutes les souches ont été sensibles à l'imipénème cependant 33,3 % des souches ont été résistantes à l'ertapénème.

Concernant les aminosides, le taux de résistance a été de 73,3 % et 6,7 % respectivement pour la gentamicine et l'amikacine. Par ailleurs, Le taux de résistance à la ciprofloxacine a été de 86,7 % (**tableau XIV**).

Tableau XII : Taux de résistance aux antibiotiques des souches de *Escherichia coli* productrices de BLSE

Familles	Antibiotiques	<i>Escherichia coli</i>			
		Nombre de souches BLSE	Nombre de Souches résistantes	Pourcentage	Nature de la résistance
Pénicillines	Amoxicilline	44	44	100	acquise
	Amoxicilline-acide clavulanique	44	44	100	acquise
	Tircalline-acide clavulanique	44	44	100	acquise
Céphalosporines	Céfotaxime	44	43	98	acquise
	Ceftriaxone	44	44	100	acquise
	Cefoxitine	44	28	63,6	acquise
Aminosides	Amikacine	44	6	13,6	acquise
	Gentamicine	44	40	91	acquise
Carbapénèmes	Imipenème	44	0	0	
	Ertapénème	44	12	27,3	acquise
Quinolones	Ciprofloxacine	44	42	95,4	acquise
Sulfamides	Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	44	40	91	acquise
Mono-bactame	Aztréonam	44	44	100	acquise
Acides fosfoniques	Fosfomycine	44	1	2,3	acquise
Polymyxines	Colistine	44	0	0	acquise
Rifamycines	Rifampicine	44	44	100	acquise

Tableau XIII : Taux de résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae*
productrices de BLSE

Familles	Antibiotiques	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
		Nombre de souches BLSE	Nombre de Souches résistantes	Pourcentage	Nature de la résistance
Pénicillines	Amoxicilline	31	31	100	naturelle
	Amoxicilline-acide clavulanique	31	31	100	Acquise
	Tircalline-acide clavulanique	31	31	100	Acquise
Céphalosporines	Céfotaxime	31	30	96,8	Acquise
	Ceftriaxone	31	30	96,8	Acquise
	Cefoxitine	31	22	71	Acquise
Aminosides	Amikacine	31	2	6,4	Acquise
	Gentamicine	31	30	96,8	Acquise
Carbapénèmes	Imipenème	31	0	0	
	Ertapénème	31	11	35,5	Acquise
Quinolones	Ciprofloxacine	31	23	74,2	Acquise
Sulfamides	Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	31	28	90,3	Acquise
Mono-bactame	Aztréonam	31	29	93,5	Acquise
Acides fosfoniques	Fosfomycine	31	18	58,1	Acquise
Polymyxines	Colistine	31	0	0	Acquise
Rifamycines	Rifampicine	31	31	100	Acquise

Tableau XIV : Taux de résistance aux antibiotiques des souches de *Enterobacter cloacae*

productrices de BLSE

Familles	Antibiotiques	<i>Enterobacter cloacae</i>			
		Nombre de souches BLSE	Nombre Souches résistantes	Pourcentage	Nature de la résistance
Pénicillines	Amoxicilline	15	15	100	naturelle
	Amoxicilline-acide clavulanique	15	15	(100)	naturelle
	Tircalline-acide clavulanique	15	14	93,3	acquise
Céphalosporines	Céfotaxime	15	13	86,7	acquise
	Ceftriaxone	15	13	86,7	acquise
	Cefoxitine	15	15	100	naturelle
Aminosides	Amikacine	15	1	6,7	acquise
	Gentamicine	15	11	73,3	acquise
Carbapénèmes	Imipenème	15			
	Ertapénème	15	5	33,3	Acquise
Quinolones	Ciprofloxacine	15	13	86,7	Acquise
Sulfamides	Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	15	12	80	acquise
Mono-bactame	Aztréonam	15	13	86,7	acquise
Acides fosfoniques	Fosfomycine	15	6	40	acquise
Polymyxines	Colistine	15	0	0	acquise
Rifamycines	Rifampicine	15	15	100	acquise

2- Caractères génotypiques des souches étudiées

2-1 Gènes de résistances aux β -lactamines détectés

L'amplification des gènes de résistance aux β -lactamines par la PCR en temps réel a montré que les souches productrices de BLSE et certaines qui étaient résistantes aux céphalosporines possédaient les gènes de résistance aux β -lactamines suivants *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* et *bla_{SHV}*. Cependant aucune des souches n'a hébergé le gène *bla_{OXA-48}* (**figure 13**). La détection des gènes de résistance aux β -lactamines par PCR conventionnelle chez les souches positives à la PCR en temps réel a montré que 95 souches hébergeaient le gène *bla_{CTX-M1}* contre 5 souches qui possédaient le gène *bla_{CTX-M9}*. Les gènes de résistance *bla_{TEM}* et *bla_{SHV}* ont été détectés respectivement chez 84 souches et 40 souches (**figure 14**).

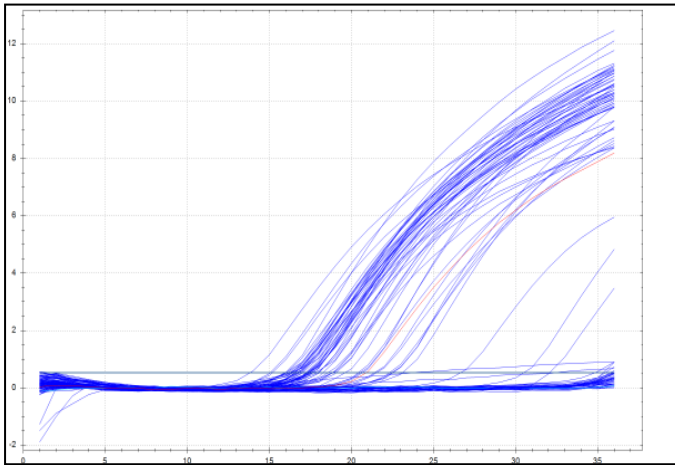
Chez les 90 souches productrices de BLSE les gènes de résistance aux β -lactamines ont été présents à des taux variables. En effet, le gène *bla_{CTX-M-1}* a été détecté chez 87 souches, soit un taux de résistance de 96,7 % contre 5 souches qui ont hébergés le gène *bla_{CTX-M-9}* pour un taux de 5,6 %. Le gène *bla_{TEM}* a été présent à un taux de 67,8 % chez 61 souches et le gène *bla_{SHV}* a été retrouvé chez 25 souches pour un taux de 27,8 %.

La répartition des gènes de résistance aux β -lactamines entre les différentes espèces bactériennes a montré que le gène *bla_{CTX-M-1}* a été le plus représenté chez l'espèce *E. coli* à un taux de 47,8 % suivi des espèces *K. pneumoniae* et *E. cloacae* à des taux respectifs de 34,4 % et 14,4 %. Tout comme le gène *bla_{CTX-M-1}*, le gène *bla_{CTX-M-9}* a été le plus retrouvé chez l'espèce *E. coli* à un taux de 4,4 % suivi de l'espèce *E. cloacae* à un taux de 1,1%. Cependant, aucune des souches de *K. pneumoniae* n'a hébergé ce gène. A propos du gène *bla_{TEM}*, 30 % des souches de *K. pneumoniae* avaient ce gène contre 26,7 % des souches de *E. coli* et 11,1% des souches de *E. cloacae*. Par ailleurs, le gène *bla_{SHV}* a été détecté le plus chez l'espèce *K. pneumoniae* à 25,6 % contre 1,1 % respectivement chez les espèces *E. coli* et *E. cloacae* (**tableau XV**).

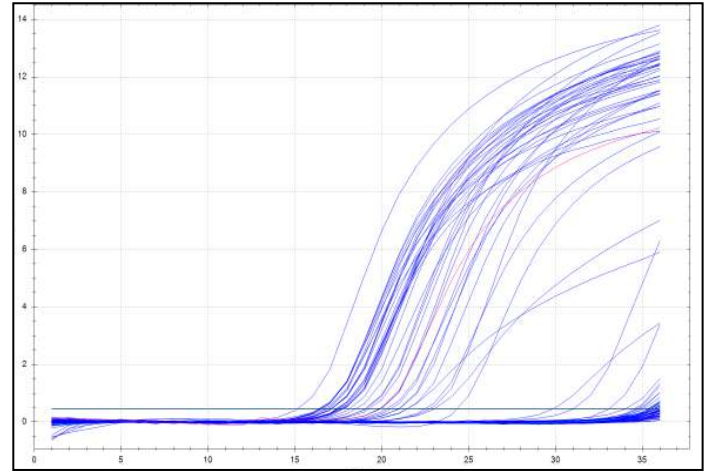
2-2 Coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines

La coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi a montré que 59 souches (65,6%) qui avaient le gène *bla_{CTX-M-1}* hébergeaient également le gène *bla_{TEM}*. Parmi ces souches, il y avait 27 souches de *K. pneumoniae*, 22 souches de *E. coli* et 10 souches de *E. cloacae*.

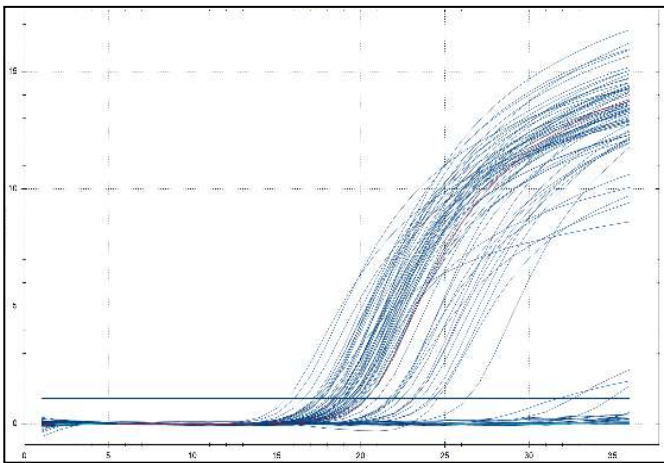
Les gènes *bla_{CTX-M-1}* et *bla_{SHV}* ont été exprimés par 25 souches dont 23 souches de *K. pneumoniae*, 1 souche de *E. coli* et 1 souche de *E. cloacae*. Par ailleurs, les trois gènes *bla_{CTX-M1}*, *bla_{TEM}* et *bla_{SHV}* ont été exprimés par 23 souches (25,6%) dont 21 souches de *K. pneumoniae*, 1 souche de *E. coli* et 1 souche de *E. cloacae*.



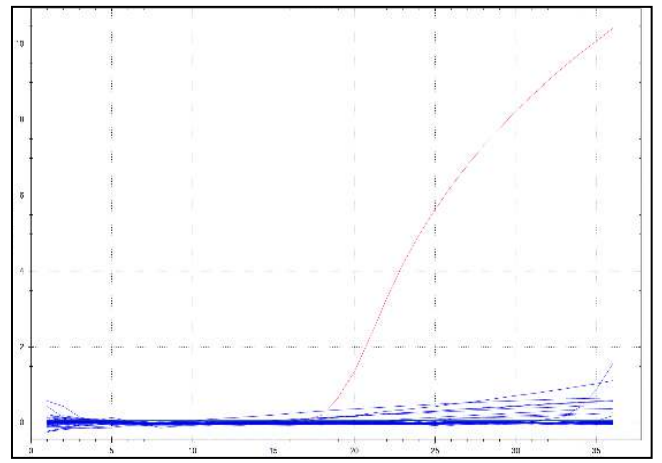
A



B



C



D

Figure 13 : Courbes représentant les gènes de résistantes aux β -lactamines détectés par la PCR en temps réel

A : couleur bleu = gènes *bla_{TEM}*; couleur rouge = témoin positif

B : couleur bleu = gènes *bla_{SHV}*; couleur rouge = témoin positif

C : couleur bleu = gènes *bla_{CTX-M}*; couleur rouge = témoin positif

D : couleur rouge = témoin positif, pas de gène *bla_{OXA-48}*

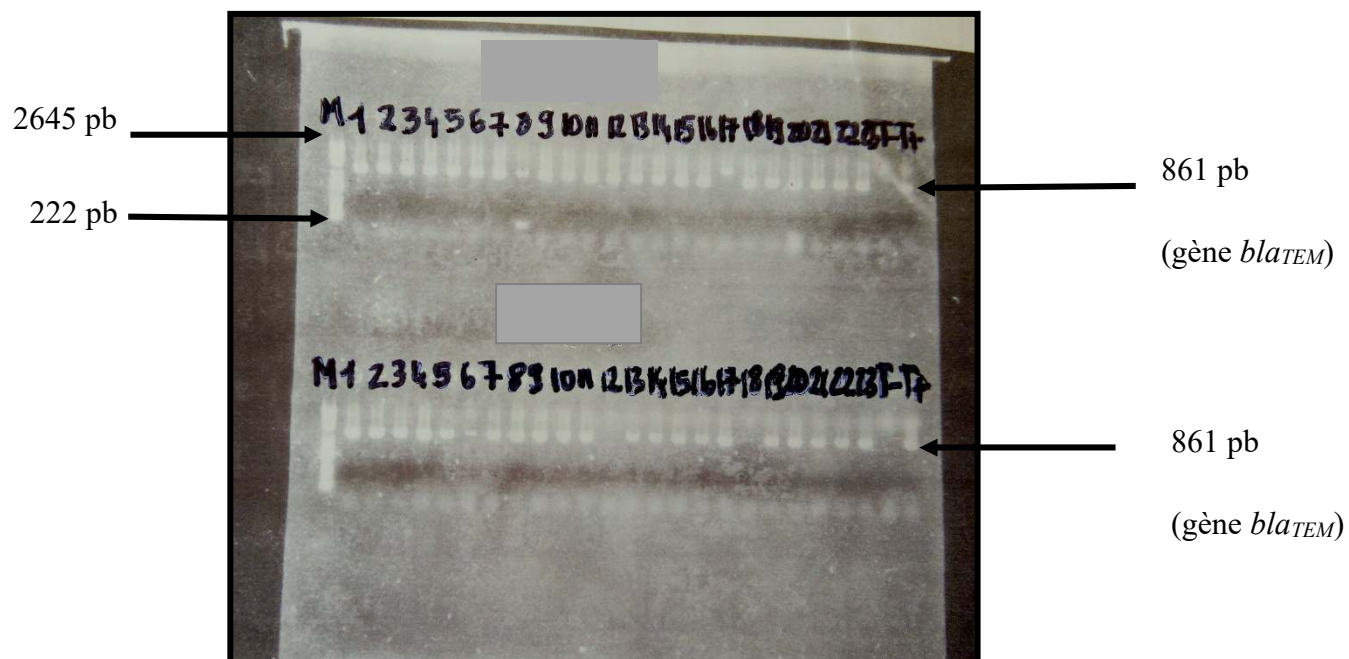


Figure 14 : Profil électrophorétique des amplicons du gène *bla_{TEM}*

M : marqueur de poids moléculaire (DNA Ladder 100 Pb, Promega), **pb** : paire de bases, **T-**: témoin négatif, **T+** : témoin positif

Tableau XV : Répartition des gènes de résistance aux β -lactamines entre les souches productrices de BLSE

Gènes de résistance	Souches BLSE (N=90)		
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>
<i>bla</i> _{CTXM-1}	43 (47,8)	31 (34,4)	13 (14,4)
<i>bla</i> _{CTXM-9}	4 (4,4)	-	1(1,1)
<i>bla</i> _{TEM}	24 (26,7)	27 (30)	10 (11,1)
<i>bla</i> _{SHV}	1 (1,1)	23 (25,6)	1 (1,1)
<i>bla</i> _{OXA-48}	-	-	-

- : pas de gène détecté

Parmi les 5 souches qui avaient le gène *bla_{CTX-M9}*, 3 souches (3,3%) dont 2 souches de *E. coli* et 1 souche de *K. pneumoniae* ont exprimé les deux gènes *bla_{CTX-M9}* et *bla_{TEM}* tandis qu'une seule souche de *E. cloacae* a exprimé les trois gènes *bla_{CTX-M9}*, *bla_{TEM}* et *bla_{SHV}*. Deux souches dont 1 souche de *E. coli* et 1 souche de *E. cloacae* ont exprimé les gènes *bla_{CTX-M-1}* et *bla_{CTX-M-9}*. Cependant, tous les gènes de résistance aux β -lactamines c'est-à-dire, *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-9}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* ont été exprimés par une seule souche de *E. cloacae* (**tableau XVI**).

2-3 Gènes de résistance aux aminosides détectés

Les gènes de résistance aux aminosides de type *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-I*, *aad*, qui ont été détectés au cours de cette étude ont été recherchés chez toutes les souches résistantes aux aminosides. Ces gènes ont été obtenus à des taux variables. Ainsi, le gène *aac(6')-Ib* a été retrouvé chez 69 souches (56,1%) contre 9 souches (7,3%) qui hébergeaient le gène *ant(2'')-I*. Quant au gène *aad*, il a été détecté chez 15 souches, ce qui représente un taux de 12,2 % (**Figure 15**).

Chez les souches productrices de BLSE, le gène *aac(6')-Ib* a été détecté chez 53 souches dont 48 souches résistantes à la gentamicine et 5 souches résistantes à l'amikacine, ce qui représente un taux de 58,9 %. Le gène *ant(2'')-I* a été détecté chez 8 souches (8,9%) qui ont été toutes résistantes à la gentamicine et deux résistantes à l'amikacine. Quant au gène *aad*, il a été détecté chez 7 souches (7,8 %) dont une seule résistante à l'amikacine et les 7 à la gentamicine. Toutefois, aucune souche n'a hébergé les gènes *aph(3)-VI* et *aac(3)-Ia*.

2-4 Coexpression des gènes de résistance aux aminosides

La coexpression des gènes de résistance aux aminosides chez les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi a montré que 5 souches qui avaient le gène *aac(6')-Ib* hébergeaient également le gène *ant(2'')-I*. Les gènes *aac(6')-Ib* et *aad 2* ont quant à eux été exprimés par 3 souches. Et une seule souche hébergeait les gènes *ant(2'')-I* et *aad 2* (**Tableau XVII**).

2-5 Coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines et aux aminosides

Il ressort de l'analyse que 53 souches (58,9%) dont 23 souches de *E. coli*, 20 souches de *K. pneumoniae* et 10 souches de *E. cloacae* ont exprimé simultanément les gènes *bla_{CTX-M-1}* et *aac(6')-Ib* contre une seule souche de *E. coli* qui a exprimé les gènes *bla_{CTX-M-9}* et *aac(6')-Ib*. Les gènes *bla_{CTX-M-1}* et *ant(2'')-I* ont quant à eux été exprimés par 7 souches dont 5 souches de *E. coli* et 2 souches de *K. pneumoniae*. De même, les gènes *bla_{CTX-M-1}* et *aad* ont été exprimés par 7 souches dont 4 souches de *E. coli* et 3 souches de *K. pneumoniae*. Cependant aucune souche n'a exprimé tous les gènes de résistance aux β -lactamines et aux aminosides (**tableau XVIII**).

Tableau XVI : Coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines chez les EBLSE

Gènes de résistance	Souches BLSE (N=90)				
	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Total	Taux (%)
<i>bla_{CTXM-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	22	10	27	59	65,6
<i>bla_{CTXM-1}</i> , <i>bla_{SHV}</i>	1	1	23	25	27,8
<i>bla_{CTXM-1}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i>	1	1	21	23	25,6
<i>bla_{CTXM-9}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	2	-	1	3	3,3
<i>bla_{CTXM-9}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i>	-	1	-	1	1,1
<i>bla_{CTXM-1}</i> , <i>bla_{CTXM-9}</i>	1	1	-	2	2,2
<i>bla_{CTXM-1}</i> , <i>bla_{CTXM-9}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i>	-	1	-	1	1,1

- : pas de coexpression

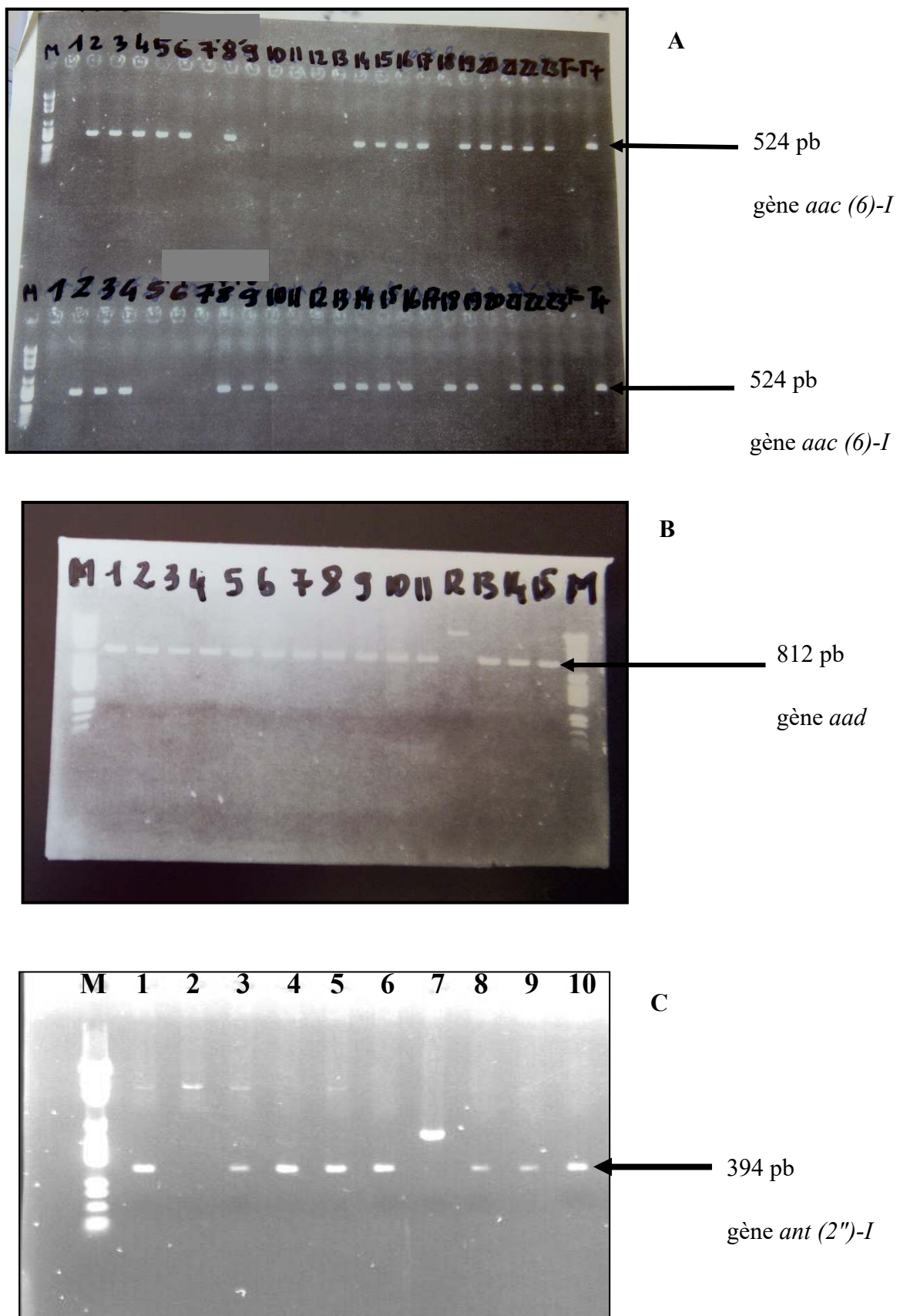


Figure 15 : Profils électrophorétiques des amplicons des gènes *aac (6)-I*, *aad* et *ant (2'')-I*

A : Profil électrophorétique des amplicons du gène *aac (6)-I*. **B :** Profil électrophorétique des amplicons du gène *aad*. **C :** Profil électrophorétique des amplicons du gène *ant (2'')-I*.

Tableau XVII : Coexpression des gènes de résistance aux aminosides

Gènes de résistance	Souches productrices de BLSE (N=90)				
	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Total	Taux (%)
<i>aac (6')-Ib, ant (2'')-I</i>	5	-	-	5	5,6
<i>aac (6')-Ib, aad2</i>	2	-	1	3	3,3
<i>ant (2'')-I, aad1</i>	-	-	1	1	1,1

- : pas coexpression

Tableau XVIII : Coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines et aux aminosides chez les souches productrices de BLSE

Gènes de résistance	Souches productrices de BLSE (N=90)				
	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Total	Taux (%)
<i>bla_{CTXM-1}, aac (6')-Ib</i>	23	10	20	53	58,9
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{TEM}, aac (6')-Ib</i>	9	7	17	33	36,7
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{SHV}, aac (6')-Ib</i>	-	-	15	15	16,7
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{TEM}, bla_{SHV}, aac(6')Ib</i>	-	-	14	14	15,6
<i>bla_{CTXM-1}, ant (2'')-I</i>	5	-	2	7	7,8
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{TEM}, ant (2'')-I</i>	1	-	2	3	3,3
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{SHV}, ant (2'')-I</i>	-	-	1	1	1,1
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{TEM}, bla_{SHV}, ant (2'')I</i>	-	-	1	1	1,1
<i>bla_{CTXM-1}, aad</i>	4	-	3	7	7,8
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{TEM}, aad</i>	3	-	3	6	6,7
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{SHV}, aad</i>	-	-	3	3	3,3
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{TEM}, bla_{SHV}, aad</i>	-	-	3	3	3,3
<i>bla_{CTXM-9}, aac (6')-Ib</i>	1	-	-	1	1,1
<i>bla_{CTXM-9}, bla_{TEM}, ant (2'')-I</i>	1	-	-	1	1,1

- : pas de coexpression

2-6 Gènes de résistance aux fluoroquinolones détectés

La recherche des gènes de résistance aux fluoroquinolones *qnrA* et *qnrB* a montré que 46,8 % des souches résistantes à la ciprofloxacine, soit 58 souches, ont hébergé ces gènes. Chez les souches productrices de BLSE, 42,2% (38 souches) ont hébergé le gène *qnrB* tandis que 3,3% (3 souches) possédaient le gène *qnrA*.

2-7 Coexpression des gènes de résistance aux fluoroquinolones

Parmi les 38 souches productrices de BLSE qui ont hébergé les gènes *qnrB*, seulement trois ont hébergé simultanément les gènes *qnrB* et *qnrA*.

2-8 Coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines et aux fluoroquinolones

La coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines et aux fluoroquinolones a montré que 42,2 % des souches dont 7 souches de *E. coli*, 12 souches de *E. cloacae* et 19 souches de *K. pneumoniae* ont exprimé les gènes *bla_{CTXM-1}* et *qnrB*. Les gènes *bla_{CTXM-1}*, *bla_{TEM}* et *qnrB* ont été exprimés par 29 souches au nombre desquelles, 3 souches de *E. coli*, 9 souches de *E. cloacae* et 17 souches de *K. pneumoniae*. Seulement 17 souches de *K. pneumoniae* ont exprimé les gènes *bla_{CTXM-1}*, *bla_{SHV}*, et *qnrB* tandis que 15 souches de *K. pneumoniae* ont exprimé les gènes *bla_{CTXM-1}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* et *qnrB*. Trois souches de *E.coli* ont hébergé les gènes *bla_{CTXM-1}* et *qnrA* et parmi ces souches 2 ont exprimé les gènes *bla_{CTXM-1}*, *bla_{TEM}* et *qnrA* (**Tableau XVIII**).

2-9 Coexpression des gènes de résistance aux trois familles d'antibiotiques

La coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones représentés par les gènes *bla_{CTXM-1}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *aac(6')-Ib*, *qnrB* a été la plus marquée chez l'espèce *K. pneumoniae*. En effet, 13 souches de *K. pneumoniae* ont exprimé ces gènes simultanément, ce qui représente un taux de 14,4% et parmi ces souches, une seule souche a exprimé les gènes *bla_{CTXM-1}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *aac(6')-Ib*, *qnrB*, *aad* (**tableau XIX**).

2-10 Coexpression des gènes de résistance selon la source de provenance des souches

La coexpression des gènes de résistance aux antibiotiques chez les souches productrices de BLSE a montré que 59 souches provenant la consultation externe et de la pédiatrie ont hébergé les gènes de résistance aux β -lactamines que sont les gènes *bla_{CTXM-1}*, *bla_{TEM}*. Par ailleurs, 53 souches provenant des services de la consultation externe et de la neurologie ont hébergé les gènes de résistance aux β -lactamines et aux aminosides que sont les gènes *bla_{CTXM-1}*, *aac(6')Ib*.

Tableau XIX : Coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines et aux fluoroquinolones

Gènes	Souches productrices de BLSE (N=90)				
	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Total	Taux (%)
<i>bla_{CTXM-1}, qnrB</i>	7	12	19	38	42,2
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{TEM}, qnrB</i>	3	9	17	29	32,2,
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{SHV}, qnrB</i>	-	-	17	17	18,9
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{TEM}, bla_{SHV}, qnrB</i>	-	-	15	15	16,7
<i>bla_{CTXM-1}, qnrA</i>	3	-	-	3	3,3
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{TEM}, qnrA</i>	2	-	-	2	2,2

- : pas de coexpression

Tableau XX : Coexpression des gènes de résistance aux trois familles d'antibiotiques

Gènes	Souches productrices de BLSE (N=90)				
	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Total	Taux (%)
<i>bla</i> _{CTXM-1} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>qnrB</i> , <i>aac</i> (6')-Ib,	-	-	13	13	14,4
<i>bla</i> _{CTXM-1} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>qnrB</i> , <i>aad</i> , <i>aac</i> (6')-Ib,	-	-	1	1	1,1

- : pas de coexpression

Les gènes de résistance aux β -lactamines et aux fluoroquinolones que sont les gènes *bla_{CTX-M-1}* et *qnr B* ont été exprimés simultanément chez 38 souches et les services les plus concernés ont été la consultation externe et la neurologie (**tableaux XXI**).

3- Gènes de résistance identifiés après séquençage

Les gènes de résistance aux β -lactamines (*bla_{CTX-M-1}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M-9}*), aux aminosides (*aad*, *ant (2'')-I*) et aux fluoroquinolones (*qnr B* et *qnr A*) détectés chez les souches productrices de BLSE ont été séquencés. Après le séquençage, la correction des séquences par le logiciel Chromaspro et le blast dans la base de données ARG-ANNOT, plusieurs gènes ont été identifiés. Les gènes *bla_{TEM-191}*, *bla_{TEM-104}* et *bla_{TEM-198}* ont été identifiés respectivement chez 12 souches (19,7 %), 10 souches (16,4 %) et 3 souches (5 %).

Par ailleurs, les gènes *bla_{SHV}* identifiées ont été : *bla_{SHV-12}* (2 souches), *bla_{SHV-27}* (1 souche), *bla_{SHV-100}* (8 souches), *bla_{SHV-83}* (1 souche), *bla_{SHV-89}* (2 souches), *bla_{SHV-106}* (2 souches) et *bla_{SHV-150}* (1 souche). Toutefois, les BLSE de type CTX-M ont été les plus répandues avec la présence du gène *bla_{CTX-M-15}* chez 40 souches, *bla_{CTX-M-1}* chez 1 souche et *bla_{CTX-M-27}* chez 1 souche. Les gènes de résistance aux fluoroquinolones identifiés ont été *qnr A1* chez 3 souches, *qnr B1* chez 28 souches, *qnr B6* chez 2 souches et *qnr B7* chez 1 souche. Quant aux gènes de résistance aux aminosides *aad1* et *aad2*, ils ont été identifiés respectivement chez 1 et 6 souches. Les gènes de résistance aux β -lactamines séquencés ont été répartis par espèce dans le **tableau XXII** et il ressort que le gène *bla_{CTX-M-15}* a été largement répandu chez l'espèce *E. coli* tandis que les gènes *bla_{SHV}* et *bla_{TEM}* ont été plus retrouvés chez l'espèce *K. pneumoniae*.

3-1- Mise en évidence des différentes mutations dans les séquences protéiques

3-1-1 Alignement des séquences protéiques des β -lactamases de type Temoneira

Les séquences protéiques des gènes *bla_{TEM-104}*, *bla_{TEM-198}* et *bla_{TEM-191}* ont été alignées avec la séquence protéique du gène *bla_{TEM-1}*. Des mutations par substitution homologues, ont été observées dans les protéines TEM-104 et TEM-198. Ces mutations par substitution ont été trouvées en position 262 avec l'acide aspartique (D) dans la protéine TEM 1 remplacé par la thréonine (T) au niveau des protéines TEM-104 et TEM-198. La **figure 16** met en évidence la mutation par substitution observée dans la protéine TEM-104. Cette substitution, notée, D262T a été due à la délétion d'une cytosine en position 782 au niveau des séquences nucléotidiques des gènes *bla_{TEM-104}* et *bla_{TEM-198}* (**Annexe 2**).

Tableau XXI : Coexpression des gènes de résistance selon la source de provenance

Gènes	Nombre de souches productrices de BLSE	Services hospitaliers plus concernés
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{TEM}</i>	59	Consultation externe/ Pédiatrie
<i>bla_{CTXM-1}, aac(6')Ib</i>	53	Consultation externe/ Neurologie
<i>bla_{CTXM-1}, qnr B</i>	38	Consultation externe/ Neurologie
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{TEM}, bla_{SHV}</i>	23	Urologie
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{TEM}, bla_{SHV}, aac(6')Ib</i>	14	Urologie
<i>bla_{CTXM-1}, bla_{TEM}, bla_{SHV}, aac(6')Ib, qnrB</i>	13	Consultation externe

Tableau XXII : Répartition des gènes de résistance aux β -lactamines identifiés selon les espèces

Gènes	Souches productrices de BLSE (N=90)			
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloace</i>	Total
<i>bla</i> CTXM-15	22	10	8	40
<i>bla</i> CTXM-1	1	-	-	1
<i>bla</i> CTXM-9	1	-	-	
<i>bla</i> TEM-198	1	1	1	3
<i>bla</i> TEM-191	3	5	4	12
<i>bla</i> TEM-104	3	7	-	10
<i>bla</i> SHV-106	-	2	-	2
<i>bla</i> SHV-83	-	1	-	1
<i>bla</i> SHV-27	-	1	-	1
<i>bla</i> SHV-89	-	2	-	2
<i>bla</i> SHV-100	-	8	-	8
<i>bla</i> SHV-12	-	1	1	2
<i>bla</i> SHV-150	-	1	-	1

- : absence de gène

TEM-1 1MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNS
TEM-104 1MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNS

TEM-1 GKILESFRPEERFPMMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLV
TEM-104 GKILESFRPEERFPMMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLV

TEM-1 EYSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLHN
TEM 104 EYSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLHN

TEM-1 MGDHVTRLDRWEPELNEAIPNDERDITMPAAMATTLRKLLTGELLTLASR
TEM 104 MGDHVTRLDRWEPELNEAIPNDERDITMPAAMATTLRKLLTGELLTLASR

TEM-1 QQLIDWMEADKLVAGPLLRSALPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPD
TEM104 QQLIDWMEADKLVAGPLLRSALPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPD



TEM-1 GKPSRIVVIYTDG 263

TEM 104 GKPSRIVVIYTTG 263



Figure 16 : Mutation dans la séquence protéique TEM 104

En outre, l'alignement des séquences protéiques TEM 1 et TEM 191 a montré une mutation par substitution à la position 255 dans la protéine TEM 191. Cependant, cette mutation se situait à la position 189 dans la protéine TEM 1 (**Figure 17**). En effet, au niveau de l'alignement des protéines TEM 1 et TEM 191, l'appariement a été effectué entre le premier acide aminé de la protéine TEM 1 et l'acide aminé en position 68 dans la protéine TEM 191. Ainsi, l'acide glutamique en position 189 dans la séquence protéique TEM 1 a été remplacé par la lysine en position 255 dans la séquence protéique TEM 191.

3-1-2 Alignement des séquences protéiques des β -lactamases de type Sulphydryl variable

En vue de faire ressortir les éventuelles mutations, les séquences protéiques des gènes *bla_{SHV-83}* et *bla_{SHV-89}* ont été alignées avec la séquence protéique du gène *bla_{SHV-1}* tandis que les séquences protéiques des gènes *bla_{SHV-12}*, *bla_{SHV-27}*, *bla_{SHV-100}* et *bla_{SHV-106}* ont été alignées avec la séquence protéique du gène *bla_{SHV-2}*. Cependant, en consultant la table SHV sur le site internet <http://www.lahey.org/Studies/>, le gène *bla_{SHV-150}* n'est associé à aucun sous-groupe. De ce fait, la recherche de mutations n'a pas été effectuée.

3-1-2-1 Alignement des séquences protéiques SHV-1 et SHV-89

L'alignement des séquences protéiques SHV-1 et SHV-89 a montré deux mutations par substitution. La première substitution a été trouvée à la position 31 avec la leucine (L) dans la protéine SHV-1 remplacée par la glutamine (Q) dans la protéine SHV-89. Cette substitution, notée L31Q est due au remplacement d'une thymine en position 92 dans la séquence nucléotidique du gène *bla_{SHV-1}* par une adénine dans celle du gène *bla_{SHV-89}*.

La deuxième mutation a été la substitution de la méthionine (M) en position 125 dans la protéine SHV-1, par la valine (V) dans la protéine SHV-89 (**Figure 18**). Au niveau de la séquence nucléotidique du gène *bla_{SHV-1}*, l'adénine en position 373 a été remplacée par la guanine dans la séquence nucléotidique du gène *bla_{SHV-89}* (**Annexe 3**). Par ailleurs, l'alignement des séquences protéiques SHV-1 et SHV-83 n'a montré aucune mutation.

3-1-2-2 Alignement des séquences protéiques SHV-2 et SHV-12

Les séquences protéiques de SHV-2 et SHV-12 ont été alignées et deux mutations par substitution ont été mises en évidence (**Figure 19**).

La première mutation correspond à la substitution de la leucine (L) en position 31 dans SHV-2 par la glutamine (Q) dans SHV-12. Cette substitution, notée L31Q est due au niveau nucléotidique, au remplacement d'une thymine en position 92 dans le gène *bla_{SHV-2}* par une adénine dans le gène *bla_{SHV-12}*.

TEM-1 68 METMETSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEK
TEM-191 1 METMETSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEK
TEM-1 HLTDMETTVRELCSAAITMETSNTAANLLTTIGGPKELTAFLHNMET
TEM-191 HLTDMETTVRELCSAAITMETSNTAANLLTTIGGPKELTAFLHNMET

TEM-1 GDHVTRLDRWEPENEAIPNDERDTTMETPAAMETATTLRKLLTGELLTL
TEM-191 GDHVTRLDRWEPENEAIPNDERDTTMETPAAMETATTLRKLLTGELLTL

TEM-1 ASRQQLIDWMETEADKVAGPLLRSAIPAGWFIADKSGAGE RGSRGIIAAL
TEM-191 ASRQQLIDWMETEADKVAGPLLRSAIPAGWFIADKSGAGK RGSRGIIAAL

TEM-1 GPDGKPSRIVVIYT 279
TEM-191 GPDGKPSRIVVIYT 212

Figure 17 : Mutation dans la séquence protéique TEM 191

↓

SHV 1 1 MRYIRLCIISLLATLPLAVHASQPPEQIKLSESQLSGRVGMIEMDLASGRT
 SHV-89 1 MRYIRLCIISLLATLPLAVHASQPPEQIKQSESQLSGRVGMIEMDLASGRT

SHV 1 LTAWRADERFPMMSTFKVVLGAVLARVDAGDEQLERKIHVRQQDLVDY
 SHV-89 LTAWRADERFPMMSTFKVVLGAVLARVDAGDEQLERKIHVRQQDLVDY

↓

SHV 1 SPVSEKHLADGMTVGELCAAITMSDNSAANLLLATVGGPAGLTAFLRQIG
 SHV-89 SPVSEKHLADGMTVGELCAAITVSDNSAANLLLATVGGPAGLTAFLRQIG

↑

SHV 1 DNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQRQ
 SHV-89 DNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQRQ

SHV 1 LLQWMVDDR VAGPLIRSVLPAGWFIADKTGAGERGARGIVALLGPNNKAE
 SHV-89 LLQWMVDDR VAGPLIRSVLPAGWFIADKTGAGERGARGIVALLGPNNKAE

SHV 1 RIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286
 SHV-89 RIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286

Figure 18 : Mutations dans la séquence protéique SHV-89

SHV-2 1 MRYIRLCIISLLATLPLAVHASPPLEQIK**L**SESQLSGRVGMIEMDLASGRTL
SHV-12 1MRYIRLCIISLLATLPLAVHASPPLEQIK**Q**SESQLSGRVGMIEMDLASGRTL

SHV-2 TAWRADERFPMMSTFKVVLCGAVLARVDAGDEQLERKIHQRQDLVDYS
SHV-12 TAWRADERFPMMSTFKVVLCGAVLARVDAGDEQLERKIHQRQDLVDYS

SHV-2 PVSEKHLADGMTVGELCAAITMSDNSAANLLLATVGGPAGLTAFLRQI
SHV-12 PVSEKHLADGMTVGELCAAITMSDNSAANLLLATVGGPAGLTAFLRQI

SHV-2 GDNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQR
SHV-12 GDNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQR

SHV-2 QLLQWMVDDRVAAGPLIRSVLPAGWFIADKTGAS**E**RGARGIVALLGPNNK
SHV-12 QLLQWMVDDRVAAGPLIRSVLPAGWFIADKTGAS**K**RGARGIVALLGPNNK

SHV-2 AERIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286
SHV-12 AERIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286

Figure 19 : Mutations dans la séquence protéique SHV-12

Concernant la deuxième mutation, l'acide glutamique (E) en position 235 dans SHV-2 a été remplacé par la lysine (K) dans SHV-12 et la mutation a été notée E235K. Dans la séquence nucléotidique du gène *bla_{SHV-2}*, c'est la guanine en position 703 qui a été remplacée par une adénine dans celle du gène *bla_{SHV-12}* (**Annexe 4**)

3-1-2-3 Alignement des séquences protéiques SHV-2 et SHV-27

Deux mutations ont été observées lors de l'alignement des séquences protéiques SHV-2 et SHV-27. La première mutation a été la substitution de la glycine (G) en position 152 dans SHV-2 par l'acide aspartique (D) dans SHV-27. Cette mutation est due à la substitution d'une guanine en position 455 dans la séquence nucléotidique du gène *bla_{SHV-2}* par une adénine dans le gène *bla_{SHV-27}*.

La deuxième mutation a été une substitution de la serine (S) en position 234 dans SHV-2 par la glycine (G) dans SHV-12 (**Figure 20**). Au niveau de l'alignement des séquences nucléotidiques, l'adénine en position 700 dans le gène *bla_{SHV-2}* a été remplacée par une guanine dans la séquence du gène *bla_{SHV-27}* (**Annexe 5**).

3-1-2-4 Alignement des séquences protéiques SHV-2 et SHV-100

L'alignement des séquences protéiques SHV-2 et SHV-100 a montré trois mutations dont deux mutations par substitution et une mutation par insertion. La première mutation a été la substitution de la tyrosine (Y) à la position 3 dans la protéine SHV-2 par la phénylalanine (F) dans la protéine SHV-100. Cette mutation, notée Y3F, est due au niveau nucléotidique à la substitution d'une adénine en position 8 dans la séquence nucléotidique du gène *bla_{SHV-2}* par une thymine dans celle du gène *bla_{SHV-100}*.

La deuxième mutation a été une insertion de 13 acides aminés à la position 44 dans la séquence protéique SHV-100. Au niveau de l'alignement nucléotidique, ce sont 39 bases azotées qui ont été insérées à la position 96 dans la séquence du gène *bla_{SHV-100}* (**Annexe 6**). Cette insertion a entraîné une troisième mutation à la position 234 de la protéine SHV-2 mais qui correspond à la position 247 dans la protéine SHV-100 (**Figure 21**).

3-1-2-5 Alignement des séquences protéiques SHV-2 et SHV-106

L'alignement des séquences protéiques SHV-2 et SHV-106 a mis en évidence une mutation par substitution. Celle-ci se situe à la position 3 dans la protéine SHV-2 avec le changement de la tyrosine (Y) par la phénylalanine (F) dans la protéine SHV-106 (**Figure 22**). Cette mutation, notée Y3F, est due au niveau nucléotidique à la substitution d'une adénine en position 8 dans la séquence nucléotidique du gène *bla_{SHV-2}* par une thymine dans celle du gène *bla_{SHV-106}*.

SHV-2 1 MRYIRLCIISLLATLPLAVHASQPQPLEQIKLSESQLSGRVGMIEMDLASGRTL
SHV-27 1 MRYIRLCIISLLATLPLAVHASQPQPLEQIKLSESQLSGRVGMIEMDLASGRTL

SHV-2 TAWRADERFPMMSTFKVVLGAVLARVDAGDEQLERKIHQRQQDLVDYS
SHV-27 TAWRADERFPMMSTFKVVLGAVLARVDAGDEQLERKIHQRQQDLVDYS

SHV-2 PVSEKHLADGMTVGELCAAITMSDNSAANLLLATVGGPAGLTAFLRQ**I**
SHV-27 PVSEKHLADGMTVGELCAAITMSDNSAANLLLATVGGPAGLTAFLRQ**D**

SHV-2 DNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQRQ
SHV-27 DNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQRQ

SHV-2 LLQWMVDDR VAGPLIRSVLPAGWFIADKTG**S**ERGARGIVALLGPNNKAE
SHV-27 LLQWMVDDR VAGPLIRSVLPAGWFIADKTG**G**ERGARGIVALLGPNNKAE

SHV-2 RIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286
SHV-27 RIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286

Figure 20 : Mutations dans la séquence protéique SHV-27

SHV-2 1 MR**Y**IRLCIISLLATLPLAVHASPQPLEQIKLSESQLSGRVGMIE-----
SHV-100 1 MR**F**IRLCIISLLATLPLAVHASPQPLEQIKLSESQLSGRVGMIE**SESQLSG**

SHV-2 -----MDLASGRTLTAWRADERFPMMSTFKVVLCGAVLARVDAGDEQ
SHV-100 **RVGMIE**MDLASGRTLTAWRADERFPMMSTFKVVLCGAVLARVDAGDEQ

SHV-2 LERKIHyrQQDLVDYSPVSEKHLADGMTVGELCAAaitMSDnSAANLLLA
SHV-100 LERKIHyrQQDLVDYSPVSEKHLADGMTVGELCAAaitMSDnSAANLLLA

SHV-2 TVGGPAGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPASMAATL
SHV-100 TVGGPAGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPASMAATL

SHV-2 RKLlTSQRlSARSQRQllQWmVDDRvAGPLIRSVLPAGWFIADKTG**SE**
SHV-100 RKLlTSQRlSARSQRQllQWmVDDRvAGPLIRSVLPAGWFIADKTG**GE**

SHV-2 RGARGIVAllGpNNKAERIVVIYLRDTPASMAERNQqIAGIGAAIEHWQR
SHV-100 RGARGIVAllGpNNKAERIVVIYLRDTPASMAERNQqIAGIGAAIEHWQR

Figure 21 : Mutations dans la séquence protéique SHV-100

↓
SHV-2 1 MR**Y**IRLCIISLLATLPLAVHASQPPEQIKLSESQLSGRVGMIEMDLASGRTL
SHV-106 MR**F**IRLCIISLLATLPLAVHASQPPEQIKLSESQLSGRVGMIEMDLASGRTL
 ↑

SHV-2 TAWRADERFPMMSTFKVVLGAVLARVDAGDEQLERKIHQRQQDLVDYS
SHV-106 TAWRADERFPMMSTFKVVLGAVLARVDAGDEQLERKIHQRQQDLVDYS

SHV-2 PVSEKHLADGMTVGELCAAITMSDNSAANLLLATVGGPAGLTAFLRQIG
SHV-106 PVSEKHLADGMTVGELCAAITMSDNSAANLLLATVGGPAGLTAFLRQIG

SHV-2 DNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQRQ
SHV-106 DNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPASMAATLRKLLTSQRLSARSQRQ

SHV-2 LLQWMVDDR VAGPLIRSVLPAGWFIADKTGASERGARGIVALLGPNNKA
SHV-106 LLQWMVDDR VAGPLIRSVLPAGWFIADKTGASERGARGIVALLGPNNKA

SHV-2 ERIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286
SHV-106 ERIVVIYLRDTPASMAERNQQIAGIGAALIEHWQR 286

Figure 22 : Mutation dans la séquence protéique SHV-106

4- Transfert de la résistance par conjugaison

Afin de déterminer le support génétique de la résistance aux antibiotiques et la possibilité du transfert de plasmides, l'expérience de conjugaison a été réalisée. Parmi les 3 souches sélectionnées, une souche a transféré la résistance aux antibiotiques à la souche réceptrice *E. coli* J53. La **figure 23** montre la sélection de la souche transconjugante sur le milieu Müeller Hinton additionné de l'azide de sodium, du ceftriaxone, de l'amikacine et de la gentamicine.

L'identification de la souche transconjugante par la spectrométrie de masse MALDI-TOF a montré qu'il s'agit d'une souche de *E. coli*. Les antibiogrammes de la souche donatrice, réceptrice et de la souche transconjugante qui ont été effectués ont montré le transfert de la résistance aux céphalosporines de troisième génération, à la gentamicine et la production de BLSE (**Figure 24**). Les résultats de la PCR conventionnelle ont montré que la souche transconjugante hébergeait les mêmes gènes de résistance aux β -lactamines (*bla_{CTX-M-1}*) et aux aminosides (*aac(6')-Ib*) que la souche donatrice (**Figure 25**).

5- Identification de gènes de résistance à la rifampicine

Le gène de résistance à la rifampicine *arr2* a été recherché chez toutes les souches étudiées car elles ont présenté toutes une résistance à la rifampicine. Le profil électrophorétique des amplicons obtenus a montré que 4 souches, soit un taux de 4,4 %, ont hébergé ce gène (**Figure 26**). Au nombre de ces souches, il y'a 3 souches de *K. pneumoniae* et 1 souche de *E. coli*.

La recherche de la relation clonale entre les 4 souches par la technique du MLST a montré qu'elles ont différentes séquences types ou ST. La ST 5 a été trouvée chez la souche de *E.coli* et les trois souches de *K. pneumoniae* ont exprimé respectivement les ST 273, ST 307, ST 309. La **figure 27** montre le profil électrophorétique des 7 gènes de ménage des espèces *E. coli* et *K. pneumoniae* qui ont permis de déterminer les différentes ST.

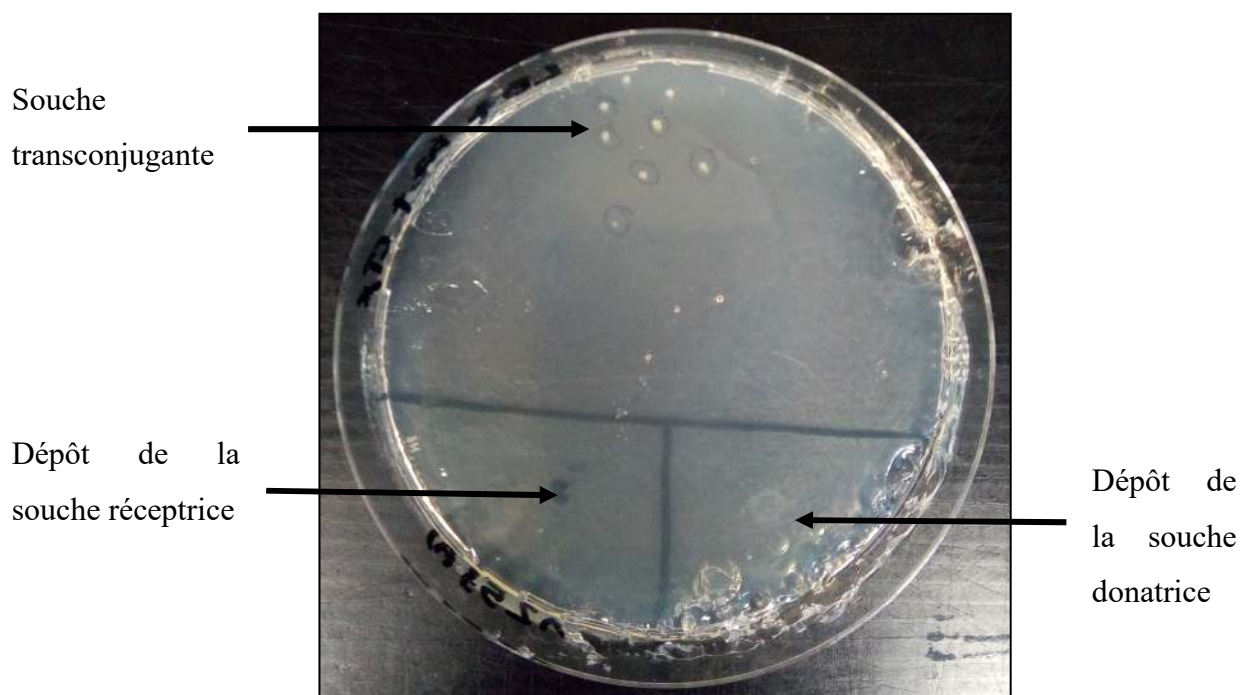
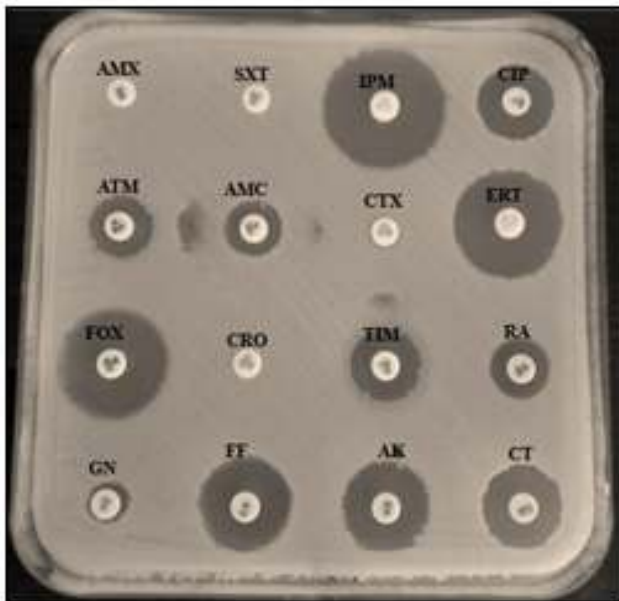


Figure 23 : Sélection de souches transconjugantes sur le milieu Müller Hinton modifié



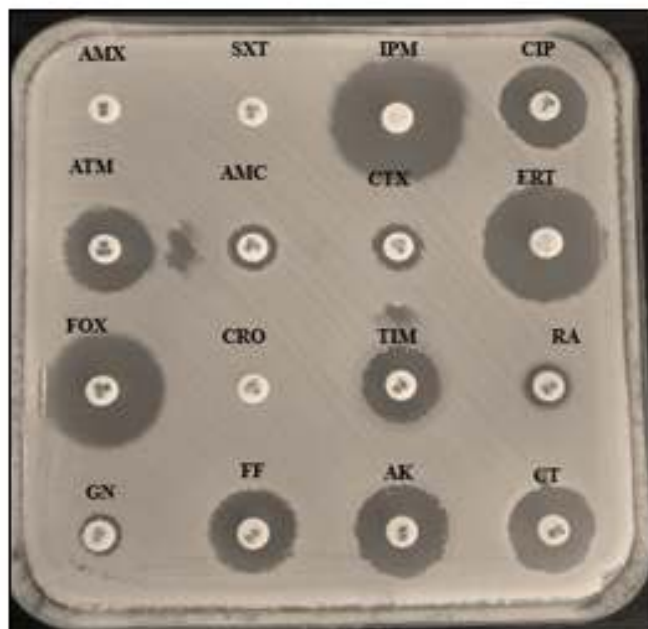
+



A = Souche donatrice

B = Souche réceptrice

=



C = Souche transconjugante

Figure 24 : Antibiogrammes des souches donatrice, réceptrice et transconjugante

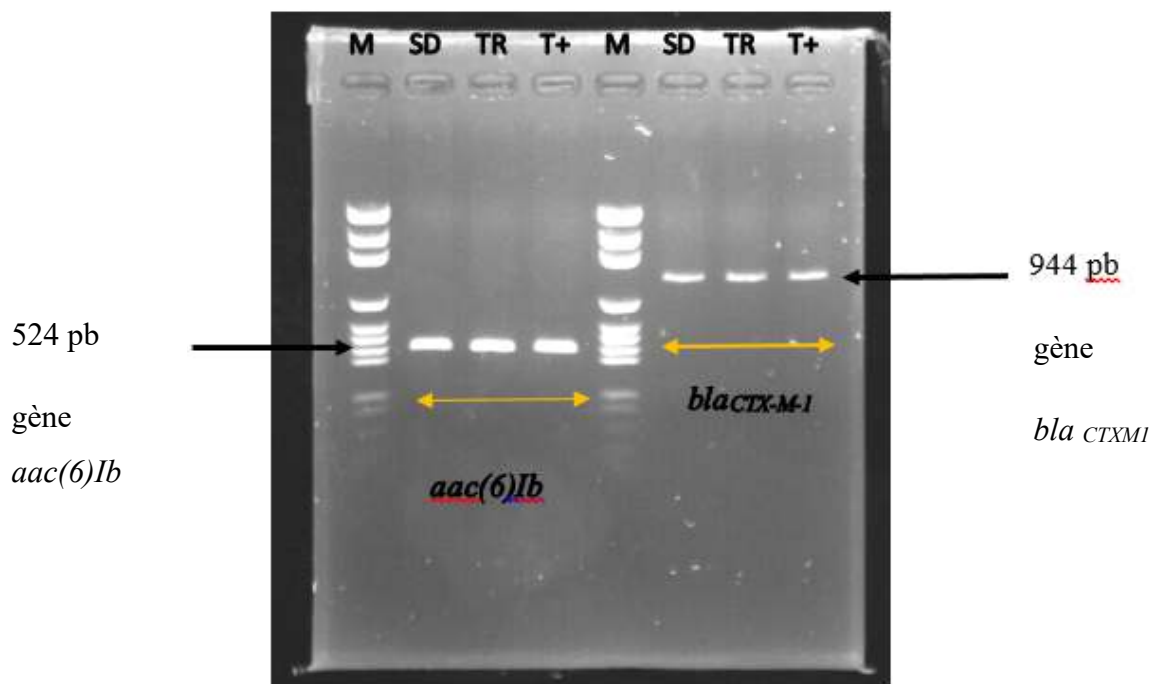


Figure 25 : Profil électrophorétique des amplicons des gènes *aac(6)-Ib* et *bla_{CTX-M1}*

M : marqueur de poids moléculaire (DNA Ladder 100 Pb, Promega) ; **SD** : souche donatrice ; **TR** : transconjugant ; **T+** : témoin positif

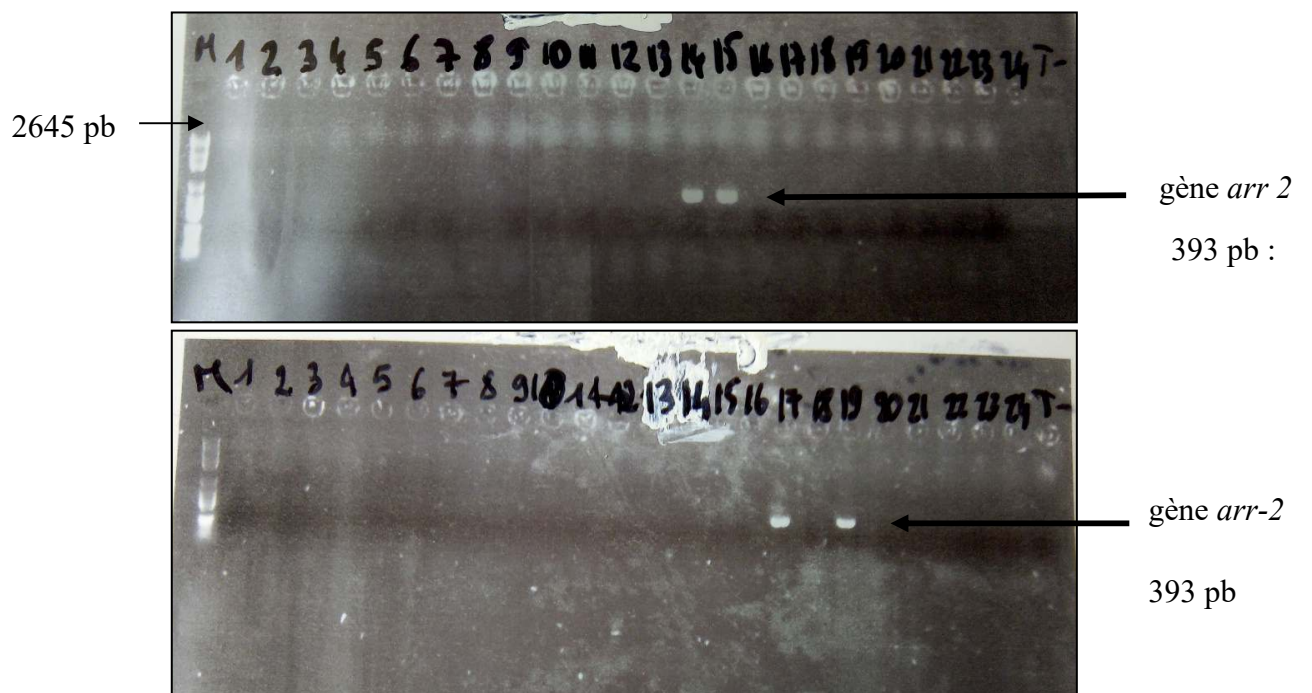


Figure 26 : Profil électrophorétique des amplicons du gène *arr 2*

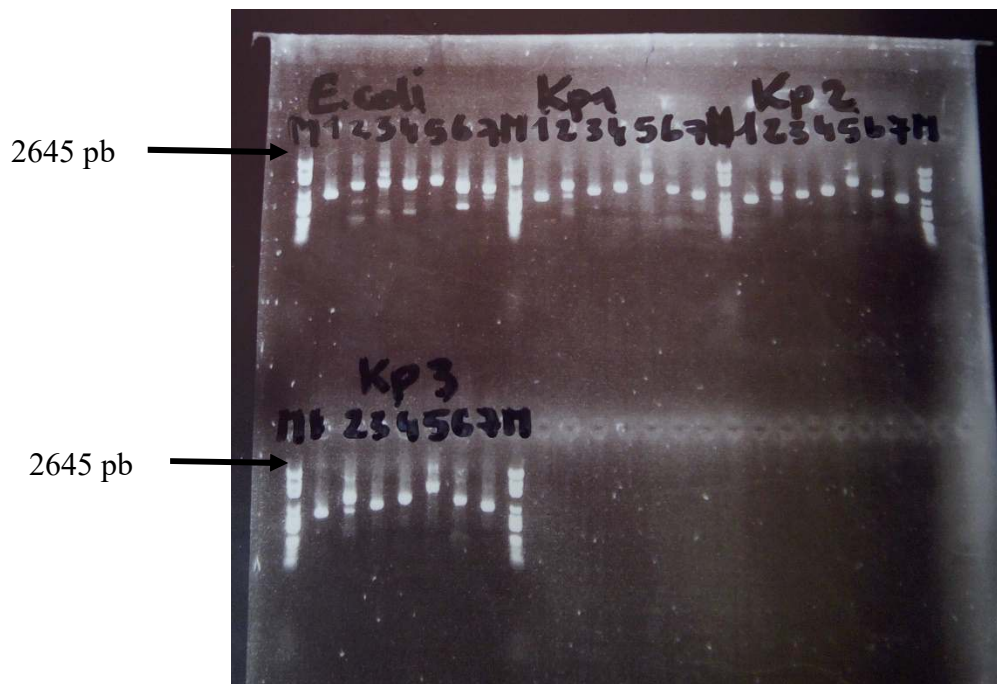


Figure 27 : Profil électrophorétique des amplicons des 7 gènes de ménage de *E. coli* et de *K.*

pneumoniae

E. coli 725YO/15

K.pn1 : *K. pneumoniae* 868Y/13

K.pn2 : *K. pneumoniae* 1141Y/15

K.pn3 : *K. pneumoniae* 654UB/15

Pour l'espèce *E. coli*, les puits 1 à 7 représentent les 7 gènes de ménage que sont les gènes *adh*, *fumC*, *icd*, *purA*, *gyrB*, *recA* et *mdh*. Pour l'espèce *K. pneumoniae*, les puits 1 à 7 représentent les 7 gènes de ménage que sont les gènes *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* et *tonB*.

DISCUSSION

La résistance des bactéries, particulièrement des entérobactéries aux antibiotiques, constitue un véritable problème de santé publique. Cette résistance, affecte aussi bien les pays développés que surtout les pays en voie de développement où cohabitent l'automédication et la vente anarchique des médicaments en dehors des structures légales (**Aminov, 2010**). Dans les pays d'Afrique de l'Ouest, l'endémicité des infections respiratoires, des méningites bactériennes, des diarrhées et d'autres maladies infectieuses a augmenté la consommation d'antibiotiques (**Hounsa, 2009 ; Alsan et al., 2015**).

L'objectif général de cette étude a consisté à caractériser des gènes de résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones codant pour les acétyltransférases, les nucléotidyltransférases, les phosphotransférases et les protéines QNR chez des entérobactéries productrices de BLSE dans le district d'Abidjan. Pour ce faire, le travail a porté sur 153 entérobactéries constituées de différentes espèces à savoir 71 souches de *E. coli*, 57 souches de *K. pneumoniae*, 22 souches de *E. cloacae*, 2 souches de *C. freundii* et 1 souche de *M. morgani*. Parmi ces souches, certaines ont été sensibles aux antibiotiques tandis que d'autres ont été multi-résistantes.

La prévalence des entérobactéries productrices de BLSE déterminée dans cette étude s'élevait à 58,8 %. Ce taux est supérieur à ceux des études antérieures qui ont rapporté des prévalences de 9 % en 2008 et 56,2 % en 2016 chez des entérobactéries productrices de BLSE en Côte d'Ivoire (**Guessennd et al., 2008a ; Toty et al., 2016**). En effet, l'augmentation considérable de la prévalence des souches productrices de BLSE en Côte d'Ivoire pourrait être expliquée par l'usage abusif et inadéquat des antibiotiques, principale source d'émergence de la résistance aux antibiotiques (**Sirinavin et al., 2004**). Des travaux similaires réalisés dans certains pays de l'Afrique de l'ouest ont mis en évidence la production de BLSE chez les entérobactéries d'origine humaine à des taux variables.

Au Bénin, les résultats d'une étude ont montré que 35,5 % d'entérobactéries ont été productrices de BLSE (**Anago et al., 2015**). Une autre étude réalisée au Nigeria a montré que 52,1 % d'entérobactéries testées étaient productrices de BLSE (**Raji et al., 2015**). De même, au Burkina Faso, les résultats des travaux de **Ouedraogo et al. (2016)** ont rapporté un taux de 58 % d'entérobactéries productrices de BLSE.

Par ailleurs, les échantillons biologiques d'où ont été isolées les entérobactéries productrices de BLSE à des taux élevés ont été le liquide d'ascite, le liquide pleural et un prélèvement d'ORL. La présence d'entérobactéries productrices de BLSE dans ces échantillons pourrait-être due à plusieurs facteurs. Dans le cas du liquide d'ascite, l'infection est une complication fréquente au cours de la cirrhose.

La flore intestinale est variable chez les patients atteints de cirrhose et la prévalence des entérobactéries pathogènes varie de 10 à 30 % (Nousbaum, 2015). Concernant l'infection du liquide pleural cela pourrait-être dû à des pneumopathies bactériennes causées par divers microorganismes parmi lesquels, les entérobactéries (Otty, 2016). A propos, de la présence d'entérobactéries productrices de BLSE dans le prélèvement d'ORL, cela pourrait-être due à des antibiothérapies antérieures effectuées par certains patients (Amana, 2013).

Par ailleurs, les services d'où provenaient les souches productrices de BLSE à des taux élevés ont été la diabétologie et l'urologie. Ce résultat pourrait-être dû à certains facteurs tels que la durée d'hospitalisation, l'utilisation de sondes, l'hémodialyse, une chirurgie récente et l'antibiothérapie. En effet, nombreuses sont les classes d'antibiotiques dont l'utilisation a été associée à l'émergence d'entérobactéries productrices de BLSE (Zahar, 2009).

Concernant, le taux de résistance aux céphalosporines de troisième génération que sont le céfotaxime et le ceftriaxone chez les souches productrices de BLSE, au cours de cette étude, a été respectivement de 95,6 % et 96,7 %. Ces taux de résistance élevés pourraient être dus à l'utilisation fréquente des C₃G tels que le céfotaxime et le ceftriaxone dans le traitement d'infections bactériennes selon Rubin et Samore (2002). Des résultats semblables ont été rapportés dans certaines études comme celle de Warjri *et al.* (2015) effectuée en Inde où les taux de résistance des EBLSE à la céfotaxime et au ceftriaxone ont été respectivement de 97,2 % et 94,9 %. En Algérie, Mathlouthi *et al.* (2016) lors de leurs travaux effectués dans des services hospitaliers ont également rapporté des taux de résistance à la céfotaxime et au ceftriaxone de 97 % et 84 %.

Parmi les β -lactamines, l'imipénème a été la molécule la plus active contre les souches, ce qui justifie sa place en premier choix dans le traitement des infections sévères à bactéries multirésistantes (Labombardi *et al.*, 2006 ; Endimiani et Paterson, 2007 ; Nordmann *et al.*, 2009).

Pour le traitement de certaines infections dues aux entérobactéries, l'utilisation des aminosides et des fluoroquinolones, le plus souvent en association avec les β -lactamines est nécessaire (Galimand *et al.*, 2005). Les aminosides agissent sur le ribosome bactérien et induisent la synthèse de protéines érronées (Touati, 2013). Cependant, leur large utilisation a contribué à l'émergence de souches résistantes (Galimand *et al.*, 2005).

Dans la présente étude, la résistance aux aminosides chez les entérobactéries productrices de BLSE a été assez marquée pour la gentamicine et moindre pour l'amikacine. En effet, sur les 90 entérobactéries productrices de BLSE, 81 souches (90 %) ont été résistantes à la gentamicine. et 9 EBLSE (10 %) ont été résistantes à l'amikacine.

Cette étude a montré l'efficacité de l'amikacine par rapport à la gentamicine dans le traitement des infections bactériennes dues aux entérobactéries productrices de BLSE. En effet, l'amikacine est un antibiotique réservé à la voie parentérale en raison d'une absorption per os négligeable (1 à 4% de la dose administrée). Après injection intra-musculaire ou en perfusion intra-veineuse lente de 30 à 60 minutes, l'amikacine diffuse rapidement dans l'organisme. Un passage de la barrière hémato-méningée de l'ordre de 10 à 20 % de la concentration sérique à travers les méninges saines est noté. Par ailleurs, la posologie adulte et enfant est de 15 mg/kg/j en 2 injections ou en monodose journalière ce qui conduit à un état d'équilibre au bout de 24 heures. De plus, le taux de fixation de l'amikacine aux protéines plasmatiques est faible (moins de 10 %) et l'élimination urinaire est rapide par filtration glomérulaire sous forme inchangée (forme active). La demi-vie est de 2 à 4 heures chez l'adulte normorénal, et de 3 à 6 heures chez le nourrisson et le nouveau-né (**Lacarelle et al., 2004**).

La résistance aux aminosides chez les entérobactéries productrices de BLSE constitue un véritable problème de santé publique qui affecte plusieurs pays. En effet, les résultats des travaux d'**Anago et al. (2015)** effectués au Bénin ont montré que 82,7 % des souches productrices de BLSE ont été résistantes à la gentamicine et 72,4 % des souches étaient résistantes à l'amikacine. Au Burkina Faso, **Ouedraogo et al. (2016)** au cours de leurs travaux ont montré que 89 % des souches productrices de BLSE ont été résistantes à la gentamicine et à d'autres membres de la famille des aminosides tels que la tobramycine (86 %) et la nétilmicine (88 %). Au Ghana, une étude a rapporté des taux de résistance élevés à la gentamicine et à l'amikacine respectivement de 90 % et 45 % (**Obeng-Nkrumah et al., 2013**). Dans les travaux de **Belbel (2014)** sur l'espèce *K. pneumoniae*, les résultats ont montré que 67,5 % des souches ont été résistantes à la gentamicine et 58,7 % à l'amikacine.

Concernant les fluoroquinolones, ils exercent leur action au moment de la réplication de l'ADN. Leurs cibles sont l'ADN gyrase et la topoisomérase IV qui régulent la topologie de l'ADN pour en permettre la réplication (**Soussy, 2006**). La résistance aux fluoroquinolones chez les entérobactéries est en général le résultat d'une mutation chromosomique entraînant une altération des enzymes cibles bactériennes que sont l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (**Muylaert et Mainil, 2013**). Toutefois, il a été rapporté également une résistance d'origine plasmidique qui s'explique par une acquisition des gènes *qnr*, *qepA*, et *aac(6')-Ib-cr* (**Poirel et al., 2007 ; Carottoli, 2009**).

Dans le présent travail, le taux de résistance à la ciprofloxacine chez les EBLSE a été de 86,7 %. Ce taux est supérieur à celui obtenu par **Guessennd et al. (2008b)** qui lors de leurs travaux ont montré que 70,2 % des EBLSE étaient résistantes à la ciprofloxacine. En 2014, **Ouattara et collaborateurs** ont quant à eux rapporté un taux de résistance à la ciprofloxacine de 93,2%.

Le taux de résistance élevé pourrait être expliqué par le fait que les fluoroquinolones sont les molécules les plus prescrites après les β -lactamines en Afrique et particulièrement en Côte d'Ivoire (**Dosso *et al.*, 2000**).

Les résultats de la présente étude sont similaires à ceux obtenus par certains auteurs en Afrique. En République Centrafricaine, les résultats des travaux de **Rafai *et al.* (2015)** ont montré que 84,8 % des souches productrices de BLSE testées ont été résistantes à la ciprofloxacine. Au Burkina Faso, **Ouedraogo *et al.* (2016)** ont rapporté que 80 % des souches productrices de BLSE ont été résistantes à la ciprofloxacine. De même, **Mathlouthi *et al.* (2016)** ont obtenu lors de leurs travaux 80 % des souches productrices de BLSE résistantes à la ciprofloxacine.

En ce qui concerne les autres antibiotiques comme la rifampicine, les souches ont présenté un taux de résistance très élevé (100 %). La rifampicine est un antibiotique utilisé dans le traitement de la tuberculose (**Baysarowich *et al.*, 2008**) et des maladies liées aux méningococcies (**Taha *et al.*, 2006**). Elle inhibe la fonction de l'ARN polymérase en bloquant le passage de l'initiation à l'élongation au niveau de la transcription (**Xu *et al.*, 2005**). La résistance à la rifampicine est un problème de santé publique selon **Sam *et al.* (2006)** car c'est le médicament de première ligne pour traiter la tuberculose (**Grosset, 1989**) et la prévention des méningites (**Taha *et al.*, 2006**). La résistance à la rifampicine initialement retrouvée chez les espèces *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis* a été transférée aux bacilles gram négatif comme les entérobactéries (**Arlet *et al.*, 2001**). En Côte d'Ivoire, la résistance à la rifampicine a été signalée depuis plusieurs décennies chez *Mycobacterium* dans les travaux de **Dosso *et al.* (1999)** et **Ouedraogo *et al.* (2000)**.

Par ailleurs, le support génétique de la résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones au cours de ce travail a été varié car plusieurs gènes de résistance ont été détectés. Les gènes de résistance aux β -lactamines détectés ont été les gènes *bla_{CTX-M-1}* (96,7 %), *bla_{TEM}* (67,8 %), *bla_{SHV}* (27,8 %), et *bla_{CTX-M-9}* (5,56 %).

La prédominance du gène *bla_{CTX-M}* obtenu dans cette étude pourrait expliquer les taux de résistance élevés aux céphalosporines de troisième génération observés chez les souches productrices de BLSE. En effet, selon **Mathlouthi *et al.* (2016)**, l'augmentation de la consommation de la céfotaxime pourrait avoir contribué à l'émergence de BLSE, et en particulier le CTX-M.

En Côte d'Ivoire, les gènes *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* ont été déjà retrouvés dans les travaux de **Guessennd *et al.* (2008b)** chez 151 entérobactéries productrices de BLSE et les proportions des gènes *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{TEM}* et *bla_{SHV}* étaient respectivement de 65,6 %, 64,9%, et 48,3%. Cette différence des proportions des gènes entre les études peut-être due au nombre de souches productrices de BLSE utilisé dans chacune d'entre elles.

Les gènes *bla_{CTX-M-15}* et *bla_{CTX-M-1}* identifiés après séquençage ont déjà été rapportés dans les travaux de **Guessennd *et al.* (2008)** et **Breurec *et al.* (2013)**. Cependant, cette étude est la première qui décrit le gène *bla_{CTX-M-27}* en Côte d'Ivoire. En effet, la présence de ce gène pourrait-être due à la dissémination des gènes de résistance entre les bactéries qui serait responsable d'émergence de la résistance.

Ailleurs, ce gène a été détecté chez des souches de *E. coli* et de *Salmonella livingstone* responsables d'infections nosocomiales et d'épidémie en Tunisie (**Bouallègue-Godet *et al.*, 2005**), en France (**Bruno *et al.*, 2014**) et au Burkina Faso (**Ouedraogo *et al.*, 2016**).

De même, l'identification des gènes *bla_{TEM-104}*, *bla_{TEM-191}* et *bla_{TEM-198}* est la première en Côte d'Ivoire. Leur présence pourrait expliquer également le taux de résistance élevé aux C₃G obtenu dans cette étude. Cependant, ces gènes ont été déjà rapporté dans certains pays comme la Suisse (**Hilty *et al.*, 2012**). Les mutations observées dans ces gènes n'ont pas été décrites. Mais, ces gènes dérivent du gène *bla_{TEM-1}* (**Fiett *et al.*, 2000**).et

En outre, les gènes *bla_{SHV}* identifiés ont été les gènes *bla_{SHV-12}*, *bla_{SHV-27}*, *bla_{SHV-83}*, *bla_{SHV-89}*, *bla_{SHV-100}*, *bla_{SHV-106}* et *bla_{SHV-150}*. Le gène *bla_{SHV-12}* a été identifié pour la première fois en 1997 en Suisse (**Nuesch-Inderbinen *et al.*, 1997**) et plus tard rapporté dans certains pays africains comme la Côte d'Ivoire (**Guessennd *et al.*, 2008b**), le Mali (**Tande *et al.*, 2010**), le Nigeria (**Kasap *et al.*, 2010**) indiquant son caractère endémique chez les entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre élargi en Afrique de l'Ouest. Selon **Magdalena *et al.* (1997)**, les mutations observées dans le gène *bla_{SHV-12}* sont impliquées dans la production de BLSE.

Par ailleurs, l'identification des gènes *bla_{SHV-27}*, *bla_{SHV-83}*, *bla_{SHV-89}*, *bla_{SHV-100}*, *bla_{SHV-106}*, *bla_{SHV-150}* est la première en Côte d'Ivoire. Leur présence pourrait expliquer les taux de résistance élevés aux pénicillines et aux céphalosporines obtenus dans cette étude.

Ailleurs dans le monde, le gène *bla_{SHV-27}* a été détecté chez différents plasmides isolés de *E. coli*, de *K. pneumoniae* et de *E. cloacae*. Il a été détecté simultanément chez ces espèces avec d'autres gènes de résistance tels que les gènes *bla_{TEM-1}*, *bla_{CMY-2}*, *bla_{IMP}*, *bla_{CTX-M-14}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{SHV-12}*, *bla_{SHV-45}* et *bla_{OXA-1}* (**Muratani *et al.*, 2006 ; Abbassi *et al.*, 2008 ; Kiratisin *et al.*, 2008**). Les mutations décrites dans ce gène sont impliquées dans l'hydrolyse du céfotaxime (**Corkill *et al.*, 2001**).

De même, les gènes *bla_{SHV-83}*, *bla_{SHV-89}*, *bla_{SHV-100}*, *bla_{SHV-106}* et *bla_{SHV-150}* ont été détectés chez des souches de *K. pneumoniae* également dans divers endroits du monde tels que la Chine (**Li *et al.*, 2009**), l'Algérie (**Ramdani-Bouguessa *et al.*, 2011**), les Etats-Unis (**Castanheira *et al.*, 2013**) et le Portugal (**Mendonça *et al.*, 2009**). Les β-lactamases de type SHV-83 et SHV-89 sont capables d'hydrolyser les pénicillines et les céphalosporines de deuxième génération.

En revanche, les β -lactamases de type SHV-12, SHV-27, SHV-100, SHV-106 sont capables d'hydrolyser les céphalosporines de troisième génération comme le céfotaxime, le ceftazidime et l'aztréonam qui est une Monobactam (**Liakopoulos et al., 2016**).

Concernant la coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines, les résultats ont montré que 23 souches productrices de BLSE ont exprimé simultanément les gènes de résistance *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*. Ce résultat est similaire à celui de **Raji et al. (2015)** dont les travaux au Nigéria ont montré la coexistence des gènes *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* et *bla_{SHV}* chez 6 entérobactéries productrices de BLSE.

Le support génétique de la résistance aux aminosides a été constitué de plusieurs gènes de résistance que sont les gènes *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-I*, *aad1* et *aad2*.

Le gène *aac(6')-Ib* code pour une acétyltransférase et il a été le plus représenté chez les souches productrices de BLSE résistantes aux aminosides avec un taux de 58,9%. Ce résultat pourrait expliquer le taux de résistance à la gentamicine et à l'amikacine obtenu chez les souches productrices de BLSE dans cette étude. En effet Le gène *aac(6')-Ib* est un gène plasmidique et chromosomique qui confère une résistance à l'amikacine et à la gentamicine selon **Shaw et al. (1993)**. Par ailleurs, ce taux est semblable à celui rapporté dans certaines études comme celle de **Park et al. (2006)** réalisée aux Etats-Unis où le gène *aac(6')-Ib* a été retrouvé chez 50,5 % des souches productrices de BLSE. De même en Inde, les travaux de **Chaudhary et Payasi (2014)** ont montré que 51,7 % des souches productrices de BLSE ont hébergé le gène *aac(6')-Ib*.

Le gène *ant(2'')-I* induit la résistance à la gentamicine, à la tobramycine, à la kanamycine et est généralement porté par des plasmides et des transposons (**Cameron et al., 1986**). Cette étude est la première qui décrit ce gène en Côte d'Ivoire. Le gène *ant(2'')-I* code pour une nucléotidyltransférase et il a été détecté chez 8,9 % des EBLSE résistantes aux aminosides. La présence de ce gène pourrait expliquer également le taux de résistance à la gentamicine chez les entérobactéries productrices de BLSE obtenu dans cette étude. Ce taux est inférieur à celui trouvé en Turquie par **Over et al. (2001)**. Ces derniers, ont rapporté un taux de 46,2 % de souches productrices de BLSE hébergeant le gène *ant(2'')-I*. En Inde, **Chaudhary et Payasi (2014)** ont montré la présence du gène *ant(2'')-I* chez 20,2% des entérobactéries productrices de BLSE testées au cours de leur étude.

Concernant les gènes *aad1* et *aad2*, désignés aussi sous le nom de *ant(3'')-I*, ils sont associés à la résistance à la spectinomycine et à la streptomycine (**Ramirez & Tolmasky, 2010**). Ils codent pour des nucléotidyltransférases. Le gène *aad1* a été détecté pour la première fois chez *Shigella flexneri* isolée au Japon à la fin des années 1950 (**Nakaya et al., 1960**).

En 1989, lorsque les intégrons ont été décrits pour la première fois, ce gène a été associé à un intégron de classe 1 (**Stokes & Hall, 1989**). Concernant le gène *aad2*, il a été détecté pour la première fois au Japon en 1965 chez une souche clinique de *P. aeruginosa* (**Kazama et al., 1995**). Outre l'intégron de classe 1, le gène *aad2* est également présent dans les intégrons complexes de classe 1 (**Boyd et al., 2002 ; Boyd et al., 2008**). Cette étude est la première qui rapporte la présence tous ces gènes de résistance aux aminosides chez les entérobactéries d'origine hospitalière en Côte d'Ivoire.

Concernant les gènes de résistance aux fluoroquinolones détectés, le gène *qnrB* a été le plus trouvé à un taux de 42,2 % suivi du gène *qnrA* (3,2%) chez les EBLSE. Le séquençage réalisé a permis d'identifier en plus des gènes *qnrA1* (3,3 %) et *qnr B1* (31,1%) dont la présence avait été déjà signalée en Côte d'Ivoire (**Guessennd et al., 2008b**), les gènes *qnr B6* (2,2 %) et *qnr B7* (1,1%) décrits pour la première fois en Côte d'Ivoire à travers cette étude et qui seraient impliqués dans la résistance aux fluoroquinolones.

Le gène *qnr B6* a été détecté dans plusieurs endroits du monde comme la Corée du Sud chez une souche de *Enterobacter aerogenes* productrice de BLSE, issue d'une collection de 644 entérobactéries provenant de 12 laboratoires cliniques (**Park et al., 2007**). En Argentine, **Cruz et al. (2013)** ont rapporté la présence du *qnr B6* chez 5 % des entérobactéries productrices de BLSE.

De même, au Maroc selon **Jamali et al. (2014)**, 0,9 % des souches productrices de BLSE testées dans leur étude ont hébergé ce gène. Les gènes *qnr B6* et *qnr B7* ont été retrouvés en Corée du Sud, dans une étude menée sur 347 entérobactéries provenant de deux hôpitaux. Ces gènes ont été détectés respectivement chez une souche de *K. pneumoniae* et chez une souche de *C. freundii* (**Jeong et al., 2011**).

Par ailleurs, la coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones montrée dans ce travail pourrait expliquer les problèmes de diagnostic rencontrés par les prescripteurs qui conduirait aux échecs thérapeutiques et à la mort des patients (**Guessennd et al., 2008b**).

Le support génétique de la résistance des entérobactéries à la rifampicine dans cette étude a été dû au gène *arr-2*. Selon **Nikolayevskyy et al. (2007)**, plus de 90 % de la résistance à la rifampicine était due à des mutations dans le gène *rpoB*. Plus tard, la résistance a été manifestée par l'acquisition horizontale du gène *arr* qui code pour les ADP-ribosyltransférases, responsables de l'inactivation de l'antibiotique. Le gène *arr-1* a d'abord été trouvé dans le chromosome de *Mycobacterium smegmatis* et par la suite, les allèles *arr-2* et *arr-3* ont été décrits comme cassettes de gènes dans les intégrons de classe 1 présents chez les bacilles Gram négatif d'Europe et d'Asie (**Arlet et al., 2001 ; Lee et al., 2005 ; Mammeri et al., 2005**).

La résistance à la rifampicine médiée par le gène *arr-2* a été rapportée chez plusieurs espèces bactériennes dont *P. aeruginosa* (Tribuddharat et Fennwald, 1999), *E. coli* (Naas *et al.*, 2001), *K. pneumoniae* (Arlet *et al.*, 2001) et *A. baumannii* (Houang *et al.*, 2003). La détection du gène *arr2* au cours de cette étude, pourrait expliquer la résistance à la rifampicine observée chez toutes les souches testées. Cependant, la présence de ce gène uniquement chez 4 souches alors que le taux de résistance a été de 100% laisse croire que les souches utilisent d'autres mécanismes de résistance vis-à-vis de la rifampicine tels que les systèmes d'efflux (Chandrasekaran et Lalithakumari, 1998), la glycosylation (Yazawa *et al.*, 1993 ; Tanaka *et al.*, 1996), la phosphorylation (Yazawa *et al.*, 1994) ou encore l'expression du gène *arr-3* (Arlet *et al.*, 2001).

Par ailleurs, le typage moléculaire des 4 souches qui ont hébergé le gène *arr-2* par la technique du MLST a montré que ces souches appartenaient à 4 différents types de séquences à savoir ST 5, ST 273, ST 307, ST 309. Ce résultat montre que ces souches n'ont aucun lien de parenté. Des souches ayant les mêmes profils ont été retrouvées à travers le monde et impliquées dans diverses infections.

A Douala au Cameroun, une souche de *E. coli* isolée de prélèvement de selle d'un patient hospitalisé pour un syndrome inflammatoire associé à une insuffisance rénale était du ST 5 et hébergeait les gènes de résistance aux β -lactamines *bla_{NDM-1}* et *bla_{OXA-1}*. (Smits *et al.*, 2012).

Par ailleurs, les résultats des travaux de Chou *et al.* (2016) ont montré qu'une souche de *K. pneumoniae*, isolée d'un patient souffrant d'une pneumonie aux Philippines et qui hébergeait le gène *bla_{NDM-7}* était du ST 273. De plus, selon Samuelsen *et al.* (2011) ainsi que Ageevets *et al.* (2014), le ST 273 a été reconnu comme ayant un potentiel pouvoir épidémique.

Concernant le ST 307, des travaux réalisés en Italie par Villa *et al.* (2017) ont montré que des souches de *K. pneumoniae* isolées de trois centres hospitaliers italiens, hébergeant les gènes *bla_{KPC-2}*, *bla_{KPC-3}* et *bla_{CTXM-15}* avaient le ST 307.

Quant au ST 309, il a été retrouvé chez des souches de *K. pneumoniae* isolées de patients hospitalisés au nord de la Chine (Zhao *et al.*, 2016).

En outre, l'expérience de conjugaison réalisée dans cette étude a permis de sélectionner une souche transconjugante qui avait les mêmes caractéristiques de la souche donatrice, à savoir résistante aux céphalosporines de troisième génération et à la gentamicine. Cette souche transconjugante a hébergé également les gènes *bla_{CTX-M-1}* et *aac(6)-Ib*. Ce résultat est une confirmation des résultats obtenus par Gangoué en 2007 lors des expériences de conjugaison réalisées dans ses travaux de thèse. En effet, parmi les 38 souches productrices de BLSE utilisées pour son expérience, 16 souches ont pu transférer la résistance aux céphalosporines de troisième génération et à la gentamicine aux souches transconjugantes (Gangoué, 2007).

Le co-transfert des gènes de résistance *bla_{CTX-M-1}* et *aac(6)-Ib* de la souche donatrice vers la souche transconjugante suggère que les gènes se trouvent sur un même plasmide. Certains auteurs comme **Paterson et Bonomo (2005)** ont expliqué que les gènes qui codent pour les BLSE sont portés généralement par des plasmides et seraient souvent associés à d'autres gènes de résistance aux antibiotiques tels que les aminosides.

CONCLUSION

CONCLUSION

La résistance aux antibiotiques est devenue un véritable problème de santé publique à travers le monde et particulièrement en Côte d'Ivoire, avec l'émergence et la diffusion de bactéries multi-résistantes. Le présent travail, réalisé sur une période de quatre ans (2012 à 2015) avait pour objectif général de caractériser des gènes de résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones codant pour les acétyltransférases, les nucléotidyltransférases, les phosphotransférases et les protéines QNR chez des entérobactéries productrices de BLSE dans le district d'Abidjan. L'étude a porté sur 153 entérobactéries isolées de divers échantillons biologiques provenant de divers services hospitaliers d'Abidjan.

La production de β -lactamases à spectre élargi a été mise en évidence chez 90 souches (58,8%). Le profil de résistance des souches productrices de BLSE aux antibiotiques a montré des taux de résistance élevés au ceftriaxone (96,7 %), à la céfotaxime (95,6 %) et à la céfoxitine (72,2 %). Egalement, des taux de résistance élevés aux aminosides (90 %) et fluoroquinolones (86,7 %) ont-ils été constatés. Les antibiotiques tels que l'imipénème et la colistine ont été les plus actifs sur l'ensemble des souches.

La caractérisation moléculaire des souches a montré une diversité de gènes de résistance aux β -lactamines avec l'émergence de nouveaux gènes dans notre zone géographique. Ce sont les gènes *bla_{CTX-M-27}*, *bla_{TEM-104}*, *bla_{TEM-191}*, *bla_{TEM-198}*, *bla_{SHV-27}*, *bla_{SHV-83}*, *bla_{SHV-89}*, *bla_{SHV-100}*, *bla_{SHV-106}*, *bla_{SHV-150}*. Ces gènes ont une implication en santé publique car ils induisent la résistance aux céphalosporines de troisième génération et aux pénicillines. De plus, cette étude a confirmé la propagation internationale du gène *bla_{CTX-M-15}*, responsable d'épidémies de colonisation et d'infections nosocomiales dans le monde, chez 41 souches productrices de BLSE (44,4 %).

La coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines a été mise en évidence chez 23 souches productrices de BLSE. L'analyse des séquences des gènes a montré des modifications mutationnelles qui seraient impliquées dans la résistance aux antibiotiques.

Outre ces gènes, cette étude a montré pour la première fois, l'émergence des gènes *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-I* et *aad* qui confèrent la résistance aux aminosides tels que l'amikacine et la gentamicine, rendant ainsi les possibilités de traitement des infections causées par les entérobactéries plus restreintes. La résistance aux fluoroquinolones a été marquée par la détection des gènes de résistance *qnr A1*, *qnr B1* et de nouveaux gènes de résistance en Côte d'Ivoire *qnr B6* et *qnr B7*.

La coexpression des gènes de résistance aux β -lactamines (*bla_{CTXM-1}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*), aux aminosides (*aac(6')-Ib*) et aux fluoroquinolones (*qnrB*) a été la plus retrouvée chez l'espèce *K. pneumoniae* avec 14,4% (13 souches) qui ont exprimé simultanément ces gènes de résistance.

L'expérience de conjugaison effectuée en utilisant des souches donatrices résistantes aux céphalosporines de troisième génération et à la gentamicine et une souche réceptrice sensible à tous les antibiotiques a montré le transfert des gènes de résistance aux β -lactamines (*bla_{CTXM-1}*) et aux aminosides (*aac(6')-Ib*).

Par ailleurs, une recherche plus poussée sur la résistance à la rifampicine a été effectuée et a permis de détecter un gène de résistance à la rifampicine nommé *arr-2*, mis en évidence pour la première fois en Côte d'Ivoire. Le typage des souches hébergeant ce gène par la technique du MLST a permis d'identifier les ST 5, ST 273, ST 307, ST 309.

PERSPECTIVES

Cette étude ouvre des perspectives de recherche en vue de compléter les résultats obtenus. Il s'agira de:

- Caractériser les plasmides porteurs des gènes *bla_{CTX-M-15}* impliqués dans leur dissémination.
- Rechercher les gènes de méthylation ainsi que ceux qui codent pour les systèmes d'efflux impliqués dans la résistance aux aminosides chez les entérobactéries résistantes aux aminosides qui n'ont hébergé aucun gène de résistance dans cette étude.
- Rechercher les nouveaux gènes de résistance impliqués dans la résistance aux fluoroquinolones tels que les gènes *qnr C* et *qnr D*.
- Rechercher d'autres mécanismes de résistance à la rifampicine chez les entérobactéries.

RECOMMANDATIONS

Face à l'émergence et à la diffusion des souches multirésistantes, il convient de faire des recommandations.

-Aux agents de santé

Le personnel de santé doit maintenir les mesures d'hygiène hospitalière au sein des services (l'hygiène des mains, la tenue de protection, le port de gants, la gestion du matériel et des surfaces souillées, le circuit du linge, des déchets et des prélèvements biologiques) pour limiter la diffusion de ces souches multi-résistantes.

- Aux prescripteurs

Nous recommandons baser au préalable sur les résultats d'antibiogramme avant tout traitement antibactérien. Egalement de bien observer les règles de prescription des antibiotiques seul ou en association et de bien renseigner les données informatives sur les malades pour une meilleure surveillance

-Aux populations

Pour permettre une lutte efficace contre la résistance bactérienne, les populations doivent arrêter la vente anarchique d'antibiotiques en dehors des structures légales et leur consommation sans prescription médicale.

-Aux autorités gouvernementales

Elles doivent faire prendre conscience à la population de la résistance bactérienne et veiller sur la circulation et la distribution des antibiotiques sur toute l'étendue du territoire en établissant d'étroites collaborations avec les agents de santé afin de permettre un meilleur contrôle de l'utilisation des antibiotiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- 1-Abbassi M.S., Torres C., Achour W., Sanez Y. & Costa D., 2008.** Genetic characterisation of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from stem cell transplant patients in Tunisia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **32** : 308-314.
- 2-Abbott S.L., 2007.** *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae. Manual of Clinical Microbiology.* Washington, DC : ASM press, **9** : 698-715.
- 3-Adachi J., Ericsson C.D., Jiang Z.D., Dupont M.W., Pallegar S.R. & DuPont H.L., 2002.** Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. *Journal of Infectious Diseases*, **185** : 1681-1683.
- 4-Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., Ilina E.N., Lobzin Y.V., Shlyapnikov S.A. & Sidorenko S.V., 2014.** Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **44** : 152-155.
- 5-Akoua-Koffi C., Guessennd N., Gbonon V., Faye-Ketté H. & Dosso M., 2004.** Methicillin resistance of *Staphylococcus* in Abidjan 1998-2001: A new problem. *Medicine et maladies infectieuses*, **34** : 132-136.
- 6-Alain R. & Bernard J., 2002.** Entérobactéries. *Editions lavoisier*, Paris, France, 38p.
- 7-Aslan M., Schoemaker L., Eggleston K., Kammili N., Kolli P. & Bhattacharya J., 2015.** Out-of-pocket health expenditures and antimicrobial resistance in low-income and middle-income countries: an economic analysis. *Lancet Infectious Diseases*, **15** : 1203-1210.
- 8-Amana B., Dagnra A.Y., Pegbessou E. & Kpemissi E., 2013.** Profil bactériologique des sinusites maxillaires chroniques suppurées d'origine nasale de l'adulte au CHU Tokoin de Lomé. *Pan African Medical Journal* **16**: 48
- 9-Aminov R.I., 2010.** A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, **1** : 134 p.
- 10-Anago E., Ayi-Fanou L., Akpovi C.D., Hounkpe W.B., Tchiboza M.A.D., Bankole H.S. & Sanni A., 2015.** Antibiotic resistance and genotype of beta-lactamase producing *Escherichia coli* in nosocomial infections in Cotonou, Benin. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **14** : 5-11.

11-Anonyme, 2016. <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
Consulté le 28/05/2018.

12-Arlet G., Nadjar D., Herrmann J.L., Donay J.L., Rouveau M., Lagrange P.H. & Philippon A., 2001. Plasmid-mediated rifampin resistance encoded by an *arr-2*-like gene cassette in *Klebsiella pneumoniae* producing an AAC-1 class C β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45** : 2971-2972.

13-Arlet G. & Philippon A., 2003. Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Revue Française des Laboratoires*, **352** : 41-55.

14-Avril J.L., Dabernat H., Denis F. & Monteil H., 2000. Bactériologie clinique, *Ellipses 2^{ème} édition*, Paris, France, 602 p.

B

15-Ball P., 2000. Quinolone generations : natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **46** : 17-24.

16-Bakhoun I.M.N.S., 2004. Contrôle de qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bactérienne. Thèse de Pharmacie, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal, 113 p.

17-Bakour S., Touati A., Bachiri T., Sahli F., Tiouit D., Naim M., Azouaou M. & Rolain J. M., 2014. First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo-beta-lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **20** : 696-701.

18-Barral K. & Scotet J., 2006. Classification raisonnée des β -lactamases chez les bacilles Gram négatif. Perspective d'évolution. *Tigaud de bactériologie*, 10 p.

19-Baysarowich J., Koteva K., Hughes D. W., Ejim L., Griffiths E., Zhang K., Junop M. & Wright G.D., 2008. Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: Structure and diversity of Arr. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105** : 12 p.

20-Bebrone C., 2007. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology*, **74** : 1686-1701.

- 21-Belbel Z., 2014.** Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba. Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie, 146 p.
- 22-Bell B., Goldoft M., Griffin P.M., Davis M.A., Gordon D.C., Tarr P.I., Bartleson C.A., Lewis J.H., Barrett T.J. & Wells J.G., 1994.** A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7 associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *Journal of the American Medical Association*, **272** : 1349-1353.
- 23-Benz R., 2004.** Bacterial and Eukaryotic Porins : Structure, Function, Mechanism. Roland Benz, 382 p.
- 24-Birkett C.I., Ludlam H.A, Woodford N., Brown D.F., Brown N.M., Roberts M.T., Milner N. & Curran M.D., 2007.** Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Medical Microbiology*, **56**:52-55.
- 25-Black R., 1990.** Epidemiology of travelers diarrhea and relative importance of various pathogens. *Reviews of Infectious Diseases*, **12** : 73-79.
- 26-Bonnet R., 2004.** Growing group of extended-spectrum-beta-lactamases : the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48** : 1-14.
- 27-Bouallègue-Godet O., Ben Salem Y., Fabre L., Demartin M., Grimont P. & Mzoughi R., 2005.** Nosocomial outbreak caused by *Salmonella enterica* serotype livingstone producing CTXM-27 Extended-spectrum β -lactamase in neonatal unit in Sousse, Tunisia. *Journal of Clinical Microbiology*, **43** : 1037-1044.
- 28-Bouchillon S.K., Johnson B.M., Hoban D.J., Johnson J.L., Dowzicky M.J., Wu D.H., Visalli M.A. & Bradford P.A., 2004.** Determining incidence of extended spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001–2002. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **24** : 119-124.
- 29-Boyd D., Cloeckert A., Chaslus-Dancla E. & Mulvey M. R., 2002.** Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46** :1714-1722.

- 30-Boyd D.A., Shi X., Hu Q.H., Ng L.K., Doublet B., Cloeckart A. & Mulvey M.R., 2008.** *Salmonella* genomic island 1 (SGI1), variant SGI1-I, and new variant SGI1-O in *Proteus mirabilis* clinical and food isolates from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52** : 340-344.
- 31-Bradford P.A., 2001.** Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century : characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, **14** : 933-951.
- 32-Breurec S., Guessennd N., Timinouni M., Le T.A., Cao V., Ngandjio A., Randrianirina F., Thiberge J.M., Kinana A., Dufougeray A., Perrier-Gros-Claude J.D., Boisier P., Garin B., Brisse S., 2013.** *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. *Clinical Microbiology Infectious*, **19** : 349-355.
- 33-Brisse S. & Verhoef J., 2001.** Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51** : 915-924.
- 34-Bruno P., Dunais B., Blanc V., Sakarovitch C., Touboul P. & Anastay M., 2014.** Portage digestif d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3e génération et productrices de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) chez les enfants fréquentant les crèches collectives des Alpes-Maritimes en 2012. *Bullettin Epidémiologique Hebdomadaire*, **24-25** : 416-421.
- 35-Bryskier A., 1999.** Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. *Editions Ellipses*, 1216 p.
- 36-Bush K., Jacoby G.A. & Medeiros A.A., 1995.** A functional classification scheme for lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**: 1211-1233.
- 37-Bustin S.A., 2000.** Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, **25**: 169-193.

C

- 38-Cambau E. & Guillard T., 2012.** Antibactériens agissant sur la synthèse et la conformation des acides nucléiques *Revue scientifique et technique*, **31** : 65-76.
- 39-Cameron F.H., Groot-Obbink D.J., Ackerman V.P. & Hall R.M., 1986.** Nucleotide sequence of the *AAD(2'')* aminoglycoside adenylyltransferase determinant *aadB*. Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfrII* in R388. *Nucleic Acids Research*, **14** : 8625-8635.
- 40-Carattoli A., 2008.** Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clinical Microbiology Infection*, **14** : 117-123.
- 41-Carattoli A., 2009.** Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53** : 2227-2238.
- 42-Carniel E., 1999.** The Yersinia high-pathogenicity island. *International Microbiology*, **2** : 161-167.
- 43-Carpenter J.L., 1990.** *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Reviews of Infectious Diseases*, **12** : 672-682.
- 44-Carrer A. & Nordmann P., 2011.** CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: a change in the epidemiology of ESBL. *Pathologie Biologie*, **59** : 133-135.
- 45-Castanheira M., Farrell S.E., Wanger A., Rolston K.V. & Jones R.N., 2013.** Rapid expansion of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in two Texas hospitals due to clonal spread of ST258 and ST307 lineages. *Microbial Drug Resistance*, **19** : 295-297.
- 46-Castanheira M., Sader H.S., Deshpande L.M., Fritsche T.R. & Jones R.N., 2008.** Antimicrobial Activities of Tigecycline and Other Broad-Spectrum Antimicrobials Tested against Serine Carbapenemase and Metallo β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52** : 570-573.
- 47-Cattoir V., Poirel L. & Nordmann P., 2008.** Plasmid mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52** : 3801-3804.

- 48-Cavallo J.D, Fabre R., Jehl F., Rapp C. & Garrabé E., 2004.** Béta-lactamines. *EMC Maladies Infectieuses*, **1** : 129-202.
- 49-Chandrasekaran S. & Lalithakumari D., 1998.** Plasmid-mediated rifampicin resistance in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Medical Microbiology*, **47** : 197-200.
- 50-Changeur N. & Cherruault M., 2009.** Pharmacologie des aminosides (aminoglycosides), 3 p.
- 51-Chaudhary M. & Payasi A., 2014.** Resistance Patterns and Prevalence of the Aminoglycoside Modifying Enzymes in Clinical Isolates of Gram Negative Pathogens. *Global Journal of Pharmacology*, **8** : 73-79.
- 52-Chou A., Roa M., Evangelista M.A., Sulit A.K., Lagamayo E., Torres B.C., Klinzing D.C., Daroy M.L.G., Navoa-Ng G., Sucgang R. & Zechiedrich L., 2016.** Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST273 Carrying blaNDM-7 and ST656 Carrying blaNDM-1 in Manila, Philippines. *Microbial Drug Resistance*, **22** : 7 p.
- 53-Cissé L., Lagou D., Ouattara G.J., Azagoh K.R., Nandiolo-Anelone R., Coulibaly P., Enoh S.J., Alope-Yao A.P., Cissé Boni L., Adonis-Koffi Y.L. & Oulai S.M., 2017.** L'infection urinaire de l'enfant au cours d'un accès fébrile à l'hôpital général de Port-Bouët, Abidjan, Côte d'Ivoire. *Revue CAMES SANTE*, **5** : 105-109.
- 54-Corkill J.E., Cuevas L.E., Gurgel R.Q., Greensill J. & Hart C.A., 2001.** SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolysing β -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **47** : 463-465.
- 55-Courvalin P., Leclercq R. & Bingen E., 2006.** Antibiogramme. *Eska*, 2^{ième} édition, Paris, 500 p.
- 56-Courvalin P., 2008.** La résistance des bactéries aux antibiotiques : combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. Bacterial antibiotic resistance: combinations of biochemical and genetic mechanisms. *Bulletin De l'Academie Veterinaire De France*, **1** : 7-12.
- 57-Cruz G.R, Radice M., Sennati S., Pallecchi L., Rossolini G.M, Gutkind G. & Di Conza J.A., 2013.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyimino-cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **108** : 924-927.

D

- 58-Dabbs E.R., Yazawa K., Tanaka Y., Mikami Y., Miyaji M., Andersen S.J., Morisaki N., Iwasaki, S. Shida O., Takagi H. & Kadowaki K., 1995.** Rifampicin inactivation by *Bacillus* species. *Journal of Antibiotics*. 48:815–819
- 59-Dabernat H., Petitjean O. & Schlemmer S. J. P. W. P., 1997.** Infectiologie de A à Z. 354-355 p.
- 60-Dadie A.T., Guessennd N., Tiekoura B., Faye-Kette H. & Dosso M., 2003.** Résistance aux bêtalactamines d'*Escherichia coli* d'origine alimentaire et humaine isolés à Abidjan. *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 4 : 62-69.
- 61-Davison J., 1999.** Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, 42 : 73-91.
- 62-Decoster A. & Lahieu J.C., 2006.** Cours de Bactériologie : Les entérobactéries. Disponible sur : [http : //anne.decoستر.free.fr/bgn/enterob.html](http://anne.decoستر.free.fr/bgn/enterob.html). 2006. Consulté le 15 Mars 2016
- 63-De la Cruz F. & Davies J., 2000.** Horizontal gene transfer and the origin of species : lessons from bacteria. *Trends Microbiology*, 8 : 128-133.
- 64-Del Mar Tavio M., Vila J., Ruiz J., Manuel M.S.A. & Teresa De Anta M.J., 2000.** Decreased permeability and enhanced proton-dependent active efflux in the development of resistance to quinolones in *Morganella morganii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14 : 157-160.
- 65-Deng Y.T., Zeng Z.L., Tian W., Yang T. & Liu J.H., 2013.** Prevalence and characteristics of *rmtB* and *qepA* in *Escherichia coli* isolated from diseased animals in China. *Frontiers in Microbiology*, 4 : 198.
- 66-Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P. A. & Brisse S., 2005.** Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 : 4178-4182.
- 67-Doi Y., Yokoyama K., Yamane K., Wachino J.I., Shibata N. & Yagi T., 2004.** Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 : 491- 496.
- 68-Doi Y. & Arakawa Y., 2007.** 16S ribosomal RNA methylation : emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, 45 : 88-94.

- 69-Doran T.I., 1999.** The role of *Citrobacter* in clinical disease of children. *Clinical Infectious Diseases*, **28** : 384-394.
- 70-Dosso M., Bonard D., Msellati P., Bamba A., Douhourou C., Vincent V., Peyre M., Traore M., Koffi K.K. & Coulibaly I.M., 1999.** Résistance primaire aux médicaments antituberculeux : une enquête nationale menée en Côte d'Ivoire en 1995-1996. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **3** : 805-809.
- 71-Dosso M., Bissagnene E. & Coulibaly M., 2000.** Résistances acquises et prescriptions d'antibiotiques en Afrique : quelles adéquations ? *Medecine Maladies Infectieuses*, **30** : 197-204.
- 72-Drame B., 2001.** Micro-méthodes d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : intérêts thérapeutiques et diagnostiques. Thèse de Pharmacie, Université Cheikh Anta DIOP, Dakar, Sénégal. 115 p.
- 73-Durante-Mangoni E., Grammatikos A., Utili R. & Falagas M.E., 2009.** Do we still need the aminoglycosides? *International Journal of Antimicrobial Agents*; **33** : 201-205.
- 74-Dupont H. & Ericsson C.D., 1993.** Prevention and treatment of traveler's diarrhea. *New England Journal of Medicine*, **328** : 1821-1827.

E

- 75-Elhani D., 2012.** Les bêta-lactamases à spectre étendu : le défi s'accroît. *Annales de Biologie Clinique*, **70** : 117-140.
- 76-Endimiani A. & Paterson D.L., 2007.** Optimizing therapy for infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum bêta-lactamase. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, **28** : 646 p.
- 77-Essack S.Y., Hall L.M., Pillay D.G., McFadyen M.L. & Livermore D.M., 2001.** Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **45** :88-95.

F

- 78-Falagas M.E., Kavvadia P.K., Mantadakis E., Kofteridis D.P., Bliziotis I.A., Saloustros E., Maraki S. & Samonis G., 2006.** *Morganella morganii* infections in a General Tertiary Hospital. *Infection*, **34** : 315-321.
- 79-Farmer J.J., Boatwright K.D. & Janda J.M., 2007.** Enterobacteriaceae : Introduction and identification. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A.P faller (Eds.), *Manual of Clinical microbiology*, 669p.
- 80-Fauchère J.L. & Avril J.L., 2002.** Bactériologie générale et médicale. *Ellipses Edition Marketing*. Paris, 260 p.
- 81-Fielt J., Palucha A., Miaczynska B., Stankiewicz M., Przondo-Mordarska H., Hryniewicz W. & Gniadkowski M., 2000.** A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase producing klebsiellae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44** : 1499-1505.
- 82-Freney J., Renaud F., Hansen W. & Bollet C., 2000.** *Precis de bactériologie clinique. Éditions ESKA*, France, 1692 p.
- 83-Fritsche T.R., Castanheira M., Miller G.H., Jones R.N. & Armstrong E.S., 2008.** Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52** : 1843-1845.

G

- 84-Galimand M., Courvalin P. & Lambert T., 2003.** Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **47** : 2565-2571.
- 85-Galimand M., Sabtcheva S., Courvalin P. & Lambert T., 2005.** Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; **49** : 2949-2953.

- 86-Gangoué-Piéboji J., Bedenic B., Koulla-Shiro S., Randegger C., Adio D., Ngassam P., Ndumbé P. & Hächler H., 2005.** Extended Spectrum β -lactamase producing Enterbacteriaceae in Yaounde, Cameroon. *Journal of clinical Microbiology*, **43** : 3273-3277.
- 87-Gangoué P.J., 2007.** Caractérisation des beta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales, thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Biochimie, Université de Liège, Belgique, 104 p.
- 88-Gassama A.S., 2004.** Etude du rôle des intégrons dans la multi résistance aux antibiotiques des bactéries entéropathogènes isolées en Afrique Sub-saharienne, thèse de doctorat, Université de Limoges, France, 97 p.
- 89-Gautier V., 2007.** Caractérisation et expression des gènes codant pour les β -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement, Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, 25 p.
- 90-Gbonon V.C., Guessennd K.N., Kouassi M'bengue A., Kacou N'douba A., N'guessan K.R., Faye-Kette H., Dosso M. & Mignonsin D., 2007.** Contrôles bactériologiques de l'environnement des blocs opératoires dans un pays en développement : cas du CHU de Treichville à Abidjan en l'an 2000. *Revue Bio-Africa*, **4** : 7-11.
- 91-Germani Y., Minssart P., Vohito M., Yassibanda S., Glaziou P., Hocquet D., Berthélémy P., & Morvan J., 1998.** Etiologies of acute, persistent, and dysenteric diarrheas in adults in Bangui, Central African Republic, in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59** : 1008-1014.
- 92-Girlich D., Poirel L., Leelaporn A., Karim A., Tribuddharat C., Fennewald M. & Nordmann P., 2001.** Molecular epidemiology of the integronlocated VEB-1 extended-spectrum -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**:175–182.
- 93-Grimont F. & Grimont P.A.D., 2006.** The Genus *Enterobacter*. *Prokaryotes*; **6** : 197-214.
- 94-Grosset J.H., 1989.** Present status for chemotherapy for tuberculosis. *Review Infectious Diseases*, **11** : 347-352.

- 95-Guessennd N., Kacou-N'Douba A., Gbonon V., Yapi D., Ekaza E., Dosso M., Courvalin P., 2008a.** Prévalence et profil de résistance des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) à Abidjan de 2005 à 2006. *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, **9** : 63-70.
- 96-Guessennd N., Bremont S., Gbonon V., Kacou-NDouba A., Ekaza E., Lambert T., Dosso M. & Courvalin P., 2008b.** Résistance aux quinolones de type qnr chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire. *Pathologie Biologie*, **56** : 439-446.
- 97-Guillard T., Cavallo J.D., Cambau E., Duval V., Bajolet O., Brasme L., De Champs C. & Vernet-Garnier V., 2009.** Mise au point d'une technique de PCR en temps réel pour la détection rapide des gènes qnr chez des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu. *Pathologie Biologie*, **58** : 430-433.
- 98-Gupta S.K., Padmanabhan B.R., Diene S.M., Lopez-Rojas R., Kempf M., Landraud L. & Rolain J.M., 2014.** ARG-ANNOT, a New Bioinformatic Tool To Discover Antibiotic Resistance Genes in Bacterial Genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58** : 212-220.

H

- 99-Hacker J. & Kaper J.B., 2000.** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*, **54** : 641-679.
- 100-Haeggman S., Löfdahl S., Paauw A., Verhoef J. & Brisse S., 2004.** Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48** : 2400-2408.
- 101-Hall L.M., Livermore D.M., Gur D., Akova M., & Akalin H.E., 1993.** OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37** : 1637-1644.
- 102-Hammond D.S., Schooneveldt J.M., Nimmo G.R., Huygens F. & Giffard P.M., 2005.** *BlaSHV* genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different paromoters within individual isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49** : 256-263.

- 103-Hanes D., 2003.** Nontyphoid *Salmonella*, Bier J. (Eds) *International Handbook of Foodborne Pathogens Edition*. Milotis N., New york, 149p.
- 104-Hart C.A., 2006.** *Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter* and *Serratia spp* in Principles and practice of Clinical Bacteriology, 2nd Edn eds Gillespie S. H., Hawkey P. M., editors (Chichester John Wiley & Sons Ltd), 386p.
- 105-Hidalgo L., Hopkins K.L., Gutierrez B., Ovejero C.M., Shukla S., Douthwaite S., Prasad K.N., Woodford N. & Gonzalez-Zorn B., 2013.** Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in *Enterobacteriaceae* isolated in India and the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68** : 1543-1550.
- 106-High N.J., Hales B.A., Klaus J. & Boulnois G.J., 1988.** "A block of urovirulence genes encoding multiple fimbriae and hemolysin in *Escherichia coli* O4K12H-." *Infection and immunity* **56**: 513-517.
- 107-Hilty M., Betsch B.Y., Bogli-Stuber K., Heiniger N., Stadler M., Kuffer M., Kronenberg A., Rohrer C., Aebi S., Endimiani A., Droz S. & Muhlemann K., 2012.** Transmission dynamics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the tertiary care hospital and the household setting. *Clinical Infectious Diseases*, **55** : 967-975.
- 108-Holden V.I. & Bachman M.A., 2015.** Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*. **7**: 986-995.
- 109-Holmes B., & Aucken H.M., 1998.** *Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia* and other members of the *Enterobacteriaceae*. *Microbiology and Microbial infections: Systematic Bacteriology, 9th edition*, 1033 p.
- 110-Honoré S., Lascols C., Malin D., Targaouchi R., Cattoir V., Legrand P., Soussy C.J. & Cambau E., 2006.** Émergence et diffusion chez les entérobactéries du nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones Qnr (résultats hôpital Henri-Mondor 2002–2005). *Pathologie Biologie*; **54** : 270-279.
- 111-Hooper D.C., 2000.** Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, **31** : 24-28.

112-Hooper D.C., 2003. Mechanisms of quinolone resistance. In: Hooper DC, Rubinstein E, editors. *Quinolone antimicrobial agents*. 3rd. Washington, D.C: ASM Press, 18 p.

113-Hoque S., Faruque A.S., Mahalanabis D. & Hasnat A., 1994. Infectious agents causing acute watery diarrhea in infants and young children in Bangladesh and their public health implications. *Journal of Tropical Pediatrics*, **40** : 351-354.

114-Houang E.T., Chu Y.W., Lo W.S., Chu K.Y. & Cheng A.F., 2003. Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (arr-2) and metallo-beta-lactamase (blaIMP-4) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47** : 1382-1390.

115-Hounsa A.D.M.P., 2009. Knowledge and perceptions of staff working in private dispensaries in Abidjan as regards bacterial resistance. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **67** : 284-290.

I

116-Iabadene H., Messai Y., Alouache S., Arlet G. & Bakour R., 2010. Mécanismes de résistance aux β -lactamines et aux quinolones d'*Enterobacter* dans les hôpitaux d'Alger. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*, **4** : 24 p.

J

117-Jacoby G.A. & Medeiros A.A., 1991. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **35** : 1697-1700.

118-Jacoby G.A., 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, **41** : 120-126.

119-Jacoby G.A. & Munoz-Price L.S., 2005. The new β -lactamases. *New England Journal of Medicine*, **352** : 380-391.

120-Jamali L., Haouzane F., Bouchakour M., Oufriid S., Ghazlane Z., El Mdaghri N., Nadifi S. & Timinoun M., 2014. Prévalence des gènes de résistance plasmidique aux quinolones chez des entérobactéries communautaires isolées au Maroc. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, **11** : 387-399.

121-Jeong H.S., Bae K., Shin J H., Jung H.J., Kim S.H., Lee J.Y., Oh S.H., Kim H.R., Chang C.L., Kho W.G. & Lee J.N., 2011. Prevalence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance and Its Association with Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC Beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* Korean. *Journal of Laboratory Medecine*, **31** :257-264.

122-Joly B. & Reynaud A., 2007. Entérobactéries: systématique et méthodes de diagnostic. *Edition Techniques et Documentation*, Paris, 182 p.

K

123-Kang H.Y., Kim K.Y., Kim J, Lee J.C., Lee Y.C., Cho D.T. & Seol S.Y., 2008. Distribution of conjugative-plasmid-mediated 16S rRNA methylase genes among amikacin-resistant *Enterobacteriaceae* isolates collected in 1995 to 1998 and 2001 to 2006 at a university hospital in South Korea and identification of conjugative plasmids mediating dissemination of 16S rRNA methylase. *Journal of Clinical Microbiology*, **46** : 700-706.

124-Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, **2** : 123-144

125-Kasap M., Fashae K., Torol S., Kolayli F., Budak F. & Vahaboglu H., 2010. Characterization of ESBL (SHV-12) producing clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* from a tertiary care hospital in Nigeria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **9** : 1 p.

126-Kazama H., Kizu K., Iwasaki M., Hamashima H., Sasatsu M. & Arai T., 1995. Isolation and structure of a new integron that includes a streptomycin resistance gene from the plasmid of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, **134** : 137-141.

127-Kim J.Y., Park Y.J., Kwon H.J., Han K., Kang M.W. & Woo G.J., 2008. Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with betalactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **62** : 479-483.

128-Kiratisin P., Apisarnthanarak A., Laesripa C. & Saifon P., 2008. Molecular characterization and epidemiology of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichiacoli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52** : 2818-2824.

129-Knirel Y.A., Kocharova N.A., Bystrova O.V., Katzenellenbogen E. & Gamian A., 2002. Structures and serology of the O-specific polysaccharides of bacteria of the genus *Citrobacter*. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentals*, **50** : 379-391.

130-Knox J.R., 1995. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**: 2593-2601.

131-Kumar A. & Schweizer H.P., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advance Drug Delivery Review*, **57** : 1486-1513.

L

132-Labombardi V.J., Rojzman A. & Tran K., 2006. Use of cefepime for the treatment of infections caused by extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology Infection Disease*, **56** : 313-315.

133-Lacarelle B., Basso S., Bouquet S. & Venisse N., 2004. Suivi thérapeutique de l'amikacine. In :Marquet P. Suivi thérapeutique pharmacologique pour l'adaptation de posologie des médicaments. Elsevier, Pari, France, pp. 39-50

134-Lagha N., 2015. Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Thèse de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen, Algérie, 84 p.

135-Lambert T., 2007. Aminosides et bactéries à Gram négatif. *Antibiogramme, 2ème édition*, 246 p.

136-Larouche G., 2001. Les quinolones : des années soixante à aujourd'hui, *Pharmactuel*, **34** : 7 p.

137-Lavigne J.P., 2007. Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. MB7 : Bactériologie B6 -Antibiotiques et résistance. Faculté de Médecine Montpellier -Nîmes. 3 p.

138-Lee I.K & Liu J.W., 2006. Clinical characteristics and risk factors for mortality in *Morganella morganii* bacteremia. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, **39** : 328-334.

139-Lee K., Yum J. H., Yong D., Lee H.M., Kim H.D., Docquier J.D., Rossolini G.M. & Chong Y., 2005. Novel acquired metallo-lactamase gene, *blaSIM-1*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **49** : 4485-4491.

- 140-Leverstein-Van Hall M.A., Dierikx C.M., Cohen Stuart J., Voets G.M., Van Den Munckhof M.P., Van Essen-Zandbergen A., Platteel T., Fluit A. C., Van De Sande-Bruinsma N., Scharinga J., Bonten M.J. M. & Mevius D.J., 2011.** Dutch patients retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clinical Microbiology Infection*, **17** : 873-880.
- 141-Levine M., Ferreccio C., Prado V., Cayazzo M., Abrego P., Martinez J., Maggi L., Baldini M.M., Martin W., Maneval D., Kay B., Guers L., Lior H., Wasserman S.S. & Nataro, J.P., 1993.** Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrhea infections in in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *American Journal Epidemiology*, **138** : 849-869.
- 142-Liakopoulos A., Mevius D. & Ceccarelli D., 2016.** A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Frontiers in Microbiology*, **7** : 1374 p.
- 143-Li J.B., Cheng J., Wang Q., Chen Y., Ye Y. & Zhang X.J., 2009.** A novel SHV-type beta-lactamase variant (SHV-89) in clinical isolates in China. *Molecular Biology Reports*, **36** : 1141-1148.
- 144-Livermore D.M., 1995.** Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **8** :557-584.
- 145-Livermore D.M., 2003.** Bacterial Resistance : Origins, Epidemiology and Impact. An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, **36** : 11-23.
- 146-Livermore D.M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G.M., Arlet G., Poirel L. & Woodford N., 2007.** CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **59** : 165-174.

M

- 147-Magdalena T., Nüesch-Inderbinen., Fritz H., Kayser. & Herbert H., 1997.** Survey and Molecular Genetics of SHV β -Lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: Two Novel Enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **41** : 943-949.

- 148-Mammeri H., Van De Loo M., Poirel L., Martinez-Martinez L. & Nordmann P., 2005.** Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **49** : 71-76.
- 149-Martinez-Martinez L., Pascual A. & Jacoby G.A., 1998.** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, **351** : 797-799.
- 150-Mathlouthi N., Al-Bayssari C., El Salabi A., Bakour S., Ben Gwierif S., Zorgani A.A., Jridi Y., Ben Slama K., Rolain J.M. & Chouchani C., 2016.** Carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases producing *Enterobacteriaceae* isolated from Tunisian and Libyan hospitals. *Journal of Infection in Developing Countries*, **10** : 718-727.
- 151-Menard R., Molinas C., Arthur M., Duval J., Courvalin P. & Leclercq R., 1993.** Overproduction of 3'-aminoglycoside phosphotransferase type I confers resistance to tobramycin in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **37** : 78-83.
- 152-Mendonça N., Ferreira E., Louro D. & Caniça M., 2009.** Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended-and broad- spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **34** : 29-37.
- 153-Mingeot-Leclercq M.P., Glupczynski Y. & Tulkens P.M., 1999.** Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43** : 727-737.
- 154-Minor L. & Richard C., 1993.** Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur, Paris, France, 217 p.
- 155-Miotto P., Saleri N., Dembelé M., Ouedraogo M., Badoum G., Pinsi G, Migliori G.B., Matteelli A. & Cirillo D.M., 2009.** Molecular detection of rifampin and isoniazid resistance to guide chronic TB patient management in Burkina Faso. *BMC Infectious Diseases*, **9** :142
- 156-Muratani T., Kobayashi T. & Matsumoto T., 2006.** Emergence and prevalence of β -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to cepheims in Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **27** : 491-499.
- 157-Muylaert A. & Mainil J.G., 2013.** Résistances aux fluoroquinolones: la situation actuelle. *Annales De Medecine Veterinaire*, **157** : 15-26.

- 158-Naas T., Mikami Y., Imai T., Poirel L. & Nordmann P., 2001.** Characterization of In53, a class1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *Journal of Bacteriology*, **183** : 235-249.
- 159-Naiemi N.A., Duim B., Savelkoul P.H., Spanjaard L., De Jonge E., Bart A., Vandenbroucke-Grauls C.M. & De Jong M.D., 2005.** Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit : implications for hospital epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, **43** : 4862-4864.
- 160-Nakaya R., Nakamura A. & Murata Y., 1960.** Resistance transfer agents in *Shigella*. *Biochemical Biophysical Research Communications*, **3** : 654-659.
- 161-Nataro J. P. & Kaper J.B., 1998.** Diarrhegenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, **11** : 142-201.
- 162-N'guessan K., Assi J.S., Ouassa T., Ahui-Brou J.M., Tehe A., Keita M.S., Guei A., Kouakou J. & Dosso M., 2014.** Assessment of the genotype mtbdrplus assay for rifampin and isoniazid resistance detection on sputum samples in Côte D'ivoire. *European Journal of Microbiology and Immunology*, **4 3** :166–173
- 163-Niang O., 2003.** Validation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires Thèse de Pharmacie, Université Cheikh Anta DIOP, Dakar, Sénégal, 60 p.
- 164-Nikaido H., 1994.** Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, **264** : 382-388.
- 165-Nikaido H., 2000.** Crossing the envelope: how cephalosporins reach their targets. *Clinical Microbiology and Infection*, **6** : 22-26.
- 166-Nikolayevskyy V.V., Brown T.J., Bazhora Y.I., Asmolov A.A., Balabanova Y.M. & Drobniewski F.A., 2007.** Molecular epidemiology and prevalence of mutations conferring rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from the southern Ukraine. *Clinical Microbiology and Infection*, **13** : 129-138.
- 167-Nishino K. & Yamaguchi A., 2001.** Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*; **183** : 5803-5812.
- 168-Nordmann P., Cuzon G. & Naas T., 2009.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infectious Diseases*, **9** : 228-236.

169-Nousbaum J.B., 2015. Infection du liquide d'ascite : diagnostic, traitement et prévention. POST'U, 99-105p

170-Noppe-Leclercq I., Wallet F., Haentjens S., Courcol R. & Simonet M., 1999. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Research of Microbiology*, **150** : 317-322.

171-Nuesch-Inderbilen M.T., Kayser F.H. & Hachler H., 1997. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41** : 943-949.

O

172-Obeng-Nkrumah N., Twum-Danso K., Krogfelt K.A. & Newman M.J., 2013. High Levels of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in a Major Teaching Hospital in Ghana: The Need for Regular Monitoring and Evaluation of Antibiotic Resistance. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **89** : 960-964.

173-Okusu H., Ma D. & Nikaido H., 1996. Acr AB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *Journal of Bacteriology*, **178** : 306-308.

174-Otty A., 2016. Intérêt de l'examen cytobactériologique du liquide pleural dans le diagnostic des affections pulmonaires non tuberculeuses au CNHU-PP de Cotonou. Rapport de stage de fin de formation pour l'obtention du diplôme de Licence professionnelle. Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin. 43 p

175-Ouattara M.B, Guessennd K.N, Coulibaly N.D, Saraka N.D, Coulibaly K.J, Koffi-Nevry R, Ouattara G.D, Gbonon V, Tiekoura K.B. & Dosso M., 2014. First report of qnr genes in multidrugs resistant (ESBL) enterobacteria isolated from different ecosystems in Abidjan, Ivory Coast. *International Journal of Biological Sciences and Applications*, **1** : 170-175.

176-Ouattara M.B., 2016. Biodiversité des Entérobactéries productrices de Bêta-Lactamases à Spectre Elargi (EBLSE) d'origines humaine, animale et environnementale à Abidjan (Côte d'Ivoire). Thèse unique pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire. 190 p

- 177-Ouedraogo M, Ouedraogo S.M, Diagbouga S, Coulibaly G, Achi V, Domoua K, N'dathz M. & Yapi A., 2000.** Simultaneous resistance to rifampicin and isoniazid in patients with pulmonary tuberculosis. *Revue des Maladies Respiratoires*, **17** : 477-480.
- 178-Ouedraogo A.S., Sanou M., Kissou A., Sanou S., Solaré H., Kaboré F., Poda A., Aberkane S., Bouzinbi N., Sano I., Nacro B., Sangaré L., Carrière C., Decré D., Ouégraogo R., Jean-Pierre H. & Godreuil S., 2016.** High prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing enterobacteriaceae among clinical isolates in Burkina Faso, *BMC Infectious Diseases*, **16**: 326-335.
- 179-Over U., Gur D., Unal S. & Miller G.H., 2001.** The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. *Clinical Microbiology and Infection*, **7** : 470-478.

P

- 180-Paauw A, Flute A, Verhoef J. & Leverstein-Van Hall M.A, 2004.** Major Outbreak with Plasmid-Mediated, qnr Encoded, Quinolone Resistance. *ICAAC, Poster C2-1898*.
- 181-Paolozzi L. & Liébart J.C., 2015.** Microbiologie : biologie des procaryotes et de leurs virus, Editions Dunod, Paris, 512 p.
- 182-Park C.H., Robicsek A., Jacoby G.A., Sahm D. & Hooper D.C., 2006.** Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50** : 3953-3955.
- 183-Park Y.J., Yu J.K., Lee S., Oh E.J & Woo G.J.; 2007.** Prevalence and diversity of *qnr* alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **60** : 868-871.
- 184-Park Y.J., Yu J.K., Kim S.I., Lee K. & Arakawa Y., 2009.** Accumulation of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes, *qepA* and *qnrS1*, in *Enterobacter aerogenes* co-producing *RmtB* and class A beta-lactamase LAP- 1. *Annals Clinical and Laboratory Science*, **39** : 55-59.
- 185-Paterson D.L. & Bonomo R.A., 2005.** Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, **18** : 657-686.

- 186-Pepperell C., Kus J.V., Gardam M.A., Humar A. & Burrows L.L., 2002.** Low-Virulence *Citrobacter* Species Encode Resistance to Multiple Antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46** : 3555-3560.
- 187-Perichon B., Bogaerts P., Lambert T., Frangeul L., Courvalin P. & Galimand M., 2008.** Sequence of conjugative plasmid pIP1206 mediating resistance to aminoglycosides by 16S rRNA methylation and to hydrophilic fluoroquinolones by efflux. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52** : 2581-2592.
- 188-Philippon A., Arlet G. & Jacoby G.A., 2002.** "Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46** : 1-11.
- 189-Philippon A. & Arlet G., 2006.** β -Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. *Annales de Biologie Clinique*, **64** : 37-51.
- 190-Pitart C., Sole M., Roca I., Fabrega A., Vila J. & Marco F., 2011.** First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **55** :4398-4401.
- 191-Piva I., Prereira A.L., Ferraz L.R., Silva R.S.N., Vieira A.C., Blanco J.E., Blanco M., Blanco J. & Giugliano L. 2003.** Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* from children and adults with diarrhea in Brasilia, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, **41** : 1827-1832.
- 192-Ploy M.C., Gassama A., Chainier D. & Denis F., 2005.** Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. Integrons: an antibiotic resistance gene capture system. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*; **20** : 343-352.
- 193-Podschun R. & Ullmann U., 1998.** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens : epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Review*, **11** : 589-603.
- 194-Poirel L., Lebessi E., Castro M., Fèvre C., Foustoukou M. & Nordmann P., 2004.** Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5 producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48** : 2277-2279.

195-Poirel L., Villa L., Bertini A., Pitout J.D., Nordmann P. & Carattoli A., 2007. Extended spectrum beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance. *Emergency Infection Diseases*, **13** : 803-805.

196-Poole K., 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49** : 479-487.

Q

197-Quan S., Venter H. & Dabbs E.R., 1997. Ribosylative inactivation of rifampin by *Mycobacterium smegmatis* is a principal contributor to its low susceptibility to this antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**:2456– 2460

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

R

199-Rafaï C., Frank T., Manirakiza A., Gaudeuille A., Mbecko J R., Nghario L., Serdouma E., Tekpa B., Garin B. & Breurec S., 2015. Dissemination of IncF-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from surgical-site infections in Bangui, Central African Republic. *BMC Microbiology*, **15** : 15-25.

200-Raji M.A., Jamal W., Ojemeh O. & Rotimi V.O., 2015. Sequence analysis of genes mediating extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production in isolates of Enterobacteriaceae in a Lagos Teaching Hospital, Nigeria. *BMC Infectious Diseases*, **15** : 259-264.

201-Ramdani-Bouguessa N., Manageiro V., Jones-Dias D., Ferreira E., Tazir M. & Canic M., 2011. Role of SHV β -lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to β -lactams in an Algerian hospital. *Journal of Medical Microbiology*, **60** : 983-987.

202-Ramirez M.S. & Tolmasky M.E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes .*Drug resistance Update*; **13** : 151-171.

- 203-Restieri C., Garriss G., Locas M.C. & Dozois C.M., 2007.** "Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Applied and Environmental Microbiology*. **73** : 1553-1562
- 204-Robicsek A., Sahn D., Jacoby G. & Hooper D., 2005.** Broader distribution of plasmid-mediated quinolone resistance in the United State, **49** : 3001-3003.
- 205-Rodriguez-Martinez J.M., Cano M.E., Velasco C., Martinez-Martinez L. & Pascual A., 2010.** Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **17** : 149-182.
- 206-Rodriguez-Villalobos H. & Struelens M.J., 2006.** Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Revue Réanimation*, **15** : 205-213.
- 207-Rolinson G.N., 1998.** Forty years of beta-lactam research. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **41** : 589-603.
- 208-Rubin M.A. & Samore M.H., 2002.** Antimicrobial Use and Resistance. *Current Infectious Disease Report*, **4** : 491-497.
- 209-Ryan K.J. 2004.** Enterobacteriaceae. Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious diseases. Kenneth J. Ryan, C. George Ray, editors, *4th editions*. 979 p.

S

- 210-Sahly H., Ancken H., Benedi V.J., Forestier C., Fusing V., Hansen D.S, Ofek I. & Podshun R., 2004.** Impairment of Respiratory Burst in polymorphonuclear Leukocytes by Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing Strains of *Klebsiella pneumoniae*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **23** : 20-26.
- 211-Sam I.C., Drobniewski F., More P., Kemp M. & Brown T., 2006.** *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, **12** : 752-759.
- 212-Samuelsen O., Toleman M.A., Hasseltvedt V., Fuursted K., Leegaard T.M., Walsh T.R., Sundsfjord A. & Giske C.G., 2011.** Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance. *Clinical Microbiology and Infectious*, **17** : 1811-1816.

- 213-Sara Y., Tartof O.D., Solberg A.R., Manges & Lee W. R., 2005.** Analysis of a Uropathogenic *Escherichia coli* Clonal Group by Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, **43** : 5860–5864.
- 214-Sarkozy G., 2001.** Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Veterinary Medicine of Czechoslovakia*, **46** : 257-274.
- 215-Scaletsky I., Fabbriotti S.H., Silva S.O.C., Morais M.B. & Fagundes-Neto U., 2002.** Hep-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, Sao Paulo, Brazil. *Emerging infectious diseases*, **8** : 855-858.
- 216-Schultz C., Ende J.V.D., Cobelens F., Vervoort T., Gompel A.V., Wetsteyn J.C.F.M. & Dankert J., 2000.** Diarrhegenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travelers. *Journal of Clinical Microbiology*, **38** : 3550-3554.
- 217-Schumacher A., Steinke P., Bohnert J.A., Akova M., Jonas D. & Kern W.V., 2006.** Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **57** : 344-348.
- 218-Schwarz S. & Chaslus-Dancla E., 2001.** "Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance". *Veterinary Research*, **32** : 201-225.
- 219-Sebghati T.A., Korhonen T.K., Hornick D.B. & Clegg S., 1998.** Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infection and Immunity*, **66** : 2887-2894.
- 220-Seng P., Rolain J. M., Fournier P. E., La S. B., Drancourt M. & Raoult D. 2010.** MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiology*, **5** : 1733-1754 .
- 221-Shaw K.J., Rather P.N., Hare R.S. & Miller G.H., 1993.** Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes. *Microbiological reviews*, **57** : 138-163.
- 222-Sirinavin S. & Dowell S.F., 2004.** Antimicrobial resistance in countries with limited resources: unique challenges and limited alternatives. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, **15**: 94-98.
- 223-Skurnik D. & Andremont A., 2006.** Antibiothérapie sélectionnante: de la théorie à la pratique. *Réanimation*; **15** : 198-204.

- 224-Smits S. L., Leeuwen M. V., Schapendonk C. M. E., Schürch A. C., Bodewes R., Haagmans B. L. & Osterhaus A. D. M. E., 2012.** New Delhi Metallo- β -Lactamase 4-producing *Escherichia coli* in Cameroon. *Emerging Infectious Diseases*, 18 : 9 p.
- 225-Smith M.A., Weingarten R.A., Russo L.M., Ventura C.L. & O'Brien A. D. 2015.** "Antibodies against hemolysin and cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1) reduce bladder inflammation in a mouse model of urinary tract infection with toxigenic uropathogenic *Escherichia coli*." *Infection and Immunity*. 83: 1661-1673.
- 226-Souna D., 2011.** Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbes. Mémoire de Magister en Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers .Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie, 148 p.
- 227-Souna D., 2015.** Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez Enterobacter cloacae. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers .Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie, 161 p.
- 228-Soussy C.J., 2006.** Quinolones et bactéries à Gram négatif. Dans: Patrice Courvalin, Roland Leclercq, Edouard Bingen eds. Antibiogramme, 2ème édition ESKA, Paris. 277p.
- 229-Stokes H.W. & Hall R.M., 1989.** A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular Microbiology*, 3 : 1669- 1683.
- 230-Stone P.W., Gupta A., Loughrey R.N., Della-Latta P.H., Cimiotti R.N., Larson E., Rubenstein D. & Saiman L., 2003.** Attributable Coast And Length Of Stay Of An Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreak In A Neonatal Intensive Care Unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24 : 601-606.
- 231-Stratton C.W., 2000.** Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Lebanese Medical Journal*, 48 : 186-198.
- 232-Struve C., Bojer M. & Krogfelt K.A., 2008.** Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and Immunity*, 76 : 4055-4065.

T

- 233-Taha M. K., Zarantonelli M. L., Ruckly C., Giorgini D. & Alonso J. M., 2006.** Rifampin-resistance *Neisseria meningitidis*. *Emerging Infectious Disease*, **12** : 859-860.
- 234-Tanaka Y., Yazawa K., Dabbs E. R., Nishikawa K., Komaki H., Mikami Y., Miyaji M., Morisaki N. & Iwasaki S., 1996.** Different rifampicin inactivation mechanisms in *Nocardia* and related taxa. *Microbiology and Immunology*, **40** : 1-4.
- 235-Tande D., Boisrame-Gastrin S., Munck M.R., Hery-Arnaud G., Gouriou S. & Jallot N., 2010.** Intrafamilial transmission of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Babelsberg among the families of internationally adopted children. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**: 859-865.
- 236-Thiam K., 2008.** Etude *in vitro* de la sensibilité bactérienne. Master 2 S.T.A.F.A.V, Université Gaston Berger, Sénégal, 60 p.
- 237-Toty A.A., Guessenn N., Akoua-Koffi C., Otokoré D.A., Meex C., Mbengue G.V., Djaman A.J., Dosso M., Galleni M., 2016.** First Detection of TEM-116 and SHV-75 Producing Enterobacteria Isolated from Two Ivorian Teaching Hospitals: Case of Abidjan and Bouaké. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **5** : 1-9.
- 238-Touati A., Brasme L., Benallaoua S., Gharout A., Madoux J. & De C.C., 2008.** First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagnostical Microbiology Infectious Diseases*. **60** : 287-290
- 239-Touati M., 2013.** Antibio-résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau des services de réanimation du CHU Annaba, Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en microbiologie, Université Badji Mokhtar-Annaba, Algérie, 156 p.
- 240-Tran J.H., Jacoby G.A. & Hooper D.C. 2005.** Interaction of the plasmid encoded quinolone resistance protein *Qnr A* with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49** : 118-125.
- 241-Tribuddharat C. & Fennewald P., 1999.** Integron-mediated rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43** : 960-962.

V

- 242-Vakulenko S.B. & Mobashery S., 2003.** Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical microbiology reviews*, **16**: 430-450.
- 243-Van Bambeke F. & Tulkens P., 2008.** Pharmacologie et pharmacothérapie anti-infectieuse, Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, Université catholique de Louvain, 212 p.
- 244-Villa L., Feudi C., Fortini D., Brisse S., Passet V., Bonura C., Endimiani A., Mammina C., Ocampo A. M., Jimenez J.N., Doumith M., Woodford N., Hopkins K. & Carattoli A., 2017.** Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microbial Genomics*, **3** : 110 p.

W

- 245-Wachino J. & Arakawa Y., 2012.** Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resistance Update*, **15** : 133-148.
- 246-Walsh C., 2003.** Antibiotics : actions, origins, resistance. Washington, DC: *ASM Press*. 345 pp.
- 247-Wang H., Dzink-Fox J.L, Chen M. & Levy S.B., 2001.** Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45** : 1515-1521.
- 248-Warjri I., Dutta T.K., Lalzampaia H. & Chandra R., 2015.** Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases (*bla**CTX-M-1* and *bla**SHV*) producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Klebsiella pneumoniae* isolated from humans in Mizoram, *Veterinary World*, **8** : 599-604.
- 249-Weldhagen G.F., Poirel L. & Nordmann P., 2003.** Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **47** : 2385-2392.
- 250-Williams D.L., Waguespack C., Eisenach K., Crawford J.T., Portaels F., Salfinger M., Nolan C. M., Abe C., Sticht-Groh V. & Gillis T.P., 1994.** Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy*, **38** : 2380–2386.

251-Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P. & Wieler L.H., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60: 1136–1151.

X

252-Xu M., Zhou Y.N., Goldstein B.P. & Jin D.J., 2005. Cross-Resistance of *Escherichia coli* RNA Polymerases Conferring Rifampin Resistance to Different Antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 187 : 2783-2792.

Y

253-Yagi T., Kurokawa H., Shibata N., Shibayama K. & Arakawa Y., 2000. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiology Letters*, 184 : 53-56.

254-Yamane K., Wachino J., Suzuki S., Kimura K., Shibata N., Kato H., Shibayama K., Konda T. & Arakawa Y., 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 51 : 3354-3360.

255-Yao H. A., Yapi A. D., Guessennd K. N., Oga S., Ouattara M., Kacou-N'Douba A., Dosso M. & Ouattara L., 2010. Phénotypes de résistance des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi à Abidjan de 2003 à 2004 et approches thérapeutiques. *Revue Bio-africa*, 8 : 39-45.

256-Yazawa K., Mikami Y., Maeda A., Akao M., Morisaki N. & Iwasaki S., 1993. Inactivation of rifampin by *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37 : 1313-1317.

257-Yazawa K., Mikami Y., Maeda A., Morisaki N., & Iwasaki S., 1994. Phosphorylative inactivation of rifampicin by *Nocardia otitidiscaviarum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33 : 1127-1135.

Z

258-Zahar J.R., Bille E., Schnell D., Lanternier F., Mechai F., Masse V. & Lortholary X.N.O., 2009. Diffusion communautaire des entérobactéries sécrétrices de β -lactamase à spectre élargi (EBLSE). *Medecine/Sciences*; 25 : 939-944

259-Zhao J., ChenJ., ZhaoM., Qiu X., Chen X., Zhang W., SunR., Ogutu J. O. & Zhang F., 2016. Multilocus Sequence Types and Virulence Determinants of Hypermucoviscosity-Positive *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Community-Acquired Infection Cases in Harbin, North China. *Journal of Infectious. Diseases*, **69** : 357-360.

ANNEXES

ANNEXE

Matériel et méthodes

ANNEXE 1 : Composants des cartouches du Kit EZY 1

composant d'une cartouche du kit EZ1	Numéro du Puits	Volume (µL)
tampon de lyse (tampon MTL)	1	720
Suspension diluée de particules magnétiques	2	300
tampon de perles	3	60
lavage 1 (tampon MW1-EtOH)	4	900
lavage 2 (tampon MW2-EtOH)	5	900
lavage 3 (tampon MW3-EtOH)	6	900
Eau sans RNase (Rincer)	7	1000
tampon d'élution (Eau sans RNase)	8	220
Tampon TE	9	220
Pas de réactif (vide)	10	0

ANNEXE

Résultats

ANNEXE 2 : Alignement des séquences nucléotiques *bla_{TEM-1}* et *bla_{TEM-104}*

```

TEM 1 1 ATGAGTATTCAACATTTTCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCT 60
      |
TEM 104 1 ATGAGTATTCAACATTTTCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCT 60

TEM 1 61 GTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTCAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA 120
      |
TEM 104 61 GTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTCAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA 120

TEM 1 121 CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC 180
      |
TEM 104 121 CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC 180

TEM 1 181 GAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCC 240
      |
TEM 104 181 GAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCC 240

TEM 1 241 CGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTG 300
      |
TEM 104 241 CGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTG 300

TEM 1 301 GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA 360
      |
TEM 104 301 GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA 360

TEM 1 361 TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATC 420
      |
TEM 104 361 TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATC 420

TEM 1 421 GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT 480
      |
TEM 104 421 GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT 480

TEM 1 481 GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGATACCACGATG 540
      |
TEM 104 481 GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGATACCACGATG 540

TEM 1 541 CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATTAATACTGGCGAACTACTTACTCTAGCT 600
      |
TEM 104 541 CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATTAATACTGGCGAACTACTTACTCTAGCT 600

TEM 1 601 TCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGC 660

```

```

|||||
TEM 104 601 TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC 660

TEM 1 661 TCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT 720
|||||
TEM 104 661 TCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT 720

TEM 1 721 CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC 780
|||||
TEM 104 721 CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC 780

TEM 1 781 ACCGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA 810
| |||||
TEM 104 781 ACCGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA 809
↑

```

ANNEXE 3 : Alignement des séquences nucléotiques *blas_{SHV-1}* et *blas_{SHV-89}*

```

SHV-1   1  ATGCGTTATATTTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCACCCTGCCGCTGGCGGTACAC 60
          |||
SHV-89  1  ATGCGTTATATTTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCACCCTGCCGCTGGCGGTACAC 60
          |||
SHV-1   61  GCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACCTAAGCGAAAGCCAGCTGTCGGGCCGCGTA 120
          |||
SHV-89  61  GCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACCTAAGCGAAAGCCAGCTGTCGGGCCGCGTA 120
          |||
SHV-1   12  GGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCACAGCTGACCGCTGGCGGCCGATGAA 180
          |||
SHV-89  121  GGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCACAGCTGACCGCTGGCGGCCGATGAA 180
          |||
SHV-1  181  CGCTTTCCCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGGGTG 240
          |||
SHV-89  181  CGCTTTCCCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGGGTG 240
          |||
SHV-1  241  GATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGAC 300
          |||
SHV-89  241  GATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGAC 300
          |||
SHV-1  301  TACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGTGCC 360
          |||
SHV-89  301  TACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGTGCC 360
          |||
SHV-1  361  GCCGCCATTACCAATGAGCGATAACAGCGCCCAATCTGCTACTGGCCACCGTCGGCGGC 420
          |||
SHV89  361  GCCGCCATTACCAATGAGCGATAACAGCGCCCAATCTGCTGCTGGCCACCGTCGGCGGC 420
          |||
SHV-1  421  CCCGCAGGATTGACTGCCTTTTTGCGCCAGATCGGGGACAACGTCACCCGCCTTGACCGC 480
          |||
SHV89  421  CCCGCAGGATTGACTGCCTTTTTGCGCCAGATCGGGGACAACGTCACCCGCCTTGACCGC 480
          |||
SHV-1  481  TGGGAAACGGAACCTGAATGAGGCGCTTCCCGGCGACGCCCGGACACCACTACCCCGGCC 540
          |||
SHV89  481  TGGGAAACGGAACCTGAATGAGGCGCTTCCCGGCGACGCCCGGACACCACTACCCCGGCC 540
          |||
SHV-1  541  AGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTTCGCAA 600
          |||
SHV89  541  AGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTTCGCAA 600
          |||
SHV-1  601  CGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGGACCGTTGATCCGCTCCGTG 660
          |||
SHV89  601  CGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGGACCGTTGATCCGCTCCGTG 660
          |||
SHV-1  661  CTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGAGCTGGCGAGCGGGGTGCGCGGG 720
          |||
SHV89  661  CTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGAGCTGGCGAACGGGGTTCGCGGG 720
          |||
SHV-1  721  ATTGTCGCCCTGCTTGGCCGAATAACAAAGCAGAGCGCATTGTGGTGATTTATCTGCGG 780
          |||
SHV89  721  ATTGTCGCCCTGCTTGGCCGAATAACAAAGCAGAGCGCATTGTGGTGATTTATCTGCGG 780
          |||
SHV-1  781  GATACCCCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCAGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGCGCTG 840
          |||
SHV89  781  GATACCCCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCAGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGCGCTG 840
          |||
SHV-1  841  ATCGAGCACTGGCAACGCTAA 861
          |||
SHV89  841  ATCGAGCACTGGCAACGCTAA 861
          |||

```

ANNEXE 4 : Alignement des séquences nucléotiques *blashV-2* et *blashV-12*

```

SHV-2  1    ATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCACCCTGCCGCTGGCGGTACAC  60
          |||
SHV-12  1    ATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCACCCTGCCGCTGGCGGTACAC  60
          |||

SHV-2  61    GCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACAAAGCGAAAGCCAGCTGTCTGGGCCGCGTA  120
          |||
SHV-12  61    GCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACAAAGCGAAAGCCAGCTGTCTGGGCCGCGTA  120
          |||

SHV-2  121   GGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCACGCTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAA  180
          |||
SHV-12  121   GGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCACGCTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAA  180
          |||

SHV-2  181   CGCTTTCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTG  240
          |||
SHV-12  181   CGCTTTCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTG  240
          |||

SHV-2  241   GATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGAC  300
          |||
SHV-12  241   GATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGAC  300
          |||

SHV-2  301   TACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGCGCC  360
          |||
SHV-12  301   TACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGCGCC  360
          |||

SHV-2  361   GCCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGCAATCTGCTACTGGCCACCGTCGGCGGC  420
          |||
SHV-12  361   GCCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGCAATCTGCTACTGGCCACCGTCGGCGGC  420
          |||

SHV-2  421   CCCGCAGGATTGACTGCCTTTTGGCGCCAGATCGGCGACAACGTACCCGCCTTGACCGC  480
          |||
SHV-12  421   CCCGCAGGATTGACTGCCTTTTGGCGCCAGATCGGCGACAACGTACCCGCCTTGACCGC  480
          |||

SHV-2  481   TGGGAAACGGAAGTGAATGAGGCGCTTCCCGCGACGCCCCGACACCACTACCCCGGCC  540
          |||
SHV-12  481   TGGGAAACGGAAGTGAATGAGGCGCTTCCCGCGACGCCCCGACACCACTACCCCGGCC  540
          |||

SHV-2  541   AGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTGCAA  600
          |||
SHV-12  541   AGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTGCAA  600
          |||

SHV-2  601   CGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGGACCGTTGATCCGCTCCGTG  660
          |||
SHV-12  601   CGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGGACCGTTGATCCGCTCCGTG  660
          |||

SHV-2  661   CTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGAGCTAGCGAGCGGGTGCAGCGGG  720
          |||
SHV-12  661   CTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGAGCTAGCGAGCGGGTGCAGCGGG  720
          |||

SHV-2  721   ATTGTGCGCCTGCTTGGCCGAATAACAAAGCAGAGCGCATTGTGGTGATTTATCTGCGG  780
          |||
SHV-12  721   ATTGTGCGCCTGCTTGGCCGAATAACAAAGCAGAGCGCATTGTGGTGATTTATCTGCGG  780
          |||

SHV-2  781   GATACCCCGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCAGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGCGCTG  840
          |||
SHV-12  781   GATACCCCGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCAGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGCGCTG  840
          |||

SHV-2  841   ATCGAGCACTGGCAACGCTAA  861
          |||
SHV-12  841   ATCGAGCACTGGCAACGCTAA  861
          |||

```

ANNEXE 5 : Aligement des séquences nucléotiques *blashV-2* et *blashV-27*

SHV-2	1	ATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCACCCTGCCGCTGGCGGTACAC	60
SHV-27	1	ATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCACCCTGCCGCTGGCGGTACAC	60
SHV-2	61	GCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACCTAAGCGAAAGCCAGCTGTTCGGGCCGCGTA	120
SHV-27	61	GCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAACCTAAGCGAAAGCCAGCTGTTCGGGCCGCGTA	120
SHV-2	121	GGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCGACGCTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAA	180
SHV-27	121	GGCATGATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCGACGCTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAA	180
SHV-2	181	CGCTTTCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTG	240
SHV-27	181	CGCTTTCATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTG	240
SHV-2	241	GATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGAC	300
SHV-27	241	GATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGAC	300
SHV-2	301	TACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTTGCCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGCGCC	360
SHV-27	301	TACTCGCCGGTCAGCGAAAAACATCTTGCCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGTGCC	360
SHV-2	361	GCCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGCAATCTGCTACTGGCCACCGTCGGCGGC	420
SHV-27	361	GCCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGCAATCTGCTGCTGGCCACCGTCGGCGGC	420
SHV-2	421	CCCGCAGGATTGACTGCCTTTTTGCGCCAGATCGGCGACAACGTACCCCGCCTTGACCGC	480
SHV-27	421	CCCGCAGGATTGACTGCCTTTTTGCGCCAGATCGACGACAACGTACCCCGCCTTGACCGC	480
SHV-2	481	TGGGAAACGGAACGAATGAGGCGCTTCCC GGCGACGCCCGCGACACCACTACCCCGGCC	540
SHV-27	481	TGGGAAACGGAACGAATGAGGCGCTTCCC GGCGACGCCCGCGACACCACTACCCCGGCC	540
SHV-2	541	AGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTTCGCAA	600
SHV-27	54	AGCATGGCCGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTTCGCAA	600
SHV-2	601	CGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGGACCGTTGATCCGCTCCGTG	660
SHV-27	601	CGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGGACCGTTGATCCGCTCCGTG	660
SHV-2	661	CTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGAGCTAGCGAGCGGGGTGCGCGCGGG	720
SHV-27	661	CTGCCGGCGGGCTGGTTTATCGCCGATAAGACCGGAGCTGGCGAGCGGGGTGCGCGCGGG	720
SHV-2	721	ATTGTCGCCCTGCTTGCCCCGAATAACAAAGCAGAGCGCATTGTGGTGATTTATCTGCGG	780
SHV-27	721	ATTGTCGCCCTGCTTGCCCCGAATAACAAAGCAGAGCGCATTGTGGTGATTTATCTGCGG	780
SHV-2	781	GATACCCCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCAGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGCGCTG	840
SHV-27	781	GATACCCCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCAGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGCGCTG	840
SHV-2	841	ATCGAGCACTGGCAACGCTAA	861
SHV-27	841	ATCGAGCACTGGCAACGCTAA	861

ANNEXE 6 : Alignement des séquences nucléotiques *blas_{SHV-2}* et *blas_{SHV-100}*

SHV-2	1	ATGCGTTA	TATTTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCACCCTGCCGCTGGCGGTACAC	60
SHV100	1	ATGCGTTT	TATTTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCACCCTGCCGCTGGCGGTACAC	60
SHV-2	61	GCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTA	AACTAAGC-----	96
SHV100	61	GCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTA	AACTAAGCGAAAGCCAGCTGTCGGGCCGCGTA	120
SHV-2	97	-----GAAAGCCAGCTGTCGGGCCGCGT	AGGCATGATAGAAATGGATCTG	141
SHV100	121	GGCATGATAGAAAGC	GAAAGCCAGCTGTCGGGCCGCGTAGGCATGATAGAAATGGATCTG	180
SHV-2	142	GCCAGCGGCCGCACGCTGACCGCTGGCGCGCCGATGAACGCTT	TCCCATGATGAGCACC	201
SHV100	181	GCCAGCGGCCGCACGCTGACCGCTGGCGCGCCGATGAACGCTT	TCCCATGATGAGCACC	240
SHV-2	202	TTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGT	GACGAACAGCTG	261
SHV100	241	TTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGT	GACGAACAGCTG	300
SHV-2	262	GAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGT	CAGCGAAAAA	321
SHV100	301	GAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGT	CAGCGAAAAA	360
SHV-2	322	CACCTTGCCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGCGCCGCCATTACCAT	GAGCGAT	381
SHV100	361	CATCTTGCCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGCGCCGCCATTACCAT	GAGCGAT	420
SHV-2	382	AACAGCGCCGCAATCTGCTACTGGCCACCGTCGGCGCCCCGAGGATTGACT	GCCTTT	441
SHV100	421	AACAGCGCCGCAATCTGCTGCTGGCCACCGTCGGCGCCCCGAGGATTGACT	GCCTTT	480
SHV-2	442	TTGCGCCAGATCGGCGACAACGTCACCCGCCTTGACCGCTGGGAAACGGAAC	TGAATGAG	501
SHV100	481	TTGCGCCAGATCGGCGACAACGTCACCCGCCTTGACCGCTGGGAAACGGAAC	TGAATGAG	540
SHV-2	502	GCGCTTCCCGGCGACGCCGCGACACCACTACCCGGCCAGCATGGCCGCGACCC	TGCGC	561
SHV100	541	GCGCTTCCCGGCGACGCCGCGACACCACTACCCGGCCAGCATGGCCGCGACCC	TGCGC	600


```

SHV-2  562  AAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTTCGCAACGGCAGCTGCTGCAGTGGATG  621
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
SHV100 601  AAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTTCGCAACGGCAGCTGCTGCAGTGGATG  660

SHV-2  622  GTGGACGATCGGGTCGCCGGACCGTTGATCCGCTCCGTGCTGCCGGCGGGCTGGTTTATC  681
          ||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
SHV100 661  GTGGACGATCGAGTCGCCGGACCGTTGATCCGCTCCGTGCTGCCGGCGGGCTGGTTTATC  720

          ↓
SHV-2  682  GCCGATAAGACCGGAGCTAGCGAGCGGGGTGCGCGCGGGATTGTCGCCCTGCTTGGCCCG  741
          |||||||||||||||| |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||
SHV100 721  GCCGATAAGACCGGAGCTCGCGAACGGGGTGCAGCGCGGGATTGTCGCCCTGCTTGGCCCG  780
          ↑

SHV-2  742  AATAACAAAGCAGAGCGCATTTGTGGTGATTTATCTGCGGGATACCCCGGCGAGCATGGCC  801
          |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
SHV100 781  AATAACAAAGCAGAGCGCATCGTGGTGATTTATCTGCGGGATACCCCGGCGAGCATGGCC  840

SHV-2  802  GAGCGAAATCAGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGGCTGATCGAGCACTGGCAACGCTAA  861
          |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
SHV100 841  GAGCGAAATCAGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGGCTGATCGAGCACTGGCAACGCTAA  900

```

ANNEXE 7 : Code génétique

Acide aminé	Code	Codon	Acide aminé	Code	Codon	Acide aminé	Code	Codon
Arginine Arg	R	CGU CGC CGA CGG AGA AGG	Glycine Gly	G	GGU GGC GGA GGG	Proline Pro	P	CCU CCC CCA CCG
Alanine Ala	A	GCU GCC GCA GCG	Histidine His	H	CAU CAC	Sérine Ser	S	UCU UCC UCA UCG AGU AGC
Asparagine Asn	N	AAU AAC	Isoleucine Ile	I	AUU AUC AUA	Thréonine Thr	T	ACU ACC ACA ACG
Acide aspartique Asp	D	GAU GAC	Leucine Leu	L	UUA UUG CUU CUC CUA CUG	Tryptophane Trp	W	UGG
Cystéine Cys	C	UGU UGC	Lysine Lys	K	AAA AAG	Tyrosine Tyr	Y	UAU UAC
Glutamine Gln	Q	CAA CAG	Méthionine Met	M	AUG	Valine Val	V	GUU GUC GUA GUG
Acide glutamique Glu	E	GAA GAG	Phénylalanine Phe	F	UUU UUC	STOP START		UAG UGA UAA AUG

**PUBLICATIONS
SCIENTIFIQUES**

ARTICLES PUBLIES

PUBLICATION 1 : **VICTOIRE GADOU, NATHALIE KOUADIO GUESSENND, ABALE A.TOTY, FERNIQUE KONAN, MOHAMED BAGUY OUATTARA, MIREILLE DOSSO, SEYDINA M. DIENE, JOSEPH ALLICO DJAMAN AND JEAN-MARC ROLAIN (2018).** Molecular Detection of the Arr-2 Gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Resistant to Rifampicin in Abidjan, Côte D'Ivoire. *Microbiology Research Journal International*, 23(4): 1-8, 2018; Article no.MRJI.40552 ISSN: 2456-7043

PUBLICATION 2 : **VICTOIRE GADOU, NATHALIE KOUADIO GUESSENND, ABALE A. TOTY, SEYDINA M. DIENE, JEAN-MARC ROLAIN, JOSEPH ALLICO DJAMAN, MIREILLE DOSSO (2018).** First detection of aminoglycosides resistance genes *aac(6)-Ib*, *ant(2'')-I* and *aad* in enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases in abidjan (Côte D'Ivoire). *International Journal of Microbiology Research*, ISSN: 0975-5276 & E-ISSN: 0975-9174, Volume 10, Issue 5, pp.-1171-1174.

PUBLICATION 3 : **GADOU VICTOIRE, TOTY ABALE ANATOLE, KONAN FERNIQUE, TIEKOURA KONAN BERTIN, OUATTARA MOHAMED BAGUY, GUESSENND KOUADIO NATHALIE, DJAMAN ALLICO JOSEPH (2019).** First case of *qnr* B6 and *qnr* B7 genes in enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases in Abidjan, Côte d'Ivoire. *South Asian Journal of Research in Microbiology*, 3(2): 1-6, 2019; Article no.SAJRM.48002

COMMUNICATION ORALE

GADOU VICTOIRE, GUESSENND KOUADIO NATHALIE, TOTY A. ABALE, SEYDINA M. DIENE, JEAN-MARC ROLAIN, DJAMAN JOSEPH ALLICO ET DOSSO MIREILLE (2018). Resistance aux aminosides chez les entérobactéries productrices de beta-lactamases à spectre elargi à abidjan (côte d'ivoire). Huitième édition des Rendez-Vous de l'ORMICI (Observatoire de la Résistance des Micro-organismes aux anti-infectieux en Cote d'Ivoire) du 03 au 04 Octobre 2018 à Abidjan (Côte d'Ivoire)

COMMUNICATION AFFICHEE

VICTOIRE GADOU, NATHALIE KOUADIO GUESSENND, ABALE A.TOTY, FERNIQUE KONAN, MOHAMED BAGUY OUATTARA, MIREILLE DOSSO, SEYDINA M. DIENE, JOSEPH ALLICO DJAMAN ET JEAN-MARC ROLAIN (2018). Détection moléculaire du gène *arr-2* chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* résistants à la rifampicine à Abidjan, Côte d'Ivoire

PUBLICATION 1



Molecular Detection of the *Arr-2* Gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Resistant to Rifampicin in Abidjan, Côte D'Ivoire

**Victoire Gadou^{1,2*}, Nathalie Kouadio Guessennd^{2,3}, Abalé A.Toty²,
Fernique Konan², Mohamed Baguy Ouattara², Mireille Dosso^{2,3},
Seydina M. Diène⁴, Joseph Allico Djaman^{1,2} and Jean-Marc Rolain⁴**

¹Laboratory of Biochemical Pharmacodynamics, Department of Biosciences, Felix Houphouët-Boigny University, Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

²Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, 08 BP 1563 Abidjan 08, Côte d'Ivoire.

³Laboratory of Bacteriology-Virology, Department of Medical Sciences, Felix Houphouët-Boigny University, Abidjan, Côte d'Ivoire.

⁴Research Unit on Emerging Tropical Infectious Diseases, IHU Mediterranee Infection, Faculty of Medicine and Pharmacy, Aix-Marseille University, Marseille, France.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors VG, NKG and JAD designed the study, wrote the protocol. Authors JMR, SMD and MD provided the material and equipment. Authors AAT, FK and MBO contributed to the writing and editing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/MRJI/2018/40552

Editor(s):

(1) Juliano de dea lindner, Professor, Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Brazil.

Reviewers:

(1) Masaaki Minami, Nagoya City University, Japan.

(2) Nain Taara Bukhari, University of Karachi, Pakistan.

(3) Maria Demetriou, Democritus University of Thrace, Greece.

Complete Peer review History: <http://www.sciedomain.org/review-history/24106>

Original Research Article

Received 5th January 2018

Accepted 28th March 2018

Published 11th April 2018

ABSTRACT

Aims: The aim of this study was to demonstrate the presence of rifampicin resistance *arr-2* gene in certain enterobacteria of clinical origin from various biological products.

Place and Duration of Study: National Reference Center for Antibiotics of Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, and research unit on emerging tropical infectious diseases of Aix-Marseille University,

*Corresponding author: E-mail: victoiregadou@yahoo.fr;

between January to July 2017.

Methodology: The strains were isolated from different biological samples and identified by biochemical tests and MALDI-TOF MS mass spectrometry. The Antibiotic susceptibility testing was performed by diffusion on Mueller- Hinton (MH) agar.

Results: All strains were resistant to rifampicin (100%) and amoxicillin (100%), but sensitive to imipenem and colistin. Conventional PCR using specific primers detected the *arr-2* gene in four strains, including 3 strains of *Klebsiella pneumoniae* and one strain of *Escherichia coli*. Molecular typing of the strains by MLST showed that the *E. coli* strain had ST 5 and the three strains of *K. pneumoniae* had ST 307, ST 309, ST 273 respectively.

Conclusion: This article is the first report that highlights the presence of the *arr-2* gene in enterobacteria in Côte d'Ivoire.

Keywords: *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; rifampicin; *arr-2* gene; Abidjan.

1. INTRODUCTION

Rifampicin is an antibiotic used in the treatment of tuberculosis [1], meningitis [2] and against *Staphylococcus aureus* infections [3,4]. It works by binding to the β -subunit of the RNA polymerase and inhibits the transition from initiation to elongation during transcription [5].

Resistance to rifampicin was mainly due to the mutations in the *rpoB* gene that encodes the β -subunit synthesis of bacterial RNA polymerase, resulting in decreased binding of R-RNA polymerase to rifampicin [6]. Presently, several others resistance mechanisms are identified, including efflux systems [7], glycosylation [8,9], phosphorylation [10] and inactivation of the antibiotic by ADP-ribosyltransferase (Arr) [11]. The first *arr-1* resistance gene has been described in *Mycobacterium smegmatis* [12] and subsequently the *arr-2* and *arr-3* genes have been described, carried by class I integrons in gram-negative bacilli in Europe and Asia [13,14,15]. In particular, the *arr-2* gene is present on several transposons and integrons found in strains of *Pseudomonas aeruginosa* [16], *Escherichia coli* [17], *Klebsiella pneumoniae* [13] and *Acinetobacter baumannii* [18].

The objective of the present work was to highlight the presence of the *arr-2* gene in rifampicin-resistant clinical enterobacteria isolated from Abidjan.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacterial Strains

The strains that were used in this study were 153 in number mainly of Enterobacteriaceae producing Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and those that did not. They were isolated from different biological samples, pre-

identified by biochemical tests and stored at the Center of Biological Resources (CeReB) of the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire. Their identification was confirmed by MALDI-TOF MS (Bruker) mass spectrometry.

2.2 Antibiotic Susceptibility Test

Antibiotic susceptibility was determined from young colonies grown on Mac Conkey agar (BioMérieux SA, France) for 24 hr. The antibiotics used to perform the antibiogram were: amoxicillin (25 μ g), amoxicillin + clavulanic acid (20 μ g + 10 μ g), ticarcillin + clavulanic acid (75 μ g + 10 μ g), cefotaxime (30 μ g), ceftiofuran (30 μ g), ceftriaxone (30 μ g), aztreonam (30 μ g), imipenem (10 μ g), ertapenem (10 μ g), amikacin (30 μ g), gentamicin (15 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), fosfomycin (50 μ g), colistin (50 μ g), cotrimoxazole (25 μ g), rifampicin (30 μ g). Mueller-Hinton agar growth medium was used for diffusion according to the method described by the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (CA-SFM, 2013).

2.3 Total DNA Extraction

Extraction of the total DNA from the strains was performed from 24 h young colonies using the G2 buffer contained in the EZ1 DNA Tissue Kit (QIAGEN). Using a vortex, a colony of the strain was homogenized in 200 μ L of buffer G2. The homogenate was then introduced into the EZ1 automated for extraction. The DNA thus extracted was stored at -20°C.

2.4 Gene Detection by Conventional PCR

Conventional PCR was performed for detection of *arr-2* using the following primers: *arr-2*_Forward_AATTACAAGCAGGTGCAAGGA and *arr-2*_Reverse_TTCAATGACGTGTAAACCACG. The reaction

was carried out in a reaction volume of 25 μ L consisted of 12.5 μ L of Master Mix (Quantitect Probe PCR master mix, Qiagen), 1 μ L of the primer mixture (Eurogentec), 6.5 μ L of UP water and 5 μ L of total DNA. The amplification consisted of an initial denaturation step of the double-stranded DNA for 15 min at 95°C. This step was followed by 35 amplification cycles comprising denaturation at 94°C for 1 min, hybridization at 55°C for 50 sec, elongation at 72°C for 2 min and final elongation of 7 min at 72°C.

2.5 Visualization of Amplified Genes

The PCR products were analysed using 1.5% agarose gel electrophoresis prepared with 0.5% Tris-Borate-EDTA (TBE). The BenchTop pGEM^R DNA Markers Cat.# G7521 (Promega, France) molecular weight marker were used and the migration lasted for 20 minutes at a voltage of 135 V. The visualization of the DNA bands were done on a transilluminator.

2.6 PCR, Sequencing and Molecular Typing by MLST of Resistant Strains

To determine the typical sequences of the resistant strains, a conventional PCR using specific primers of the house-keeping genes per species was carried out. The functions of these genes and the sequences of the primers were summarized in Tables 1 and 2. The purified PCR products were sequenced using the BigDye® kit (Invitrogen, Life Technologies, North America) following the manufacturer's user's guide, in the automated ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer.

Sequence analysis was performed on the MLST websites of the Pasteur Institut of Paris and MLST Warwick in order to assign a standard sequence number according to the allelic profiles of the different strains.

3. RESULTS

3.1 Antibiotics Susceptibility

All strains showed resistance 100% to rifampicin. For the resistance to amoxicillin alone, it was 100%, while the resistance rate to amoxicillin/clavulanic acid was 99.3%. The susceptibility test showed high resistance to third-generation cephalosporins, cefotaxime (85.6%), ceftriaxone (81%) and cefoxitin (80.4%) respectively. The trimethoprim-sulfamethoxazole and fosfomycin resistance levels were 86.3% and 16.3%, respectively. The aminoglycoside resistance rate was 80.4% and 81% of the strains resistant to ciprofloxacin. However, all strains were sensitive to imipenem and colistin.

3.2 Distribution of Rifampicin Resistance Genes and MLST

The *arr2* gene was detected in four strains, 1 *E. coli* and 3 *K. pneumoniae* (Fig. 1). Table 3 presents the epidemiological profile of the 4 strains carrying the *arr-2* gene. Fig. 2 shows the visualization of the 7 house-keeping genes of the *E. coli* and *K. pneumoniae* species after electrophoresis. Strain typing by MLST analysis showed that *E. coli* strain had ST 5 and all three strains of *K. pneumoniae* had ST 273, ST 307 and ST 309 respectively.

Table 1. Primers used in MLST for *E. coli*

Gene (function)	Primer sequence (5' \rightarrow 3')	Amplicon size (bp)
<i>adk</i> (adenylate kinase)	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG (F) CCGTCAACTTTTCGCGTATTT (R)	583
<i>fumC</i> (fumarate hydratase)	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC (F) GTACGCAGCGAAAAAGATTC (R)	806
<i>icd</i> isocitrate/isopropylmalate déshydrogénase)	ATGGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA (F) GGACGCAGCAGGATCTGTT (R)	878
<i>purA</i> (adenylosuccinate déshydrogénase)	CGCGCTGATGAAAGAGATGA (F) CATACGGTAAGCCACGCAGA (R)	816
<i>gyrB</i> (DNA gyrase)	TCGGCGACACGGATGACGGC (F) ATCAGGCCTTCACGCGCATC (R)	911
<i>recA</i> (ATP/GTP binding motif)	CGCATTGCTTTACCCTGACC (F) TCGTGAAATCTACGGACCGGA (R)	780
<i>mdh</i> (malate déshydrogénase)	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG (F) TTAACGAACCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT (R)	932

Table 2. Primers used in MLST for *K. pneumoniae*

Gene (function)	Primer sequence(5'►3')	Amplicon size (bp)
<i>rpoB</i> (beta-subunit of RNA polymerase)	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAAATGGCWGAGAACCA(F) TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCTTCGAAGTTGTAACC (R)	501
<i>gapA</i> (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACTCCACTCACGG (F) TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT (R)	450
<i>mdh</i> (malate dehydrogenase)	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTACCCAACCTCGCTTCAGGTTTCAG (F) TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTCCCAGCAGCAG (R)	477
<i>pgi</i> (phosphoglucose isomerase)	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC (F) TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT (R)	432
<i>phoE</i> (phosphorine E)	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG (F) TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAACTGGTAGGTGAT (R)	420
<i>inf B</i> (translation initiation factor 2)	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG (F) TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTTCAGCTCAAGAACTTC (R)	318
<i>tonB</i> (periplasmic energy transducer)	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG (F) TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATTTCGCCGGCTGRGCRGAGAG (R)	414

Table 3. Epidemiologic profile of the 4 strains carrying the *arr-2* gene

Strains	Services	Biological sample	Typical sequences
<i>E. coli</i> 725YO/15	Neurology	Blood	ST 5
<i>K. pneumoniae</i> 868Y/13	Pediatrics	Suppuration	ST 307
<i>K. pneumoniae</i> 1141Y/15	Neonatal maternity	Urine	ST 309
<i>K. pneumoniae</i> 654UB/15	pneumonology	sputum	ST 273

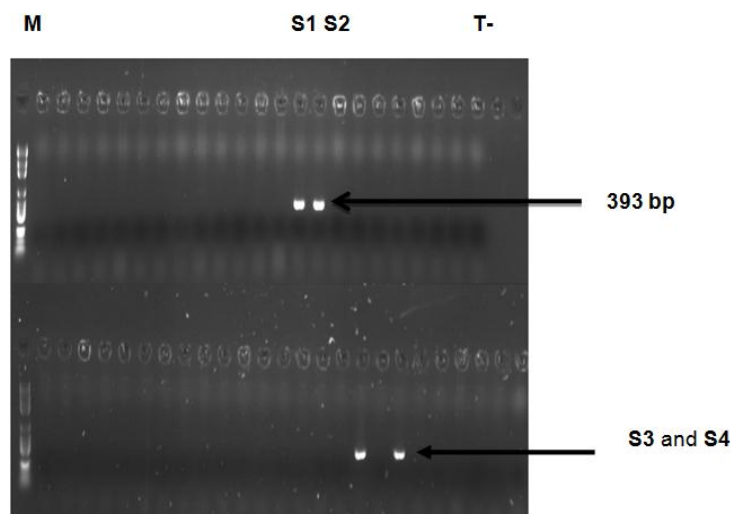


Fig. 1. Electrophoresis of *arr2* genes

M: Molecular weight marker

T:- negative control

S1: *K. Pneumoniae* 868Y/13

S2: *K. Pneumoniae* 1141Y/15

S3: *E. coli* 725YO/15

S4: *K. Pneumoniae* 654UB/15

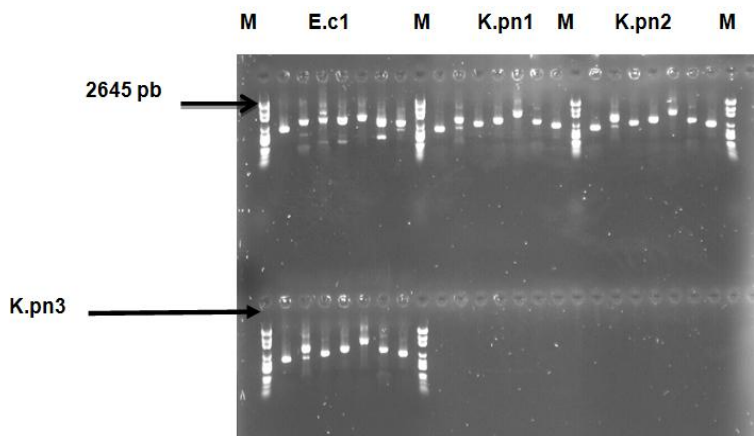


Fig. 2. Visualization of 7 house-keeping genes of *E. coli* and *K. pneumoniae*

E.c1: *E. coli* 725YO/15

K.pn1: *K. Pneumoniae* 868Y/13

K.pn2: *K. Pneumoniae* 1141Y/15;

K.pn3: *K. Pneumoniae* 654UB/15

4. DISCUSSION

Resistance to rifampicin is a serious public health problem [19] because it is the first-line drug for the treatment of tuberculosis [20] and the prevention of meningitis [2]. Rifampicin resistance induced by the *arr-2* gene has been described in several bacterial strains including *P. aeruginosa* [16], *E. coli* [17], *K. pneumoniae* [13]

and *A. baumannii* [18]. Detection of the *arr-2* gene in strains of *K. pneumoniae* and *E. coli* is the first of its kind in Côte d'Ivoire could explain rifampicin resistance observed in strains. However, the presence of this gene only in four strains while the resistance rate was 100%, suggests that strains use others mechanisms of resistance to rifampicin such as efflux systems [7], glycosylation [8,9], phosphorylation [10] or

resistance may be due to other resistance genes such as *arr-3* [13].

Moreover, the typing of strains with the *arr-2* gene by MLST analysis showed that an *E. coli* strain had ST 5. This sequence (ST 5) was found in an *E. coli* strain isolated from stool from a patient in Douala, Cameroon, which also carried the β -lactam resistance genes *blaNDM-1* and *blaOXA-1*. The patient had been hospitalized for a month in Douala for an inflammatory syndrome associated with renal failure before his transfer to Paris [21].

Also, the three strains of *K. pneumoniae* carrying the *arr-2* gene had ST 273, ST 307, and ST 309, respectively. These different standard sequences have also been obtained elsewhere in the world. The type 273 sequence was found in a strain of *K. pneumoniae*, isolated from a patient with pneumonia in the Philippines, which carried the *blaNDM-7* gene [22]. *K. pneumoniae* ST 273 has been reported in Italy, Norway, Russia and the United Kingdom. These studies reported that ST273 isolates carried various carbapenemase genes including *blaKPC*, *blaNDM-1* and *blaVIM*, and ST 273 is known to have the epidemic potential [23,24].

Regarding the ST 307 sequence, work done in Italy showed that strains of *K. pneumoniae* isolated from three Italian hospital centers and which carried the *KPC-2*, *KPC-3* and *blaCTXM-15* genes had ST 307 [25]. ST 307 was first described in 2008 in the multi-locus sequence typing database (MLST) (an unpublished isolate) and has since been described in 2013 in the United States [26]. It was initially associated with CTX-M-15 expanded spectrum β -lactamase production. The acquisition of a KPC enzyme is posterior to that of CTX-M-15, as Kp ST 307 CTX-M-15 producer was previously reported at a high rate in Italy, Korea, Pakistan, Morocco and in domestic animals from Japan [27-28].

As for the type 309 sequence, it was found in strains of *K. pneumoniae* isolated from hospitalized patients in northern China [29].

4. CONCLUSION

This study has highlighted the high resistance to rifampicin in enterobacteria of clinical origin in Côte d'Ivoire. The *arr-2* resistance gene was detected in only four strains, suggesting that there would be other mechanisms of rifampicin resistance used by the strains that should be

explored. Multilocus sequence typing (MLST) has made it possible to genetically characterize resistant strains and highlight the circulation of various clones around the world.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Baysarowich J, Koteva K, Hughes DW, Ejim L, Griffiths E, Zhang K, Junop M, Wright GD. Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: Structure and diversity of Arr. PNAS. 2008;105: 12.
2. Taha MK, Zarantonelli ML, Ruckly C, Giorgini D, Alonso JM. Rifampin-resistance *Neisseria meningitidis*. Emerg. Infect. Dis. 2006;12:859-860.
3. Kapusnik JE, Parenti F, Sande MA. The use of rifampicin in staphylococcal infections-a review. J. Antimicrob. Chemother. 1984;13:61-66.
4. Leung MJ, Kell AD, Collignon P. Antibiotic guidelines for meningococcal prophylaxis. Med. J. Aust. 1998;169:396.
5. McClure WR, Cech CL. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. J. Biol. Chem. 1978;253:8949-8956.
6. Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels F, Salfinger M, Nolan CM, Abe C, Sticht-Groh V, Gillis TP. Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 1994;38:2380-2386.
7. Chandrasekaran S, Lalithakumari D. Plasmid-mediated rifampicin resistance in *Pseudomonas fluorescens*. J. Med. Microbiol. 1998;47:197-200.
8. Tanaka Y, Yazawa K, Dabbs ER, Nishikawa K, Komaki H, Mikami Y, Miyaji M, Morisaki N, Iwasaki S. Different rifampicin inactivation mechanisms in *Nocardia* and related taxa. Microbiol. Immunol. 1996;40:1-4.
9. Yazawa K, Mikami Y, Maeda A, Akao M, Morisaki N, Iwasaki S. Inactivation of rifampin by *Nocardia brasiliensis*. Antimicrob. Agents Chemother. 1993; 37:1313-1317.
10. Yazawa K, Mikami Y, Maeda A, Morisaki N, Iwasaki S. Phosphorylative inactivation

- of rifampicin by *Nocardia otitidiscaviarum*. J. Antimicrob. Chemother. 1993;33:1127-1135.
11. Dabbs ER, Yazawa K, Mikami Y, Miyaji M, Morisaki N, Iwasaki S, Furihata K. Ribosylation by mycobacterial strains as a new mechanism of rifampin inactivation. Antimicrob. Agents Chemother. 1995;39:1007-1009.
 12. Quan S, Venter H, Dabbs ER. Ribosylative inactivation of rifampin by *Mycobacterium smegmatis* is a principal contributor to its low susceptibility to this antibiotic. Antimicrob. Agents Chemother. 1997;41:2456-2460.
 13. Arlet G, Nadjar D, Herrmann JL, Donay JL, Rouveau M, Lagrange PH, Philippon A. Plasmid-mediated rifampin resistance encoded by an *arr-2*-like gene cassette in *Klebsiella pneumoniae* producing an AAC-1 class C β -lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 2001;45:2971-2972.
 14. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-lactamase gene, *blaSIM-1*, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob. Agents Chemother. 2005;49:4485-4491.
 15. Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. Antimicrob. Agents Chemother. 2005;49:71-76.
 16. Tribuddharat C, Fennewald P. Integron-mediated rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 1999;43:960-962.
 17. Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P. 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. 2001;183:235-249.
 18. Houang ET, Chu YW, Lo WS, Chu KY, Cheng AF. Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (*arr-2*) and metallo-beta-lactamase (*blaIMP-4*) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. Antimicrob. Agents Chemother. 2003;47:1382-1390.
 19. Sam IC, Drobniewski F, More P, Kemp M, Brown T. *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance, United Kingdom. Emerg. Infect. Dis. 2006;12:752-759.
 20. Grosset JH. Present status for chemotherapy for tuberculosis. Rev. Infect. Dis. 1989;11:347-352.
 21. Smits SL, Leeuwen MV, Schapendonk CME, Schürch AC, Bodewes R, Haagmans BL, Osterhaus ADME. New Delhi Metallo- β -Lactamase 4-producing *Escherichia coli* in Cameroon. Emerg Infectious Diseases. 2012;18:9.
 22. Chou A, Roa M, Evangelista MA, Sulit AK, Lagamayo E, Torres BC, Klinzing DC, Daroy MLG, NavoaNg G, Sucgang R, Zechiedrich L. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST273 Carrying blaNDM-7 and ST656 Carrying blaNDM-1 in Manila, Philippines. Microbial Drug Resistance. 2016;22:7.
 23. Samuelsen O, Toleman MA, Hasseltvedt V, Fursted K, Leegaard TM, Walsh TR, Sundsfjord A, Giske CG. Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance. Clin. Microbiol. Infect. 2011;17:1811-1816.
 24. Ageevets VA, Partina IV, Lisitsyna ES, Iliina EN, Lobzin YV, Shlyapnikov SA, Sidorenko SV. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. Int. J. Antimicrob. Agents. 2014;44:152-155.
 25. Villa LCF, Fortini D, Brisse S, Passet V, Bonura C, Endimiani A, Mammina C, Ocampo AM, Jimenez JN, Doumith M, Woodford N, Hopkins K, Carattoli A. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. Microbial Genomics. 2017;3.
 26. Castanheira M, Farrell SE, Wanger A, Rolston KV, Jones RN. Rapid expansion of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in two Texas hospitals due to clonal spread of ST258 and ST307 lineages. Microb Drug Resist. 2013;19:295-297.
 27. Girlich D, Bouihat N, Poirel L, Benouda A, Nordmann P. 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. 2014; 20:350–354.
28. Park DJ, Yu JK, Park KG, Park YJ. Genotypes of ciprofloxacin resistant *Klebsiella pneumoniae* in Korea and their characteristics according to the genetic lineages. Microb Drug Resist. 2015;21: 622-630.
29. Zhao J, ChenJ, ZhaoM, Qiu X, Chen X, Zhang W, SunR, Ogutu JO, Zhang F. Multilocus Sequence Types and Virulence Determinants of Hypermucoviscosity-Positive *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Community-Acquired Infection Cases in Harbin, North China. J. Infect. Dis. 2016; 69:357-360.

© 2018 Gadou et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://www.sciencedomain.org/review-history/24106>

PUBLICATION 2



Research Article

FIRST DETECTION OF AMINOGLYCOSIDES RESISTANCE GENES AAC(6)-IB, ANT(2'')-I AND AAD IN ENTEROBACTERIACEAE PRODUCING EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASES IN ABIDJAN (CÔTE D'IVOIRE)

VICTOIRE GADOU^{1,2*}, NATHALIE KOJADIO GUESSENND^{2,3}, ABALE A. TOTY², SEYDINA M. DIENE⁴, JEAN-MARC ROLAIN⁴, JOSEPH ALLICO DJAMAN^{1,2}, MIREILLE DOSSO^{2,3}

¹Laboratory of Biochemical Pharmacodynamics, Department of Biosciences, Felix Houphouët-Boigny University, Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22 Côte d'Ivoire

²Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, 08 BP 1563 Abidjan 08

³Department of Medical Sciences of Felix Houphouët-Boigny University, Abidjan, Côte d'Ivoire

⁴Research unit on emerging tropical infectious diseases of Aix-Marseille University, IHU Mediterranee Infection, Faculty of Medicine and Pharmacy, Aix-Marseille-University, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France *Corresponding Author: Email - victoiredadou@yahoo.fr

Received: April 19, 2018; Revised: May 07, 2018; Accepted: May 08, 2018; Published: May 30, 2018

Abstract- The aim of this study was to highlight the presence of aminoglycoside resistance genes in enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Abidjan. The study involved 153 enterobacteriaceae of human origin and whose identification has been confirmed by Maldi ToF-type Mass Spectrometry. The antibiotic susceptibility testing was performed by diffusion on Mueller-Hinton E agar. The beta-lactams resistance genes were characterized by real-time PCR, conventional PCR and sequenced. While the aminoglycoside resistance genes were detected through conventional PCR directly. Of these strains 90 (58.8%) were producing broad-spectrum beta-lactamase. A high resistance rate to aminoglycosides (90%), cefotaxime (95.6%), ceftriaxone (96.7%), and ceftiofloxacin (72.2%) was observed in enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. The aminoglycoside resistance genes found were *aac (6) -Ib*, *ant (2'') -I* and *aad* at the rate of 58.9%, 8.9% and 7.8% respectively. Resistance genes to β -lactams detected were *bla_{CTX-M}* (96.7%), *bla_{TEM}* (67.8 %) and *bla_{SHV}* (27.8%). This study is the first to describe the aminoglycoside resistance genes in clinical strains of enterobacteriaceae in Abidjan.

Keywords- *Enterobacteriaceae*, *ESBL*, *aminoglycosides*, *resistance*, *Abidjan*

Citation: Victoire Gadou, *et al.*, (2018) First Detection of Aminoglycosides Resistance Genes AAC(6)-IB, ANT(2'')-I and AAD in Enterobacteriaceae Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Abidjan (Côte d'Ivoire). International Journal of Microbiology Research, ISSN: 0975-5276 & E-ISSN: 0975-9174, Volume 10, Issue 5, pp.-1171-1174.

Copyright: Copyright©2018 Victoire Gadou, *et al.*, This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Introduction

Beta-Lactams, aminoglycosides and fluoroquinolones are the main antibiotics of choice prescribed in the treatment of bacterial infections, especially in enterobacteriaceae [1]. However, their abusive and uncontrolled use has led to the gradual development of resistance to these microorganisms [2]. The production of β -lactamases in enterobacteria is the major mechanism for β -lactam resistance. Starting from the first β -lactamases (TEM, SHV) described the extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) have been derived and their spectrum of action now extends to third-generation cephalosporins [3]. These β -lactamases have diversified with the explosion of type CTX-M particularly CTXM-15, which is responsible for epidemics of colonization and nosocomial infections worldwide [4]. As regards to resistance to fluoroquinolones, it is chromosomal or plasmidic. Chromosomal resistance is manifested by the alteration in the target enzymes DNA-gyrase and topoisomerase IV or by reduction of the production of porins, which may lead to a decrease in the intracellular concentration of the antibiotic [5]. The genetic determinant of the plasmid resistance of enterobacteria to fluoroquinolones is the *qnr* gene whose main characteristic is to be carried by a class 1 integron, highly mobile between different plasmids, and which causes an acceleration of the diffusion of resistance [6]. As for aminoglycoside resistance, it has been attributed mainly to the inactivation of the target enzymes by the modifying enzymes (acetyl transferases, nucleotidyl transferases and phospho-

transferases [7]. However, the methylation of 16S rRNA within the 30S sub-unit of bacterial strains by genes methylation has recently emerged as a mechanism of high resistance rate to aminoglycoside (Arbekacin, Amikacin, Tobramycin, And Gentamicin) [8]. The dissemination of resistance genes between bacteria has led to the appearance of bacteria that are resistant to several antibiotics (multidrug-resistant bacteria or MDR), particularly in broad-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae [9]. The presence of ESBLs is frequently associated with certain genes that confer resistance to other classes of antibiotics [10]. This situation is the cause of therapeutic failures and an increase in morbidity and mortality [11]. In Côte d'Ivoire the presence and spreading of ESBLs strains has been reported in enterobacteria of human origin [12, 13]. The ESBL of the type TEM, SHV, CTXM have been described and often associated with quinolone resistance genes [14]. However very little data are available on the resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae, hence our interest. The objective of this study was to highlight the presence of aminoglycoside resistance genes in clinical strains of enterobacteriaceae producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases isolated in Abidjan.

Material and methods

Bacterial isolates: The strains included in this study were enterobacteriaceae isolated from January 2012 to December 2015.

These strains were isolated from urine, blood, sputum, pleural fluid and ascites from different Hospital Centres in Abidjan. These strains were previously pre-identified and stored at the Biological Resources Centre of the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire. Identification of strains was confirmed by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) (Bruker).

Antibiotic susceptibility test and phenotypic detection of ESBL

The susceptibility testing was performed using Mueller-Hinton E agar (BioMérieux SA, France) by the standard method of diffusion in agar medium described by the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (CA-SFM, 2013). The antibiotics used to perform the antibiogram were: amoxicillin (25µg), amoxicillin + clavulanic acid (20µg + 10µg), ticarcillin + clavulanic acid (75µg + 10µg), cefotaxime (30µg), ceftioxitin (30µg), ceftriaxone (30µg), aztreonam (30µg), imipenem (10µg), ertapenem (10µg), amikacin (30µg), gentamicin (15µg), ciprofloxacin (5µg), fosfomycin (50µg), colistin (50µg), cotrimoxazole (25µg), rifampicin (30µg). The phenotypic detection of ESBLs was carried out by the double synergy test comprising clavulanic acid, cefotaxime, ceftriaxone, aztreonam [15].

Detection of resistance genes

The kit "EZ1 DNA Tissue" (Qiagen) was used to extract the total bacterial DNA of each resistant strains. The beta-lactams resistance genes were detected through real-time PCR and conventional PCR. Aminoglycoside resistance genes were searched directly by conventional PCR.

Real-time PCR for detection of beta-lactams (*bla*) resistance genes

The reaction was carried out in a reaction volume of 20 µL composed of 10 µL of Master Mix (Qiagen Quantitect Probe PCR master mix), 2 µL of Forward and Reverse primers (Eurogentec), 2 µL of DNase-free water (Invitrogen), 1 µL probe (Life Technologies) and 5µL of total DNA diluted to 10%. The amplification procedure consisted of an initial denaturation step of the double-stranded DNA for 15 min at 95°C, followed by 35 cycles of amplification of the target DNA including denaturation at 95°C for 1s., hybridization and elongation at 60°C for 35s. Primers and specific probe for real-time PCR were summarized in [Table-1].

Conventional PCR amplification and electrophoresis

The target genes for beta-lactams were *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, for the aminoglycoside *aac(6)-Ib*, *ant(2'')-I*, *aad*. The reaction was carried out in a reaction volume of 25 µL composed of 12.5 µL of Master Mix (Quantitect Probe PCR master mix, Qiagen), 1 µL of Forward and Reverse primers (Eurogentec) [Table-2], 6.5 µL of DNase-free water (Invitrogen) and 5 µL of total DNA. The amplification consisted of an initial denaturation step of the DNA for 15 min at 95°C. This step was followed by 35 amplification cycles comprising denaturation at 94°C for 1 min, hybridization at 55°C for 50 sec, elongation at 72°C for 2 min and a final elongation step of 7 min at 72°C. The amplification products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel prepared with 0.5% Tris-Borate-EDTA. The DNA bands of the amplicons were visualized on a transilluminator.

DNA sequencing

The purified amplification products were sequenced using the BigDye® kit (Life Technologies) in an automate ABI PRISM 3730xl DNA Analyzer. The same primers used for the detection of resistance genes by conventional PCR were used to sequence some resistance genes. The obtained nucleotide sequences were analysed by local BLAST in the ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation) database of IHU-Marseille.

Results

Identification and susceptibility to antibiotics

A total of 153 enterobacteriaceae composed of 71 *Escherichia coli*, 57 *Klebsiella pneumoniae*, 22 *Enterobacter cloacae*, 2 *Citrobacter freundii*, and 1 *Morganella morganii* were identified. Of these strains 90 (58.8%) were producing ESBL and the ESBL distribution by species was 44 *E. coli*, 31 *K. pneumoniae* and 15 *E.*

cloacae. The susceptibility test showed a high third-generation cephalosporins resistance rate respectively 95.6% to cefotaxime, 96.7% to ceftioxitin and 72.2% to ceftioxitin in enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. The aztreonam and ertapenem resistance levels were 95.6% and 31.1% respectively. Among the ESBL 90% (81 strains) were resistant to gentamicin while 10% (9 strains) were resistant to amikacin [Table-3].

Types of β-lactamases genes

Detection of *bla* genes showed the presence of *bla_{TEM}* (67.8 %), *bla_{SHV}* (27.8%), *bla_{CTX-M-1}* (96.7%) genes. Sequencing of *bla_{TEM}* genes revealed the presence of *bla_{TEM-191}* (13.3%), *bla_{TEM-104}* (11.1%) and *bla_{TEM-198}* (3.3%). The distribution of the *bla_{SHV}* gene as follows: *bla_{SHV-12}* (2.2%), *bla_{SHV-27}* (1.1%), *bla_{SHV-100}* (8.9%), *bla_{SHV-83}* (1.1%), *bla_{SHV-89}* (2.2%), *bla_{SHV-106}* (2.2%) and *bla_{SHV-150}* (1.1%). For *bla_{CTX-M}* gene, the distribution showed the presence of *bla_{CTX-M-15}* (44.4%) and *bla_{CTX-M-1}* (1.1%).

Distribution of aminoglycoside resistance genes

The detection of aminoglycoside resistance genes has shown the presence of the *aac(6)-Ib*, *ant(2'')-I* and *aad* genes at variable rates in Enterobacteriaceae producing ESBL. The *aac(6)-Ib* gene was detected in 53 strains (58.9%) against 8 strains (8.9%) for the *ant(2'')-I* gene. The *aad* gene was detected in 7 strains (7.8%) and sequencing identified the *aad1* gene in one strain (1.1%) and *aad2* in 6 strains (6.7%).

Discussion

The aim of this study was to highlight the presence of aminoglycoside resistance genes in clinical strains of enterobacteriaceae producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases isolated in Abidjan. We determined the prevalence of ESBL producing enterobacteria at 58.8%. This rate is higher than those of previous studies that reported prevalences of 9 and 56.2% respectively in ESBL-producing enterobacteria in Côte d'Ivoire [13, 16]. The significant increase in the prevalence of ESBL could be explained due to the abuse and inappropriate use of antibiotics, the main cause of the emergence of antibiotic resistance [17]. Detection of β-lactam resistance genes has also enable detection of several resistance genes. The *bla_{CTX-M}* gene was the most represented with predominance of the *bla_{CTX-M-15}*. The latter is involved in many epidemiological situations and nosocomial infections worldwide as a result of epidemic plasmid transfer [18]. Its strong presence in the strains could be the origin of the high resistance to C3G observed in this study. Indeed, a recent study conducted in Tunisia in 2014 revealed that 88% of *E. coli* strains, isolated from the urine of patients in a Tunisian hospital, were resistant to cefotaxime, they harbored the *bla_{CTX-M-15}* gene. The increased consumption of cefotaxime may have contributed to the emergence of ESBL, and in particular CTX-M [19]. Earlier work in Côte d'Ivoire has also reported the presence of this gene [20]. Moreover, the ESBLs genes of the type TEM (*bla_{TEM-191}*, *bla_{TEM-104}*, *bla_{TEM-198}*) obtained in this study are new genes described in Côte d'Ivoire. They were detected in *Klebsiella pneumoniae* strains in Switzerland and Iran [21,22]. In addition to these genes, several variants of the *bla_{SHV}* gene have been highlighted in this study. The *bla_{SHV-12}* gene was first identified in Switzerland in 1997 [23] and later reported in various continents, including Africa in Mali and Nigeria [24,25], indicating a high endemicity of Enterobacteriaceae in West Africa. In Côte d'Ivoire, *bla_{SHV-12}* has been described in previous work and associated with *qnr* genes [14]. The other genes detected namely *bla_{SHV-27}*, *bla_{SHV-83}*, *bla_{SHV-89}*, *bla_{SHV-100}*, *bla_{SHV-106}*, *bla_{SHV-150}* are new genes described in Côte d'Ivoire. The *bla_{SHV-27}* gene was detected in different plasmids isolated from *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* and associated with the resistance genes of certain antibiotics (*bla_{DHA-1}*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{TEM-1b}*, *bla_{CMY-2}*, *bla_{IMP}*, *bla_{CTX-M-14}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{SHV-12}*, *bla_{SHV-45}*, *bla_{OXA-1}*, *dfra5*, *ereA2*) [26-28]. The *bla_{SHV-89}*, *bla_{SHV-100}*, *bla_{SHV-150}*, *bla_{SHV-83}* and *bla_{SHV-106}* genes were also detected in *Klebsiella pneumoniae* strains in various parts of the world, in China, Algeria, USA and Portugal [29-32]. The β-lactamases of the type SHV-83, SHV-89 belong to phenotype 2b and are capable of hydrolyzing the penicillin and cephalosporins (cephaloridine and cephalothin) while the beta-lactamases of the type SHV-12, SHV-27, SHV-100, SHV-106, belonging to phenotype 2be are capable of hydrolysing third-generation cephalosporins (cefotaxime, ceftazidime) and aztreonam [33].

Table-1 Primers used in this study for real-time PCR

Gene name	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)
<i>Bla_{TEM}</i>	TEM_RT_F	TTCTGCTATGTGGTGCCGTA	213
	TEM_RT_R	GTCCTCCGATCGTTGCAGA	
	TEM_RT_Probe	AACTCGGTGCGCCGATACACTATTC	
<i>Bla_{CTX-M}</i>	CTXM_groupA_RT_F	CGGGCRATGGCGCARAC	105
	CTXM_groupA_RT_R	TGCRCCGGTSGTATTGCC	
	CTXM_groupA_RT_Probe	CCARCGGGCGCAGYTGGTGAC	
	CTXM_groupB_RT_F	ACCGAGCCSACGCTCAA	221
	CTXM_groupB_RT_R	CCGCTGCCGGTTTTATC	
	CTXM_groupB_RT_Probe	CCCGCGYGATACCACCACGC	
<i>Bla_{SHV}</i>	SHV_RT_F	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA	105
	SHV_RT_R	TCCTGCTGGCGATAGTGGAT	
	SHV_RT_Probe	TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG	

Table-2 Primers used for conventional PCR

Gene name	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)
<i>Bla_{TEM}</i>	TEM_F	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	861
	TEM_R	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	
<i>Bla_{CTX-M}</i>	CTX-M1_F	CCCATGGTTAAAAAATCACTGC	944
	CTX-M1_R	CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG	
<i>Bla_{SHV}</i>	SHV_F	ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC	1051
	SHV_R	TTTATGGCGTTACCTTGACC	
<i>aac(6')-Ib</i>	Aac6-1B_F	TATGAGTGGCTAAATCGAT	395
	Aac6-1B_R	CCCGCTTCTCGTAGCA	
<i>ant(2'')-I</i>	Ant(2'')-I_F	GACACAACGCAGGTCACATT	524
	Ant(2'')-I_R	CGCATATCGCGACCTGAAAGC	
<i>aad</i>	Aad_F	TTGTACGGCTCCGAGTG	812
	Aad_R	CCCAATTTGTGTAGGGCTTA	

Table-3 Resistance profile of Enterobacteriaceae producing ESBL to antibiotics

Antibiotics	Critical diamètres	Resistance rate n (%)
Amoxicillin/ clavulanic acid	16-21	90 (100)
Cefotaxime	23-26	86 (95.6)
Ceftriaxone	23-26	87 (96.7)
Cefoxitin	15-22	65 (72.2)
Ertapenem	26-28	28 (31.1)
Aztreonam	21-27	86 (95.6)
Amikacin	15-17	9 (10)
Gentamicin	16-18	81 (90)

In our study, aminoglycoside resistance was described with the detection of *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-I*, *aad1* and *aad2* genes. It is the first report of these genes in Côte d'Ivoire. The *aac(6')-Ib* gene is a plasmid and chromosomal gene that confers resistance to amikacin and gentamicin [34]. It was most represented in aminoglycoside-resistant strains (56%), which is superior to the results of a study conducted in the United States where *aac(6')-Ib* was found in 50.5% of enterobacteria [35]. This gene has also been detected in some countries like Belgium, Greece, France, India [36-38]. The *ant(2'')-I* gene induces resistance to Gentamicin, Tobramycin, Dibekacin, Sisomicin, Kanamycin, and is generally transported by plasmids and transposons [39]. It was found in 8.9% of the aminoglycoside-resistant strains, this rate is lower than that found in Turkey where 46.2% of the aminoglycoside resistant strains had the *ant(2'')-I* gene [40]. The *aad1* and *aad2* genes encode an aminoglycoside-3 "adenylyltransferase labeled *ant(3'')-I* or *aad(3'')* (9) [41]. The *aad1* gene was detected for the first time in *Shigella* Isolated flexneri in Japan in the late 1950s [42]. In 1989 when integrons

were first described, this gene was found to be associated with a class 1 integron [43]. The *aad2* gene was first detected in Japan in 1965 in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* [44]. In addition to the class 1 integron, the *aad2* gene is also present in Class 1 complex integrons [45, 46].

Conclusion

The aminoglycoside resistance shown in this study, the first of its kind to be carried out in this country, showed a high rate of the *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-I* and *aad* genes among clinical strains of Enterobacteriaceae producing ESBL. New resistance genes to β -lactamase have been described and associated with resistance to aminoglycosides. Since these antibiotics (beta-lactams, aminoglycosides) are used in the treatment of many bacterial infections, the presence of resistance genes gives a cause for concern. Therefore, monitoring the prescription of these antibiotics is very necessary given the easy spreading of resistance genes between bacteria.

Application of research: This study should lead the authorities and health workers to a relevant policy of monitoring the prescription of antibiotics such as beta-lactams and aminoglycosides as well as a continuous monitoring of the resistance for a better control of the circulation of the resistant strains.

Research Category: Aminoglycosides Resistance

Abbreviation:

ESBL: Extended-Spectrum Beta-Lactamases; Bla : beta-lactam

Acknowledgement / Funding: We are grateful to the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Côte d'Ivoire for having given a scholarship in France (No. 912 / MESRS / DB / SD-BHCI / SD / CBK). We also thank Mr. Jean Marc Rolain in Research unit on emerging tropical infectious diseases for his grateful assistance and technical support.

Author Contributions: All author equally contributed

Author statement: All authors read, reviewed, agree and approved the final manuscript

Conflict of Interest: None declared

Ethical approval: This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

[1] Cantón R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F. and Coque T.M. (2008) *Clinical Microbiology Infection*, 14(1), 144-153.

[2] Shears P. (2001) *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(2), 127-130.

[3] Paterson D.L. and Bonomo R.A. (2005) *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686.

[4] Carrer A. and Nordmann P. (2011) *Pathologie Biologie*, 59(6), 133-135.

[5] Jacoby G.A. (2005) *Clinical Infectious Diseases*, 41(2), 120-126.

[6] Robicsek A., Jacoby G.A. and Hooper D.C. (2006) *Lancet Infectious Diseases*, 6(10), 629-640.

[7] Wachino J. and Arakawa Y. (2012) *Drug Resistance Updates*, 15(3), 133-148.

[8] Doi Y., Yokoyama K., Yamane K., Wachino J.I., Shibata N. and Yagi T. (2004) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(2), 491-496.

[9] Faure S (2009) *Thèse de Doctorat de l'Université de Rennes, France*, 190.

[10] Bradford P.A. (2001). *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933-951

[11] Cosgrove S.E., Kaye K.S., Eliopoulous G.M. and Carmeli Y. (2002) *Archives of Internal Medicine*, 162(2), 185-190.

[12] Yao H.A., Yapi A.D., Guessennd K.N., Oga S., Ouattara M., Kacou-N'Douba A., Dosso M. and Ouattara L. (2010) *Revue Bio-africa*, 8(1), 39-45.

[13] Guessennd N., Kacou-N'Douba A., Gbonon V., Yapi D., Ekaza E., Dosso M. and Courvalin P. (2008) *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 9(1), 63-70.

[14] Guessennd N., Bremont S., Gbonon V., Kacou-N'Douba A., Ekaza E., Lambert T., Dosso M. and Courvalin P. (2008) *Pathologie Biologie*, 56(7-8), 439-446.

[15] Bakour S., Touati A., Bachiri T., Sahli F., Tiouit D., Naim M., Azouaou M. and Rolain J.M. (2014) *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(6), 696-701.

[16] Toty A.A., Guessennd N., Akoua-Koffi C., Otokoré D.A., Meex C., Mbengue G.V., Djaman A.J., Dosso M. and Galleni M. (2016) *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.*, 5(5), 1-9.

[17] Sirinavin S. and Dowell S.F. (2004) *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15(2): 94-98.

[18] Ruppé E. (2010) *Antibiotiques* 12(1), 3-16.

[19] Mathlouthi N., Al-Bayssari C., El Salabi A., Bakour S., Ben Gwierif S., Zorgani A. A., Jridi Y., Ben Slama K. and Rolain J.M., Chouchani C. (2016) *Journal of Infection in Developing Countries*, 10(7), 718-727.

[20] Guessennd K.N., Toty A.A., Gbonon M.C., Dondelinger M., Toé E., Ouattara M.B., Tiékoura B., Konan F., Dadié A.T., Dosso M. and Galleni M. (2017) *International Journal of Biological Research*, 2(3), 05-08.

[21] Hilty M., Betsch B.Y., Bogli-Stubler K., Heiniger N., Stadler M., Kuffer M., Kronenberg A., Rohrer C., Aebi S., Endimiani A., Droz S. and Muhlemann K. (2012) *Clinical Infectious Diseases*. 55 (7), 967-975.

[22] Shahraki-Zahedani S., Rigi S., Bokaeian M., Ansari-Moghaddam A. and Moghadampour M. (2016) *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49(4), 441-445.

[23] Nuesch-Inderbinen M.T., Kayser F.H. and Hachler H. (1997) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(5), 943-949.

[24] Tande D., Boisrame-Gastrin S., Munck M.R., Hery-Arnaud G., Gouriou S. and Jallot N. (2010) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(5), 859-865.

[25] Kasap M., Fashae K., Torol S., Kolayli F., Budak F. and Vahaboglu H. (2010) *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9, 1.

[26] Muratani T., Kobayashi T. and Matsumoto T. (2006) *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27, 491-499.

[27] Abbassi M.S., Torres C., Achour W., Sanez Y. and Costa D. (2008) *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 308-314.

[28] Kiratisin P., Apisarnthanarak A., Laesripa C. and Saifon P. (2008). *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 52(8), 2818-2824.

[29] Li J.B., Cheng J., Wang Q., Chen Y., Ye Y. and Zhang X.J. (2009) *Molecular Biology Reports*, 36 (5), 1141-1148.

[30] Ramdani-Bouguessa N., Manageiro V., Jones-Dias D., Ferreira E., Tazir M. and Canic M. (2011) *Journal of Medical Microbiology*, 60, 983-987.

[31] Castanheira M., Farrell S.E., Deshpande L.M., Mendes R.E. and Jones R.N. (2013) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57(7), 3012-3020.

[32] Mendonça N., Ferreira E., Louro D. and Caniça M. (2009) *International Journal Antimicrobial Agents*, 34(1), 29-37.

[33] Liakopoulos A., Mevius D. and Ceccarelli D. (2016) *Frontiers in Microbiology*, 7, 1374.

[34] Shaw K.J., Rather P.N., Hare R.S. and Miller G.H. (1993) *Microbiological Reviews*, 57(1), 138-163.

[35] Park C.H., Robicsek A., Jacoby G.A., Sahm D. and Hooper D.C. (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50(11), 3953-3955.

[36] Miller G. H., Sabatelli F.J., Hare R.S., Glupczynski Y., Mackey P. and Shlaes D. (1997) *Clinical Infectious Diseases*, 24(1), 46-62.

[37] Chaudhary M. and Payasi A. (2014) *Global Journal of Pharmacology*, 8, 73-79.

[38] Vakulenko S.B. and Mobashery S. (2003) *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 430-450.

[39] Cameron F.H., Groot Obbink D.J., Ackerman V.P. and Hall R.M. (1986) *Nucleic Acids Research*, 14(21), 8625-8635.

[40] Over U., Gur D., Unal S. and Miller G.H. (2001) *Clinical Microbiology and Infection*, 7(9), 470-478.

[41] Ramirez M.S. and Tolmasky M.E. (2010) *Drug resistance Update*, 13, 151-171. Nakaya R., Nakamura A. and Murata Y. (1960) *Biochemical Biophysical Research Communications*, 3, 654-659.

[42] Stokes H.W. and Hall R.M. (1989) *Molecular Microbiology*, 3, 1669-1683.

[43] Kazama H., Kizu K., Iwasaki M., Hamashima H., Sasatsu, M. and Arai T. (1995) *FEMS Microbiology Letters*, 134, 137-141.

[44] Boyd D., Cloeckert A., Chaslus-Dancla E. and Mulvey M.R., (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 1714-1722.

[45] Boyd D.A., Shi X., Hu Q.H., Ng L.K., Doublet B., Cloeckert A. and Mulvey M.R. (2008) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52, 340-344

PUBLICATION 3



First Case of Qnr B6 and Qnr B7 Genes in Enterobacteriaceae Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Abidjan, Côte D'ivoire

Gadou Victoire^{1,2*}, Toty Abalé Anatole², Konan Fernique²,
Tiékoura Konan Bertin², Ouattara Mohamed Baguy²,
Guessennnd Kouadio Nathalie^{2,3} and Djaman Allico Joseph^{1,2}

¹Department of Biosciences, Laboratory of Biochemical Pharmacodynamics, Felix Houphouët-Boigny University, Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

²Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, 08 BP 1563 Abidjan 08, Côte d'Ivoire.

³Department of Medical Science, Felix Houphouët-Boigny University, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. Authors GV, GKN and DAJ designed the study, drafted the protocol and provided the material and equipment. Authors TAA, KF, OMB and TKB contributed to the writing and editing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

Editor(s):

(1) Eliton da Silva Vasconcelos, Department of Physiological Sciences, Federal University of Sao Carlos – UFSCar, Rod. Washington Luiz, Sao Carlos, Brazil.

Reviewers:

(1) Kaunara A. Azizi, Tanzania.

(2) Vivek Kumar Singh, Nepal.

(3) Pinar Sanlibaba, Ankara University, Turkey.

Complete Peer review History: <http://www.sdiarticle3.com/review-history/48002>

Original Research Article

Received 03 January 2019

Accepted 11 March 2019

Published 11 April 2019

ABSTRACT

Aims: The aim of this study was to characterize fluoroquinolone resistance genes in enterobacteriaceae that produce extended-spectrum β -lactamases, isolated in Abidjan.

Place and Duration of Study: Pasteur Institute of Côte d'Ivoire and research unit on emerging tropical infectious diseases of Aix-Marseille University from January 2017 at July 2017.

Methodology: The study included 90 enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases isolated from biological products from various hospital services in Abidjan. These strains have been pre-identified and stored at the Center for Biological Resources (CeReB) of Pasteur Institute of Côte d'Ivoire. The identification of the strains was confirmed using the mass

*Corresponding author: Email: victoiregadou@yahoo.fr;

spectrometry MALDI-TOF (MS) and the antibiotic sensitivity test was performed using Müller Hinton's agar diffusion method. The fluoroquinolone resistant genes were detected by conventional PCR and then, sequenced.

Results: The strains studied were *Escherichia coli* (44), *Klebsiella pneumoniae* (31) and *Enterobacter cloacae* (15). High resistance rates to ceftriaxone (96.7%), cefotaxime (95.6%), aztreonam (95.6%) and cefoxitin (72.2%) were observed in all strains producing broad spectrum β -lactamases. The resistance rate to fluoroquinolones represented by ciprofloxacin was 86.7%. The fluoroquinolone resistance genes detected were *qnr A* (3.3%) and *qnr B* (42.2%). Sequencing identified the *qnr A1* (3.3%), *qnr B1* (31.1%), *qnr B6* (2.2%) and *qnr B7* (1.1%) genes.

Conclusion: This study made it possible to identify fluoroquinolone resistance genes in enterobacteriaceae producing β -lactamases which have an extended spectrum in Abidjan.

Keywords: Enterobacteriaceae; fluoroquinolones; *qnr B6*; *qnr B7*; Abidjan.

ABBREVIATIONS

ESBL : Extended-Spectrum Beta-Lactamases

Qnr : Quinolone resistance

1. INTRODUCTION

Quinolones are widely used antibiotics in the treatment of various infections [1]. Quinolones are generally characterized by a broad spectrum of activity, a good oral bioavailability and a good tissue penetration [2] while fluoroquinolones, are characterized by the presence of a fluorine atom in position 6 and a nitrogen ring, and most often by the presence of a piperazine in position 7 [3]. Their main targets are DNA gyrase and topoisomerase IV DNA [4].

Fluoroquinolones interact with the DNA-enzyme complex, i.e. with the DNA gyrase which is bound to bacterial DNA or with the topoisomerase IV, bound to bacterial DNA to create conformational changes. The new fluoroquinolone-enzyme-DNA complex blocks the progression of the replication fork, resulting in the inhibition of enzymatic activity and DNA synthesis [5,6]. Several mechanisms are involved in fluoroquinolone resistance. These are the mutational modifications of target enzymes, the reduction of membrane's permeability, the reduction of intracellular antibiotic concentration by efflux systems and the action of the QNR protein [7]. The *qnr* gene that codes for the QNR protein is the genetic determinant of plasmid resistance to fluoroquinolones [8]. The importance of this genetic support is its transferability and its ability to accelerate the spread of fluoroquinolone resistance. *Qnr* genes have been identified in different strains of enterobacteriaceae and often associated with the production of extended-spectrum beta-lactamases [4]. This situation is at the root of

therapeutic failures and the increase in morbidity and mortality rates worldwide [9]. The objective of this study was to characterise fluoroquinolone resistance genes in enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases isolated in Abidjan, Côte d'Ivoire.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Selection of Strains

This study included 90 strains of enterobacteriaceae producing broad spectrum β -lactamases. The 90 strains were distributed as follows: 44 *Escherichia coli*, 31 *Klebsiella pneumoniae* and 15 *Enterobacter cloacae*. They were taken from a collection of 153 enterobacteriaceae isolated from various biological products (urine, blood, suppurations, saliva) from various hospital services in the city of Abidjan. These strains were pre-identified and stored at Biological Resource Center of Pasteur Institute of Côte d'Ivoire from 2012 to 2015.

2.2 Confirmation of the Identity of Strains by MALDI-TOF

The strains preserved in deep agars were revived using an enrichment broth which were incubated at 37°C for 24 hours in an oven (Thermo Fisher). The strains' isolation was performed on MacConkey agar and their re-identification was confirmed by mass spectrometry (MALDI-TOF) at the laboratory of the Emerging Tropical Infectious Diseases Research Unit at Aix-Marseille University in France.

2.3 Strains' Sensitivity to Antibiotics

The antimicrobial susceptibility test was performed using Müller-Hinton agar (BioMérieux SA, France) by the standard method

of diffusion in agar described by the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (CA-SFM, 2013). The strain of *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as control strain. The antibiotics tested were: amoxicillin (25 µg), amoxicillin + clavulanic acid (20 µg + 10 µg), cefotaxime (30 µg), cefoxitin (30 µg), ceftriaxone (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10µg), ertapenem (10 µg), ciprofloxacin (5 µg). The phenotypic detection of extended-spectrum β-lactamases was carried out by the synergy test comprising amoxicillin+clavulanic acid, cefotaxime, ceftriaxone, aztreonam [10].

2.4 Research of Fluoroquinolone Resistance Genes by PCR

The strains' DNA was extracted using the EZ1 extraction kit (Qiagen) as recommended by the manufacturer. The search for the *qnr A* and *qnr B* genes was carried out by conventional PCR. The amplification reaction was performed in a reaction volume of 25 µL composed of 12.5 µL Master Mix (Quantitect Probe PCR Master mix, Qiagen), 1 µL forward and reverse primer (Eurogentec), 5 µL total DNA and 6.5 µL ultra-pure water (Invitrogen). The primers of the fluoroquinolone resistance genes used in this work have been summarized in Table 1.

The amplification of genes by conventional PCR consisted of an initial DNA denaturation step at 95°C for 15 min. This step was followed by 35 amplification cycles including a denaturation at 94°C for 1 min, a hybridization at 55°C for 50 s, an elongation at 72°C for 2 min and a final elongation step of 7 min at 72°C. The amplification products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis prepared with 0.5% Tris-Borate-EDTA (TBE) and 3.75% SYBR SAFE. The DNA bands of the amplicons were visualized on a transilluminator.

2.5 DNA Sequencing

The amplicons were purified and sequenced using the BigDye® kit (Life technologies) as recommended the manufacturer in an automate

ABI PRISM 3730xl Genetic Analyser PLC. In addition, genes' identification was carried out in the ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene Annotation) database of the IHU-Marseille in France.

3. RESULTS

3.1 Antibiotics Susceptibility

A high resistance rates to ceftriaxone (96.7%), cefotaxime (95.6%), aztreonam (95.6%) and cefoxitin (72.2%) were observed in all strains producing broad spectrum β-lactamases. The resistance rate to fluoroquinolones represented by ciprofloxacin was 86.7%.

The analysis of the results of the susceptibility testing of *Escherichia coli* strains to antibiotics showed that for antibiotics of the β-lactam family, 100% of the strains were resistant for amoxicillin and for amoxicillin-clavulanic acid. The cephalosporin resistance rate was 98% and 100% for cefotaxime and ceftriaxone respectively. All strains were susceptible to imipenem, however 27.3% of strains were resistant to ertapenem. The ciprofloxacin resistance rate was 95.4%.

In *Klebsiella pneumoniae* strains, cephalosporins resistance rate was 71% for cefoxitin, 96.8% for cefotaxime and ceftriaxone respectively. In this species too, all strains were sensitive to imipenem, however 35.5% of strains were resistant to ertapenem. The resistance rate of *K. pneumoniae* strains was 100% to amoxicillin clavulanic acid. In addition, the ciprofloxacin resistance rate was 74.2%.

For *Enterobacter cloacae* strains, the resistance rate to amoxicillin clavulanic acid and cefoxitin was 100% while 86.7% of strains were resistant to cefotaxime and ceftriaxone. All strains of *E. cloacae* were susceptible to imipenem, however 33.3% of the strains were resistant to ertapenem. Table 2 summarizes the antibiotic resistance rates in the different species studied.

Table 1. Primers used for the detection of fluoroquinolone resistance genes

Gene name	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)
<i>qnr A</i>	QnrA_F	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG	542
	QnrA_R	ATCCAGATCGGCAAAGGTTA	
<i>qnr B</i>	QnrB_F	GACAGAAACAGGTTACCCGGT	594
	QnrB_R	CAAGACGTTCCAGGAGCAACG	

3.2 Resistance Genes Identified

The search for fluoroquinolone resistance genes showed the presence of *qnr B* genes in 38 strains, thus, representing a rate of 42.2% and *qnr A* in 3 strains, representing a rate of 3.3%.

The distribution of fluoroquinolone resistance genes by species showed that 3 strains of *E. coli* (6.8%), hosted the *qnr A* gene and 7 strains (15.9%) the *qnr B* gene.

The *qnr A* gene was not detected in any of the *K. pneumoniae* and *E. cloacae* strains. However, 19 strains of *K. pneumoniae*, i.e. about 61.3%, and 12 strains of *E. cloacae* (80%) hosted the *qnr B* gene.

The sequencing technique helped to identify the *qnr A1* genes in 3 strains of *E. coli* at a rate of 3.3%. *qnr B1* was identified in 28 strains (31.1%) including 13 strains of *K. pneumoniae* (14.4%), 11 strains of *E. cloacae* (12.2%) and 4 strains of *E. coli* (4.4%). The *qnr B6* gene was identified in 2 strains of *K. pneumoniae* (2.2%) and the *qnr B7* gene in 1 strain of *K. pneumoniae* (1.1%).

4. DISCUSSION

Fluoroquinolones act at the time of DNA replication. Their targets are DNA gyrase and

topoisomerase IV, which regulate the topology of DNA to allow replication [11]. The resistance to fluoroquinolones in enterobacteriaceae is generally the result of a chromosomal mutation causing the alteration of bacterial target enzymes [4]. However, resistance caused by plasmids has also been reported as a result of the acquisition of resistance genes *qnr*, *qepA*, and *aac(6')-Ib-cr* [12,13]. Plasmids carrying the *qnr A* and *qnr B* genes frequently carry resistance genes to β -lactam, aminoglycosides, and tetracycline [4].

In this work, the fluoroquinolones resistance rate represented by ciprofloxacin in enterobacteriaceae producing extended spectrum β -lactamases was 86.7%. This rate is higher than that reported by Guessens et al. [14] who, in their work, showed that 70.2% of the strains producing extended spectrum β -lactamases were resistant to ciprofloxacin. Ouattara et al. [15] reported a 93.2% ciprofloxacin resistance rate in strains producing broad spectrum β -lactamases.

The high resistance rates could be explained by the fact that fluoroquinolones are the most prescribed molecules after β -lactam in Africa and particularly in Côte d'Ivoire [16]. These results are agree with those obtained by some authors in Africa. Indeed, in the Central African Republic, the results of the work of Rafai et al. [17] showed that 84.8% of the broad spectrum strains, producing β -lactamases tested were

Table 2. Antibiotic resistance rate

Antibiotics	Strains producing ESBL (%)		
	<i>E. coli</i> n= 44	<i>K. pneumoniae</i> n= 31	<i>E. cloacae</i> n= 15
Amoxicillin	44 (100)	31 (100)	15 (100)
Amoxicillin- clavulanic acid	44 (100)	31 (100)	15 (100)
Aztreonam	44 (100)	29 (93.5)	13 (86.7)
Cefotaxime	43 (98)	30(96.8)	13 (86.7)
Cefoxitin	28 (63.6)	22 (71)	15 (100)
Ceftriaxone	44 (100)	30 (96.8)	13 (86.7)
Ciprofloxacin	42(95.4)	23 (74.2)	13 (86.7)
Ertapenem	12 (27.3)	11 (35.5)	5 (33.3)
Imipenem	0	0	0

* ESBL: extended-spectrum beta-lactamase, n: number

Table 3. Distribution of genes between strains

Detected genes	Strains producing ESBL (%)		
	<i>E. coli</i> n= 44	<i>K. pneumoniae</i> n= 31	<i>E. cloacae</i> n= 15
<i>Qnr A</i>	3 (6.8)	0	0
<i>Qnr B</i>	7 (15.9)	19 (61.3)	12 (80)

* ESBL: extended-spectrum beta-lactamase, n: number

resistant to ciprofloxacin. Similarly, in Burkina Faso, Ouedraogo et al. [18] reported that 80% of the strains producing broad spectrum β -lactamases were resistant to ciprofloxacin. In Algeria, Mathlouthi et al. [19] reported that 80% of strains producing extended spectrum β -lactamases tested in their work were resistant to ciprofloxacin.

The *qnr* genes detected included *qnr* B gene which was detected at a rate of 42.2% followed by the *qnr* A gene (3.3%) in strains producing extended spectrum β -lactamases. The sequencing carried out made it possible to identify in addition to the *qnr* A1 (3.3%) and *qnr* B1 (31.1%) genes, the *qnr* B6 (2.2%) and *qnr* B7 (1.1%) genes which are involved in the resistance to fluoroquinolone. Moreover, the *qnr* A1 and *qnr* B1 genes were reported in 2008 in Côte d'Ivoire [14]; however, this study is the first to report the presence of the *qnr* B6 and *qnr* B7 genes involved in fluoroquinolone resistance.

Elsewhere in the world, the *qnr* B6 gene has been detected in South Korea in a strain of *Enterobacter aerogenes* producing broad spectrum β -lactamases from a collection of 644 enterobacteriaceae from 12 clinical laboratories [20]. Similarly, in Argentina, Cruz et al. [21] reported the presence of *qnr* B6 in 5% of enterobacteriaceae that produce broad spectrum β -lactamase. Also, in Morocco, the *qnr* B6 gene was detected in 0.9% of strains producing extended spectrum β -lactamases tested in the work of Jamali et al. [22].

The *qnr* B6 and *qnr* B7 genes were found in South Korea in a study of 347 enterobacteriaceae from two hospitals. These genes were detected respectively in a strain of *K. pneumoniae* and a strain of *Citrobacter freundii* [23].

5. CONCLUSION

This study showed a high level of resistance to fluoroquinolones in enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases. The *qnr* B gene was the most detected (42.2%) followed by the *qnr* A gene (3.3%). The study showed as well the presence of the *qnr* B6 and *qnr* B7 genes for the first time in Côte d'Ivoire. Given the importance of fluoroquinolones in the treatment of many bacterial infections, the presence of resistance genes is a concern. Therefore, monitoring the prescription of antibiotic is necessary to limit the risk of spreading resistance genes.

COMPETING INTEREST

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Kim ES, Hooper DC. Clinical importance and epidemiology of quinolone resistance. *Infect Chemother.* 2014;46(4):226-238.
2. Larouche G. Les quinolones: Des années soixante à aujourd'hui. *Pharmactuel.* 2001; 34(2):40-46.
3. Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. *Antibiogramme.* Eska, 2^{ème} édition, Paris; 2006.
4. Muylaert A, Mainil JG. Résistances aux fluoroquinolones: la situation actuelle. *Ann Méd Vét.* 2013;157(1):15-26.
5. Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin infect dis.* 2000;31(2):24-28.
6. Cambau E, Guillard T. Antibactériens agissant sur la synthèse et la conformation des acides nucléiques. *Rev Sci Tech.* 2012;31(1):65-76.
7. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis.* 2005;41(2): 120-126.
8. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(10):629-640.
9. Cosgrove SE, Kaye KS, Eliopoulos GM, Carmeli Y. Health and economic outcomes of the emergence of third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacter* species. *Arch Intern Med.* 2002;162(2):185-190.
10. Bakour S, Touati A, Bachiri T, Sahli F, Tiouit D, Naim M, et al. First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo-beta-lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J infect chemother.* 2014;20(6):696-701.
11. Soussy CJ. Quinolones et bactéries à Gram négatif. Dans: Patrice Courvalin, Roland Leclercq, Edouard Bingen eds. *Antibiogramme,* 2^{ème} édition; Paris: ESKA; 2006.
12. Poirel L, Villa L, Bertini A, Pitout JD, Nordmann P, Carattoli A. Extended spectrum beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(5):803-805.

13. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):2227-2238.
14. Guessennd N, Bremont S, Gbonon V, Kacou-N Douba A, Ekaza E, Lambert T, et al. Résistance aux quinolones de type qnr chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire. *Pathol Biol.* 2008;56(5): 439-446.
15. Ouattara MB, Guessennd KN, Coulibaly ND, Saraka ND, Coulibaly KJ, Koffi-Nevry R, et al. First report of qnr genes in multidrugs resistant (ESBL) enterobacteria isolated from different ecosystems in Abidjan, Ivory Coast. *Int J Biol Sci Appl.* 2014;1(4):170-175.
16. Dosso M, Bissagnene E, Coulibaly M. Résistances acquises et prescriptions d'antibiotiques en Afriques: quelles adéquations? *Med Mal Infect.* 2000;30: 197-204.
17. Rafai C, Frank T, Manirakiza A, Gaudeuille A, Mbecko JR, Nghario L, et al. Dissemination of IncF-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from surgical-site infections in Bangui, Central African Republic. *BMC Microbiol.* 2015;15:15.
18. Ouedraogo AS, Sanou M, Kissou A, Sanou S, Solaré H, Kaboré F, et al. High prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing enterobacteriaceae among clinical isolates in Burkina Faso. *BMC Infect Dis.* 2016;16:326.
19. Mathlouthi N, Al-Bayssari C, El Salabi A, Bakour S, Ben Gwierif S, Zorgani AA, et al. Carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae isolated from Tunisian and Libyan hospitals. *J Infect Dev Count.* 2016;10(7):718-727.
20. Park YJ, Yu JK, Lee S, Oh EJ, Woo GJ. Prevalence and diversity of qnr alleles in AmpC-producing Enterobacter cloacae, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: A multicentre study from Korea. *J Antimicrobial Chemother.* 2007;60(4):868-871
21. Cruz GR, Radice M, Sennati S, Pallecchi L, Rossolini GM, Gutkind G, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in Argentina. *Memó Instit Oswa Cruz.* 2013;108(7):924-927.
22. Jamali L, Haouzane F, Bouchakour M, Oufriid S, Ghazlane Z, El Mdaghri N, et al. Prévalence des gènes de résistance plasmidique aux quinolones chez des entérobactéries communautaires isolées au Maroc. *Int J Inno Sci Res.* 2014;11: 387-399.
23. Jeong HS, Bae K, Shin JH, Jung HJ, Kim SH, Lee JY, et al. Prevalence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance and Its Association with Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC Beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* Korean. *J Lab Med* 2011;31:257-264.

© 2019 Victoire et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:
The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://www.sdiarticle3.com/review-history/48002>

RESUME

La résistance des entérobactéries aux antibiotiques connaît une évolution mondiale préoccupante du fait de la production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE). Ces microorganismes, responsables d'infections nosocomiales se retrouvent résistants à plusieurs familles d'antibiotiques comme les aminosides et les fluoroquinolones. Le but de cette étude était de caractériser des gènes de résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones codant pour les acétyltransférases, les nucléotidyltransférases, les phosphotransférases et les protéines QNR chez des entérobactéries productrices de BLSE dans le district d'Abidjan. Au total, 153 souches d'entérobactéries ont été testées et 90 souches (58,8%) ont été productrices de BLSE. La répartition était comme suite: 44 *E. coli*, 31 *K. pneumoniae*, 15 *E. cloacae*. Excepté l'imipénème, le test de sensibilité aux β -lactamines a montré des taux de résistance élevés au ceftriaxone (96,7 %), à la céfotaxime (95,6 %) et à la céfoxitine (72,2 %). Egalement, des taux de résistance élevés aux aminosides (90 %) et fluoroquinolones (86,7 %) ont été constatés. Les β -lactamases de type CTX-M-15 étaient prédominantes (44,4 %) suivi de nouveaux gènes tels que TEM-191 (13,3%) et de SHV-100 (8,9%). Des gènes de résistance aux aminosides ont été détectés pour la première fois dans notre pays à des taux variables ainsi que de nouveaux gènes de résistance aux fluoroquinolones. Ce sont : *aac(6')-Ib* (58,9%), *ant(2'')-I* (8,9%) et *aad* (7,8%) *qnr B6* (2,2 %), *qnr B7* (1,1%). La coexpression des gènes *bla_{CTXM-1}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *aac(6')-Ib*, *qnrB* chez les souches BLSE avait le taux le plus élevé c'est-à-dire 14,4 %. Le transfert de la résistance bactérienne par conjugaison a été confirmé par le transfert des gènes *bla_{CTXM-1}* et *aac(6')-Ib*. Le typage moléculaire de 4 souches résistantes à la rifampicine par la technique MLST a montré que les souches avaient les ST 5, ST 273, ST 307 et ST 309.

Mots clés: Entérobactéries, BLSE, résistance, aminosides, fluoroquinolones.

ABSTRACT

The resistance of enterobacteriaceae in antibiotics knows a worrisome world evolution due to the production of extended spectrum β -lactamases (ESBL). These microorganisms, responsible for nosocomial infections, are resistant to several families of antibiotics such as aminoglycosides and fluoroquinolones. The aim of this study was to characterize aminoglycoside and fluoroquinolone resistance genes encoding acetyltransferases, nucleotidyltransferases, phosphotransferases and QNR proteins in ESBL-producing enterobacteria in Abidjan District. A total of 153 strains of enterobacteria were tested and 90 strains (58.8%) were producing ESBL. The distribution was as follows: 44 *E. coli*, 31 *K. pneumoniae*, 15 *E. cloacae*. Except for imipenem, the β -lactam sensitivity test showed high levels of resistance to ceftriaxone (96.7%), cefotaxime (95.6%) and cefoxitin (72.2%). Also, high levels of resistance to aminoglycosides (90%) and fluoroquinolones (86.7%) were observed. CTX-M-15 β -lactamases were predominant (44.4%) followed by new genes such as TEM-191 (13.3%) and SHV-100 (8.9%). Aminoglycoside resistance genes have been detected for the first time in our country at variable rates as well as new fluoroquinolone resistance genes. They are: *aac(6')-Ib* (58.9%), *ant(2'')-I* (8.9%), *aad* (7.8%) *qnr B6* (2.2%) and *qnr B7* (1.1%). The coexpression of the *bla_{CTXM-1}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *aac(6')-Ib*, *qnrB* genes in the ESBL strains had the highest level that is 14.4%. The transfer of bacterial resistance by conjugation was confirmed by the transfer of the genes *bla_{CTXM-1}* and *aac(6')-Ib*. Molecular typing of 4 rifampicin resistant strains by the MLST technique showed that strains had ST 5, ST 273, ST 307 and ST 309.

Key words: Enterobacteriaceae, ESBL, resistance, aminoglycosides, fluoroquinolon