

UNIVERSITE MOHAMMED V - RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
Centre d'études doctorales des Sciences de la vie et de la santé
FILIERE DE BIOLOGIE MEDICALE

THESE DE DOCTORAT

**ETUDE EPIDEMIO-MOLECULAIRE DES ENTEROBACTERIES
PRODUCTRICES DE β -LACTAMASES A SPECTRE ELARGI
AU CHU DE MARRAKECH**

Présentée et soutenue le 12 Juillet 2017

Par

Mohamed Chrif EL BOUAMRI

JURY

Pr. A. BELMEKKI

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V-Rabat

Pr. S. ZOUHAIR

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V-Rabat

Pr. Y. SEKHSOKH

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V-Rabat

Pr. M. RABHI

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V-Rabat

Pr. K. ZEROUALI

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Hassan II-Casablanca

Président de thèse

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا
إنك أنت العليم الحكيم


اللهم
اللهم

سورة البقرة الآية: 31

اللهم إنا نسألك علما نافعاً و قلباً خاشعاً و شفاه

من كل ولد و سقم



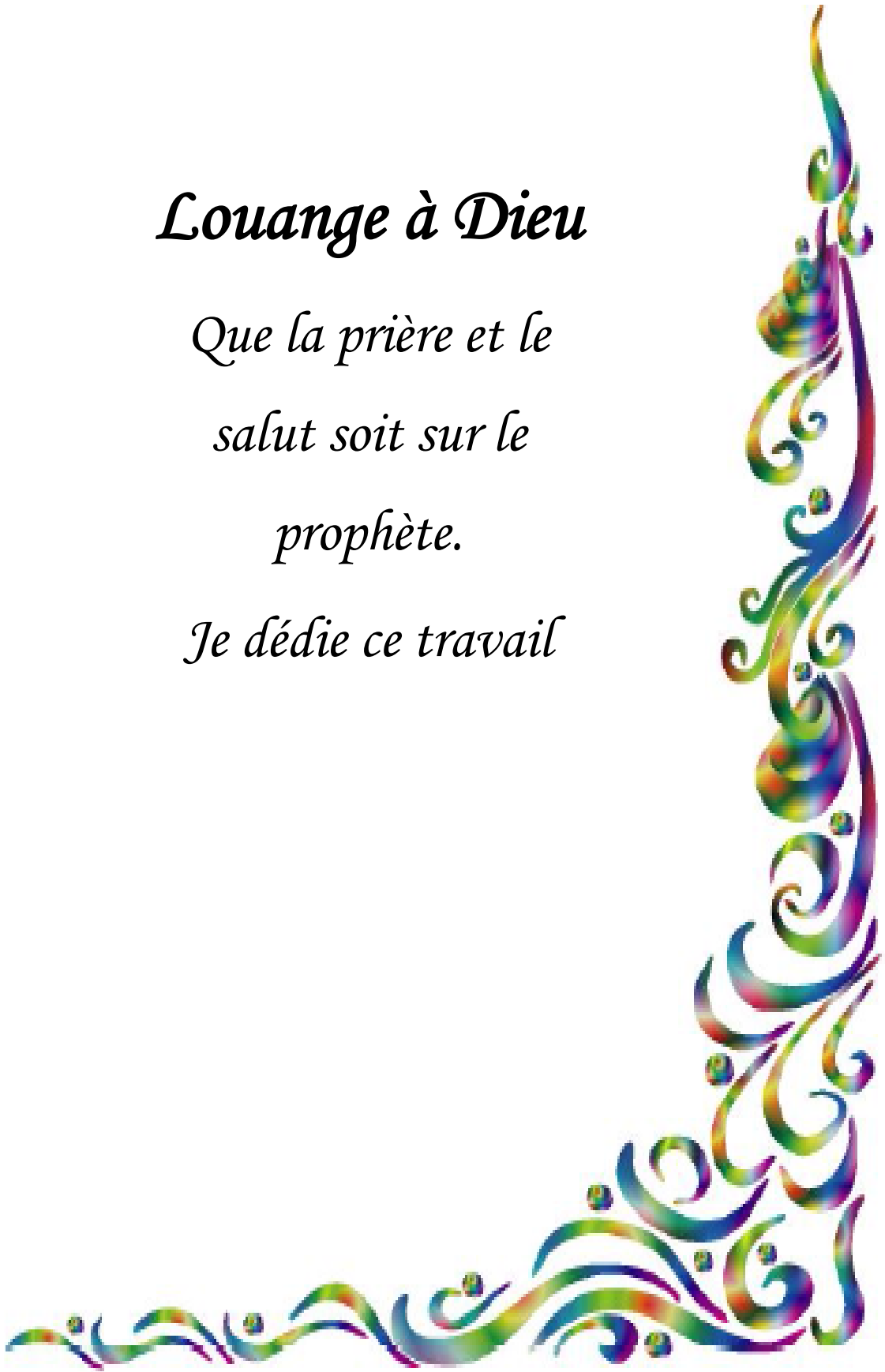


Dédicaces

Louange à Dieu

*Que la prière et le
salut soit sur le
prophète.*

Je dédie ce travail

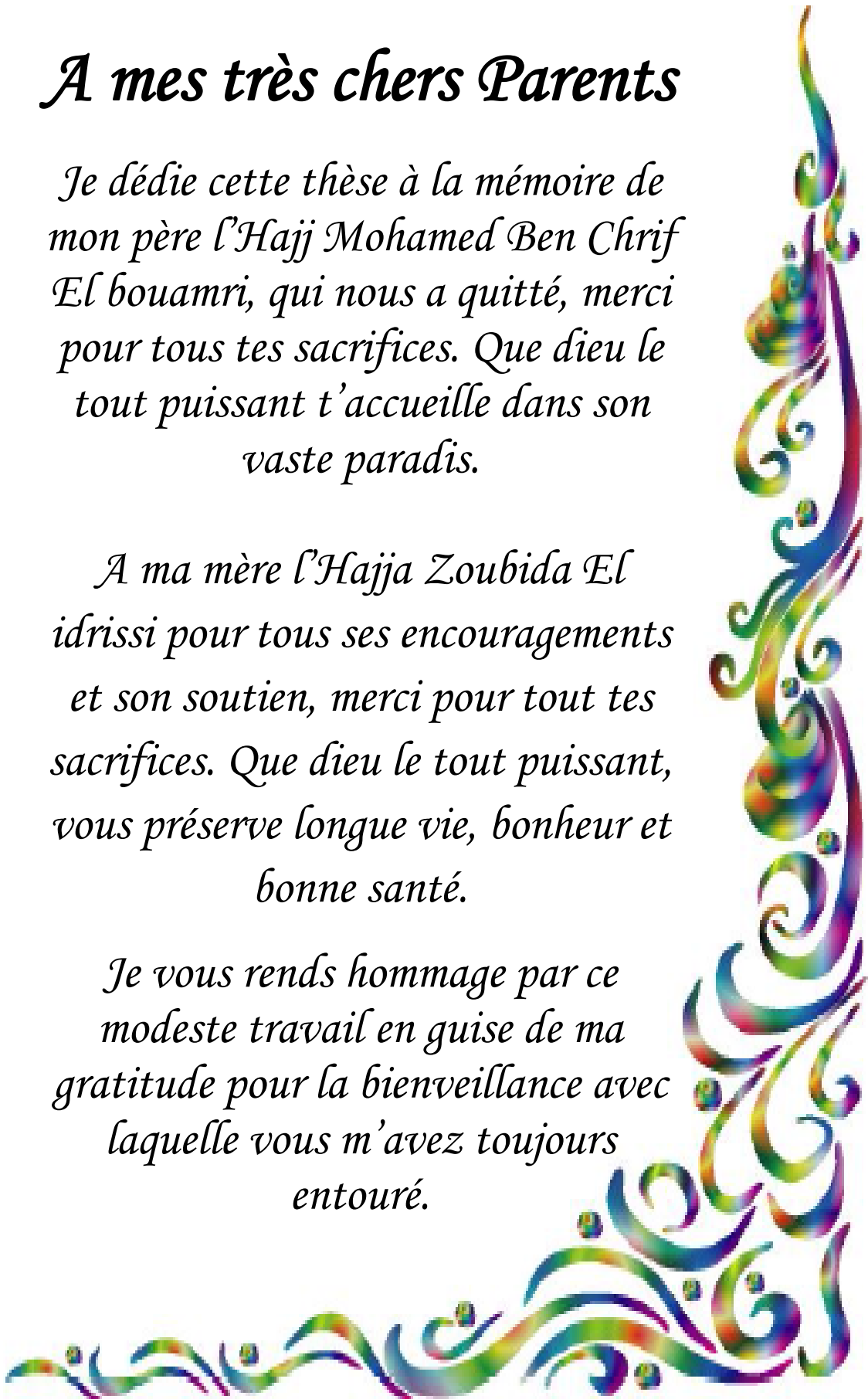


A mes très chers Parents

Je dédie cette thèse à la mémoire de mon père l'Hajj Mohamed Ben Chrif El bouamri, qui nous a quitté, merci pour tous tes sacrifices. Que dieu le tout puissant t'accueille dans son vaste paradis.

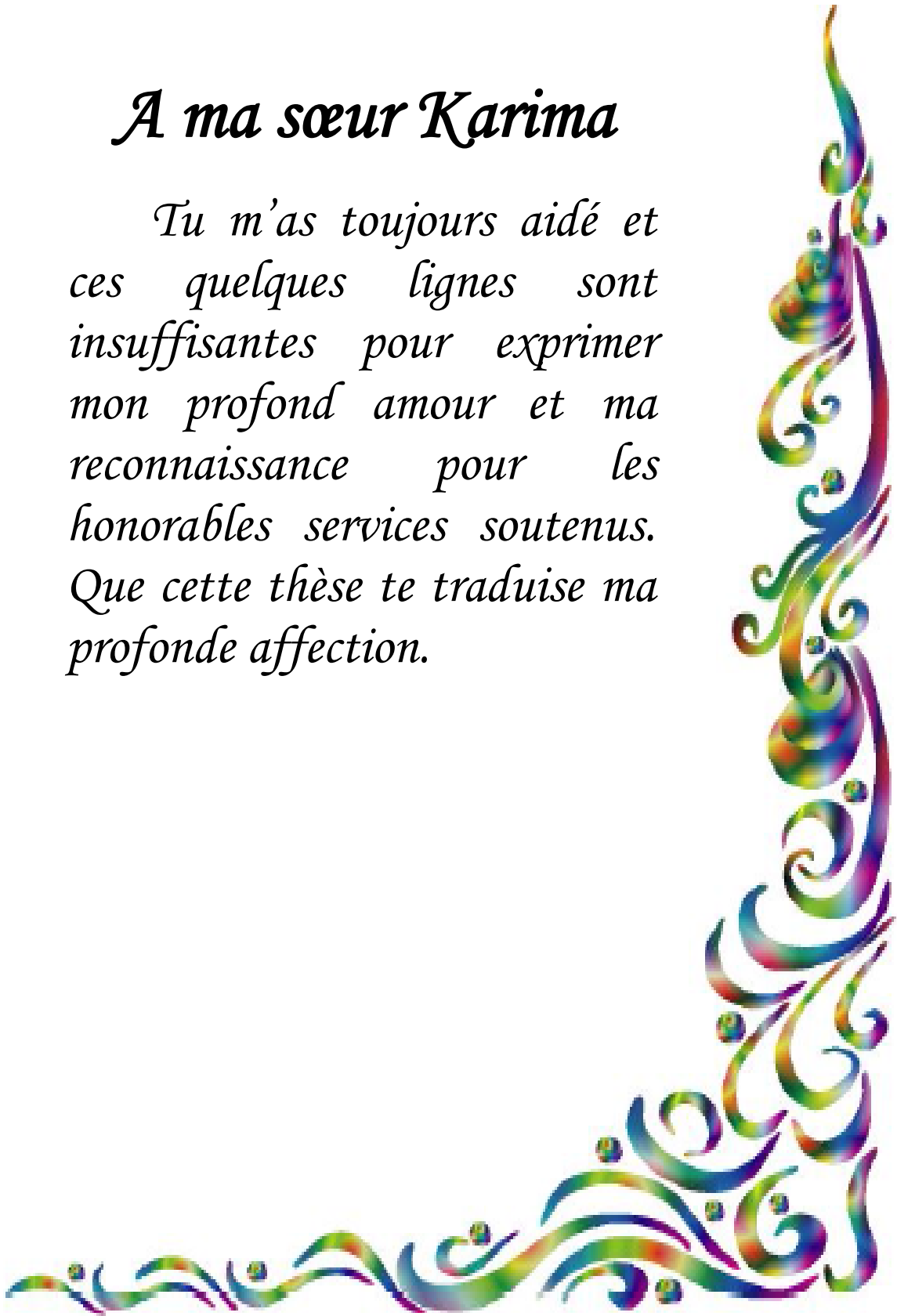
A ma mère l'Hajja Zoubida El idrissi pour tous ses encouragements et son soutien, merci pour tout tes sacrifices. Que dieu le tout puissant, vous préserve longue vie, bonheur et bonne santé.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma gratitude pour la bienveillance avec laquelle vous m'avez toujours entouré.



A ma sœur Karima

Tu m'as toujours aidé et ces quelques lignes sont insuffisantes pour exprimer mon profond amour et ma reconnaissance pour les honorables services soutenus. Que cette thèse te traduise ma profonde affection.



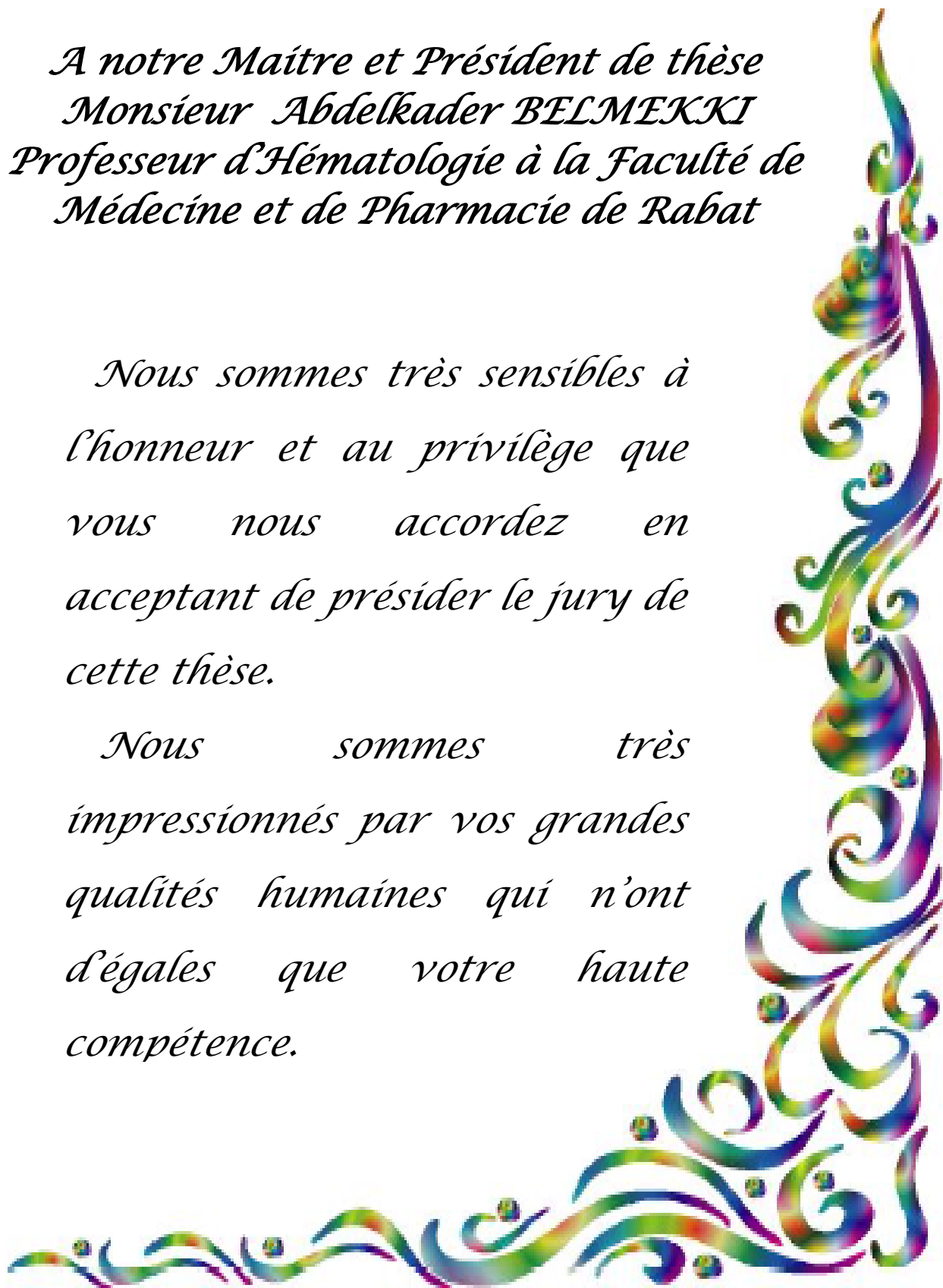


Remerciements

*A notre Maître et Président de thèse
Monsieur Abdelkader BELMEKKI
Professeur d'Hématologie à la Faculté de
Médecine et de Pharmacie de Rabat*

*Nous sommes très sensibles à
l'honneur et au privilège que
vous nous accordez en
acceptant de présider le jury de
cette thèse.*

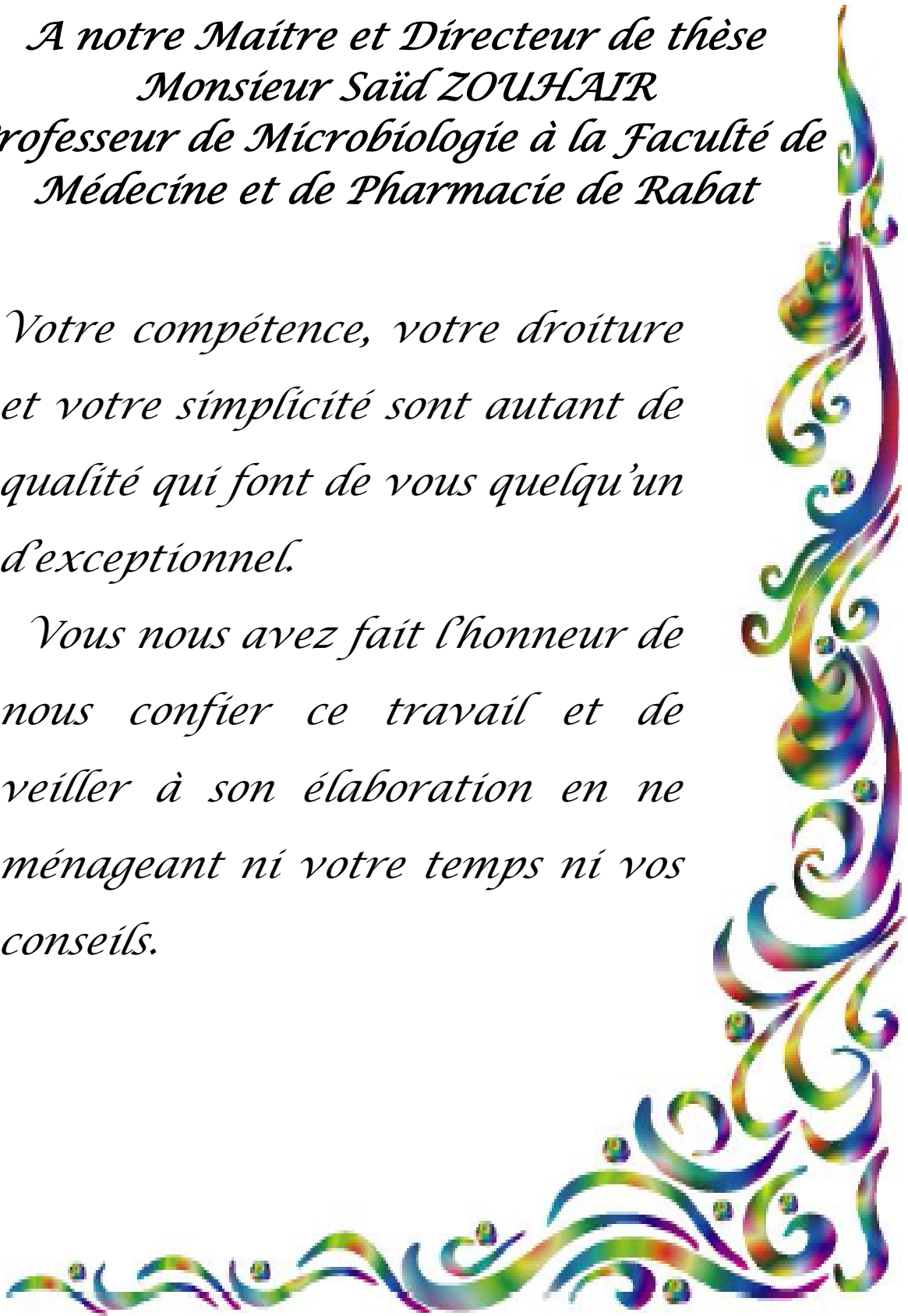
*Nous sommes très
impressionnés par vos grandes
qualités humaines qui n'ont
d'égales que votre haute
compétence.*



*A notre Maître et Directeur de thèse
Monsieur Saïd ZOUHAIR
Professeur de Microbiologie à la Faculté de
Médecine et de Pharmacie de Rabat*

*Votre compétence, votre droiture
et votre simplicité sont autant de
qualité qui font de vous quelqu'un
d'exceptionnel.*

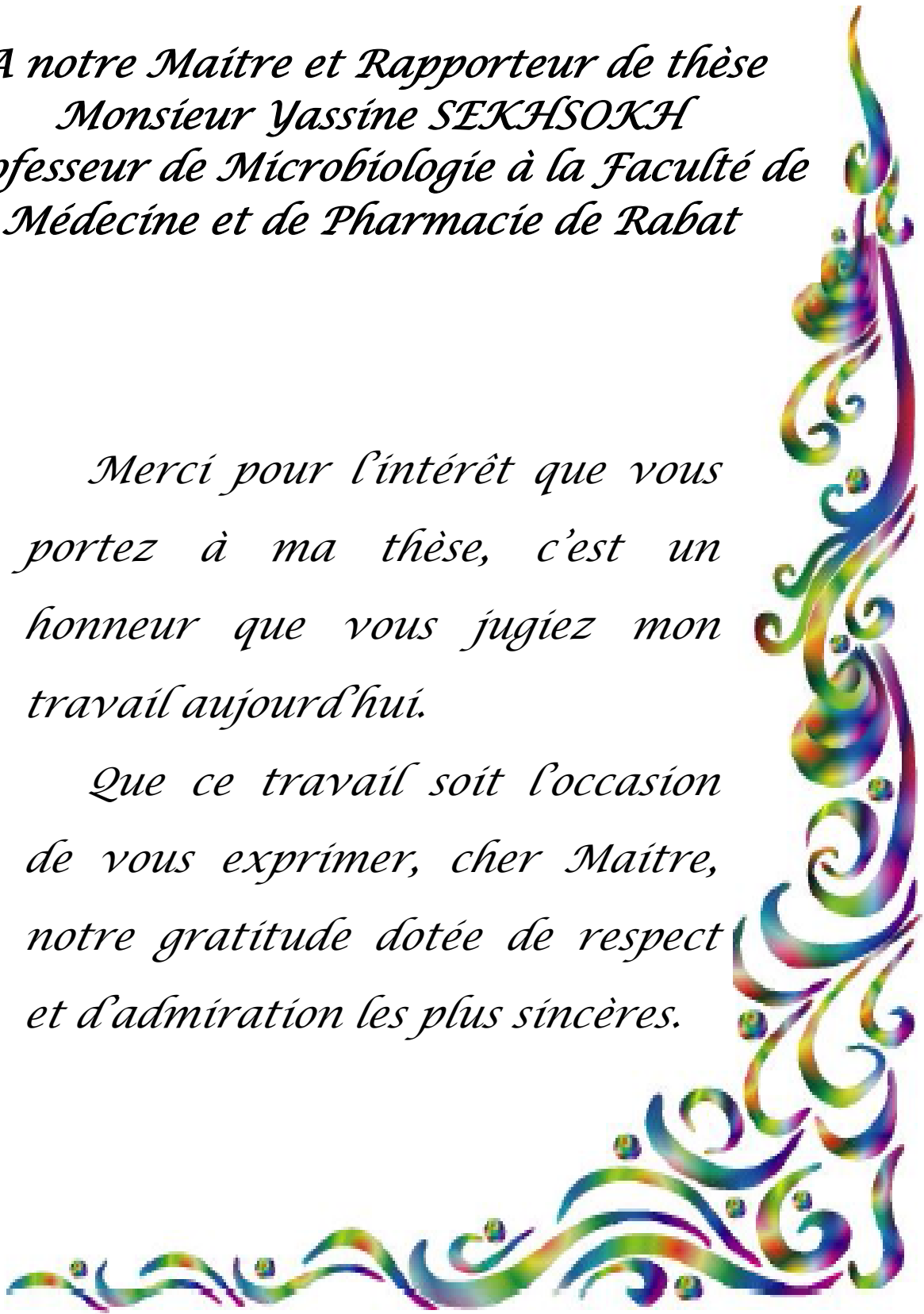
*Vous nous avez fait l'honneur de
nous confier ce travail et de
veiller à son élaboration en ne
ménageant ni votre temps ni vos
conseils.*



*A notre Maître et Rapporteur de thèse
Monsieur Yassine SEKHSOKH
Professeur de Microbiologie à la Faculté de
Médecine et de Pharmacie de Rabat*

*Merci pour l'intérêt que vous
portez à ma thèse, c'est un
honneur que vous jugiez mon
travail aujourd'hui.*

*Que ce travail soit l'occasion
de vous exprimer, cher Maître,
notre gratitude dotée de respect
et d'admiration les plus sincères.*

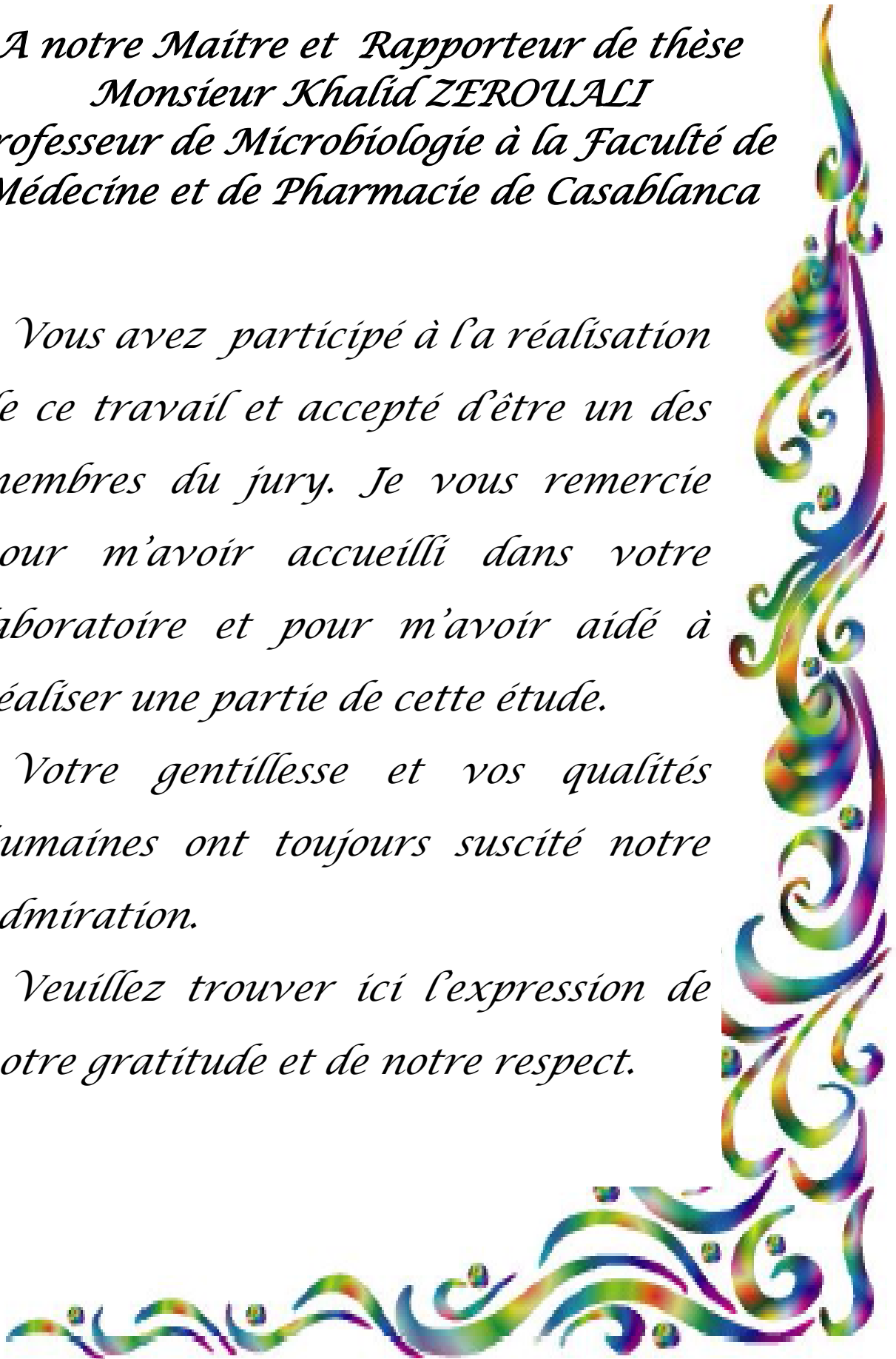


*A notre Maître et Rapporteur de thèse
Monsieur Khalid ZEROUALI
Professeur de Microbiologie à la Faculté de
Médecine et de Pharmacie de Casablanca*

*Vous avez participé à la réalisation
de ce travail et accepté d'être un des
membres du jury. Je vous remercie
pour m'avoir accueilli dans votre
laboratoire et pour m'avoir aidé à
réaliser une partie de cette étude.*

*Votre gentillesse et vos qualités
humaines ont toujours suscité notre
admiration.*

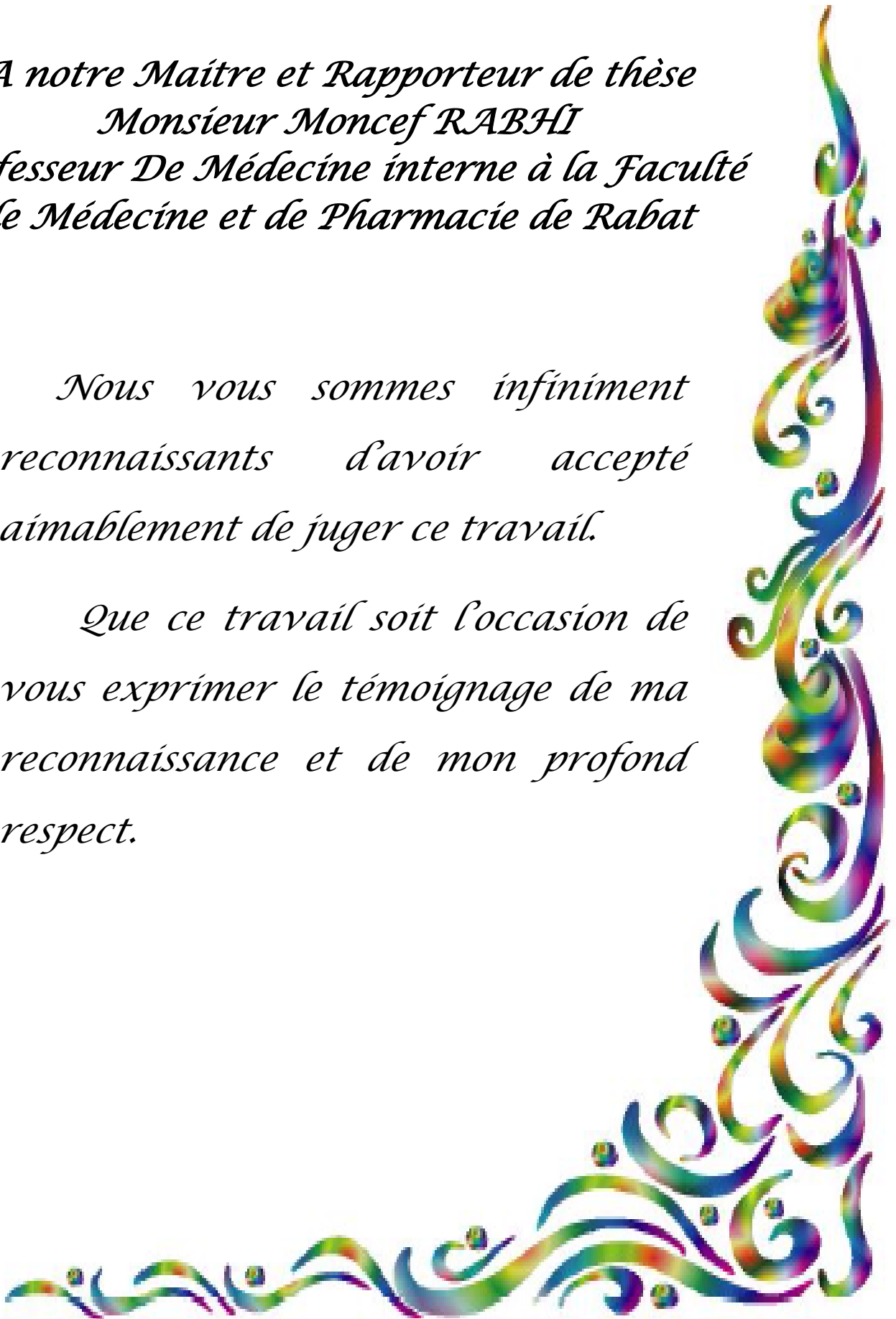
*Veuillez trouver ici l'expression de
notre gratitude et de notre respect.*



*A notre Maître et Rapporteur de thèse
Monsieur Moncef RABHI
Professeur De Médecine interne à la Faculté
de Médecine et de Pharmacie de Rabat*

*Nous vous sommes infiniment
reconnaissants d'avoir accepté
aimablement de juger ce travail.*

*Que ce travail soit l'occasion de
vous exprimer le témoignage de ma
reconnaissance et de mon profond
respect.*

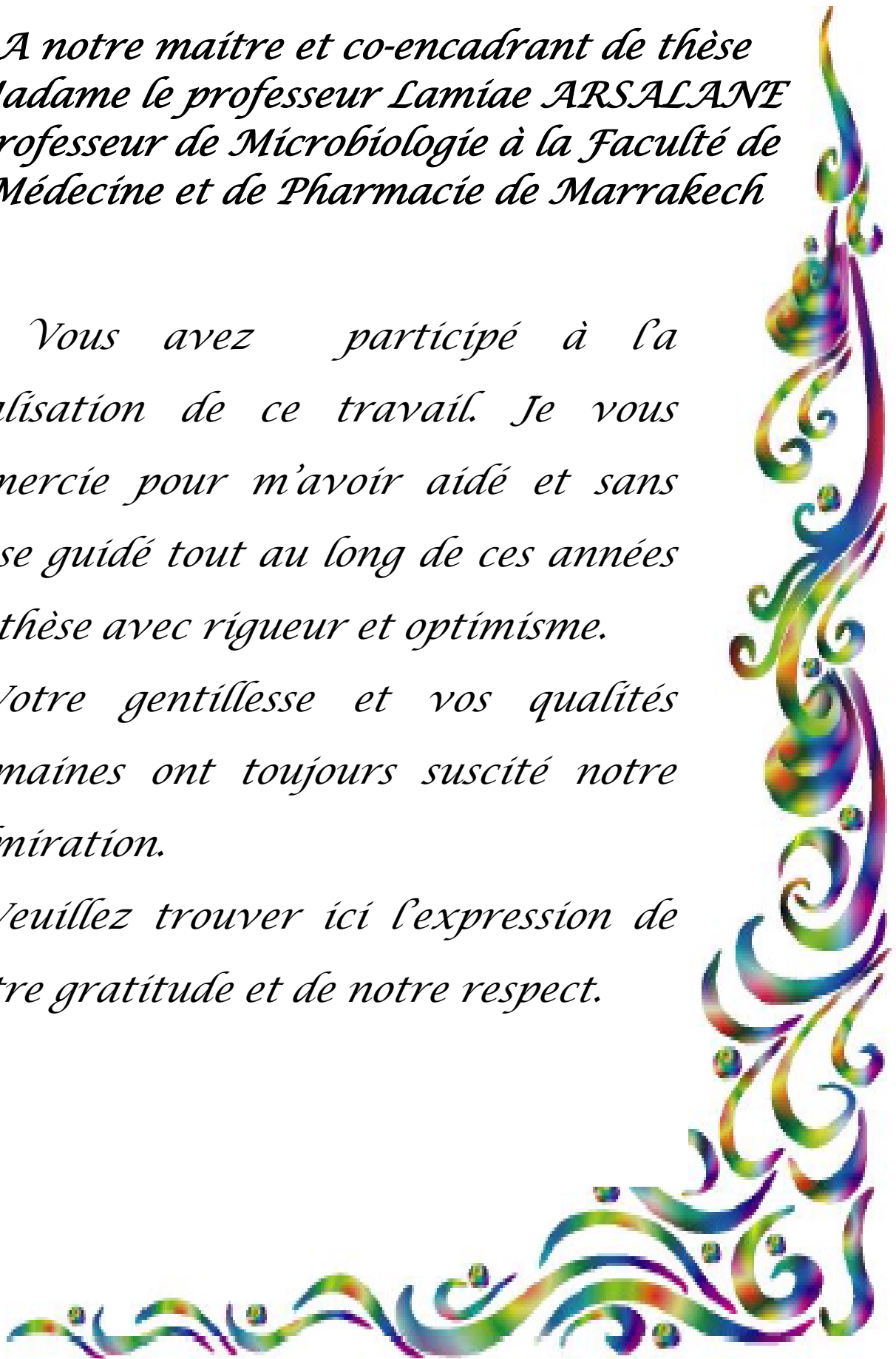


*A notre maître et co-encadrant de thèse
Madame le professeur Lamiae ARSALANE
Professeur de Microbiologie à la Faculté de
Médecine et de Pharmacie de Marrakech*

*Vous avez participé à la
réalisation de ce travail. Je vous
remercie pour m'avoir aidé et sans
cesse guidé tout au long de ces années
de thèse avec rigueur et optimisme.*

*Votre gentillesse et vos qualités
humaines ont toujours suscité notre
admiration.*

*Veuillez trouver ici l'expression de
notre gratitude et de notre respect.*



LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classification des principales espèces d'entérobactéries isolées au laboratoire de bactériologie médicale.

Tableau 2: Listes (standard et complémentaire) des antibiotiques à tester pour les entérobactéries.

Tableau 3: Exemples d'appellation de certaines BLSE.

Tableau 4: Classification des β -lactamases selon Bush et al.

Tableau 5: Evaluation comparée (%) de la détection des β -lactamases à spectre élargi ou étendu chez 147 souches d'entérobactéries.

Tableau 6: Profil de résistance aux antibiotiques des 17 souches d'*E. coli* utilisées pour la détermination des gènes codants pour les enzymes BLSE.

Tableau 7: Séquences nucléotidiques des différentes amorces utilisées pour cette étude.

Tableau 8: Préparation du mélange pour les réactions de la PCR.

Tableau 9: Protocoles de PCR suivant le type de gène recherché.

Tableau 10: Répartition des souches d'Entérobactéries productrices de BLSE selon la nature des prélèvements pathologiques.

Tableau 11: Evolution des *E. coli*-BLSE selon les années par rapport aux entérobactéries uropathogènes isolées.

Tableau 12: Evolution des *K. pneumoniae* uropathogènes productrices de BLSE selon les années par rapport aux entérobactéries uropathogènes isolées.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Galerie Api 20E pour l'identification des entérobactéries.

Figure 2: Plaque d'identification bactérienne par l'automate Microscan-WalkAway®.

Figure 3: Mécanismes d'acquisition d'un ADN étranger par transferts génétiques.

Figure 4: Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques.

Figure 5: Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

Figure 6: Structure du peptidoglycane.

Figure 7: Pompe d'efflux chez un bacille à Gram Négatif.

Figure 8: Représentation schématique de la mesure de la CMI par la diffusion sur milieu gelosé: Méthode du E-test.

Figure 9: Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase.

Figure 10: Enzymes de la famille TEM.

Figure 11: Enzymes de la famille SHV.

Figure 12: Phylogénie des β -lactamases chromosomiques de *Kluyvera sp.* et des CTX-M.

Figure 13: Galerie API 20E identifiant *K. pneumoniae*.

Figure 14: Photo de l'automate Microscan WalkAway®

Figure 15: Plaque 96 puits pour identification et antibiogramme utilisé par l'automate Microscan WalkAway®.

Figure 16: Etapes d'identification des souches bactériennes par l'automate Microscan WalkAway®.

Figure 17: Détermination de la CMI de l'antibiotique par microdilution en milieu liquide.

Figure 18: Détermination du phénotype BLSE par méthode automatisée avec Microscan®.

Figure 19: Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de double synergie.

Figure 20: Test de synergie positif pour une souche d'*E. coli* (Aspect en bouchon de champagne).

Figure 21: E-test de l'imipénème pour une souche de *K. pneumoniae*.

Figure 22. Test de synergie positif (aspect en « bouchon de champagne »).

Figure 23: Répartition des entérobactéries uropathogènes selon les espèces bactériennes entre 2010 et 2012.

Figure 24: Répartition des E-BLSE selon la nature du prélèvement pathologique.

Figure 25: Fréquence d'isolement des Entérobactéries productrices de BLSE au sein des entérobactéries isolées sur une période de 3ans (2010-2012).

Figure 26: Répartition des E-BLSE selon l'origine du prélèvement urinaire.

Figure 27: Répartition des Entérobactéries BLSE uropathogènes isolées en milieu hospitalier selon les services.

Figure 28: Répartition des E-BLSE selon les espèces bactériennes par rapport aux entérobactéries uropathogènes isolées.

Figure 29: Répartition des E-BLSE selon les espèces bactériennes par rapport aux entérobactéries uropathogènes productrices de BLSE isolées.

Figure 30: Evolution des E-BLSE au cours des 3 années d'étude par rapport aux Entérobactéries uropathogènes isolées.

Figure 31: Evolution des E-BLSE au cours des 3 années d'étude par rapport aux E-BLSE uropathogènes isolées.

Figure 32: Corésistance des E-BLSE uropathogènes isolées aux différents antibiotiques testés entre 2010 et 2012.

Figure 33: Taux moyens de résistance des souches d'*E. coli* non productrices de BLSE aux différents antibiotiques testés entre 2010 et 2012.

Figure 34: Fréquence d'isolement des *E. coli* productrices de BLSE entre 2010 et 2012 par rapport aux souches d'*E. coli* isolées.

Figure 35: Corésistance des souches d'*E. coli* productrices de BLSE aux différents antibiotiques testés entre 2010 et 2012.

Figure 36 : Distribution des entérobactéries responsables d'infections urinaires.

Figure 37: Taux moyens de résistance des souches de *K. pneumoniae* non productrices de BLSE isolées aux différents antibiotiques testés entre 2010 et 2012.

Figure 38: Fréquence d'isolement des *K. pneumoniae* uropathogènes productrices de BLSE entre 2010 et 2012 par rapport aux souches de *K. pneumoniae* uropathogènes isolées.

Figure 39: Corésistance des souches de *K. pneumoniae* aux différents antibiotiques testés entre 2010 et 2012.

Figure 40: Typage par PCR simplex CTX-M1 de 17 souches épidémiques *E. coli* (E).

Figure 41: Typage par PCR simplex SHV de 17 souches épidémiques d'*E. coli* (E).

Figure 42: Typage par PCR simplex TEM de 17 souches épidémiques d'*E. coli* (E).

Figure 43: Distribution des gènes codants pour les enzymes BLSE produites par les souches d'*E. coli* productrices de BLSE.

LISTE DES ABREVIATIONS

IU : Infection urinaire.

E. coli : *Escherichia coli*.

K. pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*.

E. cloacae : *Enterobacter cloacae*.

BLSE: β -lactamases à spectre élargi.

E-BLSE: Entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi.

TEM : Temoniera.

SHV : Sulfhydryl variable.

CTX-M: Cefotaximase-Munich.

BMR: Bactéries multirésistantes.

C3G : Céphalosporines de troisième génération.

C4G : Céphalosporines de quatrième génération.

SXT: Sulfaméthoxazole-triméthoprim.

Amx: Amoxicilline.

Tic: Ticarcilline.

AMC: Amoxicilline - Acide clavulanique.

FQ: Fluoroquinolones.

Cip: Ciprofloxacine.

Ak: Amikacine.

Gm : Gentamicine.

Tb : Tobramycine.

Fox : Céfoxitine.

AZT : Aztréonam.

Ctx : Céfotaxime.

Caz : Ceftazidime.

Fep : Céfépime.

PCR: Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerase chain reaction).

ADN : Acide Désoxyribonucléique.



*TABLE DES
MATIÈRES*

RESUME.....	1
PRODUCTION SCIENTIFIQUE EN RAPPORT AVEC LE SUJET DE THESE.....	5
INTRODUCTION.....	10
PREMIERE PARTIE: GENERALITES.....	13
CHAPITRE 1 : LES ENTEROBACTERIES.....	14
1/ DEFINITION DES ENTEROBACTERIES.....	15
2/ CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DES ENTEROBACTERIES.....	15
3/ CLASSIFICATION DES PRINCIPALES ENTEROBACTERIES.....	17
4/ DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE.....	21
CHAPITRE 2 : LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES.....	28
1/ DEFINITION DE LA RESISTANCE BACTERIENNE.....	29
2/ TYPES DE RESISTANCE BACTERIENNE.....	29
3/ DETERMINISME GENETIQUE DE LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES.....	31
4/MECANISMES DE RESISTANCE AUX DIFFERENTES CLASSES D'ANTIBIOTIQUES.....	32
5/ MECANISMES DE LA RESISTANCE DES ENTEROBACTERIES AUX β-LACTAMINES.....	35
6/ SENSIBILITE DES ENTEROBACTERIES AUX β-LACTAMINES.....	39
7/ PRINCIPES ET METHODES DE MESURE DE SENSIBILITE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES.....	44
8/ ROLE DE LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE DANS LA PREVENTION DE LA RESISTANCE BACTERIENNE.....	46
CHAPITRE 3 : LES β-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI.....	47
1/ DEFINITION DES β-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI.....	48
2/ MECANISME D'ACTION DES β-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI.....	48
3/ NOMENCLATURE DES β-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI.....	49
4/ CLASSIFICATION DES β-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI.....	51
5/ METHODE DE DETECTION DES β-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI.....	58
6/ FACTEURS DE RISQUE D'ACQUISITION D'UNE ENTEROBACTERIE PRODUCTRICE DE β-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI.....	61
7/ CONSEQUENCES D'UNE INFECTION A ENTEROBACTERIE PRODUCTRICE DE β-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI.....	61
8/ PREVENTION CONTRE LA DISSEMINATION DES ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES DE β-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI.....	62
9/ TRAITEMENT DES INFECTIONS A ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES β-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI.....	63
DEUXIEME PARTIE : PARTIE PRATIQUE.....	66
INTRODUCTION.....	67
MATERIEL ET METHODES.....	69
RESULTATS.....	86
ARTICLE 1: Évolution récente du profil épidémiologique des entérobactéries uropathogènes productrices de β-lactamases à spectre élargi à Marrakech, Maroc...	87
ARTICLE 2: Profil actuel de résistance aux antibiotiques des souches d'<i>Escherichia coli</i> uropathogènes et conséquences thérapeutiques.....	99

ARTICLE 3: Sensibilité aux antibiotiques de souches urinaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i> uropathogènes et émergence de souches résistantes aux carbapénèmes: Une étude rétrospective menée au sein d'un hôpital universitaire au Maroc, Afrique du Nord.....	104
ARTICLE 4: La caractérisation moléculaire des souches d'<i>Escherichia coli</i> productrices de β-lactamase à spectre élargi dans un hôpital universitaire au Maroc, Afrique du Nord.....	110
DISCUSSION GENERALE.....	118
CONCLUSIONS.....	129
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	131



RESUME

Titre: ETUDE EPIDEMIO-MOLECULAIRE DES ENTEROBACTERIES PRODUCTRICES DE β -LACTAMASES A SPECTRE ELARGI AU CHU DE MARRAKECH

Mots-clés: Entérobactéries; β -lactamases à spectre étendu; résistance ; antibiotiques.

Les infections à entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi constituent un risque infectieux croissant et peuvent conduire à des impasses thérapeutiques du fait de leur multirésistance aux antibiotiques. Ces bactéries multirésistantes ont été rapportées dans plusieurs pays, notamment au Maroc. Cependant, aucune documentation n'est disponible sur le profil épidémiomoléculaire des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi au niveau de la région de Marrakech.

Ainsi, les objectifs de cette étude sont donc de suivre, sur une durée de trois ans, l'évolution du profil épidémiomoléculaire des entérobactéries uropathogènes productrices de β -lactamases à spectre élargi (E-BLSE) et de décrire leur niveau actuel de résistance aux antibiotiques.

Sur une durée de trois ans, nous avons constaté une importante augmentation de la prévalence des E-BLSE (9% en 2010 à 13% en 2012). L'étude de l'antibiorésistance des E-BLSE isolées a mis en évidence les taux de co-résistance suivants: 83% pour la ciprofloxacine, 83% pour l'association sulfaméthoxazole-triméthoprim (SXT), 80 % pour la gentamicine et 54 % pour l'amikacine.

Le typage moléculaire des souches d'entérobactéries productrices de BLSE a permis d'établir les profils suivants: CTX-M (70%), SHV (12%), CTX-M + SHV (12%) CTX-M1 + TEM (6%) et TEM (0%).

L'étude épidémiomoléculaire des entérobactéries productrices de BLSE permet une meilleure adaptation de l'antibiothérapie aux données épidémiologiques locales et s'avère essentielle pour une meilleure compréhension de leur mode de diffusion.

Title: EPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR STUDY OF EXTENDED SPECTRUM β -LACTAMASES PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE AT THE TEACHING HOSPITAL OF MARRAKECH

Key-words: Enterobacteriaceae, extended spectrum β -lactamases, resistance; antibiotics.

Infections due to extended spectrum β -lactamases (ESBL) producing enterobacteriaceae are a growing risk of infection and may even lead in many cases to therapeutic inefficiency because of their resistance to many antibiotics. These multidrug resistant bacteria have been reported in several countries, including Morocco. However, there are no available data on the epidemiological and molecular profile of the ESBL producing Enterobacteriaceae isolated at the Marrakech region.

The objectives of this study were to follow, over a period of three years, the evolution of the epidemiological profile of ESBL producing Enterobacteriaceae, describe their current level of antibiotic resistance and determine types of ESBLs produced by these multi-drug resistant bacteria.

Over a period of three years, we have seen a significant increase in the prevalence of ESBL producing Entérobacteriaceae (9% in 2010 to 13 % in 2012) which is becoming worrying not only in the hospital setting but also in the community. Study of antimicrobial resistance of the isolated ESBL producing Enterobacteriaceae showed the following rates of antibiotic resistance: 83% to ciprofloxacin, 83% to trimethoprim - sulfamethoxazole, 80% to gentamicin and 54% to amikacin.

Molecular typing of ESBL-producing Enterobacteriaceae strains showed the following ESBL production patterns: CTX-M (70%), SHV (12%), CTX-M + SHV (12%) CTX-M1 + TEM (6%) and TEM (0%).

The epidemiological and molecular study of ESBL producing Enterobacteriaceae remains essential for a better understanding of the diffusion mode of these multidrug resistant bacteria and also for a better adaptation of the probabilistic antibiotic therapy to local epidemiological data.

عنوان: الدراسة الوبائية و الجزئية للبكتيريا المعوية المنتجة لأنزيمات "بتلاكتماز" في المستشفى الجامعي بمراكش


الكلمات الرئيسية: البكتيريا المعوية- أنزيمات- بتلاكتماز- مقاومة- المضادات الحيوية.

العدوى الناجمة عن البكتيريا المعوية المنتجة لأنزيمات بتلاكتماز يشكل خطرا متزايدا وربما يؤدي في كثير من الحالات إلى عدم الكفاءة العلاجية بسبب مقاومة هذه البكتيريا للعديد من المضادات الحيوية. تم الإبلاغ عن هذه البكتيريا في العديد من الدول من بينها المغرب ومع ذلك لا توجد معلومات متاحة حول التعريف الوبائي و الجزئي لهذه البكتيريا المتواجدة في جهة مراكش.

تمثلت أهداف هذه الدراسة، على مدى ثلاث سنوات، في تتبع تطور الوضع الوبائي و الجزئي للبكتيريا المعوية المنتجة لأنزيمات بتلاكتماز، وصف مستواها الحالي لمقاومة المضادات الحيوية و تحديد أنواع الأنزيمات المنتجة.

على مدى ثلاث سنوات، شهدنا زيادة كبيرة في نسبة البكتيريا المنتجة الأنزيمات بتلاكتماز (9% سنة 2010 إلى 13% سنة 2012) وأصبحت مثيرة للقلق ليس فقط على مستوى المستشفيات ولكن أيضا خارجها. أظهرت دراسة مقاومات هذه البكتيريا للمضادات الحيوية النسب التالية: 83% لسيبروفلوكساسين، 83% لسولفاميتوكسازول / تريموثوبريم ، 80% لجونتايميسين و54% للأميكاسين. الدراسة الجزئية لأنواع الأنزيمات المنتجة تمثلت في انتاجات وحيدة: (70%) CTX-M ، SHV (12%)، (0%) TEM. بعض البكتيريا تنتج نوعين من الأنزيمات: (6%) CTX-M+TEM و (12%) CTX-M+SHV.

تبقى الدراسة الوبائية و الجزئية أساسية لملائمة العلاج الاحتمالي بمضادات الحيوية للبيانات الوبائية المحلية.



*PRODUCTION SCIENTIFIQUE
EN RAPPORT AVEC
LE SUJET DE THESE*

ARTICLES ORIGINAUX PUBLIES

1)EVOLUTION RECENTE DU PROFIL EPIDEMIOLOGIQUE DES ENTEROBACTERIES UROPATHOGENES PRODUCTRICES DE β -LACTAMASES A SPECTRE ELARGI A MARRAKECH, MAROC

M C. El BOUAMRI, L. ARSALANE, Y. El KAMOUNI, M. BERRAHA, S. ZOUHAIR

Article original publié au journal : Progrès en urologie (2014) 24, 451—455

2)DIAGNOSTIC PHENOTYPIQUE ET MOLECULAIRE DES BACTERIES MULTIRESISTANTES : LE POINT EN 2014

S. ZOUHAIR, M C. El BOUAMRI, Y. El KAMOUNI, H. YAHYAOUI, L. ARSALANE

Article original publié au Journal: Biologie Médicale » / Volume 3-Numéro 9 / Avril-Juin 2014

3)PROFIL ACTUEL DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES d'*Escherichia coli* UROPATHOGENES ET CONSEQUENCES THERAPEUTIQUES

M C. El BOUAMRI, L. ARSALANE, Y. El KAMOUNI, H. YAHYAOUI, N. BENNOUAR, M. BERRAHA, S. ZOUHAIR

Article original publié au journal : Progrès en urologie (2014) 24, 1058—1062

4)ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITIES AMONG URINARY *Klebsiella pneumoniae* AND THE EMERGENCE OF CARBAPENEM RESISTANT STRAINS: A RETROSPECTIVE STUDY FROM A UNIVERSITY HOSPITAL IN MOROCCO, NORTH AFRICA

M C. El BOUAMRI, L. ARSALANE, Y. El KAMOUNI, S. ZOUHAIR

Article original publié au journal: African Journal of Urology (2015) 21, 36-40.

5)MOLECULAR CHARACTERIZATION OF EXTENDED SPECTRUM β -LACTAMASE PRODUCING *Esherichia coli* IN UNIVERSITY HOSPITAL IN MOROCCO, NORTH AFRICA

M C. El BOUAMRI, L. ARSALANE, K. ZEROUALI, K. KAFTY, Y. El KAMOUNI, S. ZOUHAIR

Article original publié au journal: African Journal of Urology (2015) 21, 161-166.

■ COMMUNICATIONS AFFICHEES

1) EPIDEMIOLOGIE DES ENTEROBACTERIES SECRETRICES DE β -LACTAMASES ISOLEES D'INFECTIONS URINAIRES A MARRAKECH

M.C. EL BOUAMRI, L. ARSALANE, Y. EL KAMOUNI, M. BERRAHA, S. ZOUHAIR.
XVe journées scientifiques de l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech (Marrakech, 09-10 Novembre 2012);

2) FREQUENCE ET PROFIL DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES D'*Escherichia* ISOLEES A L'HMA DE MARRAKECH

M. C. EL BOUAMRI, L. ARSALANE, Y. EL KAMOUNI, M. BERRAHA, S. ZOUHAIR.
12^{ème} journée de l'association de lutte contre les maladies infectieuses « ALMI » (Marrakech, 08 Décembre 2012);

3) FREQUENCE ET PROFIL DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES DE *Klebsiella pneumoniae* ISOLEES A L'HMA DE MARRAKECH

M. C. EL BOUAMRI, L. ARSALANE, Y. EL KAMOUNI, M. BERRAHA, S. ZOUHAIR.
12ème journée de l'association de lutte contre les maladies infectieuses « ALMI » (Marrakech, 08 Décembre 2012);

4) PROFIL EPIDEMIOLOGIQUE DES ENTEROBACTERIES SECRETRICES DE BETA-LACTAMASES ISOLEES A MARRAKECH

M. C. EL BOUAMRI, L. ARSALANE, Y. EL KAMOUNI, M. BERRAHA, S. ZOUHAIR.
4èmes journées du centre des études doctorales de la faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat « CEDOC » (Rabat, 15-16 Février 2013);

5) PROFIL EPIDEMIOLOGIQUE DES SOUCHES DE *Klebsiella pneumoniae* UROPATHOGENES PRODUCTRICES DE β -LACTAMASES A SPECTRE ELARGI ISOLEES A L'HOPITAL MILITAIRE AVICENNE DE MARRAKECH

M.C. EL BOUAMRI, L. ARSALANE, Y. EL KAMOUNI, H. EL YAHIAOUI, M. BERRAHA, S. ZOUHAIR.
13èmes journées Marocaines de Biologie Clinique de la société Marocaine de Chimie Clinique « SMCC » (Casablanca, 06-08 Juin 2013);

6) PROFIL DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES D'*Escherichia coli* UROPATHOGENES A MARRAKECH

M.C. EL BOUAMRI, L. ARSALANE, Y. EL KAMOUNI, H. EL YAHIAOUI, N. BENNOUAR, M. BERRAHA, S. ZOUHAIR.

13ème journée de l'association de lutte contre les maladies infectieuses « ALMI » (Marrakech, 14 Décembre 2013);

7) EVOLUTION RECENTE DU PROFIL EPIDEMIOLOGIQUE DES ENTEROBACTERIES UROPATHOGENES PRODUCTRICES DE β -LACTAMASES A SPECTRE ELARGI A MARRAKECH

M.C. EL BOUAMRI, L. ARSALANE, Y. EL KAMOUNI, H. EL YAHIAOUI, N. BENNOUAR, M. BERRAHA, S. ZOUHAIR.

13ème journée de l'association de lutte contre les maladies infectieuses « ALMI » (Marrakech, 14 Décembre 2013);

8) CURRENT ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE OF UROPATHOGENIC *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED IN THE MARRAKECH REGION

M.C. EL BOUAMRI, L. ARSALANE, Y. EL KAMOUNI, H. EL YAHIAOUI, N. BENNOUAR, M. BERRAHA, S. ZOUHAIR.

12èmes journées scientifiques d'internat de Marrakech « JIM » (Marrakech, 26-29 Mars 2014);

9) PROFIL EPIDEMIOLOGIQUE DES SOUCHES D'*Escherichia coli* UROPATHOGENES PRODUCTRICES DE β -LACTAMASES A SPECTRE ELARGI ISOLEES A MARRAKECH

M.C. EL BOUAMRI, L. ARSALANE, Y. EL KAMOUNI, H. EL YAHIAOUI, N. BENNOUAR, M. BERRAHA, S. ZOUHAIR.

5èmes journées Nationales de Biologie Practicienne « AMBM » (El Jadida, 4-5 Avril 2014);

10) PROFIL EPIDEMIOLOGIQUE ACTUEL DES SOUCHES DE *Klebsiella pneumoniae* UROPATHOGENES A MARRAKECH

M.C. EL BOUAMRI, L. ARSALANE, Y. EL KAMOUNI, H. EL YAHIAOUI, N. BENNOUAR, M. BERRAHA, S. ZOUHAIR.

2^{ème} congrès de la Société Marocaine d'infectiologie Pédiatrique et de Vaccinologie « SOMIPEV » (Marrakech, 11-13 Avril 2014);

11) LA RESISTANCE D'*Escherichia coli* UROPATHOGENES AUX FLUOROQUINOLONES : ETUDE A PROPOS DE 924 ISOLATS A L'HOPITAL MILITAIRE AVICENNE MARRAKECH

Y. EL KAMOUNI, M.C. EL BOUAMRI, Y. AIT EL FKI, H. EL YAHIAOUI, M. BERRAHA, L. ARSALANE, S. ZOUHAIR.

13èmes journées Marocaines de Biologie Clinique de la société Marocaine de Chimie Clinique « SMCC » (Casablanca, 06-08 Juin 2013);

12) PROFIL EPIDEMIOLOGIQUE DES INFECTIONS A *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* RESISTANT A LA CEFTAZIDIME ISOLEES A MARRAKECH

H.YAHYAOU, Y.EL KAMOUNI, M.C. EL BOUAMRI, N.BENNOUAR, L.ARSALANE, S.ZOUHAIR

13ème journée de l'association de lutte contre les maladies infectieuses « ALMI » (Marrakech, 14 Décembre 2013);

13) PROFIL BACTERIOLOGIQUE DES INFECTIONS A *Acinetobacter baumannii* ISOLEES A L'HOPITAL MILITAIRE AVICENNE DE MARRAKECH

H.YAHYAOU, Y. EL KAMOUNI, M.C. EL BOUAMRI, N.BENNOUAR, L.ARSALANE, S.ZOUHAIR

13ème journée de l'association de lutte contre les maladies infectieuses « ALMI » (Marrakech, 14 Décembre 2013);

14) FREQUENCE DES BACTERIES MULTIRESISTANTES A L'HOPITAL MILITAIRE AVICENNE DE MARRAKECH

H. YAHYAOU, M.C. EL BOUAMRI, N. BENNOUAR, M. BERRAHA, Y. EL KAMOUNI, L. ARSALANE, S. ZOUHAIR.

13èmes journées Marocaines de Biologie Clinique de la société Marocaine de Chimie Clinique « SMCC » (Casablanca, 06-08 Juin 2013);

15) *ACINETOBACTER BAUMANNII* MULTIRESISTANT : EPIDEMIOLOGIE ACTUELLE A L'HOPITAL MILITAIRE AVICENNE DE MARRAKECH

L. ARSALANE, M. C. EL BOUAMRI, M. BERRAHA, Y. EL KAMOUNI, M. EL MEZOUARI, S. ZOUHAIR.

XVe journées scientifiques de l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech (Marrakech, 09-10 Novembre 2012);

16) PROFIL EPIDEMIOLOGIQUE DE LA TUBERCULOSE A MARRAKECH

M. BERRAHA, L. ARSALANE, M.C. EL BOUAMRI, Y. EL KAMOUNI, S. ZOUHAIR.

XVe journées scientifiques de l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech (Marrakech, 09-10 Novembre 2012);



INTRODUCTION

Les entérobactéries forment un vaste groupe de bacilles à Gram négatif largement distribués dans la nature et dans le tube digestif de l'homme et des animaux, d'où leur nom « entérobactéries ». Ces bactéries, caractérisées par leur multiplication rapide et leur acquisition fréquente de la résistance aux antibiotiques, occupent une place importante en pathologie infectieuse humaine et représentent ainsi la plus grande partie de l'activité du laboratoire de bactériologie médicale. Sur le plan de la pathologie humaine, les différentes espèces d'entérobactéries peuvent être schématiquement classées en deux principaux groupes :

- Les bactéries pathogènes opportunistes: Les espèces bactériennes appartenant à ce groupe font partie de la flore commensale habituelle de l'homme et des animaux. Les infections bactériennes ont donc généralement un point de départ endogène et sont très fréquentes.
- Les bactéries pathogènes spécifiques: Ces espèces bactériennes sont strictement pathogènes (Par exemple: l'ingestion des espèces bactériennes appartenant aux genres: *Salmonella*, *Yersinia* et *Shigella*).

Par ailleurs, les β -lactamines constituent une famille majeure d'antibiotiques qui sont très largement utilisés en clinique en raison de leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et leur faible coût pour de nombreuses molécules [1]. L'usage intensif et souvent abusif de ces antibiotiques a été rapidement suivi par l'apparition de souches multirésistantes et a compromis, dans de nombreux cas, l'utilisation en antibiothérapie de ces molécules de choix. En effet, les bactéries ont développé différents mécanismes de résistance aux β -lactamines, notamment la synthèse d'enzymes (β -lactamases) qui catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame donnant un produit biologiquement inactif [2].

La production de BLSE a été décrite pour la première fois chez une souche de *Klebsiella pneumoniae*, en 1983 en République Fédérale d'Allemagne [3, 4, 5]. Par la suite, plus de 200 types de β -lactamases ont été décrites (www.Lahey.org/studies/inc_webt.html) à travers le monde [5]. Elles ont été classées en 11 familles différentes sur la base de leur séquence d'acides aminés : TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, FEC et OXA. Les enzymes de type TEM (Temoniera), SHV (Sulfhydryl variable) et CTX-M (Céfotaximase-Munich.) représentent les trois familles majeures de BLSE. Elles confèrent aux entérobactéries la résistance à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes et sont inhibées partiellement par les inhibiteurs des β -lactamases tel l'acide clavulanique [4].


Alors que les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi (E-BLSE) étaient observées essentiellement en milieu hospitalier, la diffusion de ces germes multirésistants en milieu communautaire est de plus en plus importante [6, 7]. La transmission, principalement plasmidique, des gènes codants pour les BLSE est responsable de leur dissémination rapide et ainsi de l'augmentation de la prévalence des bactéries productrices de BLSE partout dans le monde [8].

Les infections induites par les souches productrices d'E-BLSE sont généralement responsables d'une morbi-mortalité élevées et de dégâts économiques importants suite au prolongement de la durée d'hospitalisation et au recours à des médicaments souvent onéreux pour le traitement de ce genre d'infections [9, 10].

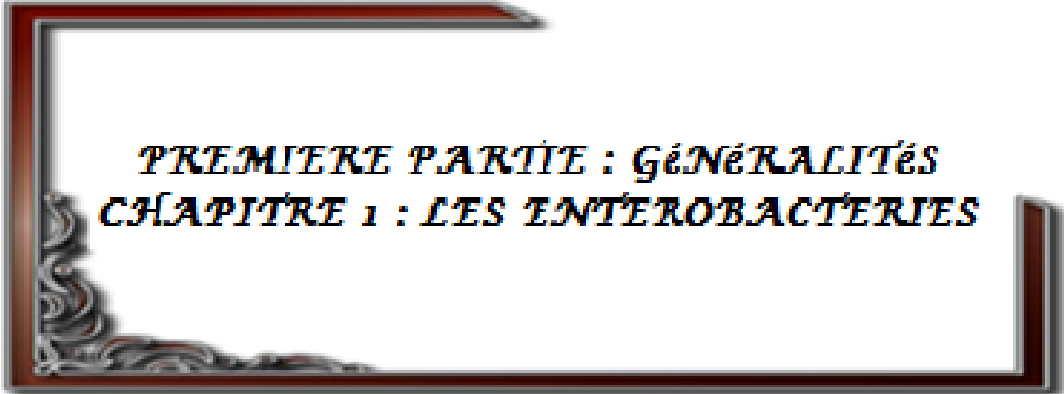
Actuellement, la résistance bactérienne aux antibiotiques est devenue un défi majeur des industries pharmaceutiques au niveau du monde entier. En effet, cette grande capacité des entérobactéries à résister aux principaux antibiotiques utilisés en antibiothérapie amène à un constat pessimiste quant à l'efficacité de notre arsenal thérapeutique dans le traitement des infections à BMR, notamment les entérobactéries productrices de BLSE. Bien que la surveillance épidémiologique, ainsi que la maîtrise de la diffusion de ces bactéries multirésistantes constitue une priorité, peu de données permettent de définir l'ampleur de ce phénomène au Maroc.

La connaissance du profil épidémiologique des entérobactéries à intérêt médical est indispensable pour une meilleure optimisation du traitement empirique des infections à entérobactéries dans notre région par l'adaptation du protocole d'antibiothérapie aux données épidémiologiques locales et l'élaboration d'une stratégie de contrôle de la résistance antimicrobienne. Dans ce cadre, les objectifs de cette étude étaient de:

- Trouver une bonne méthodologie de détection des entérobactéries productrices de BLSE.
- Suivre l'évolution du profil épidémiologique des entérobactéries uropathogènes productrices de β -lactamases à spectre élargi (E-BLSE) isolées dans le service de microbiologie de l'hôpital Militaire Avicenne de Marrakech et de décrire leur niveau actuel de résistance aux antibiotiques.
- Etablir la caractérisation moléculaire des principaux types de BLSE produites « blaCTX-M, blaTEM et blaSHV » par les E-BLSE isolés au niveau de la région de Marrakech.
- Formuler les recommandations prévenant la diffusion de ces bactéries multirésistantes contre lesquelles les possibilités thérapeutiques sont très réduites, voire nulles.



PREMIERE PARTIE
GénéRALITés



PREMIERE PARTIE : GÉNÉRALITÉS
CHAPITRE 1 : LES ENTEROBACTERIES

1/ Définition des entérobactéries [11, 12, 13, 14, 15, 16]:

La famille des entérobactéries comprend plusieurs genres bactériens dont certains sont les hôtes principaux du tube digestif de l'Homme et des animaux. Ils sont retrouvés soit à l'état de pathogène, soit à l'état de commensal. Toutes les entérobactéries répondent à la définition générale suivante:

- a) Bacilles à Gram négatif;
- b) Mobiles avec ciliature péritriche ou immobiles (Exemple : les genres *Shigella* et *Klebsiella*);
- c) Pousent facilement sur des milieux de culture ordinaires à 37°C;
- d) Aérobie-anaérobie facultatif;
- e) Fermentent le glucose avec ou sans production de gaz;
- f) Réduisent les nitrates en nitrites;
- g) Possèdent une catalase (à l'exception de l'espèce *Shigella dysenteriae*);
- h) Ne possèdent pas d'oxydase.
- i) Ne sont pas sporogènes.

Les différences entre ces nombreuses espèces bactériennes viennent de critères plus précis, tels que la fermentation des sucres, la production ou non de sulfure et la production d'enzymes du métabolisme (Exemple : les désaminases et les décarboxylases).

2/ Caractères bactériologiques des entérobactéries:

2.1/ Caractères morphologiques [17, 18, 19]:

Les dimensions des entérobactéries varient selon l'espèce bactérienne, la souche bactérienne et l'âge de la culture. Ce sont des bacilles à Gram négatif généralement de 2 à 4 microns de long sur 0,4 à 0,6 microns de large. Un grand polymorphisme est présent chez certains genres bactériens comme le genre *Proteus* dont l'appellation provient de Protée qui est un dieu de la mythologie grecque qui changeait de forme à volonté.

La plupart des entérobactéries sont mobiles avec des flagelles pouvant atteindre 20 µm. Cette mobilité peut varier en fonction de la température d'incubation (Par exemple: *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica* sont habituellement mobiles à 28°C et immobiles à 37°C). D'autres espèces d'entérobactéries sont cependant immobiles (par exemple : les espèces bactériennes des genres *Klebsiella* et *Shigella*).

Les entérobactéries peuvent posséder des pili communs qui leur confèrent des propriétés agglutinantes pour les hématies. Les bactéries hébergeant des plasmides possèdent généralement d'autres types de pili, nommés pili sexuels, qui interviennent dans le transfert du matériel génétique d'une bactérie à une autre par conjugaison. Certaines espèces d'entérobactéries, comme *Klebsiella pneumoniae*, peuvent être entourées par une capsule qui leur confère la virulence.

2.2/ Caractères cultureux [20, 21]:

A l'exception de certaines bactéries exigeantes qui nécessitent pour leur croissance un ou plusieurs facteurs de croissance, les entérobactéries sont des aérobies-anaérobies facultatives qui se développent facilement sur des milieux de cultures ordinaires.

La température optimale de croissance est habituellement entre 35° à 37°C et le temps de division moyen varie de 20 à 40 min avec donc un maximum de culture atteint habituellement en moins de 24h d'incubation.

Sur milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries peuvent prendre différents aspects (Exemple : L'espèce *Klebsiella pneumoniae* forme, sur gélose, de grandes colonies muqueuses et luisantes avec une tendance à la confluence).

2.3/ Caractères biochimiques [21, 22]:

Les entérobactéries possèdent de nombreux caractères biochimiques grâce à leur grande diversité enzymatique. Certains caractères biochimiques peuvent être communs à toutes les entérobactéries comme ils peuvent être présents uniquement chez certaines espèces d'entérobactéries. Ces derniers sont ainsi appelés des caractères de différenciation et jouent un rôle primordial dans l'identification bactérienne.

•Les principaux caractères biochimiques communs sont:

- Fermentation du glucose avec ou sans production de gaz;
- Réduction des nitrates en nitrites;
- Oxydase négative;
- Catalase positive (à l'exception de *Shigella dysenteriae* sérotype 1);
- Aérobies-anaérobies facultatifs.

• **Les caractères de différenciation sont:**

Les caractères biochimiques de différenciation utilisent des tests qui étudient :

- le métabolisme protéique (Par exemple: présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane);
- la fermentation des sucres (Par exemple: glucose, lactose, saccharose);
- la capacité d'utiliser le citrate comme seule source de carbone;
- la production d'enzymes (décarboxylases, désaminases);
- la production d'hydrogène sulfuré.

2.4/ Caractères antigéniques [23]:

Les entérobactéries possèdent différents types d'antigènes dont les principaux sont:

- **Antigènes O (ou somatiques):** Ces antigènes de la paroi bactérienne sont présents chez toutes les entérobactéries. Ils sont de nature lipopolysaccharidique et thermostable à 100°C. L'agglutination des bactéries par l'antisérum O de spécificité correspondante est lente et granulaire. L'antigène O est constitué d'une mosaïque d'antigènes dont certains sont des constituants communs à toutes les entérobactéries, et d'autres, des constituants spécifiques de chaque espèce. Il comprend trois parties: la paroi lipidique, la partie 'core' et le polysaccharide.
- **Antigènes H (ou flagellaires):** Ces antigènes sont présents uniquement chez les entérobactéries mobiles. L'antigène H est thermolabile (détruit par la chaleur) à 100°C. Les anticorps H se fixent sur les flagelles et entraînent la formation d'agglutinats caractéristiques floconneux d'apparition plus rapide que les agglutinats O.
- **Antigènes capsulaires K:** Ce sont des antigènes de l'enveloppe. Ce sont des antigènes solubles et thermolabiles utilisés dans le diagnostic au laboratoire par des techniques d'agglutinations souvent simples et rapides.

3/ Classification des principales espèces d'entérobactéries:

La famille des entérobacteriaceae comprend plus de 30 genres et 120 espèces bactériennes répertoriées. Le tableau 1 résume les principales espèces à intérêt médical communément isolées aux laboratoires de bactériologie médicale:

Genre bactérien	Espèce bactérienne
Escherichia	<i>E. coli</i>
Klebsiella	<i>K. pneumoniae, K. oxytoca, K. ozaenae, K. rhinoscleromatis</i>
Enterobacter	<i>E. cloacae, E. aerogenes, ...</i>
Citrobacter	<i>C. freundii, C. koseri, ...</i>
Proteus	<i>P. mirabilis, P. vulgaris, P. penneri, ..</i>
Providencia	<i>P. rettgerii, P. stuartii, P. alcalifaciens, ...</i>
Morganella	<i>M. morganii</i>
Serratia	<i>S. marcescens, ...</i>
Salmonella	<i>S. enterica</i> (6 sous types)
Yersinia	<i>Y. pestis, Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis</i>

Tableau 1: Classification des principales espèces d'entérobactéries isolées au laboratoire de bactériologie médicale.

3.1/ *Escherichia coli* [21, 22] :

L'espèce bactérienne *Escherichia coli* (*E. coli*) a été isolée pour la première fois par Theodor Escherich en 1885. Elle est retrouvée en abondance dans la flore commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. *E. coli* est l'une des espèces bactériennes la plus souvent impliquée en pathologie infectieuse, notamment dans les infections urinaires (plus de 80%) et certaines entéropathies pouvant être dues à certaines souches d'*E. coli* appartenant à l'un des groupes d'*Escherichia coli* suivants:

- a. Les *E. coli* entéro-hémorragiques (ECEH): Ces bactéries sont capables de produire des toxines et provoquer des diarrhées sanglantes;
- b. Les *E. coli* entérotoxigènes (ECET): Elles sont responsables de la « diarrhée des voyageurs » et des syndromes épidémiques dans les pays du tiers monde;

- c. Les *E. coli* entéro-invasifs (ECEI): Elles sont capables de pénétrer dans les cellules et de provoquer des syndromes dysentériques avec invasion de la muqueuse intestinale;
- d. Les *E. coli* entéropathogènes (ECEP): Elles sont responsables de gastro-entérites infantiles.

E. coli exprime les caractères généraux des entérobactéries et elle est entre autres : lactose (+), ONPG (+), indole (+), acétoïne (-), citrate (-), uréase (-).

3.2/ Le groupe Klebsiella/ Enterobacter/ Serratia (KES) :

Les entérobactéries appartenant au groupe KES utilisent, pour la fermentation du sucre, une voie métabolique particulière qui produit l'acétoïne mis en évidence par la réaction de Voges Proskauer (VP).

3.2. a/ Le genre Klebsiella [13, 24, 25] :

Ce genre comporte des entérobactéries toujours immobiles, généralement entourées d'une capsule polysaccharidique, plus ou moins volumineuse selon les espèces bactériennes et selon les types antigéniques capsulaires. Le genre *Klebsiella* compte 4 principales espèces: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*.

K. pneumoniae et *K. oxytoca* sont des bactéries ubiquistes principalement isolées dans les infections urinaires mais aussi dans les infections de plaies et les bactériémies. Certaines *K. pneumoniae* peuvent aussi être responsables de pneumopathies aiguës.

K. ozaenae et *K. rhinoscleromatis* sont strictement adaptées au tractus respiratoire de l'homme. Elles sont ainsi souvent responsables d'affections sévères et souvent chroniques de l'arbre respiratoire. *K. rhinoscleromatis* est l'agent du rhinosclérome et *K. ozaenae* peut être l'agent d'infections bronchiques chroniques dans les bronchiectasies ou la mucoviscidose. En raison de parentés génomiques, les taxonomistes considèrent les espèces *K. ozaenae* et *K. rhinoscleromatis* comme des sous-espèces de *Klebsiella pneumoniae*, soit respectivement *K. pneumoniae subsp. ozaenae* et *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*.

3.2. b/ Le genre Enterobacter :

Les espèces bactériennes appartenant au genre *Enterobacter* sont des entérobactéries mobiles qui poussent facilement sur tous les milieux d'isolement pour bacilles à Gram négatif. Le genre *Enterobacter* comprend trois principales espèces : *E. cloacae*, *E. aerogenes*

et *E. agglomerans*. On rencontre *E. aerogenes* et *E. cloacae* dans la nature (eau et sol), les aliments et l'environnement hospitalier. *E. agglomerans* est une bactérie tellurique isolée de végétaux et légumes. Chez l'homme, ces bactéries ne sont pas entéropathogènes et sont principalement isolées de fécès.

3.2. c/ Le genre *Serratia*:

Le genre *Serratia* comprend 8 espèces, dont les principales sont *S. marcescens* et *S. liquefaciens*. Certaines souches produisent un pigment rouge (prodigiosine) et montrent souvent une multirésistance aux antibiotiques. *Serratia marcescens*, espèce fréquemment isolée en milieu hospitalier, est responsable de nombreuses infections nosocomiales, notamment d'infections urinaires et respiratoires.

3.3/ Le genre *Citrobacter* :

Ces entérobactéries, ayant en commun la capacité d'utiliser le citrate comme seule source de carbone, sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme. Le genre *Citrobacter* comprend deux espèces fréquemment isolées dans le laboratoire de bactériologie médicale: *Citrobacter freundii* et *Citrobacter koseri*.

3.4/ Le groupe *Morganella/Proteus/Providencia* :

Les bactéries de ce groupe sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux et peuvent également être retrouvées sur la peau et les muqueuses. Les principales espèces bactériennes appartenant à ce groupe sont:

- *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris*;
- *Morganella morganii*;
- *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii* et *Providencia alcalifaciens*.

Contrairement aux autres entérobactéries, toutes ces espèces possèdent des enzymes (la tryptophane désaminase et la phénylalanine désaminase), constituant ainsi un test idéal pour leur identification. *P. mirabilis* et *P. vulgaris* ont aussi la particularité d'envahir la surface des milieux gélosés solides.

Les *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* sont souvent responsables d'infections urinaires. *P. mirabilis* possède une uréase très active ce qui provoque une forte alcalinité des urines. Ce pH élevé prédispose le patient à la formation de calculs urinaires en facilitant la précipitation de sels normalement présents dans l'urine.

3.5/ Le genre Salmonella [21, 22, 23] :

Les Salmonelles sont des bactéries qui se disséminent dans la nature par les selles. Chez l'homme, elles sont principalement responsables de la fièvre typhoïde et de gastro-entérites. Taxonomiquement, il existe actuellement une seule espèce bactérienne appartenant au genre Salmonella: *Salmonella enterica*. Cette espèce comprend néanmoins plus de 2300 sous-types sérologiques différenciés sur la base des antigènes somatiques (O) et flagellaires (H).

En pratique médicale, il importe de connaître quatre sérovars de *Salmonella* qui sont adaptés à l'homme (seul réservoir) et chez qui ces bactéries provoquent une maladie stéréotypée : la fièvre typhoïde. Ce sérovars sont: *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* et *S. Paratyphi C*. La plupart des salmonelles sont : ONPG (-), Indole (-), Uréase (-), TDA (-) et H₂S (+) « à l'exception de *S. paratyphi A* ».

3.6/ Le genre Shigella :

Les *Shigella* sont des bactéries entéro-invasives, capables de pénétrer dans les cellules épithéliales de la muqueuse et de s'y multiplier provoquant une inflammation de la muqueuse qui se traduit par une diarrhée glaireuse et sanguinolente.

Ce sont des bactéries strictement humaines à faible pouvoir métabolique et génotypiquement très voisines des *Escherichiae*. Ce genre bactérien comporte principalement 4 espèces : *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* et *S. sonnei*.

La transmission de ces germes fait intervenir différents vecteurs: l'eau, les aliments et les contacts directs. La contamination peut se faire à partir d'un très petit nombre de bactéries et le diagnostic de ces infections se fait par coproculture.

4/ Diagnostic bactériologique:

Les entérobactéries peuvent être isolées à partir de différents prélèvements pathologiques réalisés de différents sites de l'organisme. La procédure normale de recueil de ces échantillons (sang, tractus respiratoire, plaies, urines et autres) est alors suivie.

4.1/ Diagnostic bactériologique direct:

4.1.1/ Examen macroscopique:

Il dépend du site du prélèvement pathologique et contribue à l'orientation de la conduite de l'examen bactériologique.

4.1.2/ Examen microscopique:

❖ Examen à l'état frais:

- La cytologie: Consiste à dénombrer les globules rouges (Erythrocytes) et les globules blancs (Leucocytes).
- La formule leucocytaire: Consiste à déterminer les proportions des leucocytes polynucléaires neutrophiles et des leucocytes lymphocytaires. Dans le cas d'une infection bactérienne, notamment à entérobactéries, on note une réaction leucocytaire à prédominance neutrophile (PNN).
- La mobilité: les principaux genres d'entérobactéries immobiles sont *Klebsiella* et *Shigella*.

❖ Examen après coloration au Gram:

- Il renseigne sur l'aspect des bactéries: les entérobactéries ont toutes un aspect en bacilles en gram négatif.

4.1.3/ Culture:

Les entérobactéries se développent facilement sur la plupart des milieux gélosés utilisés en routine au laboratoire de bactériologie médicale, notamment les milieux suivants: le MacConkey, le pourpre de bromocrésol « BCP ». Les entérobactéries les plus fréquemment isolées ont un aspect caractéristique sur gélose au sang ou gélose de MacConkey utile pour l'identification présomptive. Certains milieux sélectifs comme le milieu Salmonelle-Shigelle (SS) sont habituellement proposés pour la culture des pathogènes entériques du tractus gastro-intestinal.

La majorité des entérobactéries se développent en 18 à 24 heures dans des conditions de cultures habituelles (incubation à 37°C en aéro-anaérobiose). Seule *Yersinia pestis* fait exception car elle se développe mieux entre 25 et 30°C qu'à une température de 37°C.

Sur des milieux de culture gélosés, les entérobactéries forment des colonies généralement de grande taille (1,5 à 3 mm), rondes, lisses et bombées. Les colonies de *Klebsiella* et d'*Enterobacter* peuvent apparaître muqueuses du fait de la présence d'une capsule polysaccharidique.

Des espèces très mobiles comme *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris* peuvent être capables d'envahir la gélose au sang ou chocolat en formant un film fin à la surface de la gélose. Les milieux déficients en électrolytes comme le milieu CLED empêchent ce phénomène.

4.1.4/ Identification:

Au sein des entérobactéries, on distingue de nombreuses espèces bactériennes dont les plus fréquemment isolées sont *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*. L'identification des espèces bactériennes passe nécessairement par la réalisation d'un nombre de tests biochimiques dont les principaux sont:

•Test de l'oxydase:

Ce test permet de mettre en évidence la production, par la bactérie étudiée, d'une enzyme: « l'oxydase ». Les bactéries possédant une chaîne respiratoire complète sont dotées d'une cytochrome oxydase. L'oxydation du Tétraméthyl-p-phénylènediamine indique que la bactérie étudiée possède une oxydase. Dans le cas des entérobactéries, bactéries non productrices d'oxydases, le test doit être négatif.

•Test de la catalase:

Les bactéries productrices de catalase ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et produire l'oxygène gazeux selon la réaction suivante:



Ce test consiste à mettre en contact la bactérie à étudier en présence d'eau oxygénée (H_2O_2). La formation de bulles, due à un dégagement du dioxygène, signe la positivité du test indiquant que la bactérie est productrice de catalase.

A l'exception de *Shigella dysenteriae* type 1, la plupart des entérobactéries isolées au laboratoire de bactériologie produisent une catalase et sont donc dites bactéries à catalase-positives.

•**Les tests de fermentation des sucres:**

Ces tests permettent la détection de la fermentation de différents sucres tels que le glucose, le lactose et le saccharose. La fermentation des sucres engendre une modification du pH du milieu se traduisant par un virage de la coloration indiquant ainsi la positivité du test. Ces tests de fermentation des sucres contribuent significativement à l'identification de l'espèce bactérienne étudiée.

•**Le test à l'ONPG (Orthonitrophényl β -D-Galactopyranoside):**

Le test à l'ONPG, indiquant la présence d'une enzyme utile au métabolisme du lactose, est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène « l'ortho-nitrophényl- β -D-galactopyranoside », se traduisant par la libération de l'orthonitrophénol (jaune) et le β -naphtol. Le virage de la coloration du milieu d'étude indique la positivité du test et la bactérie étudiée est ainsi dite bactérie à ONPG-positive.

•**La recherche de la formation de l'acétoïne (acétyl méthyl carbinol) ou Réaction de Voges-Proskauer (VP):**

Cette réaction permet de mettre en évidence la formation de l'acétoïne qui en présence d'une base forte donne une coloration rouge-rose spécifique. Les principales espèces productrices de l'acétoïne sont celles appartenant au groupe Klebsiella/ Enterobacter/ Serratia (KES).

•**La recherche de la production de l'uréase:**

Ce test est réalisé sur un milieu urée-tryptophane qui est couramment appelé urée-indole. Les bactéries productrices d'une uréase active scindent l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniac. La production de l'uréase entraîne à une alcalinisation du milieu se traduisant par un virage de l'indicateur coloré.

•**La recherche de la production d'indole:**

Ce test est réalisé sur un milieu urée-tryptophane. Les bactéries possédant une tryptophanase dégradent le tryptophane en indole, en acide pyruvique et en ammoniac. L'indole formé réagit avec le réactif de Kovacs (ou le paradiméthylaminobenzaldéhyde) en milieu acide pour donner un anneau rouge qui remonte en surface.

•**L'utilisation du citrate de Simmons:**

Ce test consiste à mettre en culture la bactérie à étudier dans un milieu contenant le citrate comme seule source de carbone. Seules les bactéries capables d'utiliser le citrate vont pouvoir se développer sur ce milieu. Cette utilisation du citrate se traduit par le virage de l'indicateur coloré du pH témoignant ainsi de la positivité du test.

•**La recherche des décarboxylases:**

Les décarboxylases telles que la lysine décarboxylase « LDC », ornithine décarboxylase « ODC » et arginine décarboxylase « ADC » sont des enzymes capables de scinder les acides aminés correspondants et entraînent la libération de l'amine et du dioxyde de carbone. La synthèse de ces enzymes est favorisée par un pH acide et des conditions d'anaérobiose (dans un tube étroit).

Le milieu d'étude contient du glucose, un indicateur coloré (le rouge phénol) et l'acide aminé correspondant à chaque enzyme testée. Dans un premier temps, la fermentation du glucose entraîne une acidification du milieu favorisant la synthèse des décarboxylases. La libération de l'amine entraîne une augmentation du pH se traduisant par un virage de l'indicateur coloré du pH.

4.1.5/ Systèmes d'identification des espèces bactériennes:

L'emploi de systèmes dits classiques d'identification utilisant par exemple le milieu Kligler pour la fermentation des hydrates de carbone et le milieu de Moeller pour l'étude des décarboxylases a été progressivement abandonné au bénéfice de méthodes commercialisées miniaturisées (Par exemple : les galeries d'identification biochimique API 20E pour l'identification des entérobactéries) et par des méthodes automatisées d'identification bactérienne (Par exemple : le microscan walkaway®).

➤**La galerie d'identification biochimique (API 20 E):**

Il s'agit d'une galerie de 20 microtubes prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 tests biochimiques afin d'identifier des entérobactéries (Figure 1). Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests sont regroupés en groupes de 3 et une valeur de (1, 2, ou 4) est indiquée pour chacun. On obtient à

la fin un code de 9 chiffres qui sert à l'identification bactérienne grâce à un catalogue analytique.

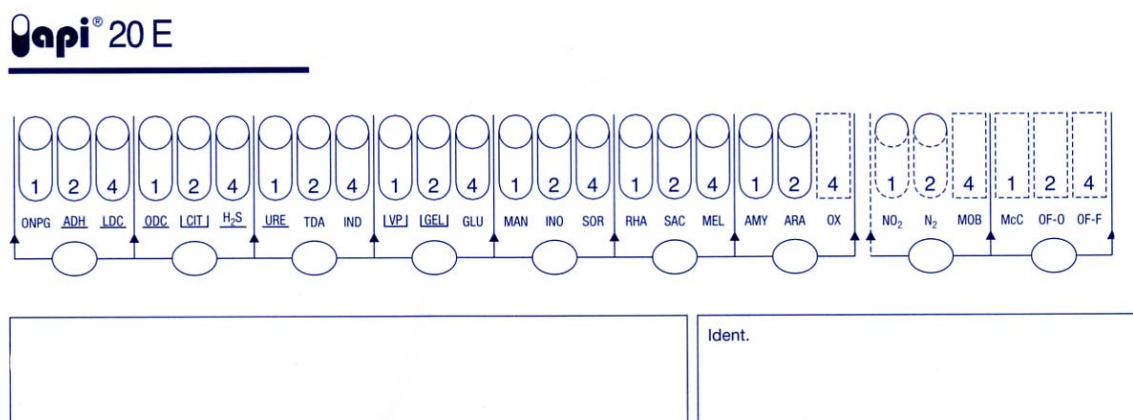


Figure 1 : Galerie Api 20E pour l'identification des entérobactéries.

➤ **La méthode automatisée d'identification:**

Les instruments entièrement automatisés tel que le Microscan-WalkAway® permettent, l'identification et l'antibiogramme des bactéries d'intérêt clinique permettant avec des résultats rapides, fiables et complets pour une meilleure prise en charge du patient.

La figure 2 montre un exemple d'une plaque pour l'identification d'un germe bactérien par l'automate Microscan-WalkAway®. Cette plaque comporte deux principales parties:

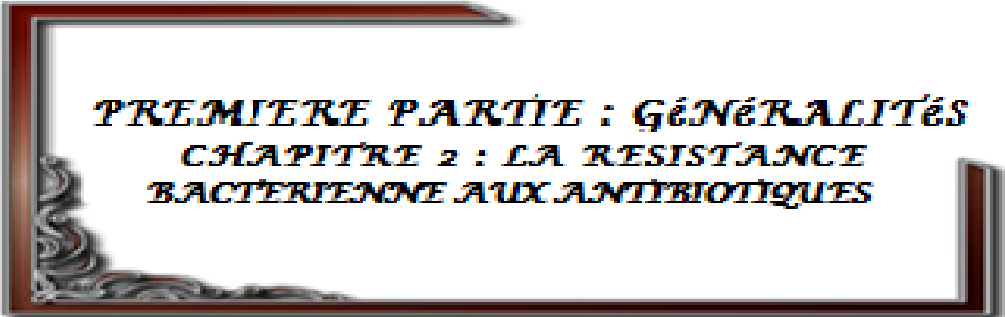
- La partie biochimique pour l'identification bactérienne: Elle permet d'identifier les germes d'intérêt clinique par colorimétrie et par fluorescence.
- La partie antibiogramme : Elle permet la mesure par turbidimétrie des concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour les antibiotiques testés. Une seule concentration d'antibiotique est testée par puits en milieu liquide avec la possibilité d'un contrôle visuel par l'utilisateur.



Figure 2: Plaque d'identification bactérienne par l'automate Microscan-WalkAway®.

4.2/ Diagnostic indirect (sérodiagnostic):

Les techniques de sérodiagnostic ne sont utilisées que pour certaines entérobactéries à identification difficile au laboratoire de microbiologie comme *Salmonella Typhi* et *Yersinia pestis*. Ces techniques reposent sur la détection de la production d'anticorps par ELISA ou par immunofluorescence. Les anticorps agglutinants peuvent être mesurés pour le diagnostic de la fièvre typhoïde. Le diagnostic sérologique de la peste est possible en utilisant des tests d'hémagglutination passive ou ELISA. Ces tests de sérodiagnostic sont habituellement réalisés dans des laboratoires de référence.



PREMIERE PARTIE : GÉNÉRALITÉS
CHAPITRE 2 : LA RESISTANCE
BACTERIENNE AUX ANTI-BIOTIQUES

1/ Définition de la résistance bactérienne :

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique donné quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration de cet antibiotique notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la plupart des souches appartenant à la même espèce bactérienne.

2/ Types de résistance bactérienne [26, 27] :

2.1/ La résistance naturelle :

C'est la résistance de toutes les souches d'une même espèce bactérienne à un antibiotique donné. Elle correspond à l'existence d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance innés, héréditaires et transmissibles verticalement à la descendance.

Ce type de résistance détermine le phénotype sauvage d'une espèce vis-à-vis d'un antibiotique. Par exemple: *Klebsiella pneumoniae*, grâce à sa pénicillinase naturelle de bas niveau, est naturellement résistante aux aminopénicillines (Par exemple: l'amoxicilline) et aux carboxypénicillines (Par exemple: la ticarcilline) par sécrétion de pénicillinases.

2.2/ La résistance acquise :

La résistance acquise correspond à la résistance à un antibiotique donné pour une souche bactérienne appartenant à une espèce naturellement sensible au même antibiotique. Cette forme de résistance résulte de l'acquisition d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance qui déterminent un phénotype différent du phénotype sauvage. Elle peut être transmise horizontalement d'une bactérie à une autre, de la même espèce ou d'espèces différentes.

2.3/ La résistance clinique :

Elle s'exprime habituellement in vivo par l'échec de l'antibiothérapie qui se traduit généralement par une évolution clinique défavorable. La corrélation entre la réponse in vitro et celle obtenue in vivo n'est pas possible sans l'expérience clinique.

2.4/ La résistance croisée :

Cette notion fait référence au spectre d'inactivation lié à un même mécanisme de résistance vis-à-vis de divers antibiotiques appartenant à la même famille ou sous groupe d'antibiotiques. Elle est le plus souvent utilisée lors de la lecture interprétative de l'antibiogramme. Par exemple, les souches de *Klebsiella pneumoniae*, naturellement résistantes à l'amoxicilline possèdent une résistance croisée avec les autres aminopénicillines telle que l'ampicilline.

2.5/ La résistance plasmidique :

Les gènes de résistance sont portés par un plasmide (ADN extrachromosomique) de taille variable. Le plasmide, en fonction de sa taille, porte généralement un grand nombre de gènes codant la résistance à plusieurs familles d'antibiotiques.

2.6/ La résistance transposable :

Les gènes de résistances sont portés par des fragments d'ADN mobiles appelés, transposons. Cet ADN additionnel peut transposer d'un plasmide à un chromosome et vice versa par excision et transposition. Le plasmide présent en plusieurs copies va permettre de générer une plus grande quantité d'enzymes et donc procurer un niveau de résistance beaucoup plus important.

2.7/ La résistance inductible

Cette résistance correspond à l'augmentation de l'expression de la résistance bactérienne en présence d'un inducteur de type antibiotique. La détection d'un tel mécanisme a eu pour conséquence de développer des molécules non inductrices et d'éviter d'associer deux antibiotiques dont l'un est inducteur et l'autre est sensible à l'induction. Par exemple, certaines espèces comme *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii* présentent une résistance inductible de leur céphalosporinase (ampC) par une céphamycine (céfoxitine, par exemple) ou un carbapénème (imipénème, par exemple).

3/ Déterminisme génétique de la résistance bactérienne aux antibiotiques:

On parle de déterminisme génétique quand la résistance bactérienne aux antibiotiques est liée à une information dont le support est un élément génétique qui peut être le chromosome bactérien, un plasmide ou un transposon. Ce déterminisme génétique est de mieux en mieux appréhendé grâce aux progrès des techniques de biologie moléculaires tels que la réaction de polymérisation en chaîne « PCR » et le séquençage.

Les mécanismes génétiques de la résistance bactérienne acquise sont principalement de deux types:

➤ **Modification d'ADN chromosomique par mutation:**

Il s'agit d'un changement dans la séquence de l'ADN d'une bactérie qui amène à son évolution et qui est transmis verticalement à la descendance. Ce changement, rare et non létal, affecte une famille précise d'antibiotiques. Plusieurs observations illustrent le potentiel évolutif d'un gène de résistance bactérien avec, comme exemple, le groupe d'enzymes dénommé CTX-M (pour céfotaximase) qui conférait, à l'origine, un plus haut niveau de résistance au céfotaxime, ceftriaxone, céfépime et à l'aztréonam qu'à la ceftazidime. Certains d'entre elles ont évolué par mutation générant un haut niveau de résistance plus élevé à la ceftazidime telles que les enzymes CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19 et CTX-M-23 [28, 29]. L'évolution d'un gène de résistance n'est pas seulement liée au gène de structure mais peut être en relation avec une mutation dans le système de régulation (dérépression ou hyperproduction) pouvant ainsi influencer le niveau de résistance [30].

➤ **Acquisition d'un ADN étranger par des transferts génétiques:**

Les bactéries ont la capacité d'acquérir des informations génétiques exogènes, portées par des éléments mobiles: plasmides, transposons, intégrons, etc. Cette résistance, très fréquente, peut concerner la majorité des antibiotiques et toucher un grand nombre d'espèces bactériennes par transmission verticale à la descendance ou par transmission horizontale à des espèces appartenant à la même espèce bactérienne ou à d'espèces différentes. L'acquisition peut se faire selon 3 mécanismes: la transduction, la transformation ou la conjugaison (Figure 3).

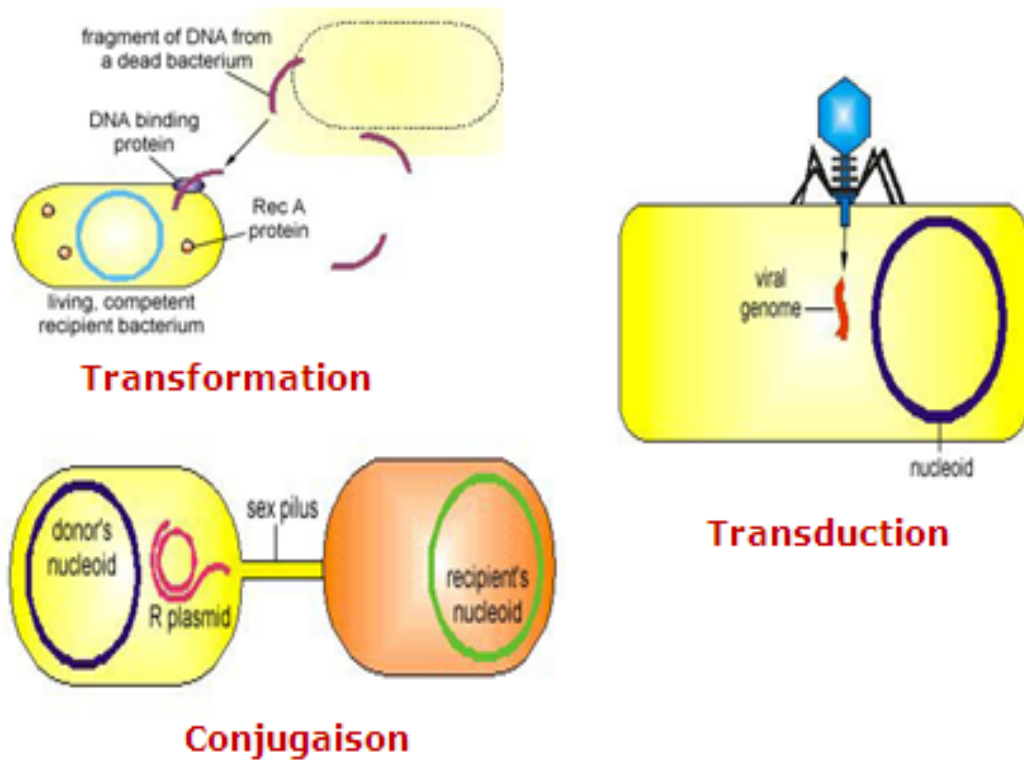


Figure 3: Les mécanismes d'acquisition d'un ADN étranger par des transferts génétiques [46].

4/ Mécanismes de résistance aux différentes classes d'antibiotiques:

La connaissance des mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques présente plusieurs avantages. Elle permet aux cliniciens de comprendre la résistance croisée entre les antibiotiques d'une même famille ou de familles voisines. Elle permet aussi aux scientifiques de synthétiser de nouvelles molécules capables d'agir efficacement sans être bloquées par les mécanismes de résistances développés par les bactéries. Par exemple, la compréhension des mécanismes de résistance bactérienne par imperméabilité a permis le développement de nouvelles β -lactamines plus hydrophiles capable de mieux traverser les membranes bactériennes qui est de nature hydrophobe [31]. La résistance bactérienne aux grandes familles d'antibiotiques peut être due à un ou plusieurs mécanismes de résistance dont les principaux sont (Figure 4):

4.1/ Diminution de la quantité d'antibiotique atteignant la cible :

4.1.a/ Par baisse de la perméabilité membranaire :

La baisse de la perméabilité de la membrane externe est due essentiellement à des modifications affectant le nombre ou la qualité des porines membranaires qui sont des protéines enchâssées dans la membrane externe des bactéries à gram négatif formant des canaux transmembranaires. Ces modifications réduisent la concentration de l'antibiotique atteignant la cible de l'antibiotique et assurent ainsi la résistance bactérienne aux antibiotiques.

4.1.b/ Par des systèmes d'efflux :

Les systèmes d'efflux sont constitués de protéines jouant le rôle de pompes capables d'expulser l'antibiotique hors de la cellule. Ces systèmes d'efflux peuvent être spécifiques à un antibiotique donné ou se comporter comme des systèmes de résistance multiple conférant une résistance à plusieurs groupes d'antibiotiques.

4.2/ Modification de la cible de l'antibiotique:

4.2.a/ Modifications quantitatives :

La modification du nombre de la cible affecte négativement l'activité de l'antibiotique et contribue ainsi à l'augmentation de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

4.2.b/ Modifications qualitatives :

La modification de la structure de la cible contribue à la diminution de son affinité pour l'antibiotique. C'est un phénomène de résistance fréquent qui peut concerner entre autres la résistance aux β -lactamines (Par exemple : les PLP modifiées dans le cas du pneumocoque) et la résistance aux fluoroquinolones (Par exemple : les mutations des topoisomères II et IV).

4.2.c/ Modification par protection de la cible :

Il s'agit d'une protection réversible de la cible. Ce type de mécanisme peut être illustré par la résistance de type Qnr aux quinolones. Ces protéines protégeant les topoisomères II et IV empêchent la fixation des quinolones.

4. 3/ Inactivation de l'antibiotique :

C'est un mécanisme prépondérant dans la résistance bactérienne, notamment pour les souches bactériennes isolées en milieu hospitalier. L'inactivation de l'antibiotique est catalysée par des enzymes qui peuvent soit hydrolyser la molécule d'antibiotique (dans certains cas pour les β -lactamines) soit modifier sa structure en substituant de nouveaux groupements chimiques (dans certains cas pour les aminosides).

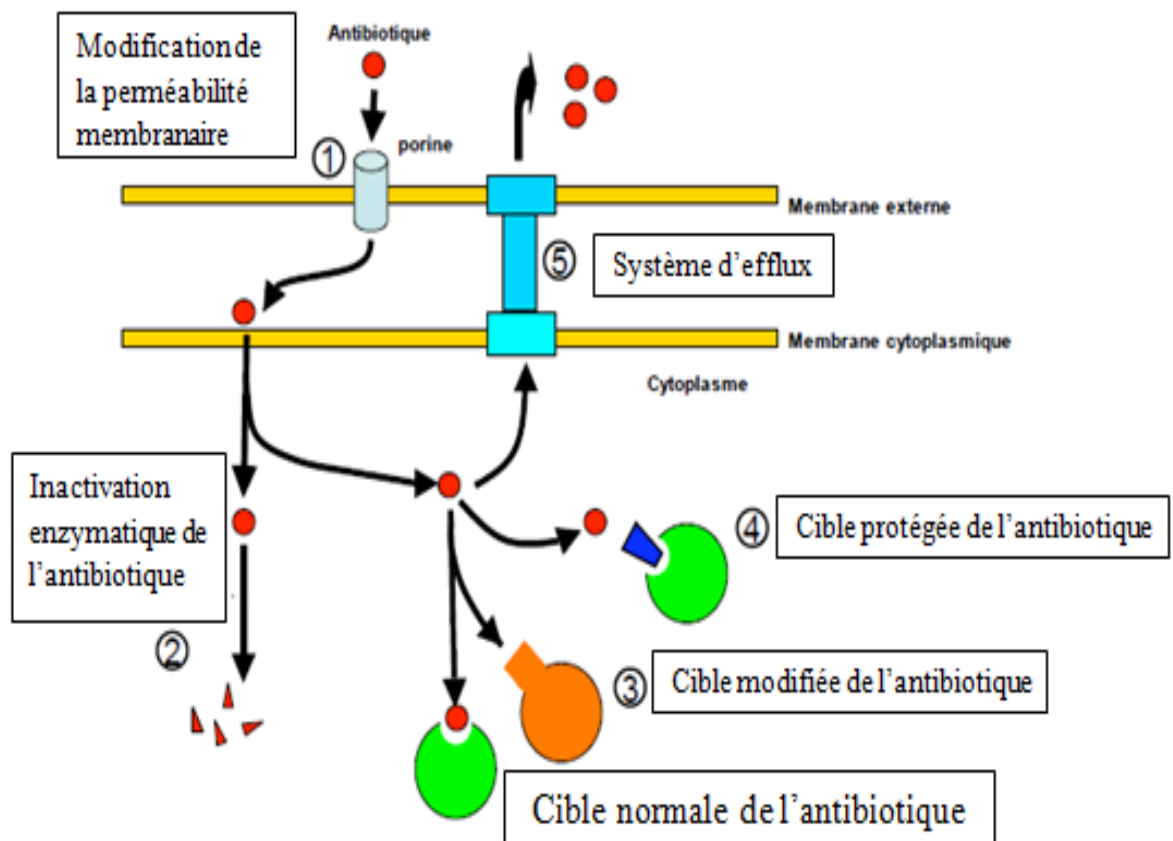


Figure 4: Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques [46].

5/ Mécanismes de résistance des entérobactéries aux β -lactamines :

Quatre principaux mécanismes ont été individualisés pour expliquer la résistance des entérobactéries aux β -lactamines: l'imperméabilité, l'inactivation enzymatique par les β -lactamases, la diminution de l'affinité des cibles aux antibiotiques et le mécanisme d'efflux.

5.1/ Diminution de la perméabilité de la membrane externe [32, 33, 34, 35]:

Pour mieux développer leur action antibiotique, les β -lactamines doivent se lier avec une affinité suffisante à leurs sites d'actions « les protéines liants les pénicillines (ou PLP) » présents sur la face externe de la membrane cytoplasmique des bactéries. Cet accès des β -lactamines aux PLP est plus ou moins facile selon qu'il s'agit de bactéries à Gram positif ou de bactéries à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est épaisse (de 20 à 80 nm) et moins complexe de celle des BGN. Elle est constituée en majeure partie de peptidoglycane, associé à des carbohydrates dont le plus connu est l'acide teichoïque (Figure 5).

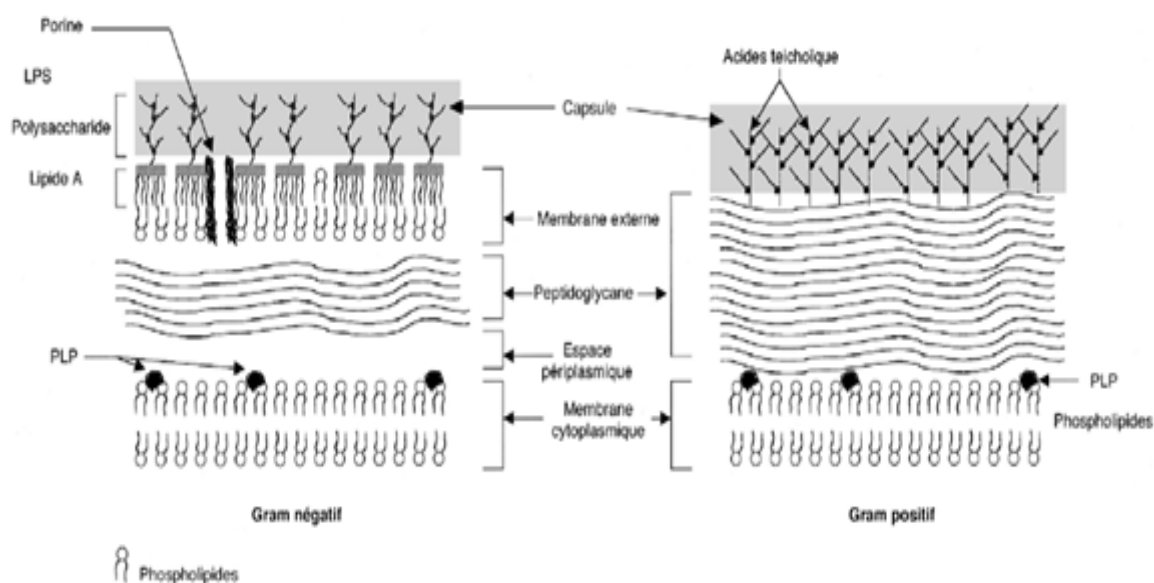


Figure 5 : Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. LPS : lipopolysaccharide ; PLP : protéines de liaison aux pénicillines [34].

La paroi des bactéries à Gram négatif est beaucoup plus complexe. Elle est constituée, de l'extérieur vers l'intérieur, d'une membrane externe, d'une couche fine de peptidoglycane et d'un espace périplasmique (Figure 5).

➤ **La membrane externe:**

La membrane externe des bactéries à Gram négatif est une membrane biologique comportant un double feuillet de phospholipides hydrophobes, dans lequel sont enchâssées de nombreuses protéines comme les porines. Ces protéines transmembranaires forment des canaux avec une structure en tonneau et un canal central hydrophile rempli d'eau.

Cette membrane agit comme une barrière hydrophobe et les β-lactamines, qui sont le plus souvent des molécules hydrophiles, vont traverser cette barrière essentiellement par la voie des porines. La vitesse de diffusion de ces solutés dont les β-lactamines à travers les porines varie en fonction de leur taille, leur hydrophilie et leurs charges relatives. Ce mécanisme explique pour partie la résistance de nombreux BGN aux antibiotiques hydrophobes telles oxaciline, erythromycine, etc.

➤ **Le peptidoglycane:**

Le peptidoglycane est un polymère en réseau composé de chaînes linéaires de l'alternance N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Ces chaînes polysidiques sont reliées entre elles par de courtes chaînes peptidiques (tétrapeptides) qui contiennent de la L-alanine, de l'acide D-glutamique, de la L-lysine et de la D-alanine (Figure 6).

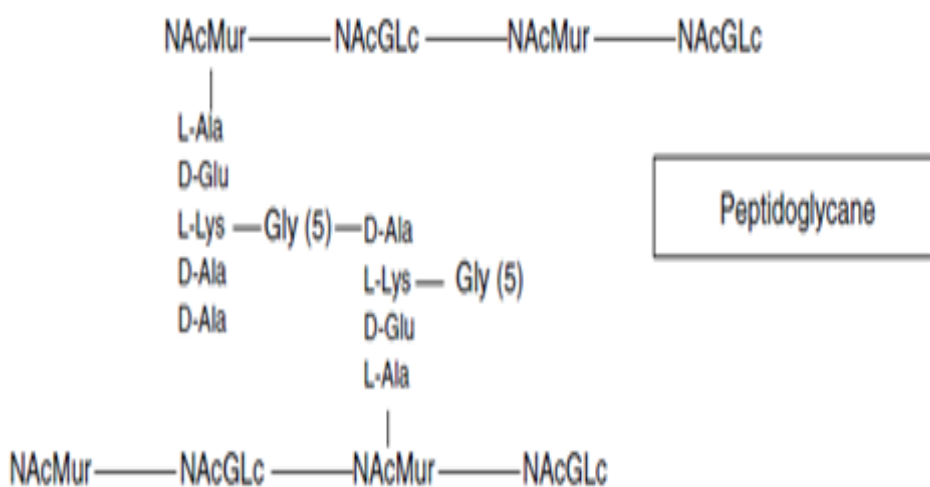


Figure 6: Structure du peptidoglycane [33].

➤ **Espace périsplasmique:**

Il sépare le peptidoglycane de la membrane cytoplasmique. C'est au niveau de cette espace qu'on retrouve les enzymes capables d'hydrolyser les β -lactamines, les β -lactamases (Figure 5). Les bactéries à gram négatif ont développé la capacité à modifier la perméabilité de leur membrane externe en réponse à l'action de certains antibiotiques. Ce mécanisme concerne surtout les entérobactéries dont les porines sont perdues et/ou obstruées partiellement ou totalement. Après avoir traversé la membrane externe des bactéries à Gram négatif, les β -lactamines diffusent facilement à travers le peptidoglycane, qui est une structure réticulée laissant passer des molécules de 100 000 daltons alors que le poids moléculaire des β -lactamines varie de 300 à 700 daltons.

5.2/ L'inactivation enzymatique (Voire chapitre 3 de la partie bibliographique).

5.3/ Modification de l'affinité des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) aux antibiotiques:

Les PLP sont des transpeptidases et carboxypeptidases, impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. Ces protéines à activité enzymatique sont insérées dans la partie externe de la membrane cytoplasmique par leur extrémité COOH, leur site enzymatique actif étant ainsi projeté vers le substrat [1].

Les β -lactamines sont des molécules présentant une analogie structurale entre le noyau β -lactame et le dipeptide terminal D-alanine-D-alanine du pentapeptide constitutif du peptidoglycane. La fixation des β -lactamines sur le site actif des PLP (transpeptidases et les carboxypeptidases) entraîne l'inactivation du site actif de l'enzyme, provoquant une inhibition de la synthèse du peptidoglycane et l'arrêt de la croissance bactérienne qui correspond à l'effet bactériostatique de l'antibiotique [1].

Chez *E. coli*, la liaison des β -lactamines aux PLP essentielles entraîne une inhibition de la croissance avec une mort bactérienne lente, alors que la saturation de toutes les PLP essentielles aboutit à une mort bactérienne rapide et complète [36].

Certaines bactéries peuvent modifier la structure du site de fixation d'un antibiotique de telle manière que cette cible continue à jouer son rôle cellulaire normal mais ne puisse plus fixer l'antibiotique. Cette modification d'affinité de la cible est plus fréquente chez les

bactéries à Gram positif, notamment chez le pneumocoque par la diminution de la sensibilité à la pénicilline G.

5.4/ Protéines d'efflux (Pompes d'efflux):

Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires assurant aux bactéries un rôle important dans l'élimination de déchets métaboliques endogènes et l'exportation de produits cellulaires tels que les toxines bactériennes [37]. Elles permettent également d'empêcher l'accumulation intracellulaire de l'antibiotique et assurent ainsi la résistance bactérienne à ce même antibiotique.

Ces pompes peuvent conférer une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques (Par exemple : les pompes d'efflux spécifiques des tétracyclines, Tet ou des macrolides, Mef). Cependant, la plupart de ces transporteurs contribuent à la multi-résistance des bactéries vis-à-vis de plusieurs classes d'antibiotiques [38, 39, 40].

Chez les bactéries à Gram négatif, les pompes d'efflux sont constituées de trois principaux composants protéiques (Figure 7):

- Un transporteur inséré dans la membrane cytoplasmique (la pompe proprement dite) ;
- Une protéine dans la membrane externe ;
- Une protéine de liaison périplasmique qui relie entre elles les deux autres protéines.

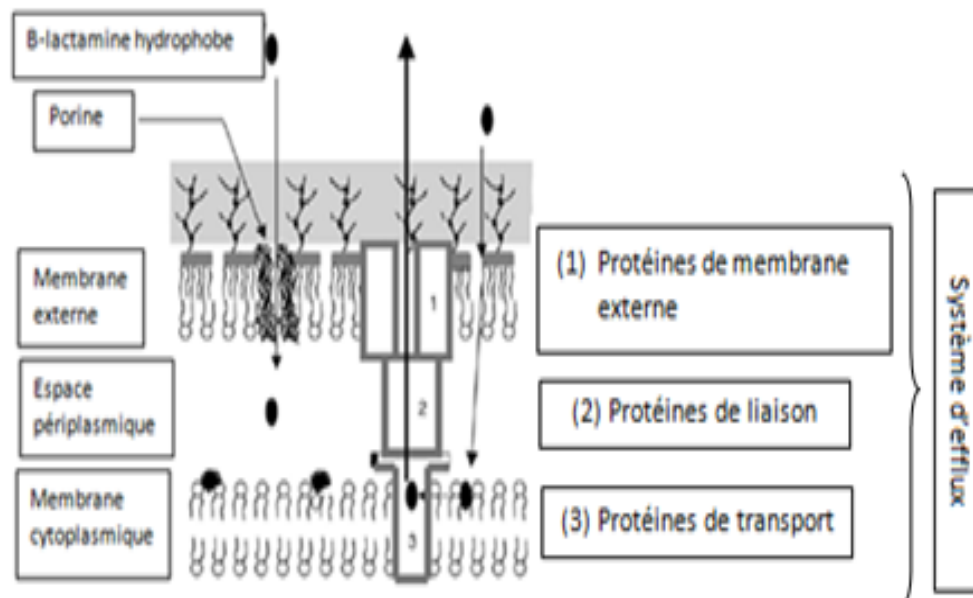


Figure 7: Pompe d'efflux chez un bacille à Gram Négatif [33].

Le transporteur fournit l'énergie de capture de la molécule à rejeter, puis va transmettre, via la protéine de liaison périplasmique, la molécule à la protéine de membrane externe qui est le canal par lequel la molécule va être expulsée à l'extérieur de la bactérie. Ce mécanisme d'efflux, qui présente une large spécificité de substrats, concerne des classes d'antibiotiques aussi diverses que les tétracyclines, les quinolones, le chloramphénicol, les macrolides et les β -lactamines. Chez les bactéries à Gram positif, le système d'efflux est moins complexe et n'est constitué que du transporteur [32, 41].

En raison du rôle majeur que jouent les pompes d'efflux dans la résistance bactérienne, on ressent de plus en plus l'intérêt du développement d'inhibiteurs utilisables en médecine. L'utilisation des différents inhibiteurs développés (Ex : le vérapamil, la réserpine ou l'oméprazole) reste compromise par leur pharmacocinétique inadaptée ou par leur toxicité élevée dans le cas de la réserpine.

6/ Sensibilité des entérobactéries aux β -lactamines:

L'ensemble des entérobactéries, comme tous les autres BGN, sont caractérisées par leur grande résistance naturelle à certains antibiotiques comme la Pénicilline G, l'oxacilline, les macrolides, les kétolides, les lincosamides, les streptogramines, l'acide fusidique, les glycopeptides, les oxazolidinones et les lipopeptides. Outre, les résistances naturelles communes à toutes les entérobactéries, les espèces d'entérobactéries se distinguent entre elles par des résistances naturelles propres à chaque espèce d'entérobactérie aussi bien pour les β -lactamines que pour les autres classes d'antibiotiques.

6.1/ Résistance naturelle aux β -lactamines:

La présence constante d'un certain nombre de mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries permet de distinguer, chez ces espèces bactériennes, différentes résistances naturelles vis-à-vis des β -lactamines. En raison du mode d'action très variable des β -lactamines lié à la perméabilité de la membrane externe des entérobactéries, à l'éventuelle instabilité vis-à-vis d'une β -lactamase naturelle présente dans l'espace périplasmique et enfin aux affinités possibles pour les PLP (sites d'action des β -lactamines), l'expression phénotypique de la résistance naturelle aux antibiotiques peut être très différente selon l'espèce d'entérobactérie isolée. Ces résistances naturelles, caractéristiques d'une espèce bactérienne, délimitent le spectre naturel de l'antibiotique et constituent une aide à la validation éventuelle de l'identification d'une souche bactérienne. Ainsi, une approche

phénotypique des entérobactéries à intérêt médical en termes de résistance naturelle aux β -lactamines en sept groupes est proposée [60].

➤ **Groupe 0 : *Salmonella* et *Proteus mirabilis*.**

Les souches sauvages d'entérobactéries appartenant à ce groupe sont sensibles à l'ensemble des β -lactamines et ne possèdent aucun gène de résistance aux β -lactamines.

➤ **Groupe 1 : *Escherichia coli* et *Shigella*.**

Les entérobactéries de ce groupe possèdent un gène chromosomique codant pour une céphalosporinase (*ampC*) mais l'expression de ce gène est réprimée à l'état sauvage (céphalosporinase inductible muette). Les souches sauvages de ce groupe sont donc sensibles à toutes les β -lactamines mais une mutation (faible probabilité de 10^{-6}) sur le promoteur du gène *ampC* peut provoquer l'expression phénotypique de cette céphalosporinase chromosomique.

➤ **Groupe 2: *Klebsiella*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter koseri*.**

Ce groupe est caractérisé par une pénicillinase naturelle de bas niveau (résistance de bas niveau vis-à-vis des aminopénicillines et des carboxypénicillines). Cette résistance de bas niveau est inhibée par l'acide clavulanique.

➤ **Groupe 3: *Enterobacter*, *Citrobacter freundii*, *Serratia*, *Morganella*, *Providencia*.**

Les entérobactéries de ce groupe expriment une résistance naturelle de bas niveau vis-à-vis des aminopénicillines et des céphalosporines, au moins les céphalosporines de première et de deuxième génération alors qu'il y a sensibilité vis-à-vis des carboxypénicillines. Cette résistance naturelle n'est pas inhibée par l'acide clavulanique.

➤ **Groupe 4: *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis*.**

Dans ce groupe, on retrouve une expression naturelle d'une céphalosporinase et d'une pénicillinase naturelles de bas niveau : ce phénotype est caractérisé par résistance de bas niveau vis-à-vis des aminopénicillines, des carboxypénicillines, et des céphalosporines (C1G

et C2G). Seule la pénicillinase est inhibée par l'acide clavulanique, donc la synergie est observée avec les carboxypénicillines (carbénicilline, ticarcilline) et l'acide clavulanique.

➤ **Groupe 5 : *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*.**

Ces bactéries expriment une résistance chromosomique naturelle d'une céfuroximase (céphalosporinase inhibée par l'acide clavulanique). Il n'y a pas d'expression à haut niveau de cette céphalosporinase.

➤ **Groupe 6 : *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, *Serratia fonticola*.**

Le phénotype de ces bactéries est caractéristique d'une β -lactamase chromosomique naturelle de bas niveau vis-à-vis des aminopénicillines, des carboxypénicillines et des céphalosporines (C1G et C2G). La sensibilité est constante pour les céphamycines (céfoxitine, céfotétan), les C3G et l'aztréonam.

6.2/ Résistance acquise aux β -lactamines:

Les entérobactéries présentent fréquemment des résistances acquises aux antibiotiques à large spectre. Ces résistances sont souvent conditionnées par la présence de plasmides porteurs de déterminants de résistance multiples et transférables à d'autres bactéries à Gram négatif. La réalisation de l'antibiogramme reste donc indispensable à la détermination des antibiotiques qui ont gardé leur efficacité sur le germe étudié et pouvant être utilisés dans le traitement de l'infection bactérienne.

6.3/ Antibiotiques à tester pour les entérobactéries :

Chaque antibiotique possède un mode d'action permettant d'agir sur une cible particulière de la cellule de l'entérobactérie. Il peut ainsi agir sur un niveau précis de la cellule bactérienne par :

- Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne (Par exemple: les β -lactamines);
- Inhibition de la synthèse de la membrane cytoplasmique;
- Inhibition de la synthèse protéique (Par exemple: les aminosides);
- Inhibition de la synthèse de l'ADN (Par exemple: les quinolones, l'association sulfaméthoxazole- triméthoprime);
- Autres mécanismes.

Le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie recommande l'utilisation d'un certain nombre d'antibiotiques pour la réalisation de l'antibiogramme des entérobactéries (Tableau 2). Le choix de l'antibiotique à utiliser pour le traitement dépendra de plusieurs critères, notamment les critères pharmacologiques, toxicologiques et économiques.

Tableau 2: Listes (standard et complémentaire) des antibiotiques à tester pour les entérobactéries.
 (http://www.sfmmicrobiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFMV1_0_MARS_2017.pdf)

Liste standard	Liste complémentaire
Ampicilline ou Amoxicilline	Céfuroxime
Amoxicilline/acide clavulanique	Ceftazidime-avibactam
Ticarcilline	Aztéonam
Ticarcilline/acide clavulanique ¹	Netilmicine
Méccillinam	Tobramycine
Témocilline ¹	Péfloxacin (Salmonella)
Pipéracilline	Lévofoxacin
Pipéracilline/tazobactam	Chloramphénicol
Cefadroxil ou céfalexine	Tigécycline
Céfoxitine	Nitroxoline
Céfotaxime ou ceftriaxone	Colistine
Ceftazidime	Azithromycine
Céfépime	
Céfixime	
Imipénème ou méropénème ou doripénème	
Ertapénème	
Amikacine	
Gentamicine	
Acide nalidixique	
Ofloxacin ou norfloxacine	
Ciprofloxacine	
Triméthoprime	
Cotrimoxazole	
Nitrofuranes	
Fosfomycine	

7/ Principes des principales méthodes de mesure de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques:

Pour déterminer la sensibilité bactérienne aux antibiotiques, il existe plusieurs méthodes générales dont chacune comporte d'innombrables variantes. Ces méthodes sont réalisées in vitro dans les laboratoires de microbiologie et peuvent être répartis en deux principales catégories :

7. 1/ Méthodes de dilution :

Selon ces méthodes, différentes quantités de l'antibiotique sont introduites dans une série de tubes contenant le milieu de culture dans lequel est ensuiteensemencé le germe à étudier. Après incubation, on note le développement ou non des bactéries dans les tubes. Un des avantages de ces méthodes est la détermination directe de la CMI.

7. 2/ Méthodes de diffusion :

Ces méthodes consistent à faire diffuser l'antibiotique dans un milieu gélosé en boîte de pétri. Elles peuvent être réalisées par les méthodes standards recommandées du E-test et des disques.

7. 2.a/ E-test® (ou l'epsilomètre):

Le E-test est une technique permettant d'étudier la sensibilité des bactéries par diffusion en milieu gélosé. Elle repose sur l'utilisation d'une bandelette imprégnée avec un gradient de concentrations d'antibiotique donnant une lecture directe de la CMI. Elle est déposée sur une gélose préalablement ensemencée avec une souche bactérienne. Après 18 à 24 heures d'incubation, une zone d'inhibition en forme d'ellipse indique l'inhibition de la croissance bactérienne et la CMI est lue à l'intersection entre l'ellipse et la bandelette (Figure 8).

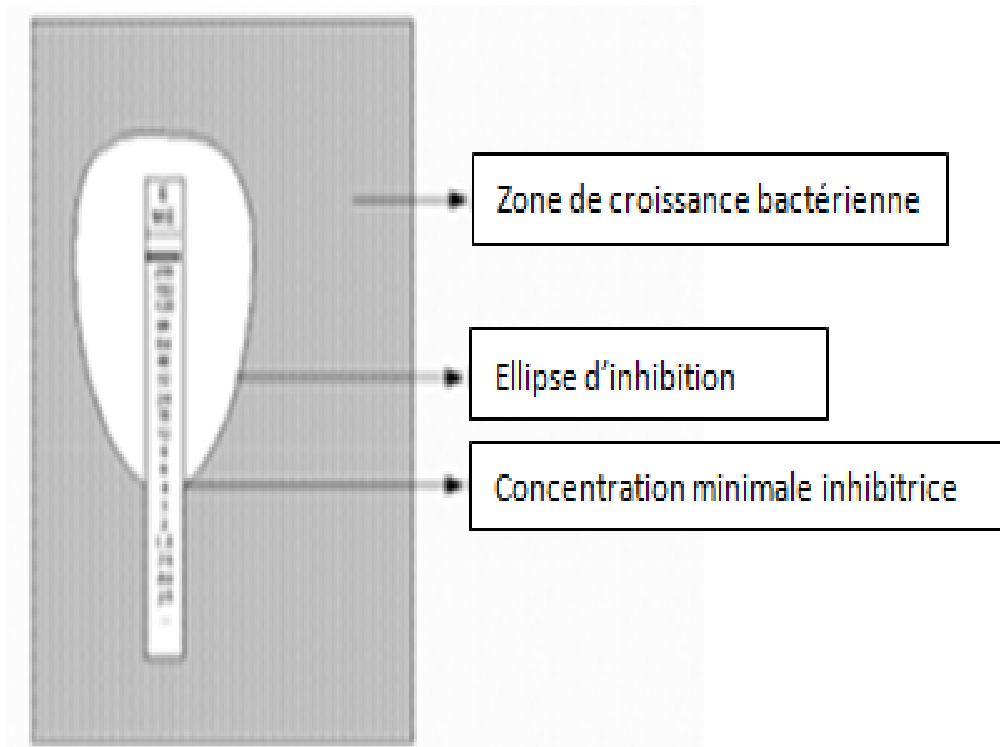


Figure 8: Représentation schématique de la mesure de la CMI par la diffusion sur milieu gélosé : Méthode du E-test.

7. 2.b/ Méthode des disques:

Elle consiste à déposer des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique à la surface d'un milieu gélosé préalablementensemencée avec la bactérie à étudier. L'antibiotique diffuse par la suite dans la gélose tout en créant un gradient de concentrations. Après 18 à 24 heures d'incubation, chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne. En fonction du diamètre de la zone d'inhibition, les souches bactériennes étudiées sont classées en trois catégories cliniques: souches sensibles (S), souches intermédiaires (I) et souches résistantes (R). En pratique courante, ce sont les méthodes automatisées (Par exemple : Microscan-walkaway®) ainsi que la méthode de diffusion sur milieu solide par la méthode des disques qui sont le plus employés.

8/ Rôle de la surveillance épidémiologique dans la prévention de la résistance bactérienne:

Les nombreuses études épidémiologiques menées ont montré une augmentation rapide de la prévalence des bactéries multirésistantes, notamment chez les souches d'entérobactéries par production de BLSE. Ce constat a amené, il y'a plusieurs années, a une prise de conscience des différents acteurs de la santé afin d'établir des mesure préventives visant à diminuer l'importante diffusion des bactéries multirésistantes aussi bien dans le milieu hospitalier que le milieu communautaire.

La surveillance épidémiologique au plan national demeure l'une des principales mesures de lutte contre la diffusion des bactéries multirésistantes. En effet, la détermination récente de la fréquence d'isolement et du niveau de résistance aux antibiotiques des germes isolés au laboratoire de bactériologie médicale permet d'établir une stratégie thérapeutique mieux adaptée au profil épidémiologique local.

La France, par exemple, dispose de nombreuses institutions qui interviennent dans la surveillance de la résistance aux antibiotiques, citons l'institut national de veille sanitaire (InVS) (<http://www.invs.sante.fr/presentation/>), les divers centres nationaux de référence (CNR), et l'observatoire national de l'étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques (ONEBRA). Aussi, divers réseaux participent à cette surveillance de l'évolution de la résistance bactérienne comme celui des hôpitaux universitaires, les laboratoires d'analyses de biologie médicale, et les hôpitaux militaires.

Au plan européen, l'European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) (<http://www.rivm.nl/earss/>) rassemble et traite les données épidémiologiques de 45 pays européens. Aux Etats unis, divers réseaux ont été mis en place dont le principal reste le Center for Diseases control (CDC), avec en particulier le National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) créé dès 1996 en collaboration avec la Food and Drug Administration (FDA) et spécialisé dans la surveillance de la sensibilité aux antibiotiques chez les entérobactéries d'origine humaine et animale (<http://www.cdc.gov/narms/>).

PREMIERE PARTIE : GENERALITE

*CHAPITRE 3 : LES β -LACTAMASES A SPECTRE ELARGI
(BLESE)*

1/ Définition des β -lactamases à spectre élargi:

Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) sont des enzymes présentant une affinité augmentée pour diverses β -lactamines dont les céphalosporines de troisième génération « C3G ». Ce sont des β -lactamases de la classe moléculaire A d'Amblar et du groupe fonctionnel 2be de Bush et al. Il est donc nécessaire de distinguer les BLSE de la classe A d'ambler des autres β -lactamases des classes B (métallo-carbapénèmes), C (céphalosporinases) et D (oxacillinasés) [2, 42].

Ces enzymes sont capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et 4^{ème} génération (céfépime, cefpirome) et les monobactames (aztréonam). Les souches d'entérobactéries productrices de BLSE restent généralement sensibles aux céphamycines (céfoxitine, céfotétan) et aux carbapénèmes (imipénème, ertapénème) et sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases, comme l'acide clavulanique [5, 43, 44].

Certains auteurs considèrent également certaines enzymes de type OXA (classe D d'Amblar et classe 2de de Bush et al.) comme des BLSE. Il existe, en effet, des oxacillinasés à spectre élargi qui ont évolué par mutation; néanmoins, il convient d'avoir à l'esprit la définition attribuant les BLSE uniquement à la classe A d'ambler et au groupe fonctionnel 2be [5, 42, 45].

2/ Mécanisme d'action des β -lactamases à spectre élargi :

Chez les entérobactéries, le mécanisme prédominant de résistance aux β -lactamines est l'inactivation enzymatique par production des β -lactamases, notamment les β -lactamases à spectre élargi [46]. Ces derniers sont des enzymes d'inactivation dont les substrats sont les β -lactamines. Ils sont capables d'ouvrir le cycle β -lactame en créant un intermédiaire acyl-enzyme instable, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle qui est responsable de l'inactivation de l'antibiotique (Figure 9).

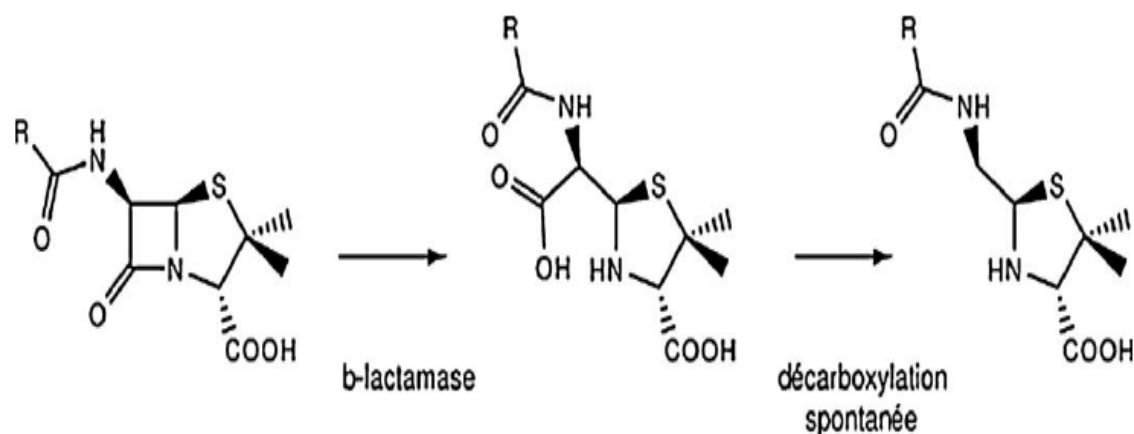


Figure 9: Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase [46].

3/ Nomenclature des β -lactamases à spectre élargi:

Le nom attribué à une β -lactamase à spectre élargi donnée est le plus souvent à trois lettres majuscules. Elle peut être en fonction du découvreur, du nom du malade, du pays, etc (Tableau 3). L'absence de règles précises de dénomination des BLSE ainsi que les substitutions de dénominations de ces enzymes entraînent une réelle confusion. Pour exemple, la pénicillinase plasmidique connue sous le nom PIT-2 dans les années 70 a été renommée SHV-1. Aussi, l'attribution de plusieurs dénominations pour désigner la même enzyme de type BLSE illustre ce propos: TEM 101, TEM-10, CAZ-3 et YOU-2.

Compte tenu de la diversité croissante des β -lactamases, il convient de choisir une dénomination communément acceptée par les microbiologistes et comprise par les cliniciens afin d'éviter toute confusion et assurer une meilleure prise en charge du patient ayant une infection à un germe producteur de β -lactamases à spectre élargi.

Nom de l'enzyme	Découvreur
PIT-1 et PIT-2	Pitton
HMS	Hedges-Matthew-Sykes
NORA	Nordmann
Pays, ville ou hopital	
SAR	South Africa
VEB-1	Vietnam Extended spectrum β -lactamase
RHH	Royal Hallamshire Hospital
MGH-1	Massachusetts General Hospital
DHA-1	Dharan hospital
BEL-1	Belgique (2004)
BES-1	Brésil (1996)
Espèce bactérienne	
PSE	Pseudomonas specific enzyme
MAL	<i>Levinea malonatica</i>
FEC	Fecal <i>E. coli</i>
PER-1	Pseudomona aeruginosa
OXY	<i>K. oxycata</i>
MOR	<i>Morganella morganii</i>

Tableau 3: Exemples d'appellation de certaines BLSE.

4/ Classification des β -lactamases à spectre élargi:

Compte tenu de l'extrême diversité des β -lactamases à spectre élargi, de nombreuses classifications ont été proposées. Ces classifications peuvent prendre comme critère soit:

- La séquence d'acides aminés et la nature du site actif (classification d'Ambler);
- La nature du substrat et le profil d'inhibition (classification de Bush Jacoby et Medeiros « Bush et al. »);
- Le déterminisme génétique des enzymes BLSE: chromosomique, plasmidique ou transposon;
- Le mode de production des enzymes BLSE: constitutive ou inductible;
- Autres.

Aujourd'hui et en raison de leurs pertinences, les deux principales classifications couramment utilisées pour classer les β -lactamases à spectre élargi sont celles d'Ambler et de Bush, Jacoby et Medeiros (Bush et al.) [47, 48]. Les β -lactamases à spectre élargi sont définies comme des enzymes appartenant à la classe A selon la classification d'Ambler et au groupe fonctionnel 2be selon la classification de Bush et al.

4.1/ Classification des β -lactamases à spectre élargi selon Bush et al. :

La classification fonctionnelle de Bush, Jacoby et Medeiros (Bush et al.) de 1988 repose sur l'activité hydrolytique (nature du substrat) et la sensibilité aux inhibiteurs (profil d'inhibition) des β -lactamases à spectre élargi. Elle est plus ramifiée notamment par la présence de sous-classes pour les β -lactamases de classe A (Tableau 4). Ainsi apparait la notion de groupe fonctionnel tel le groupe 2b qui se subdivise en sous-groupes dont le groupe 2be représentatif des β -lactamases à spectre élargi [48, 49].

Bush-Jacoby-Medeiros Group	Molecular class (Ambler)	Preferred substrates	Representative enzymes	Resistance or susceptibility to β -lactamase inhibitors
1	C	Cephalosporins	AmpC	Resistant
2b	A	Penicillins, Cephalosporins	TEM, SHV	Susceptible
2be	A	Penicillins, extended-spectrum cephalosporins, monobactams	TEM, SHV	Susceptible
2d	D	Penicillins, cloxacillin	OXA	Resistant
2e	A	Cephalosporins	Inducible cephalosporinases from <i>Proteus vulgaris</i>	Susceptible
2f	A	Penicillins, cephalosporins, carbapenems	NMC-A from <i>Enterobacter cloacae</i>	Resistant
3	B	Most β -lactams including carbapenems	L1 from <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Resistant

Tableau 4: Classification des β -lactamases selon Bush et al. [48].

4.2/ Classification des β -lactamases à spectre élargi selon Ambler et al.:

La classification structurale d'Ambler, proposée dans les années 75, prend en compte les analogies de séquence peptidique, en particulier celles du site enzymatique. Selon la classification d'Ambler, les β -lactamases peuvent être groupées en 4 grandes classes (Tableau 4) [47]:

- La classe A: correspond aux β -lactamases inhibées par l'acide clavulanique;
- La classe B: correspond aux métallo-bêta-lactamases inhibées par l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) ;
- La classe C: regroupe les céphalosporinases non inhibées par l'acide clavulanique;
- La classe D: correspond aux oxacillinases de sensibilité variable à l'acide clavulanique.

Les β -lactamases de classe A, C et D sont dites à sérine active car ils comportent une sérine active responsable de l'ouverture du cycle β -lactame. En revanche, les B-lactamases de classe B ont besoin d'un ou deux atomes de zinc ionisé (Zn^{2+}) pour hydrolyser leur substrat et sont ainsi couramment appelées métallo- β -lactamases [47, 50].

4.2.a/ Les β -lactamases de la classe A d'Amblert:

Schématiquement, les β -lactamases de la classe A d'Amblert sont sensibles à l'action des inhibiteurs des β -lactamases tel que l'acide clavulanique. Elle renferme les principaux types de β -lactamases à spectre élargi, produits par les entérobactéries, comme les enzymes TEM, SHV et CTX-M [49 Ruppé 16].

➤ Les β -lactamases de type TEM (TEMONEIRA - nom du patient):

TEM-1 représentait la β -lactamase la plus fréquemment rencontrée chez les entérobactéries. Comme en témoigne la figure ci-dessous (Figure 10), de nombreux mutants de TEM-1 ont été décrits avec un phénotype de type β -lactamases à spectre élargi. Ces mutations, responsables de l'élargissement du spectre d'action des enzymes de type TEM, ont lieu principalement au niveau de 4 résidus « hot spots » de l'enzyme en positions 104, 164, 238 et 240 selon la numération d'Amblert (Figure 10) [51, 52].

A noter que certains mutants de TEM-1 ne sont pas des BLSE mais présentent une diminution de sensibilité aux inhibiteurs des β -lactamases (acide clavulanique par exemple). On parlera alors de β -lactamases TEM résistantes aux inhibiteurs (TRI) ou inhibitor resistant TEM (IRT) [4].

Bien que fréquemment retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, les BLSE de type TEM ont aussi été rapportées chez d'autres espèces d'entérobactéries comme *E. cloacae*, *P. mirabilis* [4, 5]. En Europe, les BLSE de type TEM les plus fréquentes sont TEM-52 chez *E. coli*, TEM-3 et TEM-4 chez *K. pneumoniae* et TEM-24 chez *Enterobacter aerogenes* [53].

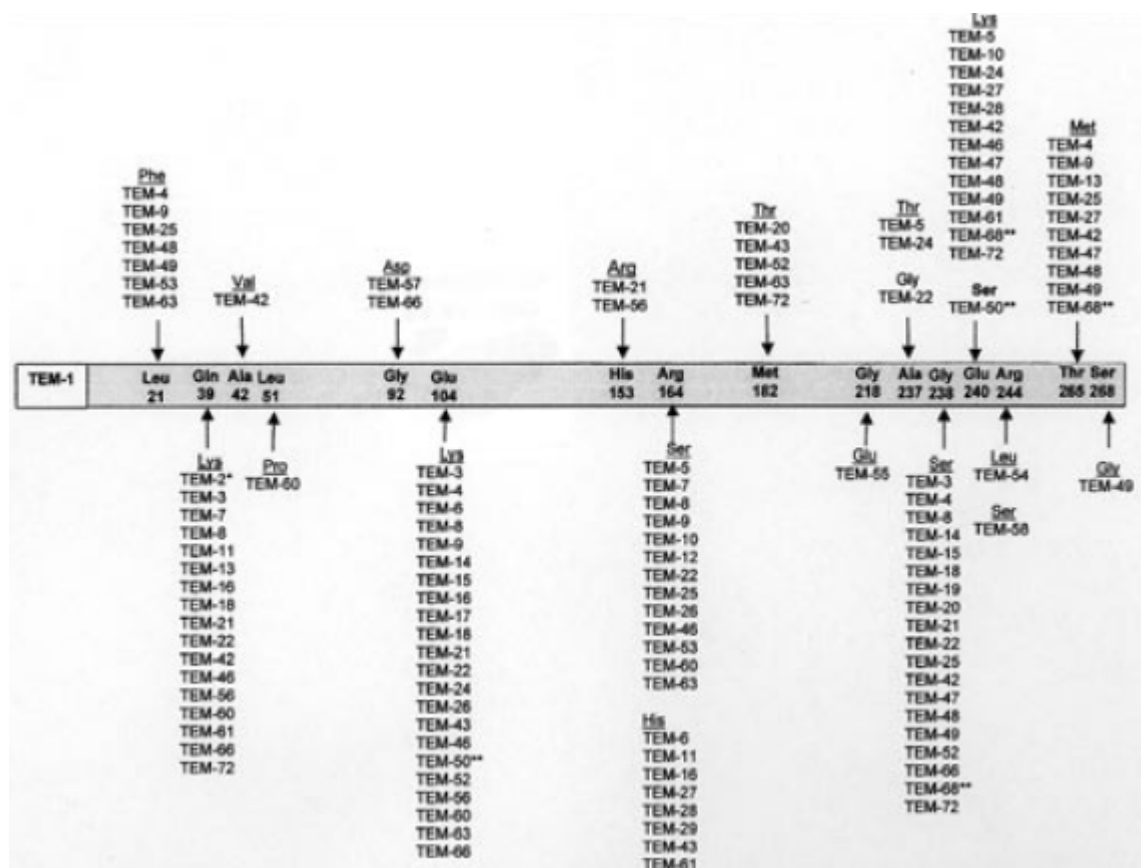


Figure 10: Les enzymes de la famille TEM [52].

Les acides aminés présents au niveau de TEM-1 (bande grise) peuvent faire l'objet d'une ou de plusieurs mutations (acides aminés soulignés) à l'origine des autres TEM (listées à la verticale).

➤ **Les β -lactamases de type SHV (SULFHYDRYL VARIABLE):**

Chez les souches de *K. pneumoniae*, le gène blaSHV, responsable de la résistance à l'ampicilline, est intégré dans le chromosome bactérien [5, 52]. Bien que les enzymes de type SHV sont essentiellement produites par les souches de *K. pneumoniae*, ces enzymes ont été aussi trouvées chez d'autres entérobactéries comme *Citrobacter freundii*, *E. coli* et *Enterobacter cloacae*. [4, 5].

La majorité des dérivés de SHV-1 (Figure 11), à phénotype β -lactamases à spectre élargi, se caractérisent par la présence d'une glycine en position 238 à la place d'une sérine. Les dérivés SHV-5 et SHV-12 sont les enzymes les plus fréquemment produites par les entérobactéries en Europe [53].

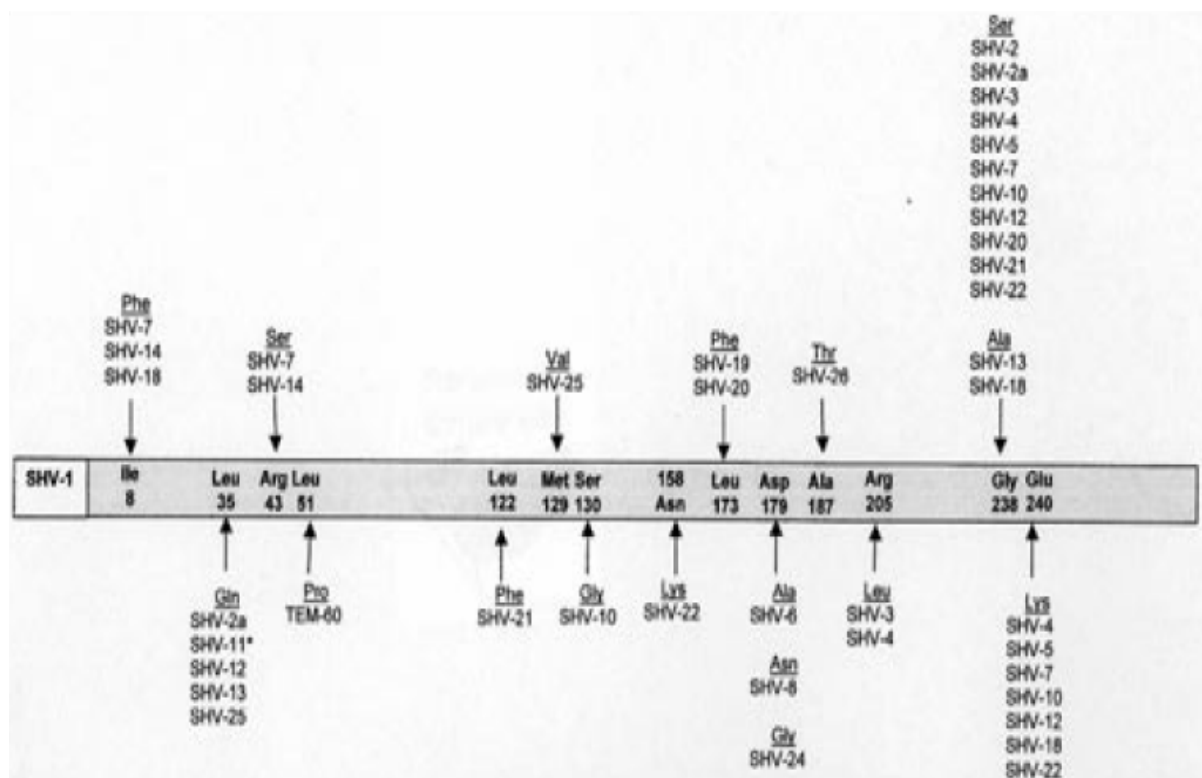


Figure 11: Les enzymes de la famille SHV [52].

Les acides aminés présents au niveau SHV-1 (bande grise) peuvent faire l'objet de mutations (acides aminés soulignés) à l'origine des autres TEM (listées à la verticale).

➤ **Les β -lactamases de type CTX-M (CEFOTAXIMASE-MUNICH):**

Ce sont des β -lactamases non-TEM et non-SHV de la classe A d'Ambler qui tiennent leur nom de par leur hydrolyse préférentielle du céfotaxime par rapport à la ceftazidime (« CTX ») et « M » pour leur lieu d'isolement (Munich). Les CTX-M possèdent moins de 40% d'homologie avec les β -lactamases à spectre élargi de type TEM et SHV [55].

Les analyses génétiques ont montré que les gènes progéniteurs des CTX-M plasmidiques sont des β -lactamases chromosomiques d'espèces du genre *Kluyvera*, entérobactéries non pathogènes environnementales d'isolement très rares en bactériologie médicale [29]. En effet, les progéniteurs des gènes codant pour les CTX-M des groupes 1 et 2 et pour celles des groupes 8 et 9 sont respectivement *K. ascorbata* (blaKLUA) [54, 55] et *K. georgiana* (blaKLUG) [56, 57]. Il est à signaler que les sources des CTX-M du groupe 25 restent inconnues [55].

La phylogénie des nombreux dérivés de CTX-M ainsi que leurs séquences en acides aminés montrent un regroupement au sein de cinq groupes (Figure 12) [29].

- Le groupe CTX-M-1 compte notamment les CTX-M-1, CTXM-3, CTX-M-10 et CTXM-15.
- Le groupe CTX-M-2 comporte les CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7 et TOHO1.
- Le groupe CTX-M-8 comporte CTX-M-8 et CTX-M-40.
- Le groupe CTX-M-9 comporte CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-17, CTXM-19, CTX-M-21, CTX-M-27 et TOHO-2.
- Enfin le groupe 25 comporte CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-41 et CTX-M-55.

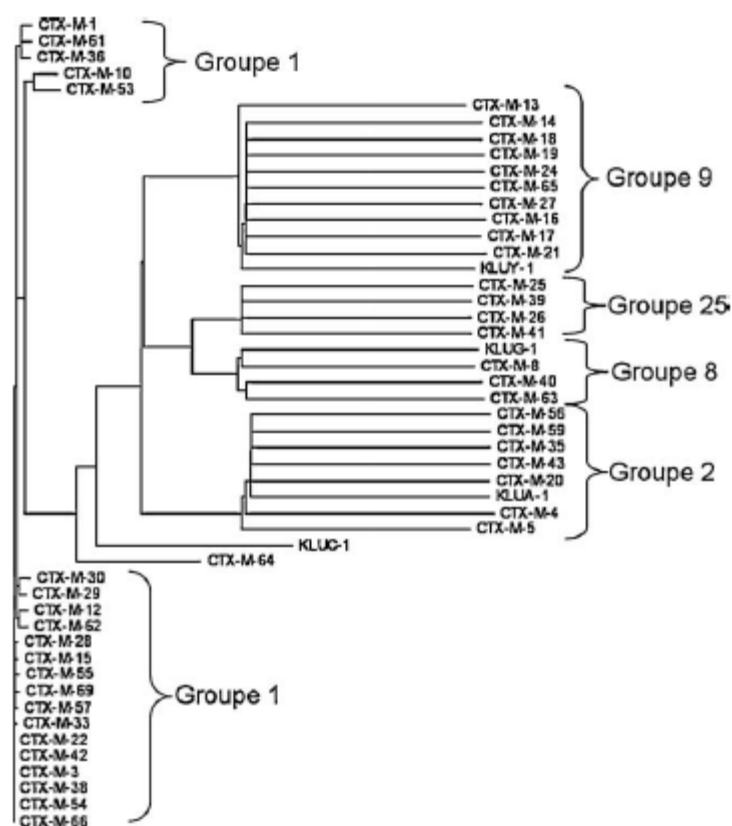


Figure 12: Phylogénie des β -lactamases chromosomiques de *Klutvera sp.* et des CTX-M [29].

Les plasmides porteurs de gènes codants pour les enzymes de type CTX-M confèrent une résistance à toutes les β -lactamines hormis les céphamycines et les carbapénèmes. Ils expriment souvent, comme pour les plasmides portants de gènes codants pour les enzymes de type TEM et SHV, de nombreuses corésistances, notamment aux aminosides, aux fluoroquinolones, aux tétracyclines et au sulfaméthoxazole-triméthoprime [55]. Cette résistance aux quinolones, principalement due aux modifications des topoisomérases, pourrait

aussi être expliquée par la diffusion de déterminants plasmidiques associés aux CTX-M, comme Qnr et AAC (6')-Ib-cr [55]. Enfin, à noter que les CTX-M peuvent être associées à la production d'une oxacillinase de type OXA-1, rendant inactives les associations de type Amoxicilline-acide clavulanique. L'association des gènes blaTEM-1, blaOXA-1, tet (A), aac (6')- Ib-cr, aac(3)-II au sein d'une même région de multirésistance est très souvent retrouvée avec blaCTX-M-15 [58].

Les premières CTX-M identifiées conféraient à l'origine, chez les entérobactéries, un plus haut niveau de résistance au céfotaxime qu'à la ceftazidime [29]. Certaines CTX-M ont ensuite évolué vers un haut niveau de résistance à la ceftazidime telles les enzymes CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-27 ou encore CTX-M-32 dérivant respectivement des CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-18, CTX-M-14 et CTX-M-1, par simple mutation ponctuelle en position 240 « Asp240Gly » de CTX-M-1 [29, 59, 60, 61, 62, 63].

En plus des BLSE de type TEM, SHV et CTX-M communément identifiées en pratique médicale, d'autres familles ont été caractérisés. Ces BLSE, appartenant à la classe A d'Ambler, sont rares et sont principalement détectées chez certaines espèces comme principalement *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. [5, 45]. On retrouve parmi ces familles de BLSE:

- Les BLSE de type GES (Guiana Extended-spectrum β -lactamase);
- Les BLSE de type VEB (Vietnam Extended-spectrum β -lactamase);
- Les BLSE de type PER (Pseudomonas Extended Resistance).

4.2.b/ Les β -lactamases de la classe B d'Ambler «Les métallo-bêta-lactamases»:

Les β -lactamases de classe B sont principalement des carbapénèmases (Par exemple: IMP et VIM) inhibées par l'EDTA [49].

4.2.c/ Les β -lactamases de la classe C d'Ambler «Les céphalosporinases»:

Les β -lactamases de classe C sont les céphalosporinases de type AmpC, inhibées par la cloxacilline [49].

4.2.d/ Les β -lactamases de la classe D d'Ambler «Les oxacillinases»:

Les oxacillinases (type OXA) sont des β -lactamases de la classe D d'Ambler et du groupe fonctionnel 2d de Bush et al. Elles confèrent la résistance à l'ampicilline et à la

céfalocone, et sont caractérisées par une forte activité hydrolytique des pénicillines M (l'oxacilline et la cloxacilline). Cependant, elles n'hydrolysent pas de façon significative les C3G et les C4G. De plus, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique [51].

Certaines oxacillinases ont été évoluées par mutation(s) ponctuelle(s) vers un élargissement du spectre montrant ainsi des propriétés de BLSE. Ces BLSE de type OXA sont principalement retrouvées chez *P. aeruginosa*, mais ont aussi été détectées chez d'autres BGN dont les entérobactéries [45, 51].

5/ Méthodes de détection des β -lactamases à spectre élargi :

Depuis l'identification des premières bactéries productrices de BLSE, les laboratoires de microbiologie clinique ont développé de nombreuses techniques afin d'accroître et améliorer la détection en routine des souches productrices de BLSE. Aujourd'hui, la microbiologie possède deux outils puissants pour étudier la détection de la production des BLSE: la bactériologie (test de synergie) et la biologie moléculaire.

5.1/ Détection phénotypique de la production des BLSE:

Les méthodes microbiologiques pour la détection des BLSE de classe A est principalement basée sur la mise en évidence de la synergie entre un inhibiteur de β -lactamases comme l'acide clavulanique et les C3G, C4G et/ou l'aztréonam ainsi que la mise en évidence d'une sensibilité conservée aux céphalosporines et aux carbapénèmes [4, 5].

C'est en France qu'a été proposée, pour la première fois, la détection des BLSE par un test de synergie entre l'acide clavulanique et les C3G [64]. Cette synergie peut être objectivée par de nombreuses méthodes dont les principales sont:

5.1.a/ Le test de double synergie sur gélose de Mueller-Hinton supplémentée avec de la cloxacilline:

Cette technique est la plus utilisée dans les laboratoires de bactériologie médicale en raison de sa forte recommandation par le CA-SFM. Elle permet l'identification des souches bactériennes productrices de BLSE grâce à un choix judicieux ainsi qu'une bonne disposition des disques d'antibiotiques sur le milieu gélosé. Le principe de ce test est la mise en évidence d'une restauration de l'activité des céphalosporines de troisième génération ou de l'aztréonam en présence d'un inhibiteur des β -lactamases tel que l'acide clavulanique. La positivité de ce test est objectivée par une image dite en « bouchon de champagne » [65].

En pratique de laboratoire, la synergie peut exister sans être détectée. Dans le cas des souches hyperproductrices de leur céphalosporinases, la détection de la synergie est à rechercher avec une C4G (céfépime, cefpirome) sur un milieu gélosé supplémenté avec de la cloxacilline, puissant inhibiteur des céphalosporinase de la classe C d'Amblar.

5.1.b/ Le E-test® spécifique pour la détermination de la production des β -lactamases à spectre élargi:

Ce sont des bandelettes mises au point systématiquement pour la détection de la production de BLSE par les bactéries. Elles renferment d'un coté un gradient d'une céphalosporine de 3^{ème} génération (Céftazidime ou Céfotaxime) et de l'autre un gradient de la même molécule associée à l'acide clavulanique. Le test est positif lorsqu'on observe une réduction d'au moins 3 fois de CMI de la C3G en présence de l'acide clvulanique.

5.1.c/ Les automates pour l'identification des germes producteurs de β -lactamases à spectre élargi:

Il existe d'autres modalités pour la réalisation d'un antibiogramme, comme l'usage de divers automates tels que le Phoenix®, le Vitek2® et le Microscan® très utilisés en pratique médicale. Ces méthodes automatisées utilisent généralement pour la détection de la production des BLSE les céphalosporines seules et en combinaison avec l'acide clavulanique. La réduction de la croissance dans les puits contenant de l'acide clavulanique comparée à ceux contenant les céphalosporines seules indique la production de β -lactamases à spectre élargi.

L'étude de Wiegand et al. en 2007, permettant de comparer entre divers méthodes de détection de BLSE, vient confirmer la place de ces diverses méthodes avec quelques différences selon l'espèce bactérienne ou le mécanisme. Il est à noter que les méthodes bactériologiques classiques, à savoir le test de double synergie, conserve toute sa place parmi les nouvelles méthodes automatisées comme le Microscan-walkaway® (Tableau 5) [66].

Méthode	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
TDS	92,9	96,6	97,5	90,5
TDI	94,1	81,4	87,9	90,6
E-test [®]	94,1	84,7	89,9	90,9
Microscan [®]	83,5	72,9	81,6	75,4
Phoenix [®]	98,8	52,2	75	96,6
Vitek2 [®]	85,9	78	84,9	96,6

TDS : test de synergie du double disque ; TDI : test de synergie avec un disque contenant une C3G et l'acide clavulanique ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive négative.

Tableau 5: Evaluation comparée (%) de la détection des β -lactamases à spectre élargi ou étendu chez 147 souches d'entérobactéries [66].

5.2/ Détection moléculaire de la production des BLSE:

Les techniques de biologie moléculaire pour l'identification des gènes de résistance bactérienne sont fiables et couramment utilisées pour compléter les études bactériologiques ou subvenir à leurs défaillances dans certaines situations. En effet, le taux de BLSE non détectées par les méthodes classiques reste élevé. Cette non détection des BLSE, par les techniques phénotypiques traditionnelles, peut s'expliquer par:

- La grande diversité des enzymes BLSE entraînant une modification importante du spectre enzymatique;
- Les difficultés de détermination des valeurs de CMI qui sont dépendante de nombreux facteurs de manipulation dont l'inoculum bactérien;
- Autres.

De ce fait, les techniques de biologie moléculaire restent des outils importants voire même indispensables pour la détection des enzymes BLSE. Ces techniques permettent également de connaître le type de BLSE que produisent les souches bactériennes multirésistantes. Elles requièrent des personnes hautement qualifiées et un laboratoire bien équipé. Parmi les principales techniques communément utilisées pour l'étude des gènes codants pour les BLSE on retrouve: la PCR, l'oligotypage, la réaction de ligature en chaîne, et le séquençage des nucléotides.

6/ Facteurs de risque d'acquisition d'une entérobactérie productrice de β -lactamases à spectre élargi :

Les facteurs de risque d'acquisition d'un germe producteur de BLSE ont largement été étudiés et sont principalement: l'admission en service de réanimation, hospitalisation prolongée, la pose de dispositifs invasifs (sondage urinaire par exemple), ventilation assistée, hémodialyse et plusieurs cures d'antibiothérapie, notamment par administration des C3G [5, 55, 67].

Les anciens porteurs d'un germe producteur de BLSE et les patients en provenance de pays à haute prévalence d'E-BLSE doivent faire l'objet d'une surveillance particulière à l'admission et éventuellement un dépistage ciblé pour contenir la diffusion des entérobactéries productrices de BLSE [68, 69, 70, 71, 72].

Diverses études menées dans le monde permettent d'observer des personnes saines porteuses d'E-BLSE sans aucun facteur de risque identifié. Ceci témoigne de la diffusion importante des germes producteurs BLSE dans la communauté [73, 74].

7/ Conséquences d'une infection à entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi :

Le diagnostic chez un patient d'une infection à une entérobactérie productrice de BLSE présente généralement des conséquences cliniques, financières et écologiques. En effet, les infections à E-BLSE s'accompagnent souvent d'échecs thérapeutiques avec un réel impact sur la morbidité, la mortalité ainsi qu'une importante augmentation du cout d'hospitalisation due au prolongement de la durée d'hospitalisation et à l'utilisation de médicaments de dernier recours souvent onéreux. Aussi, l'utilisation intensive des antibiotiques pour le traitement de ce genre d'infections cause un changement de l'écologie bactérienne caractérisé par la prolifération des bactéries multirésistantes [52].

Des études réalisées portant sur l'impact des bactériémies à entérobactéries productrices de BLSE sur la mortalité ont confirmé que ces dernières étaient associées à un risque significativement plus élevé de décès [75]. Cette surmortalité est principalement due au délai de mise en route d'une antibiothérapie empirique adaptée [76, 77]. Cependant, pour les infections urinaires à E-BLSE, la plupart des études ne concluait pas à une augmentation de la mortalité [78]; en revanche, ces infections sont clairement associées à un coût de santé plus important et à une durée d'hospitalisation plus longue [79].

Sur le plan épidémiologique, de nombreuses études ont montré que les principaux sites à partir desquels sont isolées les BLSE sont les urines et les sécrétions respiratoires. Ceci contribue énormément à la diffusion de ces bactéries multirésistantes [52].

8/ Prévention contre la dissémination des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi:

La prévention contre la dissémination des bactéries multirésistantes, notamment les entérobactéries productrices de BLSE est désormais un devoir de santé publique. L'approche doit être pluridimensionnelle et intégrer:

8.1/ Sensibilisation:

Elle consiste à informer l'ensemble du monde médical de la diffusion épidémique d'entérobactéries BLSE dont la multi-résistance confronte au risque d'impasse thérapeutique.

8.2/ Mesures préventives standards:

Ces mesures, peu respectées, comprennent une série d'actions dont les principales sont le lavage des mains par une solution hydroalcoolique, le port de gants en cas d'un risque de contact avec un liquide biologique et le port d'une surblouse en cas de soins contaminants.

Si la chambre individuelle est nécessaire chez les patients colonisés/infectés par une E-BLSE, les méthodes complémentaires d'isolement géographique et technique sont souvent contestables en raison des nombreux inconvénients qui peuvent s'y accompagner [80]. Premièrement, elles entraînent une diminution du nombre de visite par le personnel soignant (de l'ordre de la moitié) et donc de qualités moindres de soins se traduisant généralement par des effets indésirables [80, 81, 82]. Deuxièmement, l'isolement des patients aurait pour conséquence d'entraîner davantage de syndromes dépressifs [80, 83]. Enfin, le fait d'isoler un patient entraîne un allongement de sa durée de séjour avant transfert dans un autre service et un allongement des délais avant examen programmé [80].

8.3/ Dépistage des patients porteurs d'une entérobactérie productrice de β -lactamases à spectre élargi:

Il permet de limiter considérablement la diffusion par transmission croisée entre patients des entérobactéries productrices de BLSE dans le milieu hospitalier. Il reste très recommandé, notamment dans les services à forte incidence de colonisation comme la réanimation et pour les patients ayant des facteurs de risque d'acquisition [84].

8.4/ La rationalisation de la prescription des antibiotiques :

En raison des difficultés que confrontent les industries pharmaceutiques pour le développement de nouvelles molécules d'antibiotiques, il est peu probable que nous disposions prochainement de nouvelles molécules efficaces au traitement des infections à E-BLSE. De ce fait, Il est impératif d'évaluer de nouveaux schémas de traitement d'infections documentées à EBLSE et réserver l'usage des carbapénèmes, comme l'imipénème, à la prise en charge des infections sévères afin d'éviter les risques d'impasses thérapeutiques que peut présenter l'émergence des carbapénèmases.

L'un des principaux facteurs d'échec des mesures préventives de la transmission croisée est probablement lié au réservoir des E-BLSE [85]. Ces bactéries multirésistantes sont retrouvées actuellement dans l'environnement et dans la nourriture [86] ainsi que chez des animaux de compagnie [87] et des sujets sains en milieu communautaire [86]. Il a de plus été trouvé une forte proportion de sujets colonisés par des E-BLSE chez les membres de la famille de patients porteurs en communauté [88]. En milieu hospitalier, une étude trouvait également une proportion non négligeable de colonisation à *E. coli* BLSE parmi le personnel servant les repas aux patients [89].

9/ Traitement des infections à entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi:

Les options thérapeutiques pour le traitement d'une infection à entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi sont très limitées et font principalement appel aux carbapénèmes. Cette utilisation massive des carbapénèmes a, comme prévu, causée l'émergence de bactéries productrices de carbapénèmases, telles que les Klebsiella productrices de carbapénèmases « KPC » et les oxacillinas « OXA-48 » [90]. L'agence française de sécurité sanitaire et des produits de santé a rappelé dans un document de 2011 que l'usage large des carbapénèmes serait efficace à l'échelon individuel présente un haut risque collectif car favorisant l'émergence de bactéries résistantes aux carbapénèmes » [92]. De ce fait, il est devenu impératif de trouver des options thérapeutiques substitutives à l'utilisation des carbapénèmes dans le traitement des infections à E-BLSE.

L'une des alternatives thérapeutiques pour éviter la surconsommation des carbapénèmes serait la revalorisation des C3G et des C4G. Ces céphalosporines peuvent être utilisées lorsqu'elles sont sensibles sur l'antibiogramme dans le traitement des infections à E-BLSE. Il existe pourtant peu de données cliniques sur l'utilisation des C3G et C4G dans le traitement

de ces infections causées par des isolats producteurs de BLSE [93]. Bin et al. ont cependant rapporté l'efficacité de la ceftazidime sur des patients atteints de bactériémie due à *E. coli* productrices de CTX-M, lorsque la CMI de la ceftazidime était inférieure ou égale à 8µg/ ml [94].

La fosfomycine et les nitrofuranes sont des antibiotiques fortement recommandés pour le traitement de la cystite aigue non compliquée. De nombreuses études ont montré que les résistances des E-BLSE à la fosfomycine et aux nitrofuranes sont relativement beaucoup plus faibles en comparaison avec d'autres molécules utilisées massivement en thérapie des infections urinaires, notamment les fluoroquinolones [95, 96, 97]. De ce fait, les nitrofuranes et la fosfomycine conservent encore une activité intéressante contre E-BLSE uropathogènes et peuvent donc être proposés comme alternative aux carbapénèmes dans le traitement des infections urinaires à E-BLSE.

La tigécycline présente une excellente activité sur les bactéries productrices de BLSE ainsi qu'une bonne diffusion tissulaire [98]. Cependant, l'absence de données cliniques pertinentes quant à son utilisation compromet la recommandation de cette molécule pour le traitement des infections urinaires à E-BLSE uropathogènes [99, 100].

Certaines pénicillines tels que la pivmecilline (le précurseur de mécilliname) et la témocilline, sont actifs in vitro contre les bactéries productrices de BLSE. La sensibilité à la pivmecilline dépassait les 90% dans une étude française [95] et suédoise [101]. Ce médicament, modérément stable à de nombreux BLSE [102], est recommandé en France pour le traitement des cystites compliquées et pourrait bien être considéré comme une alternative pour les infections urinaires à E-BLSE chez les patients en ambulatoires [95]. La témocilline, distribuée en Belgique et au Royaume-Uni, a une bonne efficacité microbiologique dans les infections sanguines et les infections urinaires et restent in affecté par les BLSE [103].

Parmi les médicaments substitutifs des carbapénèmes, on retrouve également l'association pénicilline et inhibiteurs de β-lactamases tel que l'acide clavulanique. Les taux de sensibilité des entérobactéries productrices de BLSE à cette association restent très importants [104] indiquant ainsi que cette association pourrait ainsi être proposé pour le traitement en ambulatoire des infections urinaires dues à des entérobactéries productrices de BLSE. Les associations amoxicilline-acide clavulanique et Pipéracilline-tazobactam ont été utilisées avec succès pour le traitement de la cystite due à germes producteurs de BLSE sensible à ces associations [105, 106]. Cependant, plus de données cliniques sont nécessaires avant l'utilisation de cette association pour le traitement des infections sévères à E-BLSE.

Malgré les taux élevés de sensibilité des germes producteurs de BLSE aux céphamycines, peu de données cliniques sont disponibles concernant l'activité des céphamycines dont la céfoxitine (Méfoxin®) qui est utilisée en prophylaxie chirurgicale et commercialisée en France. Lee et al. ont mis en évidence l'important rôle que peut occuper le flomoxef, une nouvelle céphamycine, dans la substitution des carbapénèmes dans le traitement des *K. pneumoniae* productrices de BLSE [107].



*DEUXIEME PARTIE
PARTIE PRATIQUE*




INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années et suite à l'introduction en thérapeutique de nouvelles β -lactamines, l'isolement des entérobactéries productrices de β -lactamases au sein du service de bactériologie a considérablement évolué et représente, aujourd'hui, un problème majeur de santé publique. Ces β -lactamases confèrent aux bactéries qui les hébergent, les moyens de résister à la majorité, voire même dans certains cas à l'ensemble des β -lactamines développées par l'industrie pharmaceutique pour le traitement des genres compliqués d'infections bactériennes.

La détection phénotypique de ces nouvelles enzymes est fondée sur les critères habituels propres à chaque classe: sensibilité ou non aux inhibiteurs de β -lactamases ou à certaines molécules plus stables. Cependant, l'association de ces nouvelles β -lactamases avec d'autres mécanismes de résistance comme l'imperméabilité ainsi que la production de plusieurs enzymes qui peut se surajouter chez le même individu rend la détection de ces enzymes plus difficile; A côté des données phénotypiques de l'antibiogramme standard, le recours aux méthodes de biologie moléculaire tels que les techniques de PCR classique et PCR en temps réel est devenu non seulement utile mais indispensable.

L'objectif de ce travail est de détecter et isoler les bactéries productrices de BLSE à partir des prélèvements reçus au laboratoire de bactériologie d'un certain nombre de patients dans le but de :

- 1) Réaliser une étude épidémiologique-moléculaire des E-BLSE et déterminer leurs mécanismes de résistance aux antibiotiques. Ceci permettra de situer d'un point de vue moléculaire, la nature des gènes de résistances hébergés par nos souches et comparer nos résultats aux données internationales.
- 2) Aider le clinicien à prescrire à leurs patients les traitements appropriés et contribuer ainsi à élaborer une meilleure politique de prescription des antibiotiques.
- 3) Formuler les recommandations prévenant la diffusion de ces bactéries contre lesquelles les possibilités thérapeutiques sont très réduites, voire nulles.



***MATÉRIEL ET
MÉTHODES***

1. Lieu et cadre de l'étude:

Il s'agit d'une étude effectuée sur une durée de trois ans (1^{er} Janvier 2010 au 31 décembre 2012) portant sur toutes les souches non redondantes d'E-BLSE isolées à partir des prélèvements urinaires, à visée diagnostique, adressés au laboratoire de microbiologie de l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech.

Les sujets inclus dans cette étude présentaient les caractères suivants:

- Tous les patients (hospitalisés et consultants en ambulatoire) présentant une infection urinaire confirmée à entérobactérie quel que soit leur sexe ou leur âge;
- Tous les services hospitaliers ont été inclus dont les services: urologie, réanimation, médecine interne et les urgences;

Les examens cytobactériologiques des urines (ECBU) ont été fréquemment prescrits, par les cliniciens, chez les patients présentant:

- Un échec d'antibiothérapie probabiliste préalable;
- Une IU récidivante;
- Une pathologie sous-jacente;
- Une infection grave;
- Des brûlures et douleurs à la miction;
- Une pollakiurie;
- Autres.

Ont été retenus pour cette étude les prélèvements urinaires répondant à une bactériurie significative supérieure ou égale à 10^5 UFC/ml (au-delà de 2 types de colonies différentes, l'analyse n'est pas poursuivie sauf en situation particulière et en concertation avec le clinicien) en présence d'une leucocyturie supérieure ou égale à 10^4 éléments/ml. Les seuils de bactériurie de 10^3 UFC/ml pour les cystites à *E. coli* ont aussi été retenus.

2. Taille de l'échantillon:

Au total 9861 Prélèvements urinaires ont été analysés au laboratoire de microbiologie de notre hôpital. Sur l'ensemble de ces échantillons urinaires analysés, 1472 souches d'entérobactéries ont été isolées dont 160 souches étaient productrices de BLSE. Les souches d'E-BLSE ont été étudiées au laboratoire de bactériologie de l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech, puis une série de 17 souches d'E-BLSE ont fait l'objet d'une étude approfondie par biologie moléculaire au laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire à l'hôpital Ibn Rochd de Casablanca.

3. Déroulement de l'étude:

L'étude prospective a été réalisée en cinq principales étapes:

- Recueil des prélèvements urinaires au laboratoire de microbiologie de l'hôpital militaire et universitaire Avicenne de Marrakech;
- Réalisation d'un ECBU pour chaque échantillon urinaire;
- Identification et conservation des entérobactéries uropathogènes multirésistantes (BMR), notamment les souches productrices de BLSE;
- Réalisation de l'étude moléculaire d'un échantillon de souches d'E-BLSE pour la caractérisation des gènes codants pour les BLSE;
- Traitement des données épidémio-moléculaires et comparaison avec les données nationales et internationales.

4. Diagnostic bactériologique des infections urinaires:

Chaque prélèvement urinaire adressé au laboratoire de bactériologie a fait l'objet d'un examen cyto bactériologique comportant:

- Un examen microscopique permettant d'évaluer la leucocyturie et les autres éléments figurés de l'urine (hématies, cristaux. . .) ;
- Une uroculture avec dénombrement de germes (bactériurie).

Le diagnostic biologique d'infection urinaire a été retenu sur les critères classiques suivants: leucocyturie supérieure ou égale à 10^4 éléments/mL et bactériurie supérieure ou égale à 10^5 UFC/mL. Les seuils de bactériurie de 10^3 UFC/mL pour les cystites à *Escherichia coli* ont été retenus.

L'identification des souches bactériennes doit être systématiquement accompagnée d'un antibiogramme. Ces deux méthodes phénotypiques sont ensuite complétées par une recherche approfondie par biologie moléculaire des souches isolées afin caractériser les gènes producteurs des BLSE.

4.1. Examen macroscopique :

- **Aspect de l'urine:** clair, trouble, Hématique, etc;
- **Culot:** nul, faible, moyen, important;
- **Autres.**

4.2. Examen à l'état frais :

L'urine est examinée à l'état frais sur une cellule de mallassez et on note au microscope entre autres:

- Le nombre de leucocytes;
- Le nombre d'hématies;
- Présence ou absence des cristaux (oxalate de Ca^{2+} , ...);
- Présence ou absence des cellules (épithéliales, vésicales...);
- Présence ou absence des levures;
- Présence ou absence des bactéries;
- Autres.

4.3. Culture:

Afin d'obtenir des colonies bien isolées des entérobactéries uropathogènes, les échantillons urinaires ont étéensemencées sur un milieu de culture gélosé ordinaire: Le CLED (cysteine lactose electrolyte deficient) ou le BCP (Pourpre de Bromocrésol). Les boîtes de pétriensemencées ont été par la suite incubées à l'étuve pendant 18 à 24 heures à 37°C.

Plusieurs caractères peuvent être étudiés pour l'identification des germes bactériens isolés dont les principaux sont: la taille, l'aspect et le contour des colonies. Par exemple :

- Les souches d'*E. coli* donnent sur le milieu CLED de grosses colonies, lactose positif et à contours irréguliers.
- Les souches de *K. pneumoniae* donnent sur le milieu CLED de grosses colonies muqueuses, lactose positif et ayant une tendance à la confluence.

Lors de l'examen macroscopique, le nombre de bactéries sur boîtes de pétri est évalué par un dénombrement des germes urinaires (DGU) qui est exprimé en Unité Formant Colonie « UFC »/ml.

➤ Coloration de Gram:

La coloration de Gram est réalisée à partir de la culture afin d'étudier les caractères morphologiques de la bactérie étudiée, notamment la forme (ex. Cocci ou Bacille) et aussi distinguer entre les bactéries à gram négatif et les bactéries à Gram positif. Sur le Gram, les entérobactéries apparaissent sous la forme de bacilles colorés en rose.

➤ **La réaction à l'oxydase:**

Le test à l'oxydase est réalisé à l'aide d'un disque de Tetramethyl-p-phénylènediamine, imprégné d'eau distillée sur lequel a été déposée une colonie. La réaction positive à l'oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée. Les entérobactéries comme *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* sont dépourvues d'oxydase.

4.4. Identification des entérobactéries uropathogènes:

Après ensemencement sur milieux gélosés et la coloration de Gram, les souches sont identifiées selon les méthodes en usage au laboratoire. Ces méthodes peuvent être classiques (utilisation des galeries biochimiques API 20E) ou automatisées. La galerie biochimique API20E se compose de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés pour la mise en évidence d'enzymes ou de fermentation de sucres (Figure 13). Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui réhydrate les substrats. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par un changement spontané ou révélé par l'addition de réactifs. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré.

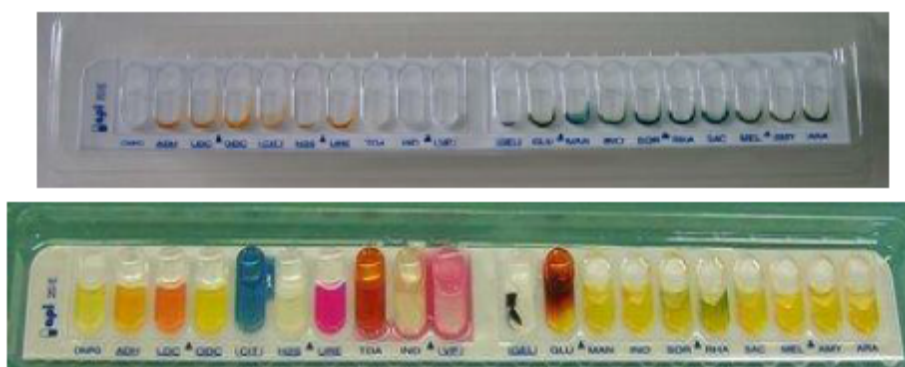


Figure 13: Galerie API 20E identifiant *K. pneumoniae*.

Pour cette étude, l'identification des bactéries a été réalisée par méthode automatisée sur Microscan Walkaway® (Dade Behring®, Sacramento, Etats-Unis) (Figure 14). Les bactéries peuvent être identifiées selon le type de réactions biochimiques qu'elles produisent.



Figure 14: Photo de l'automate Microscan WalkAway®.

La plaque 96 puits combo (Figure 15) dispose d'un nombre important de tests qui permet l'identification de l'espèce bactérienne ainsi que la détermination de son profil de résistance aux différents antibiotiques testés. Elle peut être subdivisée en deux principales parties :

- La partie pour l'identification de l'espèce bactérienne: Les cupules de cette partie sont constituées de substrats qui définissent les caractères biochimiques de la bactérie étudiée. Elles permettent ainsi l'identification de l'espèce bactérienne responsable de l'infection.

- la partie antibiogramme: Les cupules de cette partie se composent d'un nombre d'antibiotiques à différentes concentrations permettant la détermination des CMI pour les antibiotiques testés. La croissance bactérienne se traduit par une augmentation de la turbidité qui est évaluée par l'automate.



Figure 15: Plaque 96 puits pour identification et antibiogramme utilisé par l'automate Microscan WalkAway®.

❖ Mode opératoire (Figure 16):

- ✚ **Réalisation de l'inoculum bactérien:** Une attention particulière devrait être prêtée à la préparation de l'inoculum. La suspension bactérienne est obtenue, à partir d'une souche pure, en piquant trois colonies bien isolées sans contact avec la gélose grâce à une pointe calibrée Prompt® dans un milieu de suspension « flacon Prompt » suivie d'une agitation. Cette technologie prompt®, grâce à sa pointe calibrée, permet de standardiser l'inoculum rapidement et sans ajustement de la concentration par turbidimétrie.
- ✚ **Inoculation de la plaque Microscan®:** Elle est réalisée par la technologie Renok® qui permet d' d'inoculer et de réhydrater les plaques MicroScan® de façon simple et rapide en une seule étape.
- ✚ **Incubation des plaques:** Les plaques sont ensuite incubées dans le système WalkAway® pendant au moins 16 heures à 35°C.



Figure 16: les différentes étapes pour l'identification des souches bactériennes par l'automate Microscan WalkAway®.

📌 **Lecture des plaques:** Les plaques sont lues sur les instruments Microscan®.

4.5. Mesure de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries:

L'antibiogramme est l'examen biologique destiné à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques. Cet examen consiste à placer la souche bactérienne étudiée en présence d'un antibiotique et à observer l'effet de ce dernier sur le développement de la souche bactérienne étudiée. Il existe principalement trois types d'interprétation selon le résultat obtenu:

- Souche bactérienne sensible (S): souches pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutiques est forte dans le cadre d'un traitement classique avec posologie recommandée.
- Souche bactérienne intermédiaire (I): souches pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Les souches bactériennes intermédiaires ont été groupées avec les souches résistantes pour l'ensemble des analyses.
- Souche résistante (R): souches pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique. La résistance des bactéries isolées aux antibiotiques est déterminée selon la formule suivante:

$$\% \text{ de résistance} = \frac{\text{Nombre de souches résistantes + souches intermédiaires à un antibiotique}}{\text{Nombre total de souches testées du même germe}}$$

Pour cette étude, la sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode automatisée sur Microscan Walkaway (Dade Behring®, Sacramento, Etats-Unis) selon les normes du Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM) [108].

La sensibilité in vitro d'un antibiotique donné est un des pré-requis pour l'efficacité in vivo d'un traitement antibiotique.

La méthode automatisée pour la détermination de l'antibiogramme permet la détermination des CMI exactes des différents antibiotiques testés par microdilution en méthode liquide (Figure 17).

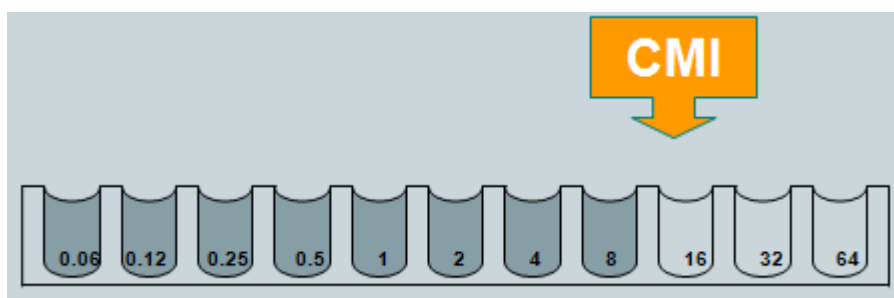


Figure 17: Détermination de la CMI de l'antibiotique par microdilution en milieu liquide employée par l'automate Microscan wallaway®.

4.6. Détection du phénotype BLSE par des techniques microbiologiques:

La recherche de la production des BLSE est une étape essentielle dans les choix thérapeutiques et la surveillance épidémiologique des germes bactériens responsables des infections. Elle est effectuée devant toute diminution du diamètre de la zone d'inhibition d'une céphalosporine de troisième génération (ex. céfotaxime et céftazidime) et ou d'une monobactame (ex. Aztréonam). Différentes approches ont été développées pour accroître la détection en routine des souches productrices des BLSE et peuvent être classés en deux catégories: Les techniques microbiologiques et les techniques moléculaires.

Les techniques microbiologiques pour la détection des BLSE utilisent les inhibiteurs de β -lactamases tels que l'acide clavulanique, en combinaison avec une céphalosporine de

troisième génération. Le principe de ces méthodes est que l'acide clavulanique inhibe les enzymes de type BLSE et ainsi réduit le niveau de résistance aux céphalosporines.

Pour la méthode automatisée avec Microscan®, une entérobactérie est classée comme productrice de BLSE quand on assiste à une diminution significative de CMI \geq à 3 dilutions de raison géométrique 2 pour la céftazidime ou le céfotaxime en présence d'une concentration fixe d'acide clavulanique, par rapport à la valeur de CMI de l'antibiotique testé seul (Figure 18).

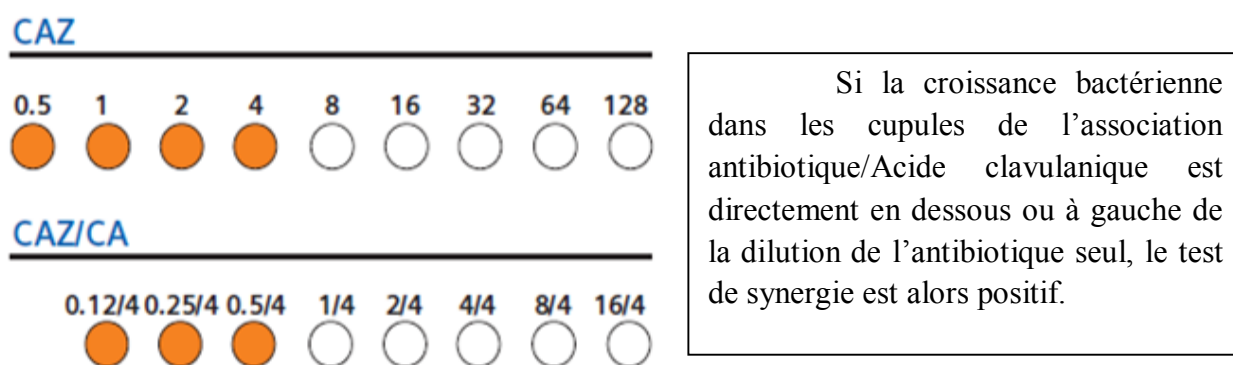


Figure 18: détermination du phénotype BLSE par méthode automatisée avec Microscan®.

D'autres systèmes automatisés tels le test BD Phoenix de Becton Dickinson Biosciences (Sparks, Md) et le test Vitek (bioMerieux Vitek, Hazelton, Missouri) sont aussi capables de détecter les BLSE.

- ✚ Les bandelettes E-test pour la détection des BLSE renferment sur un bout un gradient d'une C3G (ex. céfotaxime ou céftazidime) et sur l'autre bout la céftazidime ou céfotaxime avec l'acide clavulanique. Le test est positif lorsqu'on observe une réduction d'au moins 3 fois de CMI de la C3G en présence de l'acide clavulanique.
- ✚ Le test de double synergie a été utilisé au niveau de notre laboratoire pour la confirmation de la production de BLSE détecté par l'automate. Il consiste à préparer un inoculum bactérien à partir d'une culture jeune puis l'ensemencer par inondation sur un milieu gélosé Mueller-Hinton sur lequel est déposé autour d'un disque amoxicilline/acide clavulanique (20/10 µg) ou de ticarcilline/acide clavulanique (20/10 µg) au moins un des disques suivants: céfotaxime (30 µg), céftazidime (30 µg), ceftriaxone (30 µg),

céfépime (30 µg) et aztréoname (30 µg) sur la gélose Mueller-Hinton. La distance entre les disques centre à centre est comprise entre 20 et 30 mm (Figure 19). La boîte de pétri est ensuite incubée pendant 18 à 24h à 37°C.

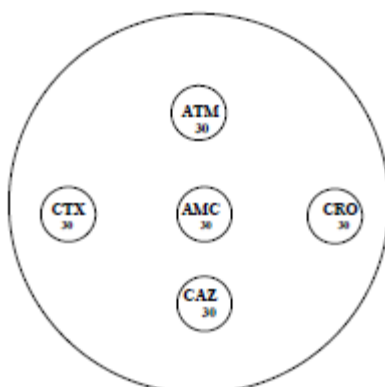


Figure 19: Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de double synergie

**ATM: Aztréonam; CAZ: Ceftazidime; CTX: Céfotaxime; CRO: Ceftriaxone.
30: représente la quantité d'antibiotique en µg dans le disque.**

La production de BLSE par la souche bactérienne étudiée se traduit par l'apparition d'une synergie entre les disques de C3G et le disque contenant l'acide clavulanique. Cette synergie est matérialisée par une image en bouchon de champagne (Figure 20).



Figure 20: Test de synergie positif pour une souche d'*E. coli* (Aspect en bouchon de champagne).

La détection de la production d'une BLSE est parfois difficile compte tenu d'une éventuelle production d'une céphalosporinase de haut niveau. En effet, l'image de synergie

peut être absente quand la souche étudiée possède deux mécanismes de résistance aux β -lactamines dont la céphalosporinase hyperproduite qui masque le phénotype BLSE. Pour cela, il reste nécessaire de réaliser un test complémentaire, notamment le test à la cloxacilline. La cloxacilline, utilisée comme inhibiteur des céphalosporinases, est incorporée dans la gélose Mueller-Hinton (250 mg/l). Les disques de CAZ et de CTX sont placés à une distance de 20 mm (de centre à centre) d'un disque contenant l'amoxicilline / acide clavulanique et on cherche l'apparition de l'image de synergie en bouchon de champagne (Figure 20).

Le test de double synergie entre un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération ou Aztréoname et un inhibiteur de B-lactamase tel l'acide clavulanique peut être insensible pour plusieurs raisons :

- La distance entre les disques;
- L'inaptitude du test à détecter la production de BLSE chez les souches productrices de céphalosporinases chromosomiques.

Malgré ces défaillances, c'est une méthode assez utilisée en routine car elle ne nécessite pas beaucoup de matériel et de réalisation facile.

4.7. Détermination des CMI par E-test :

La mesure de la CMI par les bandelettes (E-test) a concerné principalement les souches d'entérobactéries présentant une sensibilité diminuée aux carbapénèmes (ex. Ertapénème et Imipénème). Cette technique rapide et simple permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester. Ce test associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide. La bandelette est appliquée sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec un inoculum bactérien de la souche à étudier. La lecture est réalisée après 18h d'incubation à 37°C et une plage d'inhibition se dessine en forme d'ellipse dont les points d'intersection avec la bandelette graduée définissent la CMI (Figure 21).



Figure 21: E-test de l'imipénème pour une souche de *K. pneumoniae*.

4.8. Caractérisation moléculaire des souches productrices de BLSE:

Les tests phénotypiques permettent de manière présomptive d'identifier la présence de BLSE. Pour connaître le type de BLSE que produisent les souches cliniques, il faut avoir recours aux techniques de la biologie moléculaire tel que la Polymerase Chain Reaction « PCR ».

Pour cette étude, et en fonction du profil épidémiologique des germes d'entérobactéries, il a été décidé de travailler sur un échantillon de souches d'entérobactéries uropathogènes productrices de BLSE. De ce fait l'ensemble des souches d'entérobactéries uropathogènes isolées ont été répertoriés et seules les souches productrices de BLSE ont été conservées. Au total 1472 entérobactéries uropathogènes ont été isolées à partir des échantillons urinaires analysés au laboratoire, dont 160 souches productrices de BLSE.

17 souches d'*E. coli* productrices de BLSE, isolées au laboratoire de microbiologie de l'hôpital militaire Avicenne au niveau de la région de Marrakech, ont fait l'objet d'une étude approfondie en biologie moléculaire au laboratoire de bactériologie au CHU Ibn Rochd. Le tableau 6 rapporte les caractéristiques des 17 souches d'*E. coli* productrices de BLSE utilisées pour l'étude moléculaire.

Tableau 6: Profil de résistance aux antibiotiques des 17 souches d'*E. coli* utilisées pour la détermination des gènes codants pour les enzymes BLSE.

N° de la souche d' <i>E. coli</i>	TDS	Phénotype de résistance aux antibiotiques usuels														
		Amoxicilline	AMC	céphalotine	Ticarcilline	Céfoxitine	Céfotaxime	Céfazidime	Céfépime	Imipénème	Fosfomicyne	Gentamicine	Tobramycine	Amikacine	SXT	Ciprofloxacine
<i>E. coli 1</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R
<i>E. coli 2</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R
<i>E. coli 3</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
<i>E. coli 4</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R
<i>E. coli 5</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R
<i>E. coli 6</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R
<i>E. coli 8</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
<i>E. coli 9</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
<i>E. coli 10</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
<i>E. coli 11</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
<i>E. coli 12</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R
<i>E. coli 13</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>E. coli 14</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R
<i>E. coli 15</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
<i>E. coli 16</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
<i>E. coli 17</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
<i>E. coli 18</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R

(+): Test de double synergie positif.

(-): Test de double synergie négatif.

(S): Souche sensible.

(R): Souche résistante.

(TDS): Test de double synergie.

4.8.1. Préparation des matrices d'ADN bactérien pour la PCR:

Les matrices d'ADN bactérien utilisées pour les réactions d'amplification par PCR ont été générés par la suspension de cinq colonies d'une culture d'*E. coli* dans 500 µl d'eau DNase et RNase (Invitrogen, Paisley, Royaume-Uni). La suspension a été ensuite bouilli à 100 °C pendant 10 minutes dans le bloc thermique (Polystat 5; Bioblock Scientific, France), puis

centrifugé à 19 000 g pendant 5 min. Le surnageant est conservé à -20 °C pour les réactions de PCR ultérieures. Une aliquote de 1 µl du surnageant a été utilisé comme matrice d'ADN pour la PCR.

4.8.2. Typage des BLSE par détection des gènes codant pour les enzymes de type BLSE:

L'identification génotypique des BLSE a été réalisée par PCR en collaboration avec le laboratoire de Bactériologie-virologie du centre hospitalier universitaire Ibn Rochd (Casablanca, Maroc). La PCR est basée sur le mécanisme de la réplication de l'ADN. Cette technique comprend les cycles répétitifs suivants:

- i. La dénaturation de l'ADN double brin;
- ii. L'hybridation amorce-ADN cible;
- iii. L'élongation de l'ADN par addition de nucléotides en utilisant l'ADN polymérase.

L'étape de l'élongation est catalysée par la Taq polymérase (ADN polymérase thermostable extraite des bactéries *Thermus aquaticus*). Chaque produit de la réaction d'élongation servant de matrice à la réaction suivante, une série de « n » cycles consécutifs conduit à l'accumulation exponentielle du fragment répliqué.

Seules les trois types de BLSE, communément produits par les entérobactéries et identifiées en pratique médicale, étaient recherchés: CTX-M (CEFO_TAXIMASE-M_UNICH), SHV (S_ULFH_YDRYL V_AR_IA_BL_E) et TEM (TE_MONIERA – nom du patient). Les amorces consistent généralement en séquences relativement courtes qui sont différentes les unes des autres et complémentaires des sites de reconnaissance au niveau de l'ADN cible à amplifier.

Le Tableau 7 précise les séquences nucléotidiques des amorces CTX-M, TEM et SHV utilisées pour cette étude.

Tableau 7: Séquences nucléotidiques des différentes amorces utilisées pour cette étude.

Gène	Amorces (5' à 3')
CTX-M groupe 1	CTX-M (sens): GGT _T AAA _A AATCACTGCGTC
	CTX-M (Anti-sens): TTGGTGACGATTTTAGCCGC
SHV	SHV (sens): CGCCGGGTTATTCTTATTTGTTCGC
	SHV (Anti-sens): CGCCGGGTTATTCTTATTTGTTCGC
TEM	TEM (sens): ATAAAATTCTTGAAGACGAAA
	TEM (Anti-sens): GACAGTTACCAATGCTTAATCA

4.8.3. Préparation du mélange (Mix):

Dans un tube Eppendorf, préparer le mélange ci-dessous (Tableau 8). Prévoir un tube sans ADN qui servira de témoin négatif.

Tableau 8: Préparation du mélange pour les réactions de la PCR.

Tampon de la réaction	(10X ; 25 mM MgCl ₂)	5 µl
dNTP	(2,5 mM chacun)	2 µl
Amorces	(Sens) (20 pmol/µl)	1 µl
	(Anti sens) (20 pmol/µl)	1 µl
Taq DNA polymerase		0,2 (1U)
ADN bactérien		1 µl
H2O		Qsp 50 µl

4.8.4. Le profil thermique de la PCR:

Les paramètres des cycles de température, comme la dénaturation, l'hybridation des amorces, l'extension des amorces et le nombre de cycles (Tableau 9) sont essentiels pour le succès de la PCR.

Tableau 9: Protocoles de PCR suivant le type de gène recherché.

Paramètre	Condition / durée		
	blaCTX-M	blaSHV	blaTEM
Dénaturation initiale	94°C / 5min	94°C / 5min	94°C / 5min
Dénaturation	94°C / 1min	94°C / 1min	94°C / 1min
Hybridation	61°C / 1min	61°C / 1min	61°C / 1min
Elongation	72°C / 1min	72°C / 1min	72°C / 1min
Elongation finale	72°C / 7min	72°C / 7min	72°C / 7min
Nombre de cycles	30	30	30

4.8.5. Visualisation des produits PCR par électrophorèse en gel d'agarose:

L'électrophorèse sur gel d'agarose à 1% et sous tension constante 70 mV a été réalisée. 5 µl de chaque produit de PCR a été déposé au niveau de chaque puit. Le tampon de migration utilisé a été le Tris-EDTA-Acétate (TEA).

Après la migration d'électrophorèse, l'ADN est observé sous ultra violet (UV) grâce à la coloration au bromure d'ethidium « BET » qui est un agent intercalant couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire.

L'évaluation des fragments d'ADN a été réalisée en utilisant un marqueur de poids moléculaire et le gel est pris en photo avec un appareil photo numérique.

4.8.6. Interprétation:

Lorsqu'il y a un produit d'amplification avec l'ADN de la souche étudiée, comparer la taille du fragment obtenu avec celle de la souche de contrôle. Si les tailles sont identiques, le résultat est positif. Si les tailles sont très différentes, le résultat peut être rendu négatif. Si les tailles sont proches, le résultat est interprétable et peut nécessiter la détermination de la séquence du produit d'amplification.

A decorative frame with a dark red border and a white background. The word "RESULTATS" is written in a black, stylized, serif font in the center. The frame has a decorative corner element in the bottom-left corner.

RESULTATS

ARTICLE 1:

Évolution récente du profil épidémiologique des entérobactéries uropathogènes productrices de β -lactamases à spectre élargi à Marrakech, Maroc

Introduction et objectifs de l'étude

Les infections urinaires à entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi constituent un risque infectieux croissant et peuvent même conduire dans de nombreux cas à des impasses thérapeutiques du fait de leur multirésistance aux antibiotiques. Bien que la maîtrise de la diffusion de ces bactéries multirésistantes constitue une priorité, peu de données actualisées permettent de définir l'ampleur de ce phénomène au niveau de la région de Marrakech. Dans ce cadre, le but de cette étude était de suivre l'évolution du profil épidémiologique des entérobactéries uropathogènes productrices de β -lactamases à spectre élargi (E-BLSE) et de décrire leur niveau actuel de résistance aux antibiotiques.

Matériel et méthodes

Il s'agit d'une étude rétrospective d'une durée de cinq ans (du 1er janvier 2008 au 31 décembre 2012) concernant toutes les souches d'E-BLSE uropathogènes isolées au laboratoire de microbiologie de l'hôpital Avicenne de Marrakech, Maroc.

Chaque prélèvement urinaire adressé au laboratoire a fait l'objet d'un examen cytobactériologique comportant:

- Une uroculture avec dénombrement de germes (bactériurie);
- Un examen microscopique permettant d'évaluer la leucocyturie et les autres éléments figurés de l'urine (hématies, cristaux, etc).

L'identification des bactéries et de leur antibiogramme a été réalisée par méthode automatisée sur Microscan Walkaway (Dade Behring®, Sacramento, États-Unis). La production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE), détectée par l'automate, a été confirmée par un test de synergie (ou technique de double diffusion sur gélose) qui constitue le gold standard d'après le comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM). Le test de synergie repose sur l'inhibition partielle de la BLSE par les inhibiteurs des pénicillinases comme l'acide clavulanique. L'existence d'une synergie même faible entre β -lactamine (céfotaxime, ceftazidime, céfépime et aztréonam) et acide clavulanique est caractérisée par une image en « bouchon de champagne » et signe la présence d'une BLSE (Figure 22).

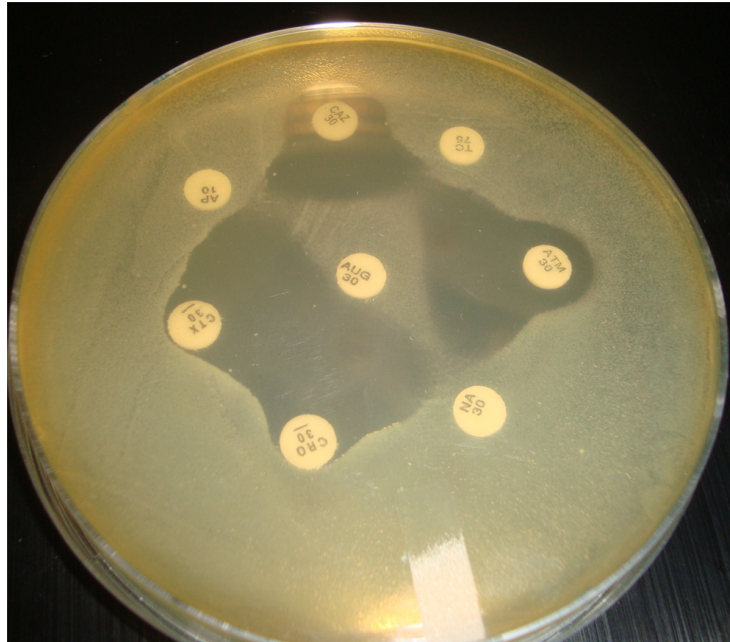


Figure 22. Test de synergie positif (aspect en « bouchon de champagne »).

Résultats

Répartition des entérobactéries uropathogènes isolées selon les espèces bactériennes:

Sur une période de trois ans, s'étalant du 1^{er} Janvier 2010 au 31 Décembre 2012, 9861 prélèvements urinaires ont été analysés au laboratoire de bactériologie de notre hôpital. Sur l'ensemble de ses échantillons urinaires analysés, 1472 souches appartenant à la famille des entérobactéries ont été isolées dont 924 souches d'*E. coli* (soit 63 %) et 321 souches de *K. pneumoniae* (soit 22 %). La figure 23 présente la fréquence d'isolement des entérobactéries selon les espèces bactériennes.

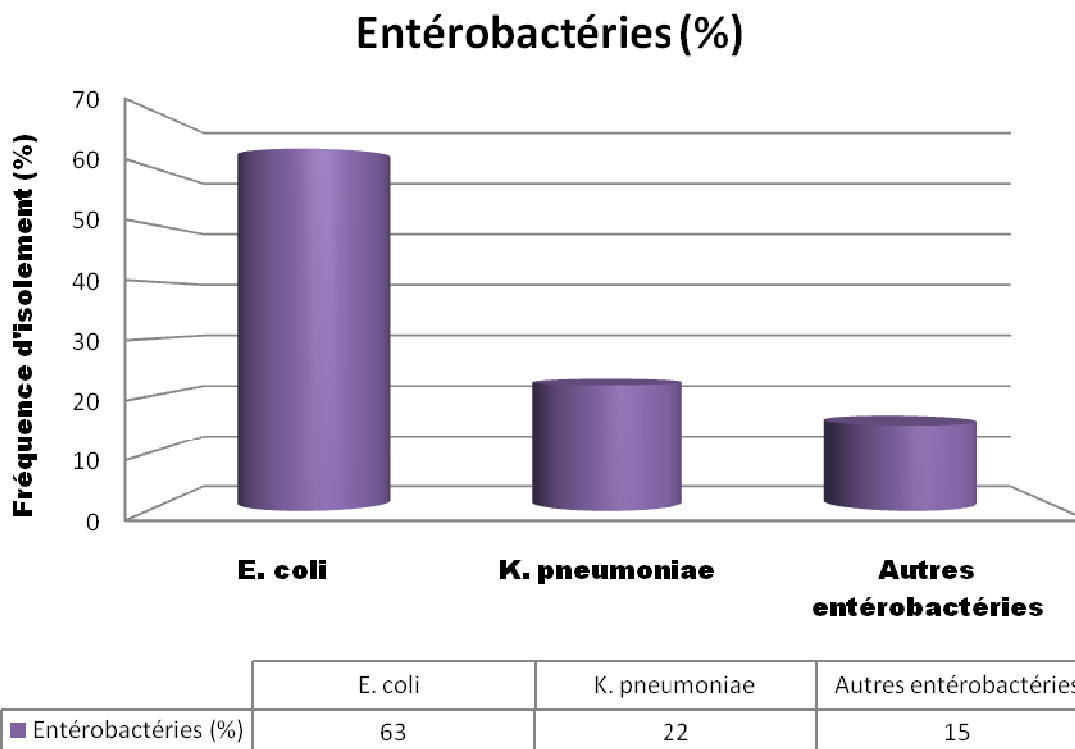


Figure 23: Répartition des entérobactéries uropathogènes selon les espèces bactériennes entre 2010 et 2012.

De l'ensemble de ces entérobactéries isolées, *E. coli* et *K. pneumoniae* ont représenté la plus grande majorité avec 85%. De ce fait, l'étude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries a porté sur les deux espèces prédominantes : *E. coli* et *K. pneumoniae*.

Répartition des Entérobactéries productrices de BLSE isolées selon la nature des prélèvements pathologiques:

Il s'agit du type de prélèvement ayant mis en évidence la présence d'une E-BLSE pour la première fois. Durant la période de l'étude, 171 E-BLSE ont été isolées à partir des différents prélèvements pathologique dont 160 (94 %) à partir de prélèvements urinaires et 11 (6%) à partir des autres prélèvements pathologiques (Tableau 10). La figure 24 montre la distribution des E-BLSE selon les prélèvements pathologiques.

Prélèvements pathologiques	Nombre d'E-BLSE isolées	Pourcentage
Urines	160	94 %
Pus	5	2,1 %
Autres prélèvements pathologiques	6	3,9 %
Total	171	100 %

Tableau 10: Répartition des souches d'Entérobactéries productrices de BLSE selon la nature des prélèvements pathologiques.

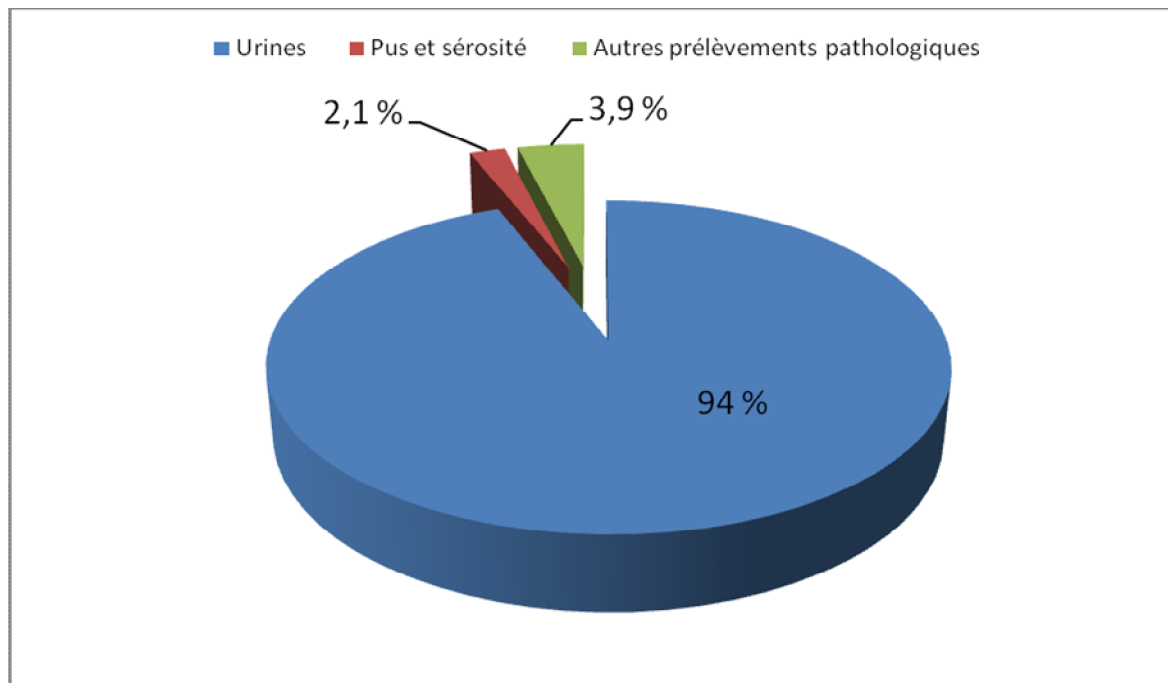


Figure 24: Répartition des E-BLSE selon la nature des prélèvements pathologiques.

Afin d'atteindre les objectifs de notre étude et en raison du profil épidémiologique des E-BLSE isolées principalement de prélèvements urinaires, nous avons choisi d'étudier le profil épidémio-moléculaire des entérobactéries uropathogènes productrices de BLSE.

La fréquence d'isolement des entérobactéries uropathogènes productrices de BLSE isolées:

Durant la période de l'étude 1472 entérobactéries uropathogènes ont été isolées dont 160 entérobactéries productrices de BLSE, soit une fréquence d'isolement des entérobactéries productrices de BLSE qui est de 11% (Figure 25).

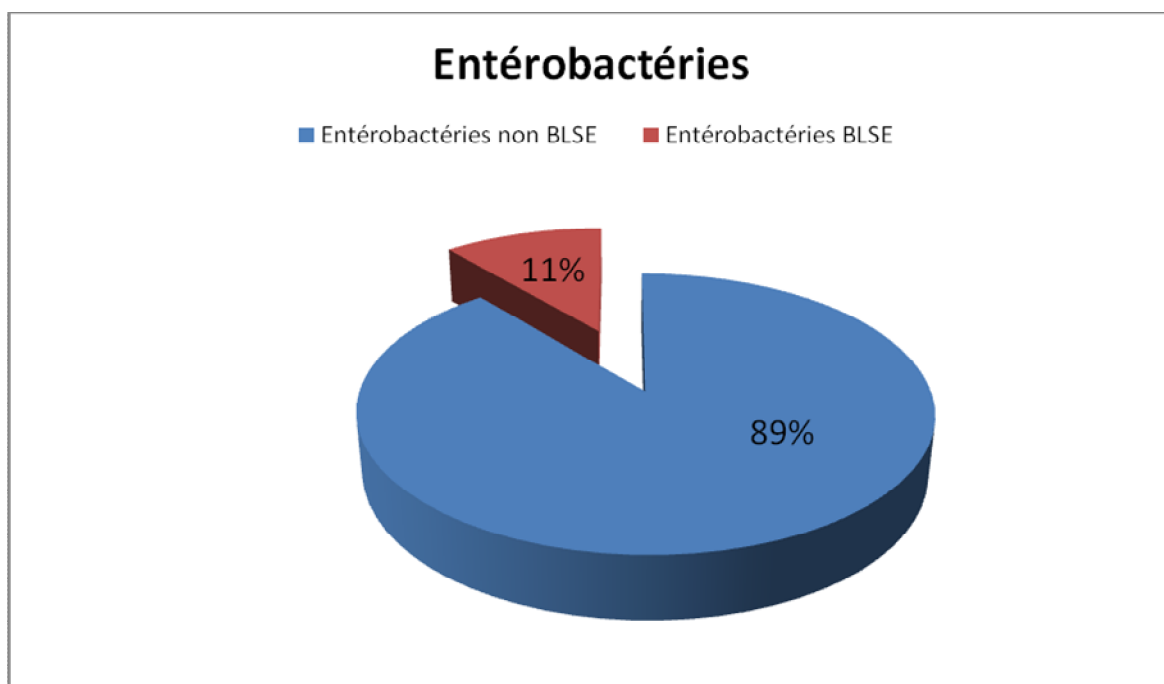


Figure 25: Fréquence d'isolement des entérobactéries productrices de BLSE au sein des entérobactéries isolées sur une période de 3 ans (2010-2012).

Les fréquences d'isolement des entérobactéries BLSE uropathogènes isolées selon l'origine du prélèvement urinaire:

Les souches d'E-BLSE uropathogènes provenaient dans 83% des cas de patients hospitalisés (Figure 26). Ces résultats montrent que les E-BLSE sont plus fréquemment isolées à l'hôpital qu'en communauté.

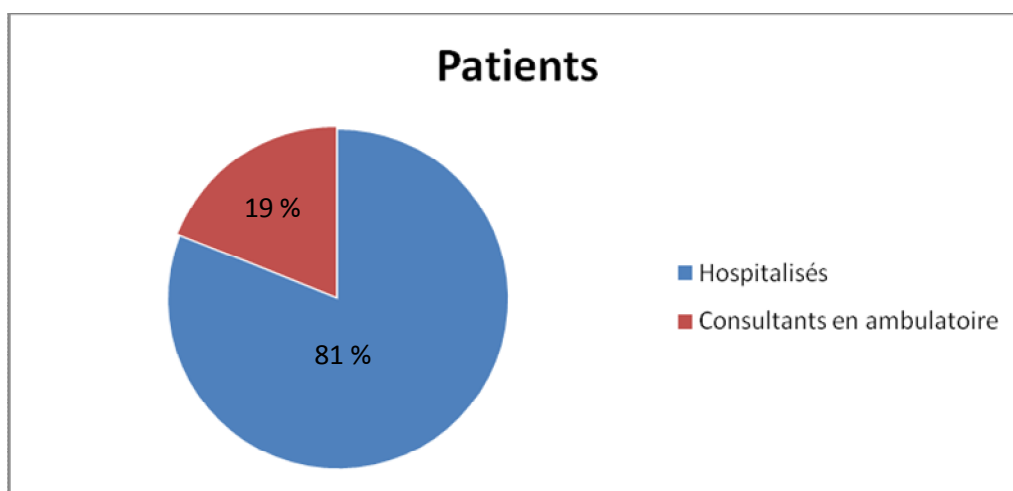


Figure 26: Répartition des E-BLSE selon l'origine du prélèvement urinaire.

Répartition des entérobactéries BLSE uropathogènes isolées dans le milieu hospitalier selon les services hospitaliers:

Les souches d'E-BLSE uropathogènes diagnostiquées ont été retrouvées chez des patients hospitalisés dans différents services d'hospitalisation, notamment l'urologie (51 %), la chirurgie viscérale (25 %) et la traumatologie (14 %) (Figure 27).

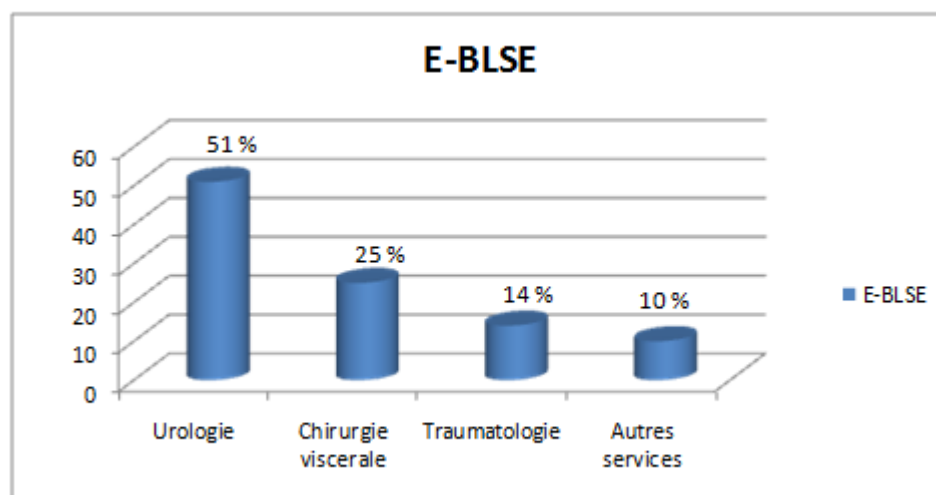


Figure 27: Répartition des Entérobactéries BLSE uropathogènes isolées dans le milieu hospitalier selon les services hospitaliers.

Répartition des entérobactéries BLSE uropathogènes isolées selon les espèces bactériennes:

i. Par rapport aux Entérobactéries uropathogènes:

Sur une durée de 3 ans, 1472 Entérobactéries uropathogènes ont été isolées. Les germes d'entérobactéries producteurs de BLSE étaient représentés principalement par les souches de *K. pneumoniae* (5,7 %) et celles d'*Escherichia coli* (4,5 %). La proportion des autres E-BLSE a cependant été inférieure à 1% durant la période de l'étude (Figure 28).

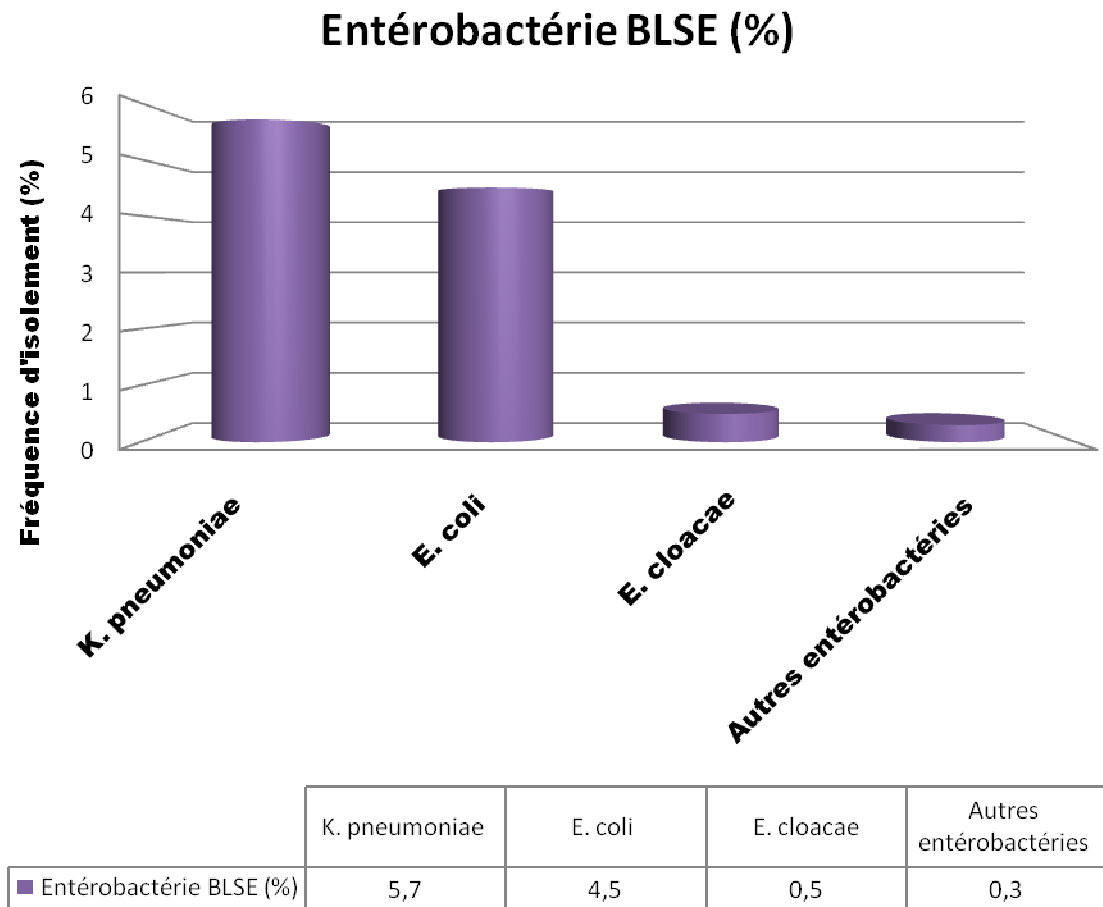


Figure 28: Répartition des E-BLSE selon les espèces bactériennes par rapport aux entérobactéries uropathogènes isolées.

ii. Par rapport aux Entérobactéries productrices de BLSE:

Sur un total de 160 E-BLSE, les souches de *K. pneumoniae* dominent dans 51% des cas, suivi de celles d'*E. coli* dans 42% des cas, d'*E. cloacae* dans 4% puis des autres entérobactéries dans 3% des cas (Figure 30).

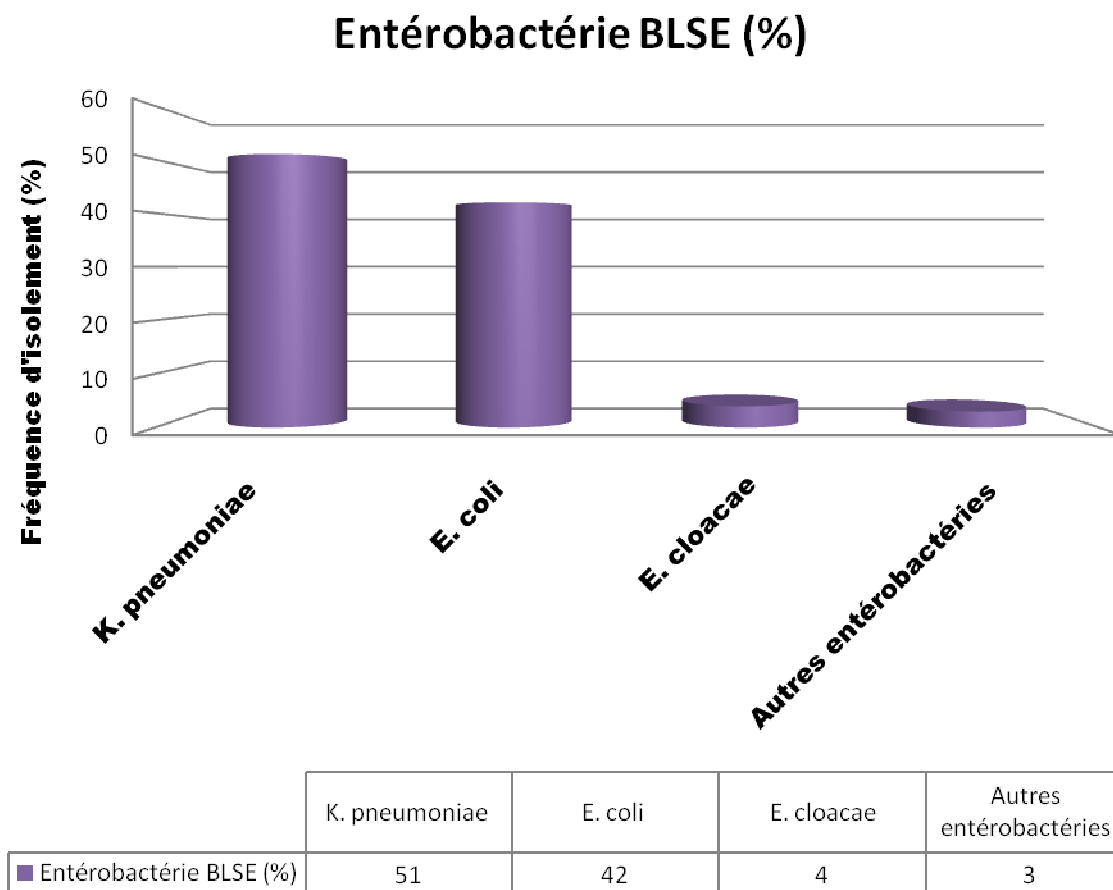


Figure 29: Répartition des E-BLSE selon les espèces bactériennes par rapport aux entérobactéries uropathogènes productrices de BLSE isolées.

Evolution des entérobactéries BLSE uropathogènes isolées selon les espèces bactériennes et les années:

i. Par rapport aux entérobactéries uropathogènes isolées:

La figure 30 présente l'évolution des E-BLSE selon l'espèce bactérienne pour chaque année. En trois ans, la prévalence des E-BLSE dans les prélèvements urinaires est passée de 9 % en 2010 à 13% en 2012.

Parmi les souches d'entérobactéries uropathogènes isolées, 160 souches ont été positives au test de double synergie avec des prévalences de 9% en 2010, 11% en 2011 et 13% en 2012. Les germes producteurs de BLSE étaient représentés principalement par les souches de *K. pneumoniae* (5% en 2010 et 6% en 2012) et celle d'*Escherichia coli* (3% en 2010 et 6% en 2012). La proportion des autres E-BLSE est restée cependant stable avec représentant environ 1% de l'ensemble des entérobactéries uropathogènes isolées.

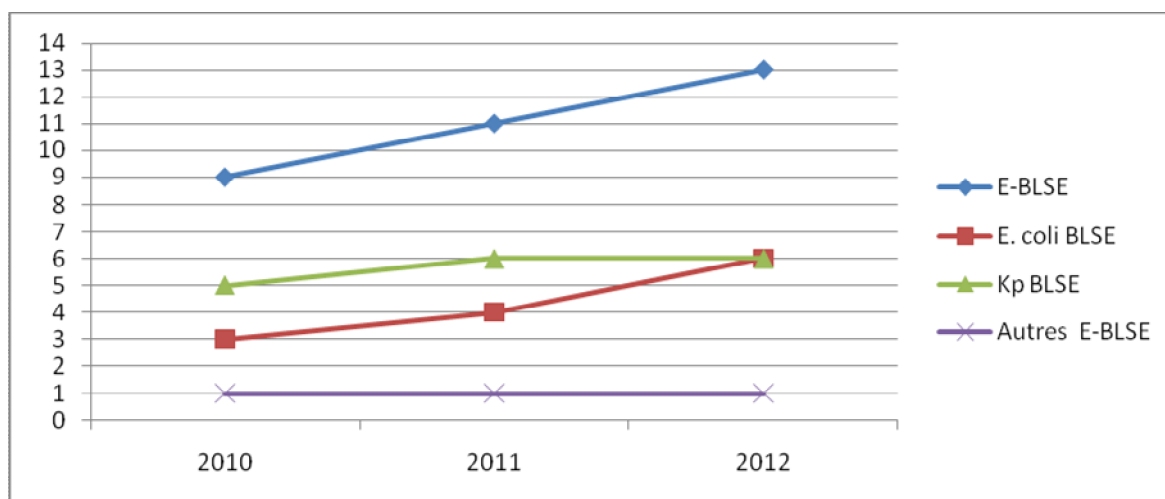


Figure 30: Evolution des E-BLSE au cours des 3 années de l'étude par rapport aux entérobactéries uropathogènes isolées.

ii. Par rapport aux E-BLSE uropathogènes isolées:

Ces souches présentant un phénotype BLSE ont été observées avec une forte fréquence d'isolement chez *K. pneumoniae* 51% (82/160) et chez *E. coli* 42% (67/160) (Figure 31).

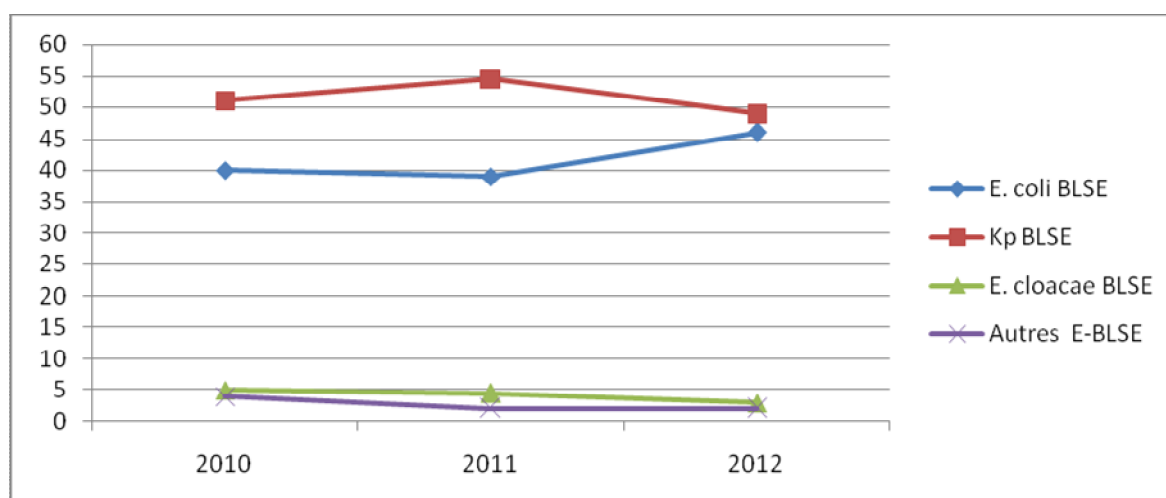


Figure 31: Evolution des E-BLSE au cours des 3 années de l'étude par rapport aux E-BLSE uropathogènes isolées.

Résistance globale aux antibiotiques des E-BLSE uropathogènes isolées:

L'étude de l'antibiorésistance chez les E-BLSE isolées a mis en évidence les taux de co-résistances suivants: 83% pour la ciprofloxacine, 83% pour l'association sulfaméthoxazole-triméthoprime (SXT), 80 % pour la gentamicine, 54 % pour l'amikacine, 4 % pour l'ertapénème et 4 % pour l'imipénème (Figure 32).

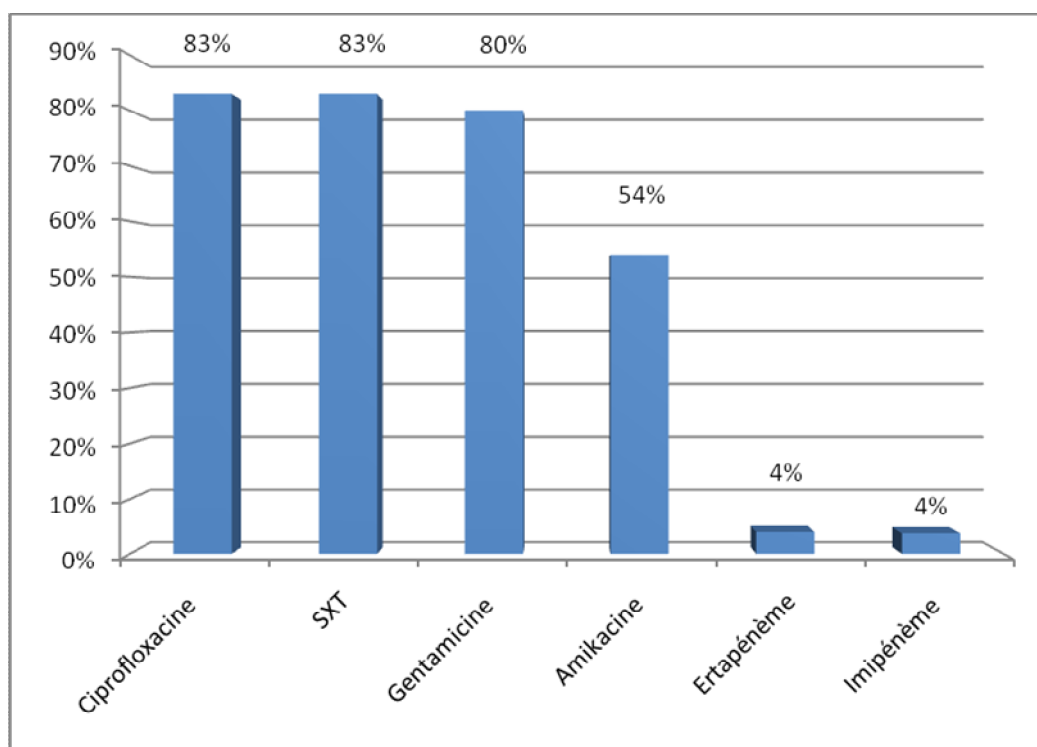


Figure 32: Corésistance des E-BLSE uropathogènes isolées aux différents antibiotiques testés entre 2010 et 2012.

ARTICLE 2:

*Profil actuel de résistance aux antibiotiques des
souches d'Escherichia coli uropathogènes et
conséquences thérapeutiques*

Introduction et objectifs de l'étude

Les infections urinaires (IU) sont un motif très fréquent de consultation et de prescription médicale en pratique courante. L'usage excessif et/ou inapproprié des antibiotiques dans le traitement des infections urinaires est à l'origine de l'émergence et de la dissémination des bactéries uropathogènes multirésistantes. Les infections urinaires à *Escherichia coli* (*E. coli*) constituent une priorité en matière de surveillance et d'étude de résistance aux antibiotiques étant donné leur fréquence d'isolement élevée et leur gravité. L'objectif de ce travail est d'évaluer la fréquence d'isolement et la sensibilité aux antibiotiques des souches d'*E. coli* uropathogènes isolées au laboratoire de microbiologie de l'hôpital Avicenne de Marrakech. Ceci permet de proposer de nouvelles mesures adaptatives pour une meilleure optimisation du traitement empirique des infections urinaires à *E. coli* dans notre région.

Méthodologie de l'étude

Nous avons mené une étude rétrospective sur une durée de trois années (du 1er janvier 2010 au 31 décembre 2012). Elle a concerné l'ensemble des souches non redondantes d'*E. coli* uropathogènes isolées au laboratoire de microbiologie de l'hôpital Avicenne de Marrakech, Maroc. Les échantillons urinaires proviennent de patients hospitalisés et de patients en ambulatoire.

Résultats

Au cours de cette étude, 1472 entérobactéries uropathogènes ont été isolées dont 924 souches non répétitives d'*E. coli*, soit une fréquence d'isolement globale de 63 %. Les souches d'*E. coli* uropathogènes ont été isolées essentiellement (86 %) chez des patients consultants en ambulatoire (dispensaires, consultations externes et urgences).

Résistance globale aux antibiotiques des souches d'*E. coli* uropathogènes non productrices de BLSE:

La répartition des souches d'*E. coli* uropathogènes selon leur provenance montre que 14 % des souches ont été isolées des différents services de l'hôpital, contre 86 % isolées de prélèvements urinaires provenant de patients consultants en ambulatoire.

L'étude de l'antibiorésistance des souches d'*E. coli* non productrices de BLSE (n= 857) isolées a mis en évidence des taux moyens de résistance à l'amoxicilline (65 %), au sulfaméthoxazole-triméthopime (55 %), à l'association amoxicilline-acide clavulanique

(43 %), à la ciprofloxacine (22 %), à la gentamicine (14 %), aux nitrofuranes (11%), à l'Amikacine (8 %), à la fosfomycine (7%), à l'ertapénème (0 %) et à l'imipénème (0 %) (Figure 33).

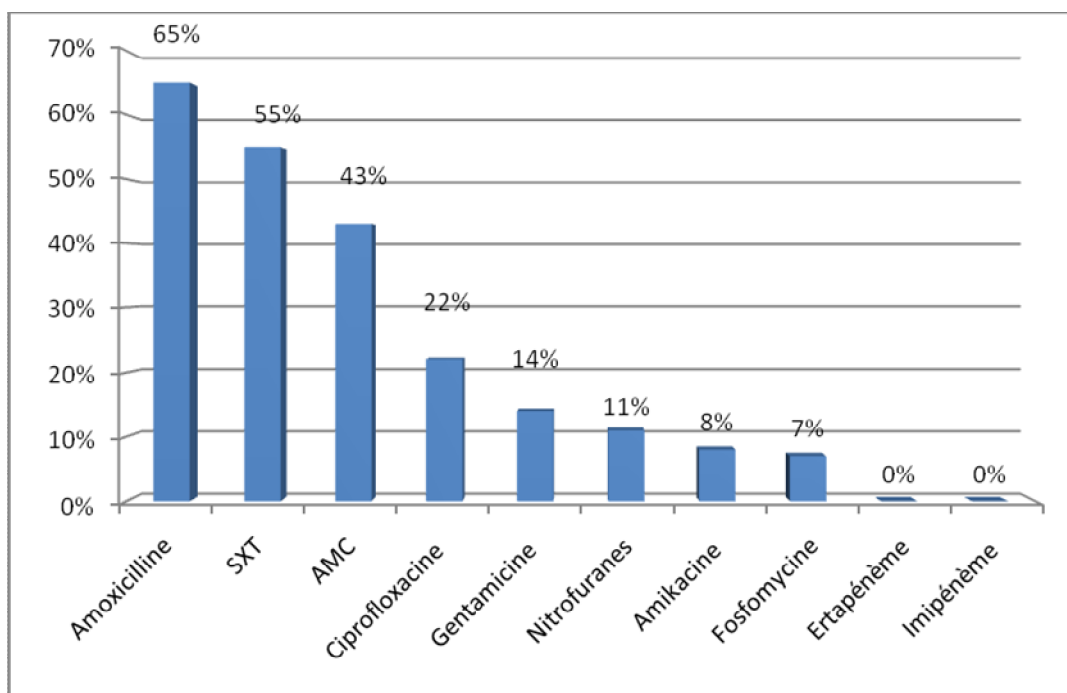


Figure 33: Taux moyens de résistance des souches d'*E. coli* non productrices de BLSE aux différents antibiotiques testés entre 2010 et 2012.

La fréquence d'isolement des *E. coli* uropathogènes productrices de BLSE isolées par rapport aux souches d'*E. coli* uropathogènes isolées:

Durant la période de l'étude 924 souches d'*E. coli* ont été isolées dont 67 souches étaient productrices de BLSE, soit une fréquence d'isolement moyenne de 7,25 % (Figure 34).

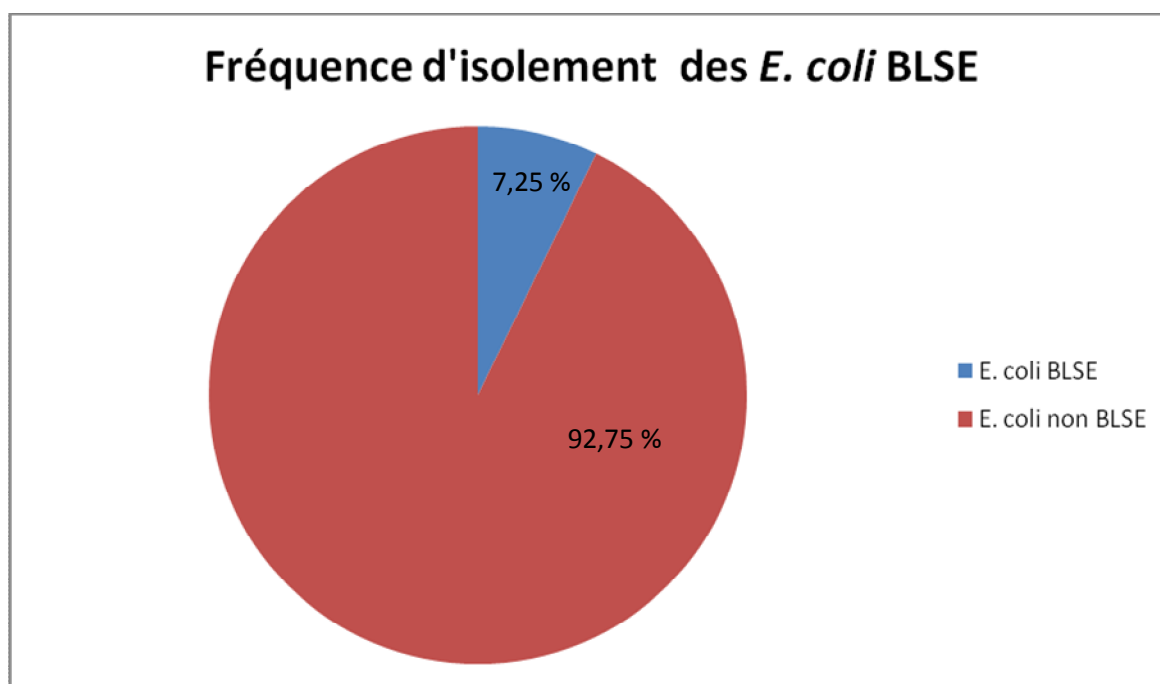


Figure 34: Fréquence d'isolement des *E. coli* productrices de BLSE entre 2010 et 2012 par rapport aux souches d'*E. coli* isolées.

Evolution des *E. coli* uropathogènes productrices de BLSE isolées par rapport aux entérobactéries uropathogènes isolées:

Les fréquences d'isolement des souches d'*E. coli* productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) est passé de 3% en 2010 à 6% en 2012, soit une fréquence moyenne de 4,5% (67/1472) de l'ensembles des souches d'entérobactéries uropathogènes (Tableau 11).

Année	2010	2011	2012
Fréquence d'isolement (X%)	3	4	6

Tableau 11: Evolution des *E. coli*-BLSE selon les années par rapport aux entérobactéries uropathogènes isolées.

Résistance globale aux antibiotiques des *E. coli* uropathogènes productrices de BLSE isolées:

Les co-résistances associées aux antibiotiques dans le cas des *E. coli* productrices de BLSE étaient de 82% pour la ciprofloxacine, 76% pour le sulfaméthoxazole-triméthoprime, 66% pour la gentamycine, 56% pour l'Amikacine et 0% pour l'ertapénème et l'imipénème (Figure 35).

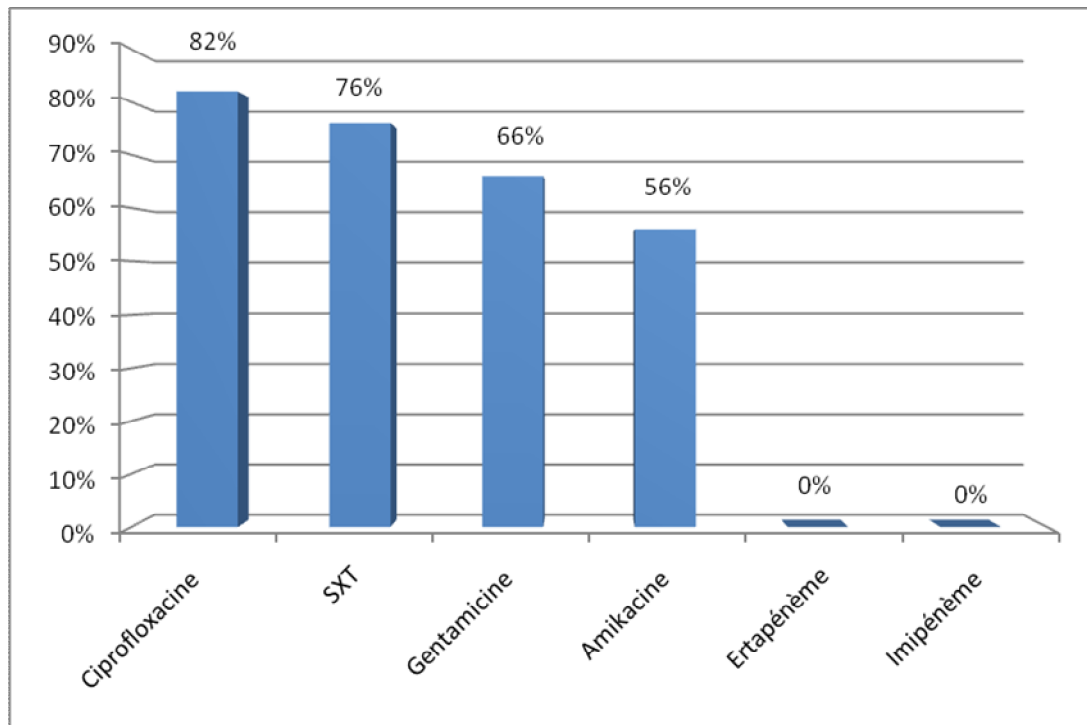


Figure 35: Corésistance des souches d'*E. coli* productrices de BLSE aux différents antibiotiques testés entre 2010 et 2012.

ARTICLE 3:

*Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* uropathogènes et l'émergence de souches résistantes aux carbapénèmes: Une étude rétrospective menée au sein d'un hôpital universitaire au Maroc, Afrique du Nord*

Introduction et objectifs de l'étude

Les infections urinaires (IUs) dues aux souches de *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) sont en augmentation dans le monde entier et représentent aujourd'hui un problème majeur de santé publique.

Le but de cette étude était de déterminer la sensibilité actuelle et locale aux antibiotiques des *K. pneumoniae* uropathogènes isolée de patients hospitalisés et de patients consultants en ambulatoire dans un hôpital universitaire à Marrakech.

Méthodologie de l'étude

Nous avons mené une étude sur une durée de trois années (du 1^{er} janvier 2010 au 31 décembre 2012). Elle a concerné l'ensemble des souches non redondantes de *Klebsiella pneumoniae* uropathogènes isolées au laboratoire de microbiologie de l'hôpital Avicenne de Marrakech, Maroc.

Résultats

Répartition des entérobactéries uropathogènes isolées selon les espèces bactériennes:

Durant la période de l'étude, s'étalant du 1^{er} Janvier 2010 au 31 Décembre 2012, 1472 souches bactériennes appartenant à la famille des entérobactéries ont été isolées dont 924 souches d'*E. coli* (soit 63 %) et 321 souches de *K. pneumoniae* (soit 22 %). La figure 36 présente la fréquence d'isolement des entérobactéries uropathogènes selon les espèces bactériennes.

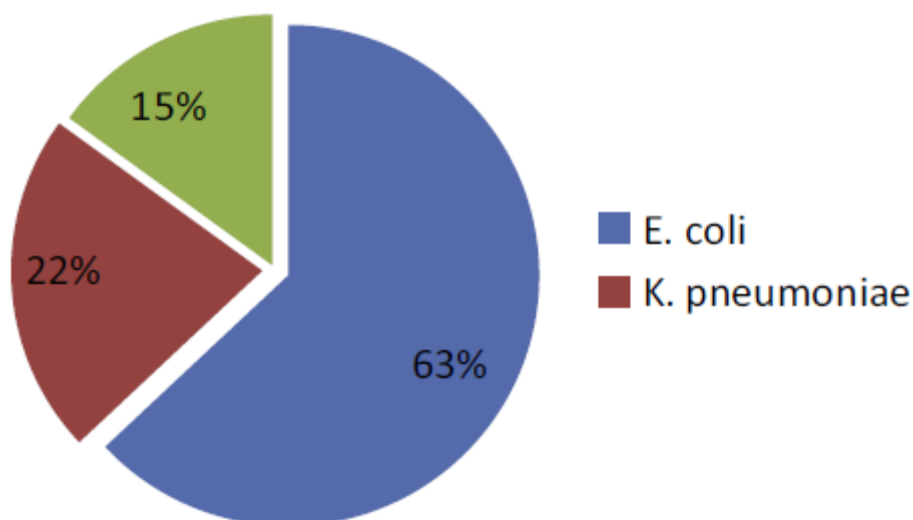


Figure 36 : Distribution des entérobactéries responsables d'infections urinaires.

Résistance globale aux antibiotiques des souches de *K. pneumoniae* uropathogènes non productrices de BLSE:

Au cours de la période de l'étude, l'analyse de la répartition des souches de *K. pneumoniae* uropathogènes selon leur provenance montre que 82% des souches ont été isolées dans le milieu communautaire avec un sex-ratio de 1,2.

La figure 37 représente la résistance aux antibiotiques des souches de *K. pneumoniae* non productrices de BLSE (n= 239) isolées entre 2010 et 2012. Ces souches ont été résistantes à l'amoxicilline (100%), à la ticarcilline (100%), au sulfaméthoxazole-triméthopime (61 %), à l'association amoxicilline-acide clavulanique (51 %), à la ciprofloxacine (32 %), à la gentamicine (21 %), aux nitrofuranes (13%), à l'amikacine (11 %), à la fosfomycine (8%), à l'ertapénème (0 %) et à l'imipénème (0 %).

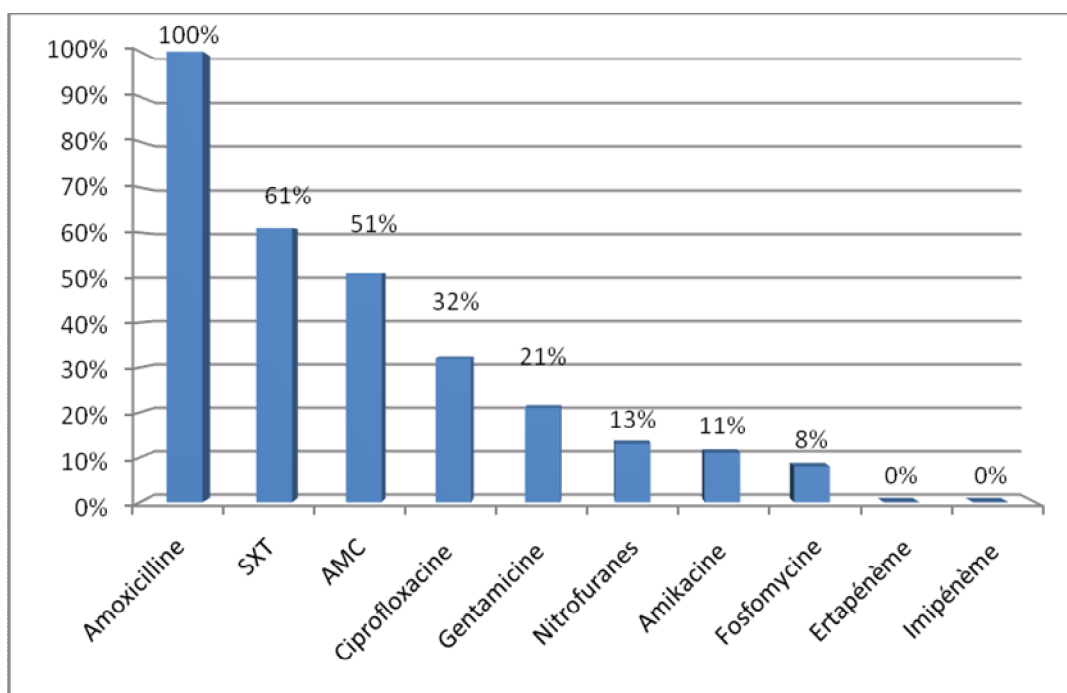


Figure 37: Taux moyens de résistance des souches de *K. pneumoniae* non productrices de BLSE isolées aux différents antibiotiques testés entre 2010 et 2012.

Fréquence d'isolement des *K. pneumoniae* productrices de BLSE uropathogènes isolées par rapport aux souches de *K. pneumoniae* uropathogènes isolées:

Durant la période de l'étude 321 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées dont 82 souches étaient productrices de BLSE, soit une fréquence d'isolement moyenne de 25,5 % (Figure 38).

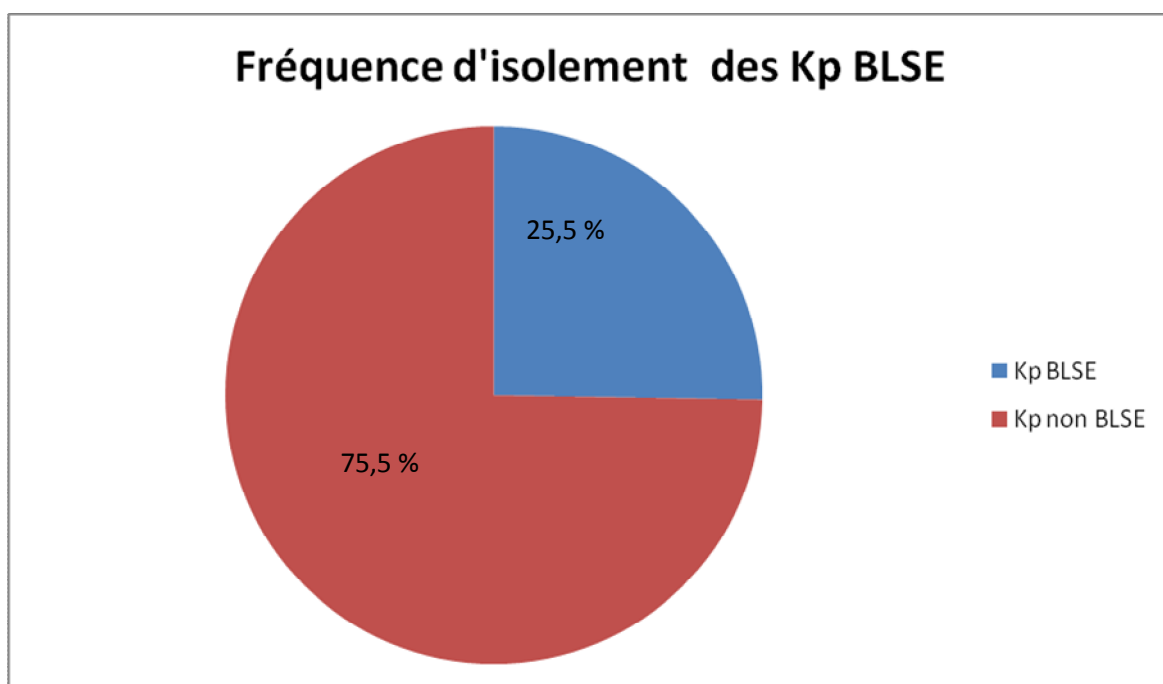


Figure 38: Fréquence d'isolement des *K. pneumoniae* uropathogènes productrices de BLSE entre 2010 et 2012 par rapport aux souches de *K. pneumoniae* uropathogènes isolées.

Evolution des *K. pneumoniae* uropathogènes productrices de BLSE isolées par rapport aux Entérobactéries uropathogènes isolées:

Les fréquences d'isolement annuelles des souches de *k. pneumoniae* productrices de BLSE par rapport aux E-BLSE uropathogènes isolées ont été étudiées pour les années 2010, 2011 et 2012 (tableau 12). Durant cette période de l'étude, le nombre de souches de *K. pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de troisième génération par la production de BLSE était 82, soit une fréquence moyenne de 25,5 % de l'ensemble des souches de *K. pneumoniae*.

Année	2010	2011	2012
Fréquence d'isolement (X %)	5	6	6

Tableau 12: Evolution des *K. pneumoniae* uropathogènes productrices de BLSE selon les années par rapport aux entérobactéries uropathogènes isolées.

Résistance globale aux antibiotiques des *K. pneumoniae* uropathogènes productrices de BLSE isolées:

L'étude de l'antibiorésistance chez les souches de *K. pneumoniae* uropathogènes productrices de BLSE isolées a mis en évidence les taux de co-résistances suivants: 89% pour l'association sulfaméthoxazole-triméthoprime (SXT), 89 % pour la gentamicine, 84% pour la ciprofloxacine, 50 % pour l'amikacine, 7 % pour l'értapénème et 7 % pour l'imipénème (Figure 39).

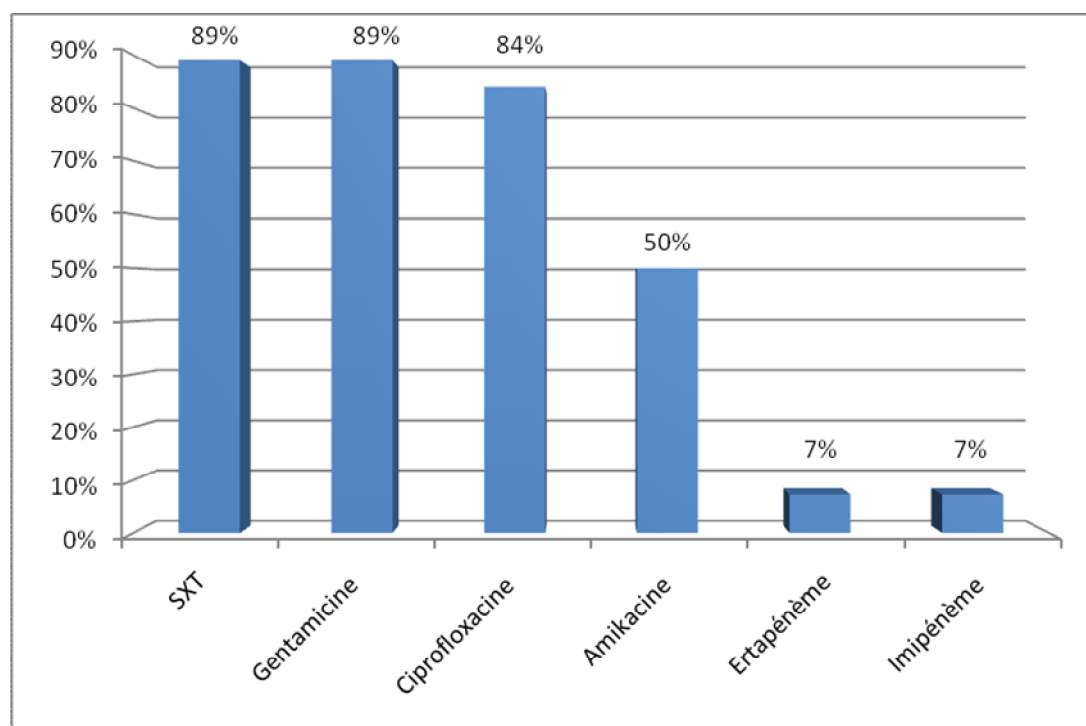


Figure 39: Corésistance des souches de *K. pneumoniae* BLSE aux différents antibiotiques testés entre 2010 et 2012.

ARTICLE 4:

Caractérisation moléculaire des souches d'Escherichia coli productrices de β -lactamase à spectre élargi dans un hôpital universitaire au Maroc, Afrique du Nord

Introduction et objectifs de l'étude

Les β -Lactamines sont parmi les antibiotiques les plus prescrits en médecine humaine. Toutefois, en raison de leur utilisation massive et souvent inappropriée, la résistance des souches d'*E. coli* uropathogènes à ces médicaments a nettement augmenté, notamment en raison de la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Les objectifs de cette étude étaient de déterminer la fréquence d'isolement des souches d'*E. coli* uropathogènes, évaluer leur niveau actuel de sensibilité aux antibiotiques et à chercher les gènes blaSHV, blaTEM et blaCTX-M codant pour la résistance à plusieurs β -Lactamines.

Méthodologie de l'étude

Nous avons mené une étude rétrospective sur une durée de trois années (du 1er janvier 2010 au 31 décembre 2012). Elle a concerné l'ensemble des souches non redondantes d'*E. coli* uropathogènes isolées au laboratoire de microbiologie de l'hôpital Avicenne de Marrakech, Maroc.

Vingt cinq pourcent (17/67) des souches d'*E. coli* productrices de BLSE, isolées au laboratoire de microbiologie de l'hôpital militaire et universitaire Avicenne au niveau de la région de Marrakech, ont été choisies aléatoirement pour faire l'objet d'une étude approfondie en biologie moléculaire au laboratoire de bactériologie au CHU Ibn Rochd. Le tableau 6 rapporte les caractéristiques des 17 souches d'*E. coli* productrices de BLSE utilisées pour l'étude moléculaire.

Seuls les trois types de BLSE, communément produits par les entérobactéries et identifiées en pratique médicale, étaient recherchés: CTX-M, SHV et TEM. Les amorces consistent généralement en séquences relativement courtes qui sont différentes les unes des autres et complémentaires des sites de reconnaissance au niveau de l'ADN cible à amplifier. Le Tableau 7 précise les séquences nucléotidiques des amorces CTX-M, TEM et SHV utilisées pour cette étude.

Tableau 6: Profil de résistance aux antibiotiques des 17 souches d'*E. coli* utilisées pour la détermination des gènes codants pour les enzymes BLSE.

N° de la souche d' <i>E. coli</i>	TDS	Phénotype de résistance aux antibiotiques usuels														
		Amoxicilline	AMC	céphalotine	Ticarcilline	Céfoxitine	Céfotaxime	Céftazidime	Céfépime	Imipénème	Fosfomicyne	Gentamicine	Tobramycine	Amikacine	SXT	Ciprofloxacine
<i>E. coli 1</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R
<i>E. coli 2</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R
<i>E. coli 3</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
<i>E. coli 4</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R
<i>E. coli 5</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R
<i>E. coli 6</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R
<i>E. coli 8</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
<i>E. coli 9</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
<i>E. coli 10</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
<i>E. coli 11</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
<i>E. coli 12</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R
<i>E. coli 13</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>E. coli 14</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R
<i>E. coli 15</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
<i>E. coli 16</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
<i>E. coli 17</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
<i>E. coli 18</i>	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R

(+): Test de double synergie positif.

(-): Test de double synergie négatif.

(S): Souche sensible.

(R): Souche résistante.

(TDS): Test de double synergie.

Tableau 7: Séquences nucléotidiques des différentes amorces utilisées pour cette étude.

Gène	Amorces (5' à 3')
CTX-M groupe 1	CTX-M (sens): GGTTAAAAAATCACTGCGTC
	CTX-M (Anti-sens): TTGGTGACGATTTTAGCCGC
SHV	SHV (sens): CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC
	SHV (Anti-sens): CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC
TEM	TEM (sens): ATAAAATTCTTGAAGACGAAA
	TEM (Anti-sens): GACAGTTACCAATGCTTAATCA

Résultats

Caractérisation des gènes codant pour les BLSE chez les souches d'*E. coli* productrices de BLSE:

Le typage moléculaire des gènes codants pour les BLSE n'a été pratiqué que sur les souches bactériennes d'*Escherichia coli*, les autres souches étant beaucoup moins responsables des infections urinaires au niveau de la région de Marrakech. Pour le screening des gènes codants pour les BLSE chez les souches d'*E. coli* uropathogènes étudiées, on a utilisé la PCR pour les gènes blaCTX-M groupe 1 (Figure 40), blaTEM (Figure 41) et blaSHV (Figure 42).

Depuis leur découverte, le nombre d'isolats cliniques produisant les CTX-M n'a cessé d'augmenter aussi bien dans le milieu communautaire que le milieu hospitalier. Ce type de BLSE se reconnaît facilement sur l'antibiogramme en gélose car le CTX est habituellement la molécule la plus touchée avec une très bonne inhibition autour du disque contenant un inhibiteur de β -lactamases tel que l'acide clavulanique. Les amorces utilisées ont permis d'amplifier toutes les souches ayant ce profil. Les BLSE de type TEM et de type SHV sont surveillées en continu depuis plusieurs années sur différents CHU du monde entier. En effet, depuis les deux dernières décennies, ils ont été régulièrement isolés des urines de patients présentant des infections urinaires. Cependant, leur nombre décroît depuis de nombreuses années et sont de plus en plus remplacés par les BLSE de type CTX-M.

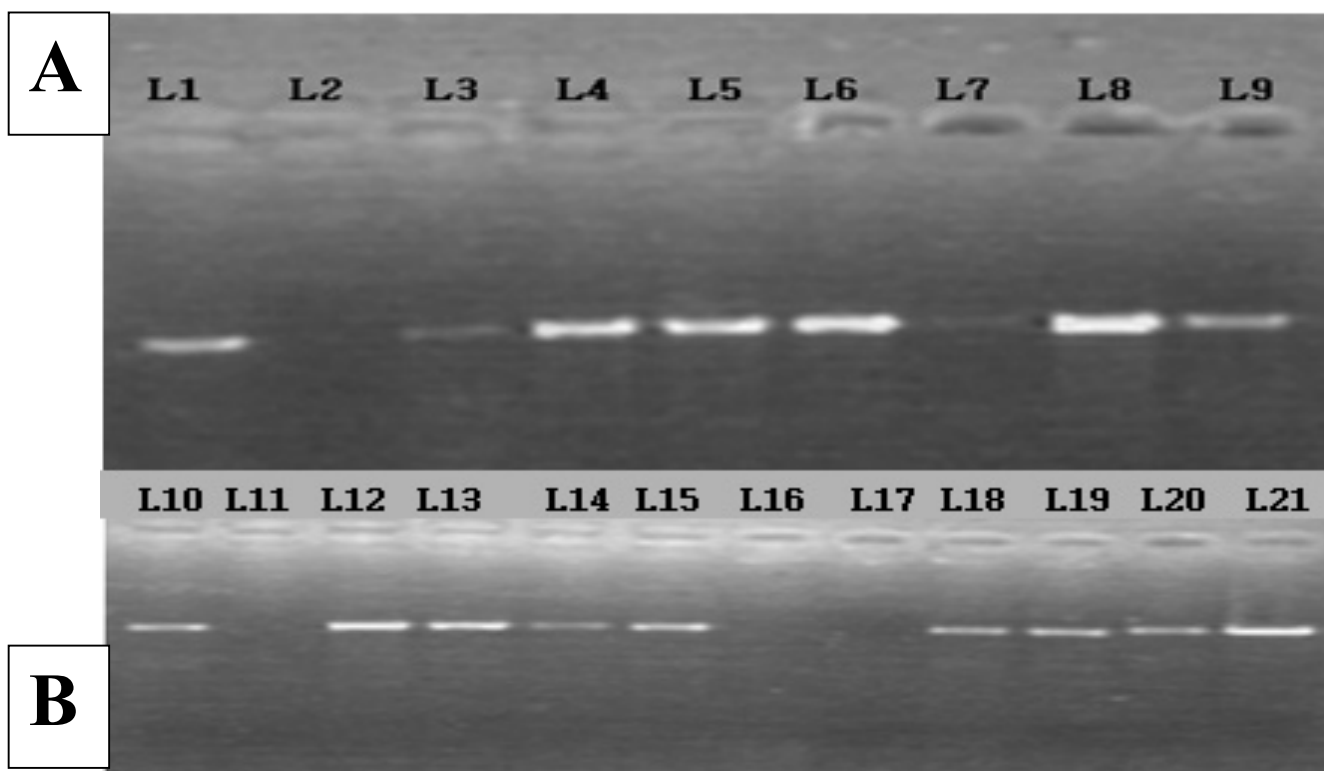


Figure 40: Typage par PCR simplex CTX-M1 de 17 souches épidémiques *E. coli* (E).

(A) L(Ligne)1: CTX-M1 témoin positif; L2: CTX-M1 témoin négatif; L3: E1; L4: E2; L5: E3; L6: E4; L7: E5; L8: E6; L9: E8.

(B) L10: CTX M1 témoin positif, L11: CTX-M1 témoin négatif; L12: E9; L13: E10; L14: E11; L15: E12; L16: E13; L17: E14; L18: E15; L19: E16; L20: E17; L21: E18.

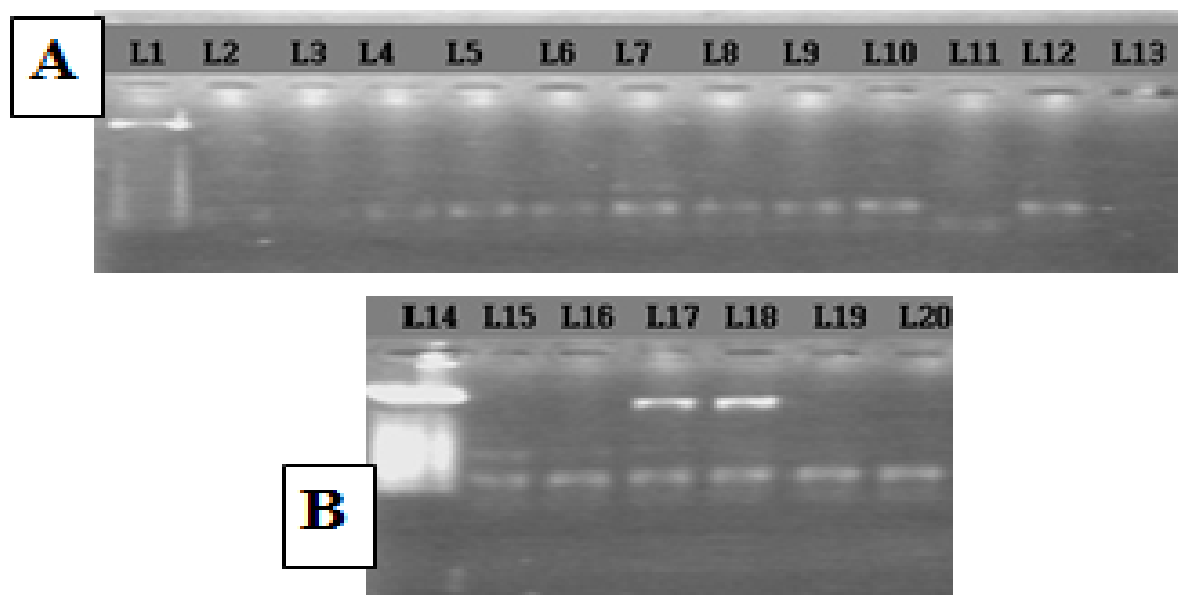


Figure 41: Typage par PCR simplex SHV de 17 souches épidémiques d'*E. coli* (E).

(A) L(Ligne)1: SHV témoin positif; L2: SHV témoin négatif; L3: E12; L4: E1; L5: E2; L6: E3; L7: E4; L8: E5; L9: E6; L10: E8; L11: E9; L12: E10; L13: E11.

(B) L14: SHV témoin positif; L15: E13; L16: E14; L17: E15; L18: E16; L19: E17; L20: E18.

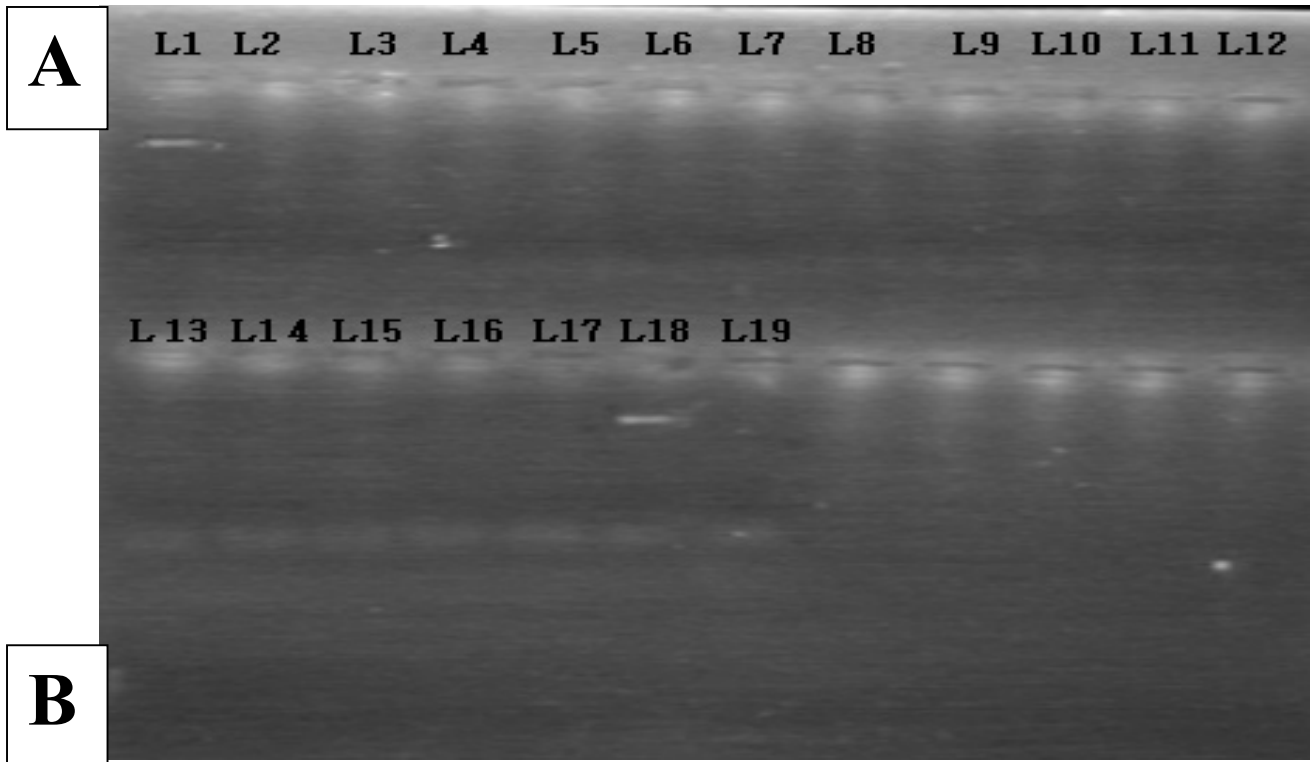


Figure 42: Typage par PCR simplex TEM de 17 souches épidémiques d'*E. coli* (E).

- (A) L (Ligne)1: TEM témoin positif; L2: TEM témoin négatif; L3: E1; L4: E2; L5: E3; L6: E4; L7: E5; L8: E6; L9: E8; L10: E9; L11: E10; L12: E11.
(B) L13: E12; L14: E13; L15: E14; L16: E15; L17: E16; L18: E17; L19: E18.

Après analyse par PCR des gènes codants pour les BLSE, il apparaît pour les 17 souches d'*E. coli* productrices de BLSE que parmi les souches d'*E. coli* BLSE producteurs, certaines souches produisaient plus d'un type de BLSE. Les modes de production de BLSE observés comprenaient la production unique de CTX-M (70%), SHV (12%), TEM (0%) et dans certains cas la production de deux types de BLSE: CTX-M1 + TEM (6%) et CTX M + SHV (12%). Les gènes codants pour des BLSE retrouvés dans notre série sont donc caractérisés par une prédominance des CTX-M et une majorité des CTX-M du groupe 1. La distribution des gènes produisant des BLSE est détaillée dans la figure 43.

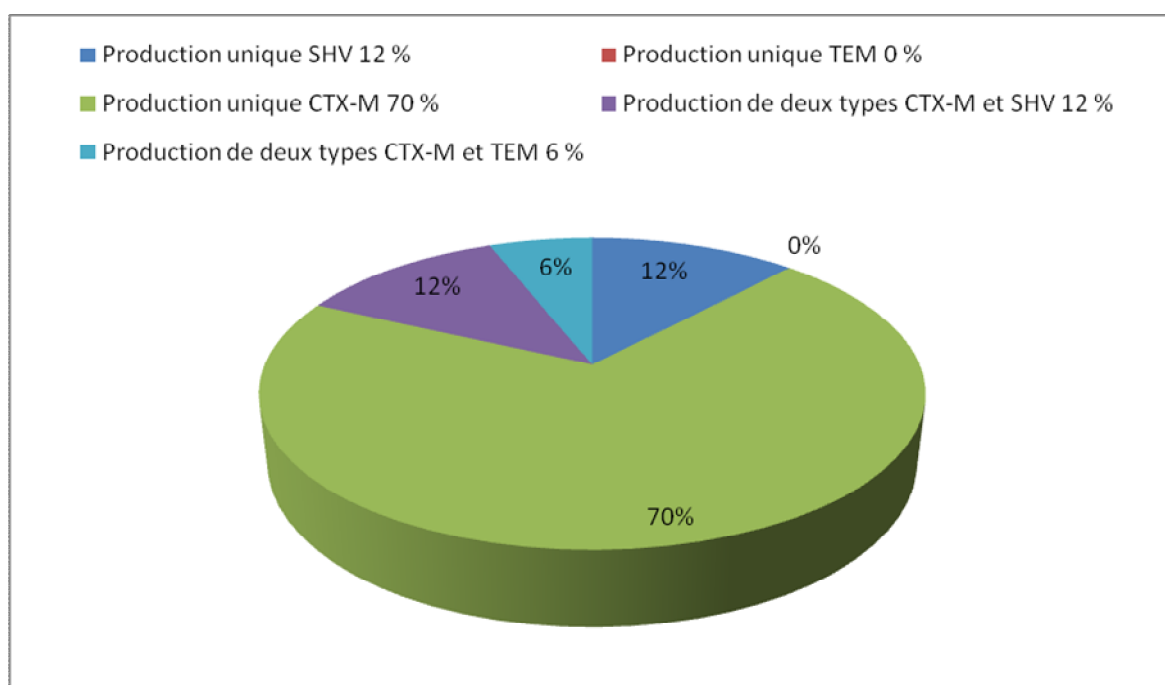


Figure 43: Distribution des gènes codants pour les enzymes BLSE produites par les souches d'*E. coli* productrices de BLSE.



***DISCUSSION
GENERALE***

Durant ces deux dernières décennies, de nombreuses études relatent la progression continue à l'échelle mondiale des E-BLSE et incriminent plus particulièrement les BLSE de type CTX-M alors que ceux de la famille des TEM ou des SHV semblent diminuer [109, 110, 111, 112]. Au Maroc, les données épidémiologiques sont parcellaires et la plupart des travaux retrouvés dans la littérature ont été effectués au niveau des villes de Casablanca et Rabat [113, 114]. Dans ce cadre, cette étude tend à décrire les niveaux actuels de résistance des E-BLSE uropathogènes aux antibiotiques au niveau de la région de Marrakech, pour une meilleure gestion du risque lié aux E-BLSE au sein de notre région.

L'infection urinaire (IU) est une pathologie fréquente et constitue ainsi un motif très fréquent de consultation et de prescription médicale en pratique courante [115, 116]. Ces infections sont le plus souvent bénignes mais elles peuvent être graves en cas d'atteinte parenchymateuse (pyélonéphrites et prostatites). *E. coli* et *K. pneumoniae*, bactéries commensales du tube digestif, sont rapportées comme étant les germes les plus souvent impliqués dans ce type d'infection. Durant les trois dernières décennies, l'usage intensif et souvent abusif des antibiotiques à large spectre tels que les fluoroquinolones et des céphalosporines de troisième génération (C3G) dans le traitement des infections urinaires a été rapidement suivi par l'apparition de souches uropathogènes multirésistantes. Ces bactéries ont développé différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dont l'efflux, la modification de la cible de l'antibiotique et la production de β -lactamases [29].

Le profil épidémiologique des bactéries uropathogènes varie d'une région à l'autre. De ce fait, la connaissance du profil épidémiologique local des bactéries pathogènes ainsi que son évolution s'impose afin de vérifier la validité des protocoles thérapeutiques de première intention et de proposer d'éventuelles mesures thérapeutiques adaptées à chaque région. Dans ce but, nous avons étudié la diversité des entérobactéries isolées des prélèvements urinaires des patients hospitalisés et des patients consultants en ambulatoire à l'hôpital militaire et universitaire Avicenne de Marrakech. Comme prévu, les résultats de notre étude ont montré que les deux espèces bactériennes *E. coli* et *k. pneumoniae* ont été à elles seules responsables de 85% des infections urinaires à entérobactéries. Ceci pourrait être clairement justifié par la physiopathologie ascendante de l'IU ainsi que la forte colonisation du périnée par les entérobactéries d'origine digestive, en particulier *E. coli* et *k. pneumoniae* [117, 118].

Les infections à *E. coli* uropathogènes constituent une priorité en matière de surveillance et d'étude de résistance aux antibiotiques étant donné leur fréquence d'isolement et résistance élevées aux antibiotiques usuels. Les résultats de notre étude ont mis en évidence une forte implication (63 %) des souches d'*E. coli* dans les IU à entérobactéries. Ceci est clairement justifié par la domination d'*E. coli* du profil épidémiologique bactérien des IU aussi bien en milieu hospitalier qu'en ville et qui atteint, selon certains auteurs, 90 % pour les IU communautaires [119, 120].

L'étude de l'antibiorésistance des souches d'*E. coli* uropathogènes isolées au niveau de notre hôpital a mis en évidence un taux de résistance aux amino-pénicillines (amoxicilline et ampicilline) de 65%. A l'échelle nationale, des taux similaires de résistance à l'amoxicilline de 70,1% et 61,2% ont été rapportés à Casablanca (Maroc) [121] et El jadida (Maroc) [122], respectivement. Des taux de résistance à l'amoxicilline encore plus élevés, allant jusqu'à 75%, ont été rapportés par plusieurs études [123, 124]. Ces taux élevés de résistance des souches d'*E. coli* uropathogènes à l'amoxicilline justifient que les aminopénicillines ne soient plus actuellement recommandées en traitement probabiliste des IU [125].

L'acquisition de la résistance à l'association amoxicilline-acide clavulanique est un phénomène mondial rapporté à des taux très variables [121, 126]. Dans notre étude, la résistance à l'amoxicilline-clavulanate a été de 43% contre un taux de résistance de 13,7% au niveau de la ville d'El jadida [122]. Au niveau de la ville de Rabat, la résistance à l'association amoxicilline-acide clavulanique a été de 60% chez les patients hospitalisés et de 50% chez les patients consultants [127].

Les fluoroquinolones occupent une place privilégiée parmi les molécules prescrites dans le traitement des infections du tractus urinaire [128, 129]. Le taux de résistance d'*E. coli* à la ciprofloxacine a été de 22% dans notre hôpital, 20% à El jadida [122], 18,3% à Casablanca [121] et 27% à Rabat [127]. La situation épidémiologique mondiale de la résistance des souches d'*E. coli* aux fluoroquinolones reste variable avec des taux de résistance de 10% aux Etats unis [130] et 40% en Chine [131].

Les taux élevés de résistance d'*E. coli* uropathogènes au Triméthoprime-sulfaméthoxazole rapportés dans notre étude (55%) et dans d'autres études à l'échelle nationale (33,7% à El jadida [122] et 40% à Casablanca [121]) confirment l'élimination de cet antibiotique dans le traitement de première intention de l'IU non compliquée.

K. pneumoniae occupe, aussi bien qu'*E. coli*, une place importante en nombre d'études réalisées en épidémiologie bactérienne [132,133]. La fréquence d'isolement des

souches de *K. pneumoniae* uropathogènes dans notre étude (22%) a été proche des taux rapportés en Ethiopie (19–21%) et au Cameroun (18,5%) [134, 135]. Elle a été de 25% en Espagne et de 14% en France [91]. Au Maroc, cette fréquence d'isolement des souches de *K. pneumoniae* uropathogènes ont été de 10% dans la région de Meknès [136] et de 28% dans la région de Rabat [137].

Les souches de *K. pneumoniae* sont naturellement résistantes aux aminopénicillines et à la ticarcilline en raison de l'expression constitutive des β -lactamases chromosomiques de la classe « A » d'Amblar [138]. Au niveau de la région de Marrakech, le taux résistance à l'AMC enregistré a été similaire au taux de résistance (50%) rapporté au niveau de la région de Rabat [137] et en Algérie [139] et deux fois supérieure à celui rapporté en Tunisie (23,7 %) [140].

La large utilisation du Triméthoprime-sulfaméthoxazole pour le traitement des infections urinaires communautaires a conduit chez les souches de *K. pneumoniae* à des niveaux de résistance élevés à cet antibiotique. Cette étude a montré que le taux de résistance des souches de *K. pneumoniae* uropathogènes aux Triméthoprime-sulfaméthoxazole (61%) a été similaire à celui rapporté dans une étude algérienne (63,2%) [139]. Ce taux élevé de résistance aux Triméthoprime-sulfaméthoxazole confirme que cet antibiotique n'est plus utilisé dans le traitement de première intention des infections urinaires non-complicquée.

Les souches de *K. pneumoniae* sont naturellement sensibles aux fluoroquinolones. Le taux de résistance à la ciprofloxacine enregistrée dans notre étude (32%) a été similaire à celui enregistré dans la région de Rabat [137]. Cette résistance acquise aux fluoroquinolones est le résultat de la combinaison de plusieurs mécanismes dont la diminution de la perméabilité membranaire, une augmentation de l'efflux et la résistance par mutation des topoisomérases qui représentent le site d'action des quinolones [141].

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes bactériennes qui inactivent la plupart des β -lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes. Elles sont aujourd'hui de plus en plus impliquées dans les infections urinaires tant communautaires que nosocomiales et constituent donc un réel problème de santé publique [142]. De ce fait, la connaissance du profil épidémiologique local des E-BLSE ainsi que leur niveau de résistance actuel aux antibiotiques est nécessaire pour adapter le protocole d'antibiothérapie des infections urinaires aux données épidémiologiques locales.

De nombreuses études relatent la progression continue à l'échelle mondiale de la fréquence d'isolement des bactéries productrices de BLSE de type CTX-M alors que les

BLSE les plus anciennes de la famille des TEM et SHV semblent diminuer [109]. Nos résultats ont mis en évidence une évolution inquiétante de la fréquence d'isolement des E-BLSE uropathogènes au niveau de la région de Marrakech. En effet, la fréquence d'isolement des E-BLSE est passée de 7 % en 2008 à 13 % en 2012 [143]. Des fréquences d'isolement des E-BLSE similaires (dépassant 10 %) ont été enregistrées en Grèce, Turquie, Italie et Portugal [144,145]. D'après Lahlou et al., cette prévalence était de 9% entre 2006 et 2008 à l'hôpital Moulay Ismail de Meknès, Maroc [136].

D'après les résultats de notre étude, 90% des E-BLSE détectées pendant l'étude étaient des souches de *Klebsiella pneumoniae* et d'*Escherichia coli*. Cela concorde avec les résultats de plusieurs études qui ont montré que ces deux espèces étaient les plus fréquemment responsables de la production des BLSE chez les entérobactéries [146, 144].

En 2010, la fréquence d'isolement de *K. pneumoniae* productrices de BLSE était nettement supérieure à celle d'*E. coli* productrices de BLSE. L'importante augmentation en trois ans des souches d'*E. coli* productrices de BLSE a rendu les fréquences d'isolement de ces deux espèces proches en 2012. Cette augmentation rapide de la fréquence d'isolement des souches d'*E. coli* productrices de BLSE, enregistrée également dans de nombreuses études européennes, montre que l'espèce *E. coli* a remplacé progressivement l'espèce *K. pneumoniae* et occupe désormais une place importante parmi les espèces productrices de BLSE [144, 146]. L'évolution du profil épidémiologique des E-BLSE isolées au niveau de la région de Marrakech est similaire à celui décrit au niveau de l'hôpital militaire Moulay-Ismaïl de Meknès [136].

Alors que les bactéries multirésistantes étaient essentiellement isolées dans le milieu hospitalier, la fréquence d'isolement des entérobactéries productrices de BLSE dans le milieu communautaire a considérablement augmenté à l'échelle mondiale ce qui laisse augurer un problème majeur de santé publique [69, 142]. Cette large diffusion des E-BLSE dans le milieu communautaire peut être expliquée par la diffusion en communauté de germes porteurs des gènes de résistance codant pour les BLSE, notamment des BLSE de type CTX-M [147] et en grande partie à l'importante utilisation en automédication des antibiotiques à large spectre.

Les gènes codants pour les BLSE, portés généralement sur des plasmides transférables de grande taille (85–275 Kb), sont souvent associés à des gènes codant pour la résistance à d'autres classes d'antibiotiques que les β -lactamines tels les aminosides, les cyclines, le triméthoprim-sulfaméthoxazole et les fluoroquinolones [55, 148, 149]. Par exemple, les CTX-M sont également souvent associées à des aminosides- acétylases de type AAC (3) et/ou

AAC (6'), conférant des tableaux de résistance variables pour la Gentamicine et l'Amikacine et rendent la Tobramycine et la Kanamycine très fréquemment inactives. De même, les CTX-M peuvent être associées à la production d'une oxacillinase de type OXA-1, rendant inactive l'association de type Amoxicilline-acide clavulanique [58]. Ceci rend les options thérapeutiques très limitées voire nulles et pose de sérieux problèmes aussi bien pour le clinicien que pour le microbiologiste.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches d'E-BLSE a montré des taux de co-résistances similaires à ceux rapportés en 2009 au niveau de l'hôpital Moulay-Ismaïl (Meknès, Maroc) [136]. Le taux élevé (82 %) de co-résistance des E-BLSE à la ciprofloxacine a confirmé la forte résistance des E-BLSE aux quinolones [141] et compromet son utilisation en pratique courante. Le pourcentage des E-BLSE résistantes à la gentamicine (74 %) était supérieur à celui à l'amikacine (53 %). La sensibilité des E-BLSE aux différents antibiotiques appartenant à la classe des aminosides varie en fonction du type de β -lactamases produites [150]. En France en 2008, globalement, les entérobactéries BLSE étaient souvent résistantes à la tobramycine (70 %), à la gentamicine (50 %), à l'amikacine (30 %) et à la ciprofloxacine (75 %) [84].

Ces niveaux inquiétants de co-résistance aux antibiotiques sont principalement la conséquence de la pression de sélection due à la prescription massive et l'usage souvent abusif des antibiotiques à large spectre [151]. Dans notre étude, la fosfomycine et les nitrofuranes ont été actives contre les E-BLSE à 87% et 85%, respectivement. Ces molécules, à forte recommandation dans le traitement des cystites aiguës non compliquées, conservent une bonne activité en raison de leur faible prescription.

L'implication des souches d'*E. coli* productrices de β -lactamases à spectre élargi dans les IU constitue un réel problème de santé publique [156]. Au niveau de la région de Marrakech, la production de BLSE par les souches d'*E. coli* uropathogènes est passée de 2 % en 2008 à 6% en 2012 de l'ensemble des entérobactéries uropathogènes isolées [143]. L'isolement de souches d'*E. coli* productrices de BLSE est aujourd'hui enregistrée dans de nombreuses régions du monde aussi bien en milieu communautaire qu'en milieu hospitalier [146, 143, 152].

Les taux de résistance aux antibiotiques chez les souches d'*E. coli* productrices de BLSE étaient supérieurs à ceux des souches d'*E. coli* non productrices de BLSE. Ceci peut être expliqué par le fait que les gènes des BLSE, portés généralement par des plasmides, sont souvent associés à des gènes de la co-résistance aux antibiotiques, notamment aux aminosides

et aux fluoroquinolones [148, 149]. Aucune résistance à l'imipénème n'a été mise en évidence pour les souches d'*E. coli* identifiées, soit une sensibilité à l'imipénème de 100%. Cependant, l'utilisation rationnelle de cette molécule est obligatoire afin d'éviter l'émergence de souches d'*E. coli* productrices de carbapénèmases.

Bien que la production de BLSE ai été rapportée chez différentes espèces au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*, *K. pneumoniae* est considérée parmi les espèces les plus fréquemment susceptibles de produire des BLSE. Dans notre étude, la fréquence d'isolement de *K. pneumoniae* productrices de BLSE a représenté 25,5 % de l'ensemble des *k. pneumoniae* isolées. Cette fréquence d'isolement a été de 20,2 % en Tunisie [140], 26% en France et 20,8 % en Espagne [153].

L'étude de l'antibiorésistance des souches de *K. pneumoniae* aux antibiotiques testés a révélé une grande disparité entre les taux de résistance aux antibiotiques des souches productrices de BLSE par rapport aux entérobactéries non productrices de BLSE. En effet, les souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE ont montré des taux de résistance élevés (84 à 89%) à la ciprofloxacine, la gentamicine et le SXT. La résistance à la ciprofloxacine (84%) des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE a été similaire au taux de résistance rapporté à Rabat 85% [137] et supérieure à celui rapporté en Tunisie 67,5% [140].

Les β -lactamases de la classe A d'Ambler, TEM, SHV et CTX-M, sont les plus souvent produites par les souches d'E-BLSE [154]. Au Maroc, l'isolement d'E-BLSE a été rapporté dans différentes institutions hospitalière [136, 143], et les gènes codants pour les BLSE sont de types bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{DHA} and bla_{OXA} [113].

L'importante résistance des E-BLSE à de nombreuses familles d'antibiotiques réduit considérablement les options thérapeutiques et entretient une hausse continue de la prescription des carbapénèmes, notamment de l'imipénème. En 2012, 10% des E-BLSE uropathogènes isolées dans notre laboratoire étaient résistantes à l'imipénème. L'ensemble de ces souches bactériennes résistantes à l'imipénème appartenait à l'espèce *Klebsiella pneumoniae*, soit 20 % de l'ensemble des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE isolées durant la même année. Selon une étude casablancaise, la résistance à l'imipénème pour les souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE dans le milieu communautaire au Maroc était de 14,7% [155]. A Rabat, deux isolats de *K. pneumoniae* productrices de carbapénèmases ont été isolés à partir du même patient, l'un comportant un plasmide portant le gène OXA-48 et l'autre le gène OXA-1 [114]. Aussi, Barguigua et al. ont montré les signes d'une émergence dans le milieu communautaire

marocain d'entérobactéries productrices de carbapénèmases exprimant les gènes bla_{OXA-48} and bla_{IMP-1} [113].

Sur la base d'études rétrospectives et prospectives, les carbapénèmes possèdent une très bonne activité contre les E-BLSE [156]. Cependant, Il est essentiel d'insister sur l'usage rationnel des carbapénèmes car il n'y a pas de nouveaux antibiotiques disponibles dans l'avenir proche pour le traitement des infections à E-BLSE. Aussi et de par son importance fondamentale dans la prise en charge des infections à E-BLSE, une vigilance particulière doit être accordée au suivi de la sensibilité des entérobactéries aux carbapénèmes. Toute évolution de sensibilité pouvant apparaître lors de prise en charge d'infections à E-BLSE par l'imipénème [157] et toute détection d'émergence ou toute introduction de clones d'entérobactéries résistants à cette molécule et circulant dans d'autres régions [156] doivent pouvoir être rapidement identifiées afin d'engager les mesures prophylactiques et thérapeutiques adéquates.

Les techniques modernes de biologie moléculaire servent non seulement l'identification précise des espèces bactériennes mais aussi à la compréhension des mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. Les entérobactéries produisant une BLSE sont toujours d'actualité dans les structures de soins même si les mesures de prévention de leur dissémination sont aujourd'hui bien codifiées.

La résistance aux céphalosporines de troisième génération par la production de BLSE était principalement due aux enzymes de type TEM et SHV. Aujourd'hui, la classe A des BLSE comportant les familles TEM, SHV et CTX-M est toujours la plus répandue [158]. Cependant la distribution des enzymes BLSE a évolué vers une prédominance des enzymes de type CTX-M, principalement chez l'espèce *E. coli* comme l'une des principales espèces porteuses de gènes codants pour les BLSE. C'est pour cette raison, il est apparu intéressant de détecter les gènes codants pour les enzymes BLSE chez les souches d'*E. coli* productrices de BLSE isolées au niveau de la région de Marrakech.

Des données limitées provenant d'études antérieures menées au Maroc montrent que les BLSE sont courantes dans les hôpitaux marocains [136, 143] et que les gènes bla_{CTX-M}, bla_{SHV} et bla_{TEM} représentent les familles des BLSE les plus fréquemment rapportées au Maroc [114, 159].

Dix sept souches d'*E. coli* productrices de BLSE ont été choisies arbitrairement afin de caractériser les gènes de résistance BLSE hébergés par ces souches d'*E. coli* productrices de BLSE responsables des infections urinaires au niveau de la région de Marrakech. Le mécanisme essentiel de résistance des souches d'*E. coli* aux β -lactamines est la production de BLSE de type CTX-M. Ces résultats correspondent aux données de la littérature qui rapportent que les BLSE de type CTX-M sont maintenant décrites dans de nombreux pays d'Europe [53] et d'Afrique [110]. En Europe, les souches d'*E. coli* productrices de CTX-M sont devenues majoritaires des entérobactéries BLSE. Les BLSE de type CTX-M les plus fréquentes sont CTX-M-15, devant CTX-M-1 et CTX-M-3 dans plusieurs pays d'Europe [53, 161]. En Amérique du Sud, surtout en Argentine, l'enzyme de type CTX-M-2 est la plus souvent décrite chez les entérobactéries et tout particulièrement chez *E. coli*. En Asie, les CTX-M ont émergé depuis 1995 et sont devenues prédominantes: CTX-M-9 et CTX-M-14 au Japon, CTX-M-14, CTX-M-13, CTX-M-9 et CTX-M-3 en Chine, CTX-M-14 en Corée et au Vietnam et CTX-M-15 et -3 en Inde [162, 163].

Les CTX-M sont des BLSE qui ont émergé au cours des années 90 et ont diffusé mondialement. On compte aujourd'hui plus de 90 CTX-M (www.lahey.org/studies) réparties en cinq familles. Elles tiennent leur nom de par leur hydrolyse préférentielle du céfotaxime par rapport à la céftazidime (« CTX ») et « M » pour leur lieu d'isolement (Munich). Ces enzymes sont codées par des gènes dérivant de gènes chromosomiques naturellement présents chez des bactéries du genre *Kluyvera* [56]. A ce jour, un grand nombre de variants CTX-M ont été identifiés et sont regroupés en 5 groupes (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25) sur la base de leur séquence en acides aminés. L'espèce *E. coli* est la plus souvent impliquée, suivie de *K. pneumoniae* et ceci dans le monde entier mais les types de CTX-M dominants diffèrent selon les pays [53].

La plupart des CTX-M confèrent un haut niveau de résistance à la céfotaxime et à la ceftriaxone. Certains variants de CTX-M ont une activité augmentée sur la ceftazidime: les CTX-M-32, -15, -16 et -27 dérivent respectivement des CTX-M-1, -3, -9 et -14 suite à une mutation Asp240Gly [60, 61]. Cette mutation augmente d'environ huit fois les CMI de la ceftazidime par rapport aux CTX-M « mères ».

D'un point de vue thérapeutique, les E-BLSE sont associées à une inefficacité fréquente de plusieurs familles d'antibiotiques. Les options thérapeutiques devant une infection documentée à E-BLSE se réduisent donc à l'utilisation d'un carbapénème qui sont considérés comme traitement de dernier recours et les infections à E-BLSE échappent donc aux schémas

thérapeutiques classiques des infections graves à entérobactéries, ou susceptibles de l'être, qui reposent sur les C3G, les fluoroquinolones et les aminosides. La bithérapie par l'adjonction d'un aminoside est compliquée par la résistance fréquente et souvent imprévisible à la gentamicine ou à l'amikacine, (voire aux deux). La sélection de souches de sensibilité diminuée voire résistantes aux carbapénèmes peut survenir *in vivo*, le plus souvent par diminution ou perte d'expression de porines [164, 165].

Parmi les molécules substitutives des carbapénèmes proposées pour le traitement des infections par E-BLSE, on peut citer les C3G, les C4G, les céphamycines, l'Association β -lactamine/inhibiteur de β -lactamases et la Tigécycline. Malgré le rôle important que peuvent jouer ces molécules dans le traitement des infections urinaires à E-BLSE, peu de données cliniques sont disponibles et donc l'activité de ces molécules reste sous-évaluée. Les nouvelles recommandations de l'EUCAST pour l'interprétation des antibiogrammes des isolats producteurs de BLSE ont déclaré les C3G et C4G pleinement actifs après la détermination de leurs concentrations minimales inhibitrices [93].

Il existe peu de données concernant l'activité des céphamycines dont la céfoxitine (Méfoxin®) qui est disponible en France et utilisée en prophylaxie chirurgicale. Son utilisation pourrait toutefois être limitée du fait de la sélection de mutants imperméables [166]. Lee et al. ont mis en évidence l'important rôle que peut occuper le flomoxef, une nouvelle céphamycine, dans le traitement des *K. pneumoniae* productrices de BLSE [107]. Une étude de Rodriguez-Bano et al. a rapporté que l'association pénicilline-inhibiteur de β -lactamases a été active dans le traitement des infections causées par des bactéries productrices de BLSE et pourrait être proposée pour le traitement en ambulatoire des infections urinaires à *E. coli* producteurs de BLSE [105]. La tigécycline présente une excellente activité *in vitro* sur les bactéries productrices de BLSE de par sa bonne diffusion tissulaire [98]. Cependant, l'absence de données cliniques pertinentes quant à son utilisation pour le traitement des infections urinaires à E-BLSE ne supporte pas son utilisation et par ailleurs ne dispose pas d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) [99]. La colimycine, dont les résistances acquises sont encore rares, constitue la dernière ligne d'antibiotiques actifs contre ces souches multirésistantes.

Les conséquences médicales (majoration de la mortalité) et économiques (durée de séjours plus longues, coûts de traitements élevés, ...) générées par les infections à E-BLSE ne sont pas négligeables et ont été largement évaluées [150]. Des études menées ont confirmé que les bactériémies à E-BLSE étaient associées à une grande mortalité [76]. Cependant, la

plupart des études ne concluait pas que les infections urinaires à E-BLSE étaient associées une mortalité [78]. D'un point de vue économique, les infections à E-BLSE s'accompagnent d'un coût de santé plus important suite au prolongement de la durée d'hospitalisation et au recours à des médicaments onéreux pour le traitement de ce genre d'infections [79].

A decorative frame with a dark red border and a grey, textured corner piece in the bottom-left. The word "Conclusion" is centered within the frame in a bold, black, serif font with a blue shadow effect.


Conclusion

Les entérobactéries occupent une place importante en bactériologie médicale et le rôle du laboratoire reste prépondérant dans l'identification de ces germes et dans l'évaluation de leur niveau de résistance aux antibiotiques. Trois décennies après leur découverte, les E-BLSE étaient isolées principalement dans les unités de soins intensifs. Elles constituent, aujourd'hui, un problème majeur de santé publique et plus que jamais avec la diffusion massive des BLSE de type CTX-M aussi bien dans le milieu hospitalier que dans le milieu communautaire.

Notre étude a clairement démontré que les E-BLSE constituent, dans la région de Marrakech, un risque infectieux croissant et peuvent conduire dans de nombreux cas à des impasses thérapeutiques. Sur une durée de 3 ans, la fréquence d'isolement des E-BLSE uropathogènes est passée de 9% en 2010 à 13% en 2012. L'étude de l'antibiorésistance des E-BLSE isolées au niveau de notre laboratoire a mis en évidence des taux de co-résistance élevés pour la ciprofloxacine (83%), le sulfaméthoxazole-triméthoprim (83%), la gentamycine (80%) et l'amikacine (54%).

Le typage moléculaire des souches d'entérobactéries productrices de BLSE a permis d'établir les profils suivants: CTX-M (70%), SHV (12%), CTX-M + SHV (12%), CTX-M1 + TEM (6%) et TEM (0%).

Il est ainsi devenu impératif d'améliorer l'hygiène hospitalière (formation du personnel aux règles préventives, précocité de dépistage, connaissance de l'écologie locale, isolement technique et géographique des porteurs) pour éviter l'éclosion d'épidémies hospitalières suite à la dissémination de ces germes multirésistants.



*REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES*

- [1] Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557 – 584.
- [2] Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33 (Suppl.5): 1131—6.
- [3] Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11(6): 315–7.
- [4] Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-51.
- [5] Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18: 657-86
- [6] Arpin C, Dubois V, Coulange L, Andre C, Fischer I, Noury P, et al. Extended-spectrum betalactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47 (11): 3506–14.
- [7] Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum betalactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(4): 735–43.
- [8] Sarkis P, Nassar D, Rehban R, Kamel G, Nemer E, Ayoub N, et al. Résistance aux quinolones dans les infections urinaires: prévalence, évolution et alternatives thérapeutiques d’après une étude de 1468 souches bactériennes. *Prog Urol* 2008; 18 (11): 705.
- [9] Patterson JE. Antibiotic utilization: is there an effect on antimicrobial resistance. *Chest* 2001; 119: 426–30.
- [10] Masterton R, Drusano G, Paterson DL, Park G. Appropriate antimicrobial treatment in nosocomial infections-the clinical challenges. *J Hosp Infect* 2003; 55:1–12.
- [11] Denis F., Dabernath, MONTEIL H. Avril J. L. *Bactériologie clinique* Edition marketing, Paris, 1998; 144-145.
- [12] Edwards P.R., Ewing W.H. *Identification of the Enterobacteriaceae Ed Burgess, Minneapolis, 3rd ed, 1977*
- [13] Farmer. Biochemical identification of new species and biogroup of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens *J. clin. Microbiol* 1985, 21: 46-76
- [14] Farmer. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification In : *Manual of clinical Microbiology*, P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, Tenover F.C. and R.H. Tenover (eds) 7th ed. *American Society for Microbiology, Washington DC, 1999: 442-458.*

- [15] Niang O. Validation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires. *Thèse Pharm., Dakar 2003, n° 60*
- [16] Perriere G. Application d'une présentation par objet des connaissances de modélisation certains aspects de l'expression des gènes chez *E. coli* UCBL. *Thèse Université de Lyon I, France. (1992): 14, 77.*
- [17] Bossert I. D., Young L.Y. Anaerobic oxidation of paracresol by a denitrifying bacterium. *Applied and environmental Microbiology 1986, 52 (5) : 1117-1122.*
- [18] Le minor L., Veron N. Bactériologie Médicale *Flam Med. Science, Paris, 1989 : 318-333 ; 773-823.*
- [19] Ndoye R. Algorithme d'identification des Entérobactéries et des bacilles gram négatifs non fermentaires. *Thèse Pharm., 2004 ; n° 83.*
- [20] Ferron A. Bactériologie médicale *Editions C. et R. 1984;(3, 14, 15):3-2- 15-6.*
- [21] Pilet C., Bourdon J. L., Toma B., Marchal N., Balbastre C. Les entérobactéries Bactériologie médicale et vétérinaire : Systématique bactérienne. *Doins Paris 2é édition 1979 : 109-187.*
- [22] Carbonnelle B., Denis F., Marmonier E., Pinon G., Vargues R., Bactériologie médicale : Techniques usuelles. *SIMEP SA, Paris, 1987: 121-137, 146-155.*
- [23] Brenner D.J. Introduction to the family Enterobacteriaceae In: Starr M.P., Stolp H.G. *Eds the prokaryotes Spinger- Verlag K.L. Berlin, 1981: 1105 – 1127*
- [24] Janda J. M. and Abbott S. L. Historical perspectives on the family Enterobacteriaceae *Lippin Cott Raven Publishers, Philadelphia 1998, 1-7.*
- [25] Le minor L., Veron M. Bactériologie Médicale *Flam. Méd. Science, Paris, 1984 : 392 – 394*
- [26] Courvalin P, Bingen E, Leclecq R. L'antibiogramme. Paris: Siska; 2006.
- [27] Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J Antimicrob Chemother 1987; 20: 323-34.*
- [28] Arlet G, Philippon A. Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Rev Fr Lab 2003; 352: 41-55.*
- [29] Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1-4.*
- [30] Sanders CC, Sanders Jr. WE. Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin-inducible beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother 1979; 15: 729 -7.*

- [31] Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 2000; 406:775–81.
- [32] Zgurskaya HI. Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* 2002; 292:95–105.
- [33] Nikaido H. Crossing the envelope: how cephalosporins reach their targets. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6(suppl3): 22S–26S.
- [34] Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 1985; 49:1–32.
- [35] Jaffe A, Chabbert YA, Semonin O. Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of b-lactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 942–948.
- [36] Fontana R, Ligozzi M, Cornaglia G. Affinities of cephalosporins for penicillin-binding proteins and their antibacterial activities in the presence of human serum albumin. *Clin Microbiol Infect* 2000;6(suppl3):82S–83S.
- [37] Paulsen IT. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 446–51.
- [38] Markham PN, Neyfakh AA. Efflux-mediated drug resistance in Grampositive bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2001; 4: 509–14.
- [39] Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 12–26.
- [40] Borges-Walmsley MI, McKeegan KS, Walmsley AR. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem J* 2003; 376: 313–38.
- [41] Nikaido H. Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis* 1998; 27(suppl1): 32S-41S.
- [42] Bush K, Jacoby GA, Amicosante G, et al. Comment on: rede-fining extended-spectrum beta-lactamases: balancing scienceand clinical need. *J Antimicrob Chemother*2009; 64:212- 3.
- [43] Livermore DM. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:3-10.
- [44] Philippon A. Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE). *Immunol Biol Spec* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.immbio.2013.04.006>
- [45] Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(Suppl. 1): 42-52.
- [46] David M Livermore. “Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact,”*Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases*

Society of America 36, no. Suppl 1 (January 15, 2003): S11–23.

[47] Ambler RP. “The Structure of Beta-Lactamases,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 289, no. 1036 (May 16, 1980): 321–331.

[48] Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39 (6): 1211–33.

[49] Ruppé E. Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l’avènement des CTX-M. *Antibiotiques* 2010; 12: 3-16.

[50] Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352:380-91.

[51] Gniadkowski M. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 11-32.

[52] Dubouix A, Marty N. Détection des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu par biologie moléculaire : Avantages, limites. *Antibiotiques*, 2004; 6 : 193-201.

[53] Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 144-153.

[54] Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3045-9.

[55] Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9: 466-75.

[56] Poirel L, Kampfer P, Nordmann P. Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 4038 - 40.

[57] Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, et al. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2112 - 5.

[58] Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, et al. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3758-64.

- [59] Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz W, Nordmann P, Gniadkowski M. Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) in Poland. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 393-6.
- [60] Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, et al. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 29 -35.
- [61] Cartelle M, del Mar Tomas M, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G. High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme. CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2308-13.
- [62] Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 1031- 4.
- [63] Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 201: 237- 41.
- [64] Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10(4): 867–78.
- [65] Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(Suppl. 1): 90–103.
- [66] Wiegand I, Geiss HK, Mack D, et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1167—74.
- [67] Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1697 - 704.
- [68] Laupland KB, Church DL, Vidakovich J, Mucenski M, Pitout JDD. Community-onset extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: importance of international travel. *J Infect* 2008; 57(6): 441–8.
- [69] Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008; 8(3):159–66.
- [70] R. Ben-Ami et al. “A Multinational Survey of Risk Factors for Infection with Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Nonhospitalized Patients,” *Clinical Infectious Diseases* 49, no. 5 (2009): 682–690.
- [71] M Guillet et al. “[Epidemiology of Patients Harboring Extended-spectrum Betalactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBLE), on Admission],” *Médecine Et Maladies Infectieuses* 40, no. 11 (November 2010): 632–636.

[72] Poirel L. et al. “Global Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase 1,” *The Lancet Infectious Diseases* 10, no. 12 (December 2010): 832.

[73] Ruppé E. et al. “Carriage of CTX-M-15-producing *Escherichia Coli* Isolates Among Children Living in a Remote Village in Senegal,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, no. 7 (2009): 3135–3137.

[74] Woerther PL. et al. “Massive Increase, Spread, and Exchange of Extended Spectrum β -Lactamase–Encoding Genes Among Intestinal Enterobacteriaceae in Hospitalized Children With Severe Acute Malnutrition in Niger,” *Clinical Infectious Diseases* 53, no. 7 (October 1, 2011): 677–685.

[75] Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae bac-terae-mia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60 (5): 913–20.

[76] Qureshi ZA, Paterson DL, Pakstis DL, Adams-Haduch JM, Sandkovsky G, Sordillo E, et al. Risk factors and outcome of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* bloodstream infections. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37(1): 26–32.

[77] Agence française de sécurité sanitaire et des produits de santé. Dix ans d'évolution des consommations d'antibiotiques en France; 2009.

[78] Kola A, Maciejewski O, Sohr D, Ziesing S, Gastmeier P. Clinical impact of infections caused by ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. *Scand J Infect Dis* 2007; 39 (11–12): 975–82.

[79] Yang YS, Ku CH, Lin JC, Shang ST, Chiu CH, Yeh KM, et al. Impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* on the outcome of community-onset bacteremic urinary tract infections. *J Micro-biol Immunol Infect* 2010; 43 (3):194–9.

[80] Zahar JR, Mamzer MF, Kouatchet A. Contact isolation in the intensive care unit: why, when and adverse effects. *Reanimation* 2011; 21(Suppl. 2): 494–502.

[81] Stelfox HT, Bates DW, Redelmeier DA. Safety of patients isolated for infection control. *JAMA* 2003; 290(14):1899–905.

[82] Saint S, Higgins LA, Nallamotheu BK, Chenoweth C. Do physicians examine patients in contact isolation less frequently? A brief report. *Am J Infect Control* 2003; 31(6): 354–6.

[83] Kennedy P, Hamilton LR. Psychological impact of the management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients with spinal cord injury. *Spinal Cord* 1997; 35(9): 617–9.

[84] Haut conseil de la santé publique. Recommandations relatives aux mesures à mettre en oeuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination; 2010.

- [85] Harris AD, Kotetishvili M, Shurland S, Johnson JA, Morris JG, Nemoy LL. How important is patient-to-patient transmission in extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* acquisition. *Am J Infect Control* 2007; 35 (2): 97–101.
- [86] Overdeest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, et al. Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerging Infect Dis* 2011; 17(7): 1216–22.
- [87] Timofte D, Dandrieux J, Wattret A, Fick J, Williams NJ. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-positive *Escherichia coli* in bile isolates from two dogs with bacterial cholangiohepatitis. *J Clin Microbiol* 2011; 49(9): 3411–4.
- [88] Lo WU, Ho PL, Chow KH, Lai EL, Yeung F, Chiu SS. Fecal carriage of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms by children and their household contacts. *J Infect* 2009;60(4):286–92.
- [89] Luo Y, Cui S, Li J, Yang J, Lin L, Hu C, et al. Characterization of *Escherichia coli* isolates from healthy food handlers in hospital. *Microb Drug Resist* 2011; 17(3):443–8.
- [90] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1791–8.
- [91] European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. Antimicrobial resistance surveillance in Europe; 2009.
- [92] Agence française de sécurité sanitaire et des produits de santé. Émergence des bactéries multi-résistantes - Importance renforcée du bon usage des antibiotiques; 2011.
- [93] Lefort A. Modification des valeurs critiques: le point de vue du clinicien. 31e réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. 2011.
- [94] Bin C, Hui W, Renyuan Z, Yongzhong N, Xiuli X, Yingchun X, et al. Outcome of cephalosporin treatment of bacteremia due to CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56: 351–7.
- [95] Fournier D., Chirouze C., Leroy J. Chollet P., Talon D., Plésiat P., et al. Alternatives to carbapenems in ESBL-producing *Escherichia coli* infections *Médecine et maladies infectieuses* 2013; 43: 62–66.
- [96] Pitout JD, Gregson DB, Campbell L, Laupland KB. Molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia in the Calgary Health Region from 2000 to 2007: emergence of clone ST131 as a cause of community-acquired infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2846–51.
- [97] Puerto AS, Fernandez JG, del Castillo Jde D, Pino MJ, Angulo GP. In vitro activity of beta-lactam and non-beta-lactam antibiotics in extended spectrum beta-lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 135–9.

[98] Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 895–904.

[99] Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Dimopoulos G. Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of tigecycline. *Curr Drug Metab* 2009; 10: 13–21.

[100] Geerlings SE, van Donselaar-van der Pant KA, Keur I. Successful treatment with tigecycline of two patients with complicated urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:2048–9.

[101] Tarnberg M, Ostholm-Balkhed A, Monstein HJ, Hallgren A, Hanberger H, Nilsson LE. In vitro activity of beta-lactam antibiotics against CTX-M producing *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30: 981–7.

[102] Kern MB, Frimodt-Moller N, Espersen F. Urinary concentrations and urine ex-vivo effect of mecillinam and sulphamethizole. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:54–61.

[103] Balakrishnan I, Awad-El-Kariem FM, Aali A, Kumari P, Mulla R, Tan B, et al. Temocillin use in England: clinical and microbiological efficacies in infections caused by extended-spectrum and/or derepressed AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2628–31.

[104] Gavin PJ, Suseno MT, Thomson Jr RB, Gaydos JM, Pierson CL, Halstead DC, et al. Clinical correlation of the CLSI susceptibility breakpoint for piperacillin-tazobactam against extended-spectrum-beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:2244–7.

[105] Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Retamar P, Picon E, Pascual A. Betalactam/beta-lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteraemia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: a post hoc analysis of prospective cohorts. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 167–74.

[106] Rodriguez-Bano J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, et al. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med* 2008; 168: 1897–902.

[107] Lee CH, Su LH, Tang YF, Liu JW. Treatment of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia with carbapenems or flomoxef: a retrospective study and laboratory analysis of the isolates. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:1074–7.

[108] [http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/CASFM 2013.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/CASFM%2013.pdf) (site consulté le 06 novembre 2013).

[109] Coque T, Baquerot F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL – producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance* 2008; 13(47):1–11.

[110] Lavollay M, Mamlouk K, Frank T, Akapabie A, Burghoffer B, Ben Redjeb S, et al. Clonal dissemination of CTX-M-15 betalactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris Area, Tunis and Bangui. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50 (7):2433–8.

[111] Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canic, a MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 273–81.

[112] Lavigne JP, Marchandin H, Delmas J, Moreau J, Bouziges N, Lecaillon E, et al. CTXM beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in French hospitals: prevalence, molecular epidemiology, and risk factors. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 620–6.

[113] Barguigua A, El Otmani F, Talmi M, Bourjilat F, Haouzane F, Zerouali K, et al. Characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from community in Morocco. *J. Med. Microbiol* 2011; 60, 1344–1352.

[114] Benouda, A., Touzani, O., Khairallah, M. T., Araj, G. F. & Matar, G. M. First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. *Ann. Trop. Med. Parasitol* 2010; 104: 327–330.

[115] Weber P, Dib C, Durand C, Moniot-Ville N. Evaluation de la sensibilité à la lévofloxacine des souches isolées d'infections urinaires basses communautaires. *Pathol Biol* 2005; 53:125–8.

[116] Hooton TM. Pathogenesis of urinary tract infection: an update. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46:S1–7.

[117] Alvarez C, Pangon B, Allouch PY, Ghnassia JC. Infections urinaires: principaux aspects épidémiologiques, bactériologiques et cliniques. *Feuill Biol* 1992; 23:15—24.

[118] Larabi K, Masmoudi A, Fendri C. Étude bactériologique et phénotypes de résistance des germes responsables d'infections urinaires dans un centre hospitalo-universitaire de Tunis : à propos de 1930 cas. *Med Mal Infect* 2003; 33:348—52.

[119] Naber KG, Schito G, Botto H, Palou J, Mazzei T. Surveillance study in Europe and Brazil on clinical aspects and Antimicrobial Resistance Epidemiology in Females with Cystitis (ARESC): implications for empiric therapy. *Eur Urol* 2008; 54(5):1164–75.

[120] Boutiba I, Boubaker EN, Ghazzi R, Jouaihia W, Mahjoubi F, Thabet L, et al. Résistance bactérienne aux antibiotiques en Tunisie : données de 1999 à 2003. *Rev Tun Infectiol* 2007;1(4): 5–11.

[121] Résistance aux Antibiotiques d'*Escherichia coli* Uropathogène Communautaire et Consommation d'Antibiotiques à Casablanca (Maroc). *European Journal of Scientific Research* 2009; Vol.36: pp.49-55.

[122] Nadmi H, Elotmani F, Talmi M, Zerouali K, Perrier-Gros-Claude J.D, Timinouni M. Profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes communautaires à El Jadida (Maroc). *Med Mal Infect* 2010; 40: 303-5.

[123] Farrell DJ, Morissey I, De Rubeis D et al. A UK multicentre study and the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. *J Infect* 2003; 46(2): 94-100.

[124] Matute A.J, Hak E., Schurink C. et al. Resistance of uropathogens in symptomatic urinary tract infection in Leon, Nicaragua. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 506-9.

[125] Agence Française de sécurité sanitaire des produits de santé, Recommandations pratiques: Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires chez l'adulte. *Médecine et Maladies infectieuses* 2008; 38S: 203-252.

[126] ONERBA. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Données de l'observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne. *Med Mal Infect* 2005; 35:155-69.

[127] Tagajdid M.R, Boumhil L, Iken M, Adnaoui M, Benouda A. Étude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. *Med Mal Infect* 2010; 40: 70-73.

[128] Lemort AL, Neuville S, Medus M et al. Evolution comparée de la sensibilité des souches de *Escherichia coli* isolées d'infections urinaires de patients consultants aux urgences et de patients hospitalisés en 2002 et 2004 à l'hôpital de Permingnam. *Pathologie Biologie* 2006; 54: 427-430.

[129] Cizman M, Orazem A, Krizan-Hergouth V et al. Correlation between increased consumption of fluoroquinolones in outpatients and resistance of *Escherichia coli* from urinary tract infections. *J Antimicrob Agents Chemother* 2001; 47: 502-3.

[130] Neuhausser MM, Weinstein RA, Rydman R. Antibiotic resistance among Gram negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolones use. *JAMA* 2003; 289: 885-8.

[131] Ling TK, Xiong J, Yu Y. Multicenter antimicrobial susceptibility survey of Gram negative bacteria isolated from patients with community-acquired infections in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:374-8.

[132] Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Molecular epidemiology of selected multi-drug resistant bacteria: A global report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49: 231- 236.

[133] Kahlmeter G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(1): 69-76.

[134] Tenssaie ZW. Multiple antimicrobial resistance in gram negative bacilli isolated from clinical specimens, Jimma Hospital, southwest Ethiopia. *Ethiop. Med. J.* 2001; 39, 305-312.

- [135] Pieboji JG, Koulla-Shiro S, Ngassam P, Adiogo D, Njine T, Ndumbe P. Antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli isolates from inpatients and outpatients at Yaounde Central Hospital. *Cameroon Int. J. Infect. Dis* 2004 ; 8, 147–154.
- [136] Lahlou A, Chegri M, L’Kassmi H. Épidémiologie et résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées d’infections urinaires à l’hôpital militaire Moulay-Ismaïl de Meknès. *Antibiotiques* 2009; 11: 90-6.
- [137] Tlamcani Z, Ellaia K, Benomar A, Kabbaj H, Alaoui AE, Seffar M. La résistance aux fluoroquinolones chez des souches de *Klebsiella* spp. productrices de bêta-lactamase à spectre étendu isolées dans les urines. *Ann Biol Clin* 2009; 67:553–6.
- [138] Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol* 1995; 8, 557–584.
- [139] Bouzenoune F, Boudersa F, Bensaad A, Harkat F, Siad N. Les infections urinaires à Ain M’lila (Algérie). Résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006 et 2007. *Med Mal* 2009; 39, 142–143.
- [140] Ben Haj Khalifa A, Khedher M. Epidémiologie des souches de *Klebsiella* spp. uropathogènes productrices de b-lactamases à spectre élargi dans un hôpital universitaire Tunisien, 2009. *Pathol Biol* 2012; 60 : e1–e5.
- [141] Nordmann P, Mammeri H. Résistance plasmidique aux quinolones. *Antibiotiques* 2007; 9: 246–53.
- [142] Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 52–9.
- [143] El Bouamri MC, Aarsalane L, Kamouni Y, Berraha M, Zouhair S. Évolution récente du profil épidémiologique des entérobactéries uropathogènes productrices de β -lactamases à spectre élargi à Marrakech, Maroc. *Prog Urol* 2014; 24: 451-455.
- [144] Nijssen S, Florijn A, Bonten MJ, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. β -lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European Enterobacteriaceae isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 585-91.
- [145] Belmonte O., Drouet D., Alba J., Moiton M.-P., Kuli B., Lugagne-Delpon N., et al. Evolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques sur l’île de la Réunion : émergence des bêta-lactamases à spectre élargi. *Pathol Biol* 2010; 58: 18-24.
- [146] Fouquet M, Morange V, Bruyère F. Évolution sur cinq ans des infections à germes produisant une B-lactamase à spectre étendu. *Prog Urol* 2012; 22, 17-21.
- [147] Ruppe E, Woerther PL, Diop A, Sene AM, Da Costa A, Arlet G, et al. Carriage of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates among children living in a remote village in Senegal. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3135 - 7.

- [148] De Champs C, Sirot D, Chanal C, Poupart MC, Dumas MP, Sirot J. Concomitant dissemination of three extended-spectrum b-lactamases among different Enterobacteriaceae isolated in a French hospital. *J Antimicrobial Chemother* 1991; 27: 441–7.
- [149] Jacoby GA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum b-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 164–9.
- [150] Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49 (5):2137–9.
- [151] Paterson D. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *Am J Med* 2006; 119 (6 Suppl. 1):S20–8.
- [152] Hernandez JR, Martinez-Martinez L, Canton R, Coque TM, Pascual A. Nationwide Study of Escherichia coli and K. pneumonia producing extended-spectrum B-lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2122–5.
- [153] Romero EDV, Padilla TP, Hernandez AH, Grande RP, Vazquez MF, Garcia IG, et al. Prevalence of clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella spp. producing multiple extended-spectrum β -lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59:433–7.
- [154] Bush K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1085– 1089.
- [155] Barguigua A., El Otmani Fatima., Talmi Mustapha., Reguig Ahmed., Jamali Loubna., Zerouali Khalid., Timinouni M. Prevalence and genotypic analysis of plasmid mediated β -lactamases among urinary Klebsiella pneumoniae isolates in Moroccan community. *The journal of antibiotics* 2013; 66: 11-16.
- [156] Pillai D, Melano R, Lo S, Tijet N, Fuksa M, Roda N. Klebsiella pneumoniae, Carbapenemase, Canada. *Emerg Infect Dis* 2009;15 (5):827–9.
- [157] Oteo J, Delgado-Iribarren A, Vega D, Bautista V, Cruz Rodriguez M, Velasco M, et al. Emergence of imipenem resistance in clinical Escherichia coli during therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32(6):534–7.
- [158] Valverde A, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, Rollan A, Baquero F, Canton R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4769–75.
- [159] Bouchakour, M. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing Enterobacteriaceae in Morocco. *J. Infect. Dev. Ctries* 2010; 4: 799–803.
- [160] Lavollay M, Mamlouk K, Frank T, Akpabie A, Burghoffer B, Ben Redjeb S, Bercion R, Gautier V, Arlet G (2006) Clonal dissemination of a CTX-M-15 beta-lactamase-producing Escherichia coli strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2433-2438.

- [161] Mendonça N, Leitão J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1946-1955.
- [162] Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J, Ito K, Arakawa Y. Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:72-9.
- [163] Duval V, Barbe C, Fusellier T, Guillard T, Bajolet O, De Champs C. *Escherichia coli* producteur de bêta-lactamase à spectre étendu : un nouveau pathogène hospitalier? *Hygiènes*. 2008; 16: 319-26.
- [164] Skurnik D, Lasocki S, Bremont S, Muller-Serieys C, Kitzis D, Courvalin P, et al. Development of ertapenem resistance in a patient with mediastinitis caused by an extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol* 2009; 59:115-9
- [165] Mena A, Plasencia V, Garcia L, Hidalgo O, Ayestaran JI, Alberti S, et al. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2831-7.
- [166] Pangon B, Bizet C, Bure A, Pichon F, Philippon A, Regnier B, et al. In vivo selection of a cephamycin-resistant, porindeficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3 beta-lactamase. *J Infect Dis* 1989; 159:1005-6.
- [167] Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye K, Ben-Ami R, Schwartz D, Carmali Y. Clinical and economic impact of bacteremia with extended spectrum beta-lactamase-producing in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50 (4):1257–62.

