

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene
Faculté des Sciences Biologiques



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

Magister en Sciences de la Nature

Option : Génétique

Par

DERKAOUI Meriem

SUJET

**Détection et caractérisation de la résistance aux antibiotiques
dans un effluent hospitalier**

Soutenu publiquement le 25/09/2011, devant le jury composé de

M^{me} HAMOUDI-TRIKI Djalila, Professeur à l'USTHB

Présidente

M^{me} MESSAI Yamina, Maître de conférences/A à l'USTHB

Directrice de Mémoire

M^{me} KHALED Safia, Professeur au CHU El-Hadi Flici, Alger

Examinatrice

M^{me} BENHASSINE Traki, Maître de conférences/A à l'USTHB

Examinatrice

M^{me} BOUDJELLA Hadjira, Maître de conférences/A à l'ENS, Kouba

Examinatrice

M^{lle} ANSSOUR Lynda, Doctorante à l'USTHB

Invitée

Résumé

Les effluents générés par l'activité hospitalière représentent une source potentielle de germes résistants aux antibiotiques et constituent ainsi une réelle menace pour la santé publique. L'objectif de ce travail a été la détection et la caractérisation de la résistance aux antibiotiques dans les effluents de l'hôpital Zmirli (Alger).

L'isolement des souches d'entérobactéries résistantes au céfotaxime a été réalisé sur gélose lactosée au tergitol 7 additionnée de céfotaxime (4 µg/ml). L'identification a été faite par galerie API 20^E et la production de β-lactamases à spectre élargi (BLSE) a été recherchée par le test de synergie (test DDS). La sensibilité aux antibiotiques a été étudiée par les méthodes de diffusion et de dilutions en milieu gélosé. Les essais de transfert des gènes de résistance ont été effectués par conjugaison et leurs supports plasmidiques ont été déterminés après extraction de l'ADN plasmidique par lyse alcaline. Les gènes de résistance aux β-lactamines (*bla*_{CTX-M} et *bla*_{AmpC}) et les déterminants PMQR « *plasmid mediated quinolone resistance* » ont été recherchés par PCR simplex ou multiplex. Les séquences *ISEcp1* et leur association aux gènes *bla*_{CTX-M} ont été recherchées par PCR. Le typage moléculaire des souches a été réalisé par ERIC-PCR.

Au total, 109 souches d'entérobactéries résistantes au céfotaxime ont été isolées. Celles-ci ont été aussi résistantes à la gentamicine et à la ciprofloxacine et 31 parmi elles ont été résistantes à la céfoxitine. Le typage moléculaire a révélé 22 profils différents, une souche par profil a été retenue pour la suite de l'étude : 8 *C. freundii*, 7 *K. pneumoniae*, 3 *K. oxytoca*, 1 *E. cloacae*, 1 *C. braakii*, 1 *E. sakazakii* et 1 *E. coli*. Les CMI des céphalosporines de troisième génération (C3G) ont été élevées chez ces souches, en particulier pour le céfotaxime et le ceftriaxone et la majorité d'entre elles ont montré une résistance additionnelle à la céfoxitine. Le principal mécanisme de résistance aux C3G a été la production de BLSE de type CTX-M (groupe CTX-M1), retrouvées chez 15 souches. L'étude de l'environnement génétique des gènes *bla*_{CTX-M} a montré leur association à la séquence *ISEcp1*. Les gènes *bla*_{CTX-M} ont été transférables chez 7 souches en association avec des plasmides auto-transférables de 155 kb, 128 kb, 95 kb et 81 kb. Le second mécanisme a été la production de céphalosporinases plasmidiques détectées chez 5 souches (4 de type CIT et 1 de type FOX) ; parmi ces dernières, deux coproduisent l'enzyme CTX-M. Les gènes CIT ont été transférables chez 3 souches en association avec un plasmide mobilisable de 5.5 kb. La résistance à la gentamicine a concerné 16 souches et a été transférable en association avec les gènes *bla*_{CTX-M} ou *bla*_{AmpC}. La résistance à la ciprofloxacine a été observée chez 17 souches et les déterminants *qnr* ont été retrouvés chez 15 souches, ils ont été de type *qnrB* (12 souches), *qnrS* (2 souches) et *qnrB+qnrS* (1 souche). Les gènes *qnrB* ont été transférables chez 4 souches en association avec les gènes *bla*_{CTX-M} et/ou *bla*_{AmpC}.

Cette étude a montré la présence des gènes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{AmpC} et *qnr* dans les effluents hospitaliers, d'où le risque potentiel de la dissémination et du transfert de la résistance dans l'environnement. Dans ce sens, l'installation de dispositifs de traitement adéquats et une réglementation stricte régissant leur élimination sont nécessaires.

Mots clés : effluents hospitaliers, entérobactéries, BLSE, céphalosporinases, déterminants PMQR.

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Equipe de Génétique, de la Faculté des Sciences Biologiques, USTHB, Alger. Ces travaux rentrent dans le cadre de la préparation de la thèse de Doctorat de M^{lle} Lynda ANSSOUR et ont été financés par le FNR et l'ANDRS.

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur Rabah BAKOUR, Responsable de l'équipe de Génétique de m'avoir accueillie dans son équipe et d'avoir suivi ce travail tout au long de son développement. Je le remercie pour toute l'aide et pour toutes les orientations qui m'ont énormément servies.

Je présente mes remerciements les plus distingués et les plus particuliers à ma Directrice de thèse le Docteur M^{me} Yamina MESSAI, Maître de conférences à la FSB, USTHB, Alger. Je vous remercie pour votre encadrement, votre soutien, votre encouragement et également pour la confiance que vous m'avez accordée durant la réalisation de ce travail. Votre présence pour m'orienter dans mes manipes et pendant l'élaboration de ce manuscrit a été vraiment spéciale et exceptionnelle. Le travail sous votre direction a été un honneur et une expérience inoubliable.

Ma reconnaissance s'adresse également à :

- M^{me} le Professeur Djalila HAMOUDI-TRIKI, pour avoir accepté la présidence du jury en dépit de ses tâches pédagogiques et scientifiques. Cela est un grand honneur pour moi.*
- M^{me} Safia KHALLED, Professeur en médecine au CHU EL-Hadi Flici, Alger. Je vous remercie de m'avoir honorée par votre présence parmi ce jury et d'avoir accepté d'examiner ce travail.*
- M^{me} le Docteur Traïk BENHASSINE, Maître de conférences à la FSB, USTHB, Alger. Merci beaucoup pour vos précieux conseils, pour vos encouragements et pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.*
- M^{me} BOUDJELLA Hadjira, Maître de conférences à l'ENS, Kouba, Alger, je suis très sensible à l'honneur que vous me faites par votre présence dans ce jury pour examiner et juger ce travail.*

Je tiens à remercier aussi M^{lle} Lynda ANSSOUR pour toute l'aide qu'elle m'a apportée sur le plan expérimental et à qui je souhaite une bonne continuation pour son Doctorat.

Mes remerciements s'adressent également à M^{lle} Soufïla ALOUACHE, pour son aide, ses conseils et ses orientations à chaque fois que j'en avais besoin.

J'en profite aussi pour remercier collectivement tous les membres de l'équipe de Génétique, qui en m'entourant d'une ambiance affectueuse hors du commun, m'ont permis de mener à bien ce travail.

Enfin, j'adresse un GRAND MERCI à mes parents et mes frères pour leur encouragement, leur soutien et leur confiance.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des figures en annexe

Liste des tableaux

Liste des tableaux en annexe

Introduction

1

Données bibliographiques

I. Les β -lactamines

2

I. 1. Classification des β -lactamines

2

I. 1. 1. Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique

2

I. 1. 1. 1. Pénames (ou pénicillines)

2

I. 1. 1. 2. Pénèmes (ou carbapénèmes)

3

I. 1. 1. 3. Clavames (ou oxapénames)

3

I. 1. 2. Dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique

5

I. 1. 2. 1. Les céphalosporines

5

I. 1. 2. 2. Les céphamycines

5

I. 1. 2. 3. Les oxacéphèmes

6

I. 1. 3. Les monobactames

6

I. 2. Mécanisme d'action des β -lactamines

6

I. 3. Mécanismes de la résistance bactérienne acquise aux β -lactamines

8

I. 3. 1. Mécanismes de résistance non enzymatique

8

I. 3. 1. 1. Imperméabilité de la membrane externe

8

I. 3. 1. 2. Système d'efflux

8

I. 3. 1. 3. Modification des protéines liants la pénicilline « PLP »

10

I. 3. 2. Mécanismes de résistance enzymatique

10

II. Résistance par production de β -lactamases

11

II. 1. Classification des β -lactamases

11

II. 1. 1. Les céphalosporinases (classe moléculaire C)

11

II. 1. 2. Les sérines β -lactamases (classes moléculaires A et D)

11

II. 1. 2. 1. Les sérines β -lactamases de la classe A

11

II. 1. 2. 2. Les sérines β -lactamases de la classe D

12

II. 1. 3. Les métallo- β -lactamases

13

II. 2. Evolution de la résistance aux β -lactamines à large spectre	13
II. 2. 1. Les céphalosporinases	13
II. 2. 1. 1. Les céphalosporinases chromosomiques	13
II. 2. 1. 2. Les céphalosporinases plasmidiques	14
II. 2. 1. 3. Les céphalosporinases à spectre élargi	16
II. 2. 2. Les β -lactamases à spectre élargi « BLSE »	16
II. 2. 2. 1. BLSE de types TEM et SHV	18
II. 2. 2. 2. BLSE non TEM non SHV	18
II. 2. 2. 2. 1. Type CTX-M	18
II. 2. 2. 2. 2. Autres types	18
II. 2. 3. Les carbapénèmases	19
II. 3. Résistances à d'autres familles d'antibiotiques « les quinolones »	20
II. 3. 1. Mode d'action des quinolones	20
II. 3. 2. Mécanismes de résistance aux quinolones	22
II. 3. 2. 1. Diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique	24
II. 3. 2. 2. Inactivation de l'antibiotique	24
II. 3. 2. 3. Protection de la cible	25
II. 3. 2. 4. Modifications de la cible par mutation des gènes de structure	27
II. 3. 3. Rôle des déterminants PMQR dans la sélection de mutants résistants aux quinolones	27
III. La résistance aux antibiotiques dans l'environnement	28
Matériel et méthodes	
I. Souches étudiées	31
II. Identification par galerie API 20 ^E	31
III. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques	31
III. 1. Antibiogramme « méthode de diffusion sur milieu gélosé »	31
III. 2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice « CMI » des antibiotiques	32
IV. Détection des β -lactamases à spectre élargi « BLSE »	33
V. Transfert des gènes de résistance par conjugaison	33
VI. Préparation de l'ADN pour la PCR	33
VII. Caractérisation des gènes de β -lactamases	34
VIII. Etude de l'environnement génétique des gènes <i>bla</i> _{CTX-M}	34
IX. Caractérisation des déterminants PMQR « <i>plasmid-mediated quinolone resistance</i> » de résistance aux quinolones	34

X. Typage moléculaire des souches par ERIC-PCR	35
XI. Extraction de l'ADN plasmidique	35
XII. Electrophorèse sur gel d'agarose	35
Résultats	
I. Identification biochimique des souches bactériennes	38
II. Sensibilité des bactéries aux antibiotiques	38
III. Production de β -lactamases à spectre élargi « BLSE »	40
IV. Transfert des gènes de résistance	40
V. Caractérisation des gènes de β -lactamases	40
V. 1. Gènes de β -lactamases à spectre élargi	47
V. 2. Gènes de céphalosporinases AmpC	47
VI. Association des gènes <i>bla</i> _{CTX-M} avec la séquence <i>ISEcp1</i>	47
VII. Typage moléculaire des souches par ERIC-PCR	51
VIII. Concentration minimale inhibitrice « CMI » des antibiotiques	51
IX. Déterminants PMQR « <i>plasmid-mediated quinolone resistance</i> » de résistance aux quinolones	56
X. Caractérisation des plasmides porteurs des gènes de résistance aux antibiotiques	56
Discussion	66
Conclusion	72
Références bibliographiques	73
Annexe	

Liste des abréviations

BHIB : « Brain Heart Infusion Broth » pour bouillon d'infusion de cœur et de cerveau

BLSE : β -lactamases à spectre élargi

C2G, C3G : céphalosporines de deuxième et troisième génération, respectivement

CMI : concentration minimale inhibitrice

DDS : « *Double Disk Synergy* » pour test de synergie

ERIC : « *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* » pour séquences intergéniques répétées, chez les entérobactéries

IS : « *Insertion Sequence* » pour séquence d'insertion

Kb: kilo-base

LB : milieu de Luria Bertani

pb ou bp: paire de base

PCR : « *Polymerase Chain Reaction* » pour réaction de polymérisation en chaîne

PMQR : « *Plasmid-Mediated Quinolone Resistance* » pour déterminants plasmidiques de la résistance aux quinolones

STEP : station d'épuration

UFC : unité formant colonie

Liste des figures

Fig. 1	: Classification des β -lactamines : d \acute{e} riv \acute{e} s de l'acide 6-amino-p \acute{e} nicillanique	4
Fig. 2	: Classification des β -lactamines : d \acute{e} riv \acute{e} s de l'acide 7-amino-c \acute{e} phalosporanique et monobactames	7
Fig. 3	: Repr \acute{e} sentation sch \acute{e} matique des principaux m \acute{e} canismes de r \acute{e} sistance aux β -lactamines	9
Fig. 4	: Mod \acute{e} le de voie de r \acute{e} gulation des c \acute{e} phalosporinases AmpC inductibles	15
Fig. 5	: Organisation des g \acute{e} nes de c \acute{e} phalosporinases AmpC plasmidiques du groupe CIT d \acute{e} riv \acute{e} s du g \acute{e} ne <i>bla</i> _{AmpC} chromosomique de <i>C. freundii</i>	17
Fig. 6	: Structure de l'int \acute{e} gron complexe de classe 1 porteur du g \acute{e} ne <i>bla</i> _{DHA-1} sous forme de g \acute{e} ne non cassette au sein de la duplication de la r \acute{e} gion 3'-CS	17
Fig. 7	: Structure du transposon Tn4401 porteur des g \acute{e} nes <i>bla</i> _{KPC-2}	21
Fig. 8	: Mod \acute{e} le de mobilisation des g \acute{e} nes <i>bla</i> _{KPC}	21
Fig. 9	: Mode d'action des quinolones par blocage de l'ADN gyrase	23
Fig. 10	: Mode d'action des quinolones sur l'ADN gyrase et la topoisom \acute{e} rase VI	23
Fig. 11	: Sensibilit \acute{e} vis- \grave{a} -vis des antibiotiques β -lactames (a) et non β -lactames (b) chez une souche de <i>C. freundii</i> (S101), (m \acute{e} thode de diffusion en milieu g \acute{e} los \acute{e})	39
Fig. 12	: Production de β -lactamases \grave{a} spectre \acute{e} largi (test DDS)	41
Fig. 13	: Sensibilit \acute{e} vis- \grave{a} -vis des antibiotiques β -lactames (a,b) et non β -lactames (c,d) (m \acute{e} thode de diffusion en milieu g \acute{e} los \acute{e}) de deux souches de <i>C. freundii</i> et leurs clones transconjugants	46
Fig. 14	: D \acute{e} t \acute{e} c \acute{t} ion par PCR des g \acute{e} nes de la famille <i>bla</i> _{CTX-M}	48
Fig. 15	: D \acute{e} t \acute{e} c \acute{t} ion par PCR des g \acute{e} nes du groupe CTX-M1	48
Fig. 16	: D \acute{e} t \acute{e} c \acute{t} ion des g \acute{e} nes <i>bla</i> _{AmpC} par PCR multiplex	49
Fig. 17	: D \acute{e} t \acute{e} c \acute{t} ion des g \acute{e} nes <i>bla</i> _{AmpC} du groupe CIT chez les clones transconjugants	49
Fig. 18	: D \acute{e} t \acute{e} c \acute{t} ion par PCR de la s \acute{e} quence <i>ISEcp1</i>	50
Fig. 19	: D \acute{e} t \acute{e} c \acute{t} ion par PCR de l'association g \acute{e} ne <i>bla</i> _{CTX-M} /s \acute{e} quence <i>ISEcp1</i>	50
Fig. 20	: Profils ERIC des souches de <i>K. pneumoniae</i>	52
Fig. 21	: Profils ERIC des souches de <i>K. oxytoca</i> (3-10) et <i>E. coli</i> (11-17)	52
Fig. 22	: Profils ERIC des souches de <i>C. freundii</i> (2-14) et <i>E. cloacae</i> (15)	53
Fig. 23	: Profils ERIC des souches de <i>E. sakazakii</i>	53
Fig. 24	: D \acute{e} t \acute{e} c \acute{t} ion des g \acute{e} nes <i>qnr</i> (A, B et S) par PCR multiplex	59

Fig. 25 :	Détection par PCR des gènes <i>aac (6')-Ib</i>	59
Fig. 26 :	Profils plasmidiques des souches productrices de BLSE CTX-M transférables	61
Fig. 27 :	Profils plasmidiques des souches productrices de céphalosporinases AmpC transférables du groupe CIT (S71 et S99), BLSE CTX-M transférable (S79) et AmpC transférable du groupe CIT + BLSE CTX-M transférable (S57)	61
Fig. 28 :	Profils plasmidiques des souches productrices de BLSE CTX-M transférables ainsi que leurs clones transconjugants	63
Fig. 29 :	Profils plasmidiques des souches productrices de céphalosporinases AmpC plasmidiques transférables du groupe CIT seules (S71 et S99) ou associées aux BLSE CTX-M transférables (S57) ainsi que leurs clones transconjugants	64

Liste des figures en annexe

Fig. 1 :	Marqueurs de taille des produits d'amplification par PCR
Fig. 2 :	Profils plasmidiques des souches sauvages de <i>C. freundii</i> (S20, S29, S89, S132, S57, S71 et S99) et de <i>K. oxytoca</i> (S9)

Liste des tableaux

Tableau I	: Liste des disques d'antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme	32
Tableau II	: Couples d'amorces utilisées pour l'amplification des différents gènes par PCR	36
Tableau III	: Conditions des réactions PCR selon le type de gène amplifié	37
Tableau IV	: Profils de sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques	39
Tableau V	: Résultats de l'antibiogramme des souches donatrices et leurs clones transconjugants	42
Tableau VI	: Résultats du test de synergie chez les souches donatrices et leurs clones transconjugants	44
Tableau VII	: Profils génétiques des 22 souches retenues	54
Tableau VIII	: Concentration minimale inhibitrice des antibiotiques chez les 22 souches	55
Tableau IX	: Concentration minimale inhibitrice des antibiotiques chez les souches donatrices et leurs clones transconjugants	57
Tableau X	: Résultats de l'amplification par PCR des déterminants PMQR	58
Tableau XI	: Résultats de l'amplification par PCR des déterminants <i>qnr</i> et <i>aac</i> (<i>6'</i>)- <i>Ib</i> chez les souches donatrices et leurs clones transconjugants	60
Tableau XII	: Profils plasmidiques des souches sauvages	62
Tableau XIII	: Profils plasmidiques des souches sauvages et leurs clones transconjugants	65

Liste des tableaux en annexe

- Tableau I** : Résultats de l'identification biochimique des souches par galerie API 20^E
- Tableau II** : Résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé
- Tableau III** : Résultats du test de synergie
- Tableau IV** : Résultats du transfert des gènes de résistance par conjugaison
- Tableau V** : Résultats de l'amplification des gènes de β -lactamases CTX-M et AmpC, de la séquence *ISEcp1* et de l'association gène *bla*_{CTX-M}/séquence *ISEcp1*
- Tableau VI** : Résultats de l'amplification des gènes de β -lactamases CTX-M et AmpC chez les souches donatrices et leurs clones transconjugants
- Tableau VII** : Profils ERIC des 109 souches
- Tableau VIII** : Profils génétiques des 109 souches

INTRODUCTION

Les activités de soins et la population de malades des hôpitaux génèrent un ensemble complexe de contaminants biotiques (microorganismes pathogènes et résistants) et abiotiques (résidus de médicaments dont les antibiotiques et autres antimicrobiens) qui sont le plus souvent retrouvés dans les effluents liquides. L'incidence des effluents hospitaliers en terme de santé publique devient de plus en plus importante au regard de l'absence ou de la faible performance du traitement par les stations d'épuration (STEP) de certaines substances chimiques, qui quittent le plus souvent les STEP presque inchangées pour être relarguées dans le milieu naturel. Par ailleurs, dans de nombreux pays en développement, les effluents liquides hospitaliers sont rejetés directement, dans l'environnement, le plus souvent sans aucun traitement au préalable. Le rejet de ces effluents dans le réseau d'assainissement ou dans le milieu naturel génère un risque pour la santé humaine et représente une contribution significative à la contamination générale de l'environnement, et plus particulièrement des milieux aquatiques. Le rejet de ces substances toxiques, dans les écosystèmes, provoque sur les germes bactériens une pression de sélection pour la résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques. Ainsi, à la déficience des moyens d'épuration des composés chimiques se juxtapose la mise en évidence de germes pathogènes multirésistants dans les rejets des hôpitaux. En utilisant des entérocoques, staphylocoques et entérobactéries comme indicateurs de présence des bactéries multirésistantes dans les biofilms formés dans les réseaux d'assainissement hospitalier, il a été relevé une importante présence de germes multirésistants. La présence de bactéries résistantes dans les effluents hospitaliers pourrait contribuer à augmenter l'exposition des populations humaines à ces bactéries.

Si les mécanismes impliqués dans l'émergence et la dissémination des gènes de résistance sont bien connus en clinique, les paramètres influençant l'émergence et les transferts de gènes dans l'environnement restent encore mal documentés. Les connaissances relatives à l'épidémiologie des bactéries dans l'environnement ont progressé ces dernières années, mais elles sont encore insuffisantes. Les connaissances scientifiques sur les mécanismes de résistance des bactéries de l'environnement méritent d'être approfondies et la prévalence de ces germes résistants dans l'environnement doit être établie. Comprendre ces mécanismes ainsi que les phénomènes épidémiologiques relatifs à leur propagation sont des préalables indispensables à l'estimation et l'appréciation du risque pour la santé publique. En Algérie, les études relatives à la présence d'antibiotiques et de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les eaux usées, dont celles des hôpitaux, sont pratiquement inexistantes. A notre connaissance, aucun des hôpitaux en Algérie ne traite ses effluents, ceux-ci sont même libérés directement dans le milieu naturel avec toutes les conséquences non négligeables en termes de santé publique et de perturbations écologiques. Dans ce cadre, notre étude a porté sur les effluents d'un hôpital des urgences médico-chirurgicales d'Alger (Zmirli) et a consisté à détecter et caractériser la résistance aux antibiotiques dans ces rejets. Nous nous sommes intéressés, en tant que marqueurs, aux familles des β -lactamines à large spectre et aux quinolones, en raison de leur très grande importance en thérapeutique anti-infectieuse.

DONNÉES

BIBLIOGRAPHIQUES

I. Les β -lactamines

Les β -lactamines constituent une vaste famille d'antibiotiques bactéricides caractérisée par la présence constante du cycle β -lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables, qui expliquent leurs différentes propriétés pharmacocinétiques et leur large spectre d'activité antibactérienne. Découverte en 1928 par Fleming, la pénicilline a été la première molécule β -lactame introduite dans les usages thérapeutiques pour le traitement des septicémies à staphylocoques. Depuis, plusieurs autres molécules ont été mises sur le marché (Cavallo et *al.*, 2004).

I. 1. Classification des β -lactamines

La structure du noyau de base qui comporte toujours le cycle β -lactame, permet de répartir les β -lactamines en trois grands groupes : les dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique, les dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique et les monobactames (Philippon et *al.*, 1993 ; Bryskier, 1999 ; Bryskier et Aszodi, 1999 ; Cavallo et *al.*, 2004).

I. 1. 1. Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique

La structure de base des dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique est composée d'un cycle β -lactame associé à un cycle thiazolidine, spécifique des pénicillines. Dans ce groupe, on trouve les β -lactamines à noyau pénème, caractéristique des pénicillines, les β -lactamines à noyau pénème (carbapénèmes) et les β -lactamines à noyau clavame dont l'acide clavulanique représente la seule molécule naturelle actuellement commercialisée (Fig. 1). Selon que le noyau est un pénème, un pénème ou un clavame, diverses substitutions confèrent à la molécule d'antibiotique des propriétés différentes et une activité antibactérienne variable qui s'exprime dans les variations du spectre d'activité antibactérien.

I. 1. 1. 1. Pénames (ou pénicillines)

Les antibiotiques appartenant à ce groupe ont en commun un noyau pénème caractérisé par un pentacycle saturé associé au noyau β -lactame. Les produits de ce groupe se distinguent par la nature du radical fixé sur le carbone en position 6 (R6) (Fig.1). Les principaux sous groupes sont:

- **La pénicilline G et ses dérivés** : ces pénicillines sont actives sur les cocci à Gram positif et négatif ainsi que quelques bacilles à Gram positif comme les corynébactéries ou les *Clostridium*. Les bacilles à Gram négatif, naturellement résistants aux pénicillines par imperméabilité, ne sont inhibés que par de très fortes concentrations ne pouvant pas être atteintes en thérapeutique. Les staphylocoques producteurs de pénicillinases sont également résistants à l'action de certaines pénicillines (pénicillines G et V) (Rolinson, 1986).
- **Les pénicillines à large spectre** : depuis la découverte de la première pénicilline par Fleming, plusieurs améliorations ont été introduites afin d'obtenir des molécules plus stables et à spectre d'activité plus étendu que la pénicilline G. Parmi ces molécules, on retrouve les aminopénicillines dont l'ampicilline, obtenue en modifiant la benzylpénicilline par le branchement d'un radical aminé (NH₂) sur sa chaîne latérale en position 6. Cette modification lui a conféré une meilleure stabilité en milieu acide et un spectre d'activité élargie à de nombreux bacilles à Gram négatif non naturellement producteurs de β -lactamases constitutives comme *E. coli*. L'activité de l'ampicilline est également plus forte que celle de la benzylpénicilline sur les streptocoques et sur *E. faecalis*. Des analogues à l'ampicilline existent dont le plus utilisé est l'amoxicilline qui a le même spectre d'activité mais qui a

comme avantages une meilleure pharmacocinétique, une meilleure absorption orale et une activité plus rapidement bactéricide.

D'autres exemples de pénicillines à large spectre d'activité existent dont les carboxypénicillines (carbénicilline et ticarcilline) et les acyluréidopénicillines (azlocilline, mezlocilline et pipéracilline). Les carboxypénicillines ont un groupement carboxyl (COOH) sur la chaîne latérale en C6 en position α de l'acide 6-amino-pénicillanique ; comparées aux aminopénicillines, elles ont un spectre d'activité plus étendu sur les bacilles à Gram- dont ceux résistants aux aminopénicillines par l'action conjuguée de la barrière de perméabilité de leur membrane externe et de l'hydrolyse dans l'espace périplasmique par une β -lactamase constitutive chromosomique. Les acyluréidopénicillines sont obtenues par substitution du groupement urée sur la chaîne latérale en C6 en position α de l'acide 6-amino-pénicillanique, leur spectre d'activité est très large car il conjugue celui des aminopénicillines et des carboxypénicillines.

- **Les amidinopénicillines** : ce sous-groupe diffère des autres pénicillines par la substitution d'une liaison méthylène en C6 sur le noyau pénème. Le pivmécillinam représente la seule amidinopénicilline actuellement disponible. Ces molécules sont très actives sur certaines entérobactéries des voies urinaires, mais peu actives sur l'ensemble des bactéries à Gram positif.

- **Les pénicillines sulfones** : le sulbactam et le tazobactam représentent les principaux composés de ce sous-groupe. Ces deux composés sont très proches du point de vue structure, ils présentent une sulfonation en position 1 sur le noyau pénème. Bien qu'ils exercent une activité antibactérienne propre à de fortes concentrations, ce sont surtout des inhibiteurs de β -lactamases, par formation de complexes covalents irréversibles aboutissant à l'inactivation du site actif d'un grand nombre de β -lactamases, essentiellement de la classe A d'Ambler.

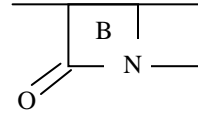
I. 1. 1. 2. Pénèmes (ou carbapénèmes)

Les carbapénèmes dérivent de la thiénamycine, produite naturellement par *Streptomyces cattleya*. Les pénèmes diffèrent des pénèmes par substitution de l'atome du soufre du pentacycle pénème par un atome de carbone (Fig. 1). L'introduction du carbone dans le noyau pentagonale des pénèmes est à l'origine de l'augmentation du pouvoir de fixation des ces molécules aux protéines cibles. Les carbapénèmes sont des antibiotiques peu inactivés par les β -lactamases bactériennes, ils sont cependant biotransformés par les déhydropeptidases rénales chez l'homme et les primates, justifiant leur prescription en association avec des inhibiteurs de ces enzymes, la cilastatine. Pour d'autres carbapénèmes tel que le méropénème, l'adjonction d'un groupe 1- β -méthyl en position 1 permet une protection importante vis-à-vis de l'action de ces enzymes.

I. 1. 1. 3. Clavames (ou oxapénames)

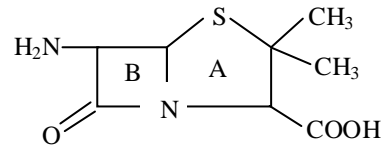
Le noyau clavame dérive du noyau pénème par substitution du soufre en position 1 par un oxygène (Fig.1). Le seul représentant de ce sous groupe, actuellement utilisé est l'acide clavulanique. Ce dernier exerce une activité antibactérienne propre, mais c'est surtout un inhibiteur irréversible de différentes β -lactamases de la classe A. L'acide clavulanique est administré en association avec d'autres β -lactamines, tel que l'amoxicilline ou la ticarcilline, permettant de restaurer leurs activités antibactériennes en présence de souches productrices de β -lactamases.

Cycle commun β -lactame



Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique

Cycle β -lactame (B) + cycle thiazolidine (A)



✓ Pénames (pénicillines)

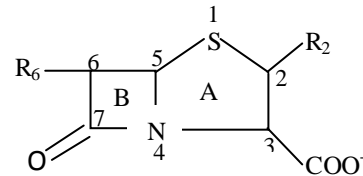
-Pénicillines G et V sensibles aux pénicillinases

-Pénicillines antistaphylococciques résistantes aux pénicillinases : pénicilline M semi-synthétiques

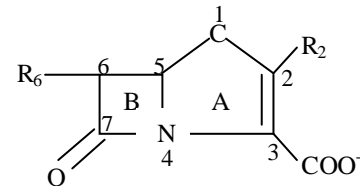
-Pénicillines à large spectre (ampicilline et apparentés) et pénicillines actives sur *P. aeruginosa* (carboxy-et uréido-pénicillines)

-Amidinopénicillines (pivmécillinam)

-Pénicillines sulfones (sulbactam et tazobactam)



✓ Carbapénèmes



✓ Clavames ou oxapénames

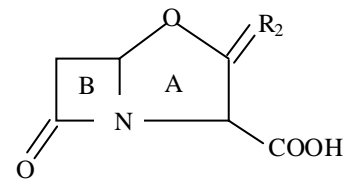


Fig. 1 : Classification des β -lactamines : dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique (Cavallo et *al.*, 2004)

I. 1. 2. Dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique

Les dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique ont un noyau de base associant le cycle β -lactame à un cycle dihydrothiasine pour former un noyau céphème qui distingue les céphalosporines des pénicillines (Fig. 2). La particularité du noyau céphème et les nombreux radicaux de substitution proposés expliquent les propriétés antibactériennes différentes des céphalosporines, justifiant leur distinction en plusieurs générations de spectre et d'intérêt clinique variables. Les céphalosporines actuellement commercialisées sont classées en quatre générations :

- **Les céphalosporines de première génération** ont un spectre d'activité limité aux cocci à Gram positif et à quelques entérobactéries ne produisant pas de céphalosporinases inductibles, elles sont hydrolysées facilement par les β -lactamases acquises. Les principaux produits disponibles dans cette catégorie sont la céfalotine, la céfazoline et la céfapirine pour les formes parentérales, le céfador, le céfadroxil et la céfalexine pour les formes orales.
- **Les céphalosporines de deuxième génération** ont un spectre d'activité un peu élargi au sein des entérobactéries, avec des variations selon les molécules. La céfoxitine et le céfotétan représentent les deux exemples d'antibiotiques dans cette catégorie de céphalosporines.
- **Les céphalosporines de troisième génération** se distinguent par l'augmentation de leur spectre d'activité et par leur stabilité à la plupart des β -lactamases. Cependant, en cas d'hyperproduction de céphalosporinases ou de production de β -lactamases à spectre élargi, ces céphalosporines sont inactivées. Les principales molécules appartenant à cette génération sont le céfotaxime, le ceftriaxone, la ceftazidime et le ceftizoxime administrées par voie parentérale, le céfixime et le céfotiamm utilisées par voie orale. D'autres céphalosporines injectables de troisième génération, dites par certains, de **quatrième génération** (céfépime et ceftirome) ont été également commercialisées. Ces dernières présentent un gain d'activité sur les cocci à Gram positif, une activité sur *P. aeruginosa* et une meilleure résistance à l'hydrolyse par les céphalosporinases hyperproduites.

Plusieurs substitutions ont été réalisées sur les carbones du noyau céphème afin d'avoir des molécules plus stables à l'activité des β -lactamases (R1, R3, R4), des molécules ayant une bonne activité intrinsèque (R1 et/ou R2) ou des molécules ayant une meilleure pharmacocinétique (R2). Suivant les substitutions en R3 et R4 du noyau céphème, on distingue les céphalosporines, les céphamycines et les oxacéphèmes (Fig. 2).

I. 1. 2. 1. Les céphalosporines

Le noyau central céphème associe un cycle β -lactame à un cycle dihydrothiazine caractérisé par la présence d'un atome de soufre en position 1 (Fig. 2). Les substitutions du radical R1 en position 7 modifient les propriétés antibactériennes et la stabilité de la molécule. Parmi les exemples de ces substitutions, les α -méthoxy-imino-céphalosporines sont caractérisées par la présence d'un radical α -méthoxy-imino en R1 (céfotaxime, ceftriaxone). D'autres substitutions peuvent être également réalisées sur le radical R2 en position 3, ces substitutions vont essentiellement modifier les propriétés pharmacocinétiques de la molécule tout en pouvant renforcer ses propriétés antibactériennes.

I. 1. 2. 2. Les céphamycines

Les principaux représentants de ce groupe sont la céfoxitine et le céfotétan appartenant aux céphalosporines de deuxième génération. Ces molécules sont caractérisées par un radical α -méthoxy en position 7 qui protège le noyau β -lactame de l'hydrolyse par les β -lactamases, mais qui est responsable d'un effet inducteur intense sur les céphalosporinases

chromosomiques (Fig. 2). Les céphamycines sont actives sur la plupart des entérobactéries, les bactéries anaérobies à Gram négatif et conservent leur activité sur les entérobactéries qui produisent une β -lactamase à spectre élargi.

I. 1. 2. 3. Les oxacéphèmes

Dans ce groupe, l'atome de soufre en position 1 du noyau céphème est remplacé par un atome d'oxygène pour former un noyau dihydro-oxazine (oxacéphème) (Fig. 2). Le noyau oxacéphème permet une meilleure pénétration à travers la paroi des bacilles à Gram négatif et une activité inhibitrice de certaines β -lactamases par analogie de structure avec les clavames.

I. 1. 3. Les monobactames

Le noyau des monobactames se caractérise par la présence du noyau monocyclique, azétidine, limité au cycle β -lactame (Fig. 2). L'aztréonam est le seul monobactame utilisée actuellement. Une série de substitutions latérales sur le noyau monobactame lui confère ses caractéristiques originales (Petitjean et Rosset, 1988). En effet, ces molécules se caractérisent par leur très bonne activité contre les aérobie à Gram négatif et plus particulièrement les entérobactéries en raison de leur bonne stabilité vis-à-vis des β -lactamases.

I. 2. Mécanisme d'action des β -lactamines

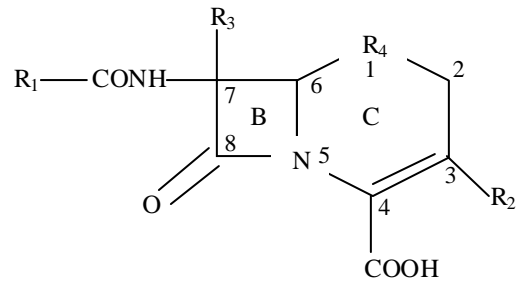
Les β -lactamines exercent leur action inhibitrice sur les bactéries par blocage de la synthèse du peptidoglycane, polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Le peptidoglycane est composé de chaînes linéaires de N-acétyl-D-glucosamine et d'acide N-acétyl muramique reliées entre elles par de courtes chaînes tétrapeptidiques contenant la L-alanine, l'acide D-glutamique, la L-lysine et la D-alanine (Vandenesch et Etienne, 1997 ; Cavallo et *al.*, 2004).

La synthèse du peptidoglycane passe par trois étapes (Philippon et *al.*, 1993 ; Cavallo et *al.*, 2004) : la première est cytoplasmique, elle correspond à la synthèse du précurseur du peptidoglycane, l'uridine diphosphate-N-acétyl-muramyl-pentapeptide (UDP-NAMP). Dans la deuxième étape, l'UDP-NAMP traverse la membrane cytoplasmique grâce à un transporteur lipidique membranaire ; durant cette étape, un deuxième sucre, la N-acétylglucosamine et une chaîne peptidique secondaire qui varie selon les espèces, sont additionnées à l'UDP-NAMP pour former un disaccharide pentapeptide (N-acétylglucosamine-N-acétylmuramique-pentapeptide) dont le motif se répète sur la chaîne du peptidoglycane. La dernière étape est pariétale, elle fait intervenir deux enzymes essentielles, les transglycosylases et les transpeptidases. Les transglycosylases permettent la création de chaînes polysaccharidiques entre les différents disaccharides pentapeptides formés. Ces chaînes polysaccharidiques sont ensuite liées entre elles par les transpeptidases qui clivent le dipeptide D-alanine terminal porté par le disaccharide pentapeptide d'une chaîne polysaccharidique et relie le quatrième peptide D-alanine au troisième peptide d'un disaccharide pentapeptide d'une autre chaîne polysaccharidique.

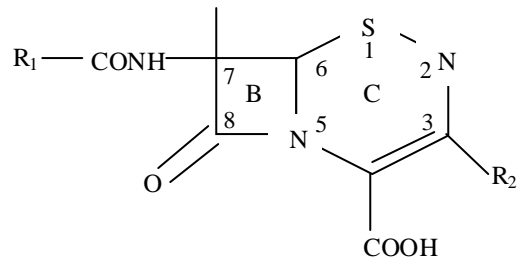
Les β -lactamines agissent en inhibant les transpeptidases, communément dites PLP « protéines liant les pénicillines » ou PBP « *penicillin binding protein* », par analogie structurale entre le noyau β -lactame et le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala du pentapeptide constitutif du peptidoglycane. La reconnaissance des β -lactamines par les PLP, aboutit à une fixation irréversible du cycle β -lactame sur le site actif (généralement une sérine) de ces enzymes cibles. Cette fixation entraîne une ouverture du cycle β -lactame par rupture de la liaison amide et une acylation du site actif sérine avec formation d'un complexe pénicilloyl-

Dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique

Cycle β - lactame B+cycle dihydrothiazine C

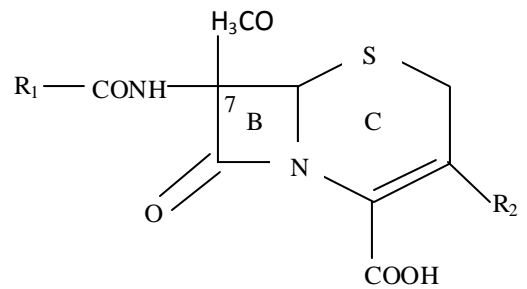


✓ **Céphalosporines**

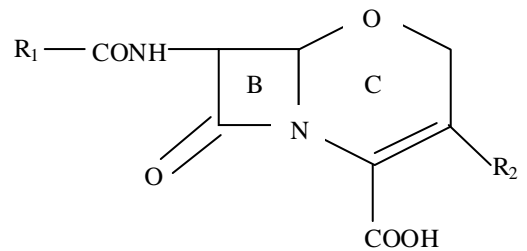


✓ **Céphamycines**

Céfoxitine, céfotétan : radical α -méthoxy en C7



✓ **Oxacéphèmes**



Monobactames

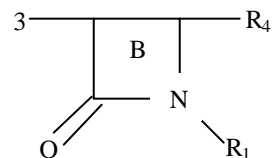


Fig. 2 : Classification des β -lactamines : dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique et monobactames (Cavallo et *al.*, 2004)

enzyme covalent qui aboutit à l'inactivation du site actif de l'enzyme, provoquant l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane et l'arrêt de la croissance bactérienne. Les β -lactamines n'ont en revanche aucune action sur les transglycosylases. L'action bactéricide des β -lactamines sur les bactéries sensibles est liée à une dégradation du peptidoglycane qui conduit à une lyse bactérienne par les autolysines. Ces dernières sont actives au cours de la phase de croissance bactérienne, ce qui explique que les β -lactamines n'ont généralement pas d'action bactéricide sur les bactéries en phase stationnaire, mais uniquement sur celles en phase de croissance (Livermore, 1995 ; Tankovic, 2000 ; Cavallo et al., 2004).

I. 3. Mécanismes de la résistance bactérienne acquise aux β -lactamines

Pour exercer leurs effets bactéricides sur les bactéries, les β -lactamines doivent atteindre leurs cibles « les PLP », situées au niveau de la face externe de la membrane cytoplasmique, en passant par plusieurs barrières (paroi, membrane externe, peptidoglycane bactérien, espace périplasmique). A chacune de ces étapes, la bactérie peut contrecarrer l'action des β -lactamines, en utilisant un ou plusieurs mécanismes de résistance naturels ou acquis. Dans cette partie, nous aborderons les mécanismes de résistance acquis chez les bactéries ; ceux-ci sont de nature enzymatique et/ou non enzymatique.

Les bactéries à Gram négatif combinent plusieurs mécanismes non enzymatiques afin de résister à l'action des β -lactamines, le premier est la diminution de la perméabilité des porines empêchant la pénétration de l'antibiotique à l'intérieur de la cellule. Le second est médié par le système d'efflux actif qui permet à la bactérie de rejeter davantage l'antibiotique dans le milieu extérieur. Enfin, la modification du site de fixation des β -lactamines (PLP) ou l'utilisation par la bactérie de transpeptidases alternatives pour la synthèse du peptidoglycane représentent également un autre mécanismes de résistance non enzymatique chez certaines bactéries, notamment à Gram positif (Livermore et Williams, 1996 ; Moya et al., 2009 ; Russo et al., 2009 ; Kishii et al., 2010 ; Zamorano et al., 2010). Les mécanismes enzymatiques acquis ont en commun la production en grande quantité de β -lactamases, enzymes hydrolysant les β -lactamines (Fig. 3).

I. 3. 1. Mécanismes de résistance non enzymatique

I. 3. 1. 1. Imperméabilité de la membrane externe

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des β -lactamines à travers la membrane externe s'effectue à travers des porines qui sont des canaux protéiques remplis d'eau. L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistances acquises aux β -lactamines, soit par une modification structurale d'une des porines essentielles, soit par une diminution du nombre de porines fonctionnelles (Livermore et Williams, 1996). Deux principales porines ont été décrites chez *E. coli* : une large porine OmpF et une étroite porine OmpC. Les études ont montré que les CMI des molécules β -lactames sont augmentées d'une manière très importante chez les mutants déficients pour les deux porines (Jaffe et al., 1982). Des homologues des porines OmpF et OmpC ont été également décrits chez d'autres espèces d'entérobactéries (*E. cloacae*, *K. pneumoniae*,...etc) (Nikaido, 1985 ; Doménech-Sanchez et al., 1999 ; Nikaido, 2003). La résistance aux β -lactamines par imperméabilité n'affecte pas les bactéries à Gram positif du fait de l'absence de la membrane externe chez ces dernières.

I. 3. 1. 2. Système d'efflux

L'hyperexpression des systèmes d'efflux représente un mécanisme de résistance très répandu et a été décrite chez de nombreuses espèces bactériennes. Cependant, les résistances

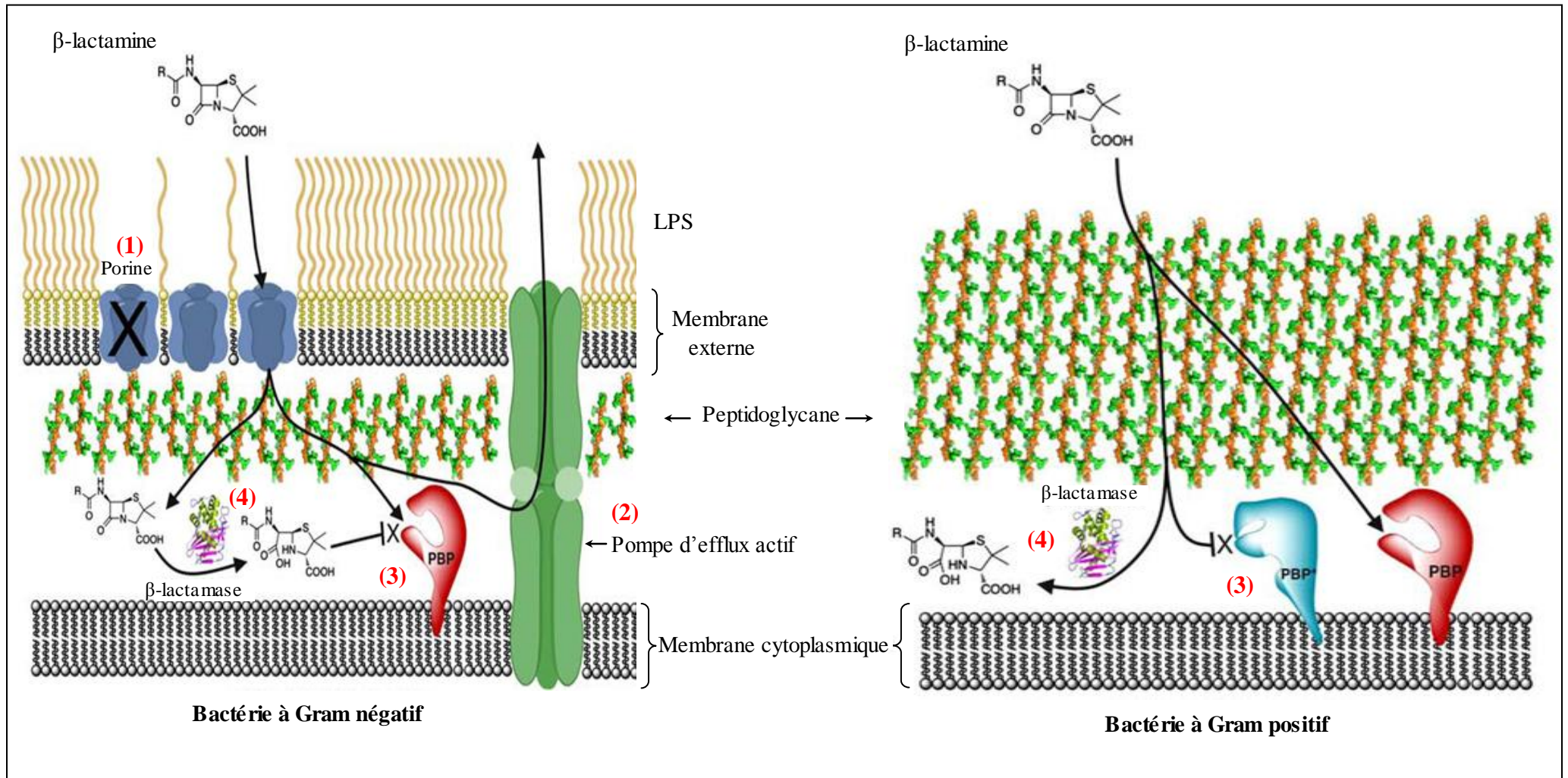


Fig. 3 : Représentation schématique des principaux mécanismes de résistance aux β -lactamines (Larrull et al., 2010)

(1) : Imperméabilité de la membrane externe, (2) : Hyperexpression des systèmes d'efflux actif, (3) : Modification des PLP, (4) : Production de β -lactamases

acquises aux β -lactamines liées à l'hyperexpression de ces systèmes n'ont été décrites que chez les bactéries à Gram négatif comme *E. coli*, *P. aeruginosa* et *N. gonorrhoeae*. Cette hyperexpression fait souvent suite à des mutations survenant dans les gènes des répresseurs qui régulent la transcription de ces systèmes de transport, comme par exemple, le gène *mexR* pour la pompe MexAB-OprM de *P. aeruginosa* ou le gène *mtrR* pour la pompe MtrCDE de *N. gonorrhoeae* (Nikaido, 1998 ; Masuda et al., 2000 ; Veal et al., 2002). D'autre part, chez les entérobactéries comme *E. coli*, l'hyperproduction de l'activateur transcriptionnel MarA « *multiple antibiotic resistance* », qui résulte de la mutation du gène codant le répresseur MarR, est capable à la fois de diminuer la porine OmpF et de stimuler l'expression de nombreux gènes dont certains codent pour des pompes efflux actifs comme le système AcrAB (Nikaido, 1998). Ces systèmes d'efflux sont surtout actifs sur les β -lactamines les plus hydrophobes qui ne passent pas la barrière de la membrane cytoplasmique et s'accumulent dans l'espace périplasmique (Nikaido, 1998 ; Nikaido et al., 1998 ; Mazzariol et al., 2000). Ils agissent en synergie avec la barrière d'imperméabilité de la membrane externe et les β -lactamases constitutives. Leur hyperexpression chez des espèces naturellement peu perméables et possédant une céphalosporinase constitutive AmpC peut conférer des résistances croisées à des antibiotiques appartenant à différentes familles comme les β -lactamines, les quinolones, le chloramphénicol et les tétracyclines (Masuda et al., 2000).

I. 3. 1. 3. Modification des protéines liant la pénicilline « PLP »

La modification des PLP est un mécanisme de résistance très répandu chez les bactéries à Gram positif et certaines bactéries à Gram négatif (Malouin et Bryan, 1986 ; Quinn et al., 1988 ; Oppenheim, 1997). Ces résistances sont dues à des mutations chromosomiques dans les gènes codant les PLP normales ou à l'acquisition de gènes étrangers codant des PLP ayant une faible affinité pour les β -lactamines. On peut ainsi aboutir à des altérations quantitatives et qualitatives des PLP, avec diminution d'affinité pour les β -lactamines, ou à une substitution des PLP cibles par une autre PLP moins affine (Spratt, 1988 ; Mendelmann et al., 1990 ; Rybkine et al., 1998 ; Antignac et al., 2001 ; Hiramatsu et al., 2002 ; Nagai et al., 2002).

I. 3. 2. Mécanismes de résistance enzymatique

La résistance enzymatique vis-à-vis des β -lactamines a pour origine la production de β -lactamases qui constitue de loin le mécanisme le plus répandu chez les bactéries. Les différentes classes de β -lactamases, leurs mécanismes d'action et leur évolution seront développées dans la suite de ce travail.

II. Résistance par production de β -lactamases

Les β -lactamases représentent un groupe hétérogène d'enzymes d'origine bactérienne capables d'inactiver les β -lactamines par hydrolyse du cycle β -lactame, structure de base commune à toutes les β -lactamines (Cavallo et *al.*, 2004). L'identification de la première β -lactamase remonte à 1940, quand Abraham et Chain ont décrit une pénicillinase sécrétée par *Bacillus (Escherichia) coli* avant l'usage clinique de la pénicilline (Abraham et Chain, 1940). Depuis, l'identification de nouvelles β -lactamases n'a cessé d'augmenter, on en compte plus de 850 sur le site lahey « <http://www.lahey.org/Studies/Webt.stm> » (Drawz et Bonomo, 2010).

Les β -lactamases catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame, selon une réaction d'acylation entre la liaison carbonyle de l'antibiotique et le groupement hydroxyle de la sérine du site actif de l'enzyme. Cette réaction aboutit à la formation d'un produit biologiquement inactif qui perd totalement son activité antimicrobienne (Matagne et *al.*, 1998).

II. 1. Classification des β -lactamases

Deux grands schémas de classification des β -lactamases ont été décrits: la classification moléculaire d'Ambler (Ambler, 1980) et la classification fonctionnelle proposée par Bush et *al.* (1995). La classification moléculaire est basée sur la séquence en acides aminés et divise les β -lactamases en 4 classes (de A à D). Les β -lactamases de classes A, C et D utilisent la sérine pour l'hydrolyse du cycle β -lactame tandis que les β -lactamases de la classe B ou métallo-enzymes nécessitent la présence d'ions Zinc divalents au niveau de leur site actif pour hydrolyser leurs substrats (Bush, 1998). La classification fonctionnelle reflète le spectre d'activité de l'enzyme et répartit les β -lactamases en 4 groupes (de 1 à 4) en fonction de leurs profils de substrats et d'inhibition. Cette classification a été mise à jour en 2010, elle propose 3 groupes de β -lactamases: le groupe 1 comprend les céphalosporinases (classe moléculaire C), le groupe 2 (classes moléculaires A et D) regroupe les sérines β -lactamases et le groupe 3 comprend les métallo- β -lactamases (Bush et Jacoby, 2010).

II. 1. 1. Les céphalosporinases (classe moléculaire C)

Ce groupe comprend les céphalosporinases chromosomiques (inductibles et constitutives), les céphalosporinases plasmidiques et les nouvelles céphalosporinases dites à spectre élargi.

II. 1. 2. Les sérines β -lactamases (classes moléculaires A et D)

Ce groupe est de loin le plus vaste, il comprend 12 sous-groupes répartis en 2 classes, A et D. Nous nous contenterons ici de décrire les principaux groupes chez les bacilles à Gram négatif.

II. 1. 2. 1. Les sérines β -lactamases de la classe A

Elles comprennent plusieurs enzymes répartis en différents sous groupes selon la classification de Bush et Jacoby (2010) et dont les principaux chez les bacilles à Gram négatif sont les β -lactamases à large spectre (sous-groupe 2b), les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) (sous-groupe 2be), les β -lactamases à large spectre résistant aux inhibiteurs (sous-groupe 2br), les β -lactamases de type MTC (*Mutants TEM complexes*) (sous-groupe 2ber) et les carbapénémases (sous-groupe 2f).

- **Le sous groupe 2b** rassemble les β -lactamases dites à large spectre qui hydrolysent les pénicillines et les céphalosporines de 1^{ère} génération et qui sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam. Dans ce groupe on retrouve les β -lactamases plasmidiques TEM-1, TEM-2 et SHV-1 identifiées dans les années 1970 et au début des années 1980 (Matthew, 1979 ; Roy *et al.*, 1983).
- **Le sous groupe 2be** comprend les BLSE. Ces enzymes sont actives sur les pénicillines et les céphalosporines comme les β -lactamases du sous groupe 2b, cependant leur activité est également élargie aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G). Les principaux représentants de ce groupe sont les variants mutés de TEM-1, TEM-2 et SHV-1 (Queenan *et al.*, 2004) et les BLSE de type CTX-M découvertes récemment (Bonnet, 2004 ; Walther-Rasmussen et Hoiby, 2004). Contrairement aux BLSE de type TEM et SHV, les CTX-M sont mieux inhibées par le tazobactam que l'acide clavulanique (Bonnet, 2004 ; Walther-Rasmussen et Hoiby, 2004).
- **Les enzymes du sous groupe 2br** sont des β -lactamases à large spectre qui, tout en gardant le spectre d'activité des enzymes du sous groupe 2b, ont acquis la résistance à l'acide clavulanique. Les enzymes appartenant à ce sous groupe sont de type TEM (36 types) et SHV (5 types) (<http://www.lahey.org/Studies/Webt.stm>).
- **Le sous groupe 2ber** est nouveau, il n'existait pas dans la classification de Bush *et al.* (1995), il comprend les variants mutés TEM qui confèrent à la fois le phénotype BLSE et la résistance à l'acide clavulanique (Sirot *et al.*, 1997 ; Robin *et al.*, 2005), ces derniers, désignées CMT « *Complex Mutants TEM* » sont actuellement au nombre de six (TEM-89, -50, -68, -109, -121 et -125), elles ont été découvertes chez *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* et *E. aerogenes* (Fielt *et al.*, 2000 ; Babic *et al.*, 2006).
- **Le sous-groupe 2f** regroupe les β -lactamases de la classe A qui hydrolysent fortement les carbapénèmes, d'où leur dénomination carbapénémases. Ces enzymes sont généralement capables d'hydrolyser les céphalosporines à spectre élargi et l'aztréonam et leur activité est mieux inhibée par le tazobactam que l'acide clavulanique. Elles peuvent être soit chromosomiques (SME, NMC-A, IMI et SFC-1) soit plasmidiques comme certains variants de GES et KPC (Bush et Jacoby, 2010 ; Cuzon *et al.*, 2010).

II. 1. 2. 2. Les sérines β -lactamases de la classe D

Elles comprennent trois sous-groupes : 2d, 2de et 2df, les sous groupes 2de et 2df sont nouveaux et ne figurent pas dans l'ancienne classification de Bush *et al.* (1995).

- **Le sous-groupe 2d** comprend les β -lactamases de la classe D capables d'hydrolyser la cloxacilline ou l'oxacilline, d'où leur dénomination OXA. La plupart de ces enzymes sont inhibées par le NaCl (Bush et Jacoby, 2010).
- **Dans le nouveau sous-groupe 2de**, sont retrouvées les enzymes OXA dont le spectre d'activité est élargi aux C3G. La plupart de ces enzymes dérivent de OXA-10 par substitution de 1 à 9 acides aminés. Elles ont été principalement retrouvées en Turquie et en France (Bradford, 2001). Ces enzymes confèrent généralement une résistance plus prononcée à la ceftazidime qu'au céfotaxime ou l'aztréonam.
- **Le sous-groupe 2df** est également nouveau, il s'agit d'enzymes OXA douées d'une activité hydrolytique des carbapénèmes et qui ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. Ces enzymes sont fréquemment rencontrées chez *A. baumannii* et sont généralement chromosomiques (Walther-Rasmussen et Hoiby, 2006). Certaines comme OXA-23 et OXA-

48 ont été identifiées chez les entérobactéries et sont codées par des gènes plasmidiques (Bush et al., 1995 ; Poirel et al., 2004).

II. 1. 3. Les métallo- β -lactamases

Les métallo- β -lactamases représentent un groupe unique du point de vue structural et fonctionnel. Elles diffèrent des autres β -lactamases par la présence d'un ou deux ions Zinc sur leur site actif. Leur importance clinique est liée au fait qu'elles hydrolysent préférentiellement les carbapénèmes. Contrairement aux sérines β -lactamases, les métallo- β -lactamases ont une faible activité hydrolytique contre les monobactames et sont insensibles à l'inhibition par l'acide clavulanique et le tazobactam. Par contre, elles sont sensibles à l'action de certains chélateurs tels que l'EDTA, à l'acide dipicolinique et le 1,10- α -phenanthroline (Laraki et al., 1999 ; Marchiaro et al., 2008).

II. 2. Evolution de la résistance aux β -lactamines à large spectre

L'introduction vers les années 1980, des β -lactamines à large spectre, plus stables aux β -lactamases, comme les céphamycines, les C3G, les monobactames et les carbapénèmes, a conduit à l'émergence de la résistance à ces nouvelles molécules. Cette résistance s'est manifestée d'abord chez les organismes naturellement producteurs de céphalosporinases AmpC, par émergence de mutants hyperproducteurs de ces enzymes qui confèrent la résistance aux céphamycines, aux C3G ainsi qu'aux monobactames (Sanders, 1987). Puis, sont apparues chez les espèces dépourvues des enzymes AmpC comme *K. pneumoniae*, les BLSE de la classe A (Philippon et al., 1989 ; Jacoby et Medeiros, 1991) ; celles-ci sont pour la plupart, des variants mutés des pénicillinases TEM-1 ou SHV-1 qui confèrent la résistance aux C3G et aux monobactames mais pas aux céphamycines et qui sont sensibles à l'effet inhibiteur du clavulanate, sulbactam ou tazobactam, généralement sans effet sur les enzymes de la classe C. L'utilisation des céphamycines et l'introduction en clinique des associations clavulanate/amoxicilline ou ticarcilline, sulbactam/ampicilline et tazobactam/piperacilline ont conduit à l'émergence de céphalosporinases plasmidiques de la classe C, apparues depuis 1988 (Medeiros, 1997 ; Philippon et Arlet, 1997). Comme leurs homologues chromosomiques, les céphalosporinases plasmidiques ont un spectre d'activité plus large que les BLSE et sont insensibles à l'effet des inhibiteurs commercialisés. L'utilisation des carbapénèmes, traitement de choix pour les infections sévères dues aux entérobactéries productrices de BLSE, a conduit également à l'émergence de souches de bactéries qui en sont résistantes. Cette résistance est principalement due à deux mécanismes, le premier associe la production d'une céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique) ou d'une BLSE à une diminution de la perméabilité membranaire, le second met en jeu des β -lactamases hydrolysant fortement les carbapénèmes (carbapénémases) (Qeenan et Bush, 2007).

II. 2. 1. Les céphalosporinases

II. 2. 1. 1. Les céphalosporinases chromosomiques

Il s'agit de β -lactamases chromosomiques qu'on retrouve chez la plupart des *Enterobacteriaceae* et quelques autres espèces bactériennes (Jacoby, 2009). Elles sont plus actives sur les céphalosporines que sur la benzylpénicilline et sont généralement résistantes à l'effet inhibiteur de l'acide clavulanique, ces enzymes sont également actives sur les céphamycines comme la céfoxitine et ont une très grande affinité à l'aztréonam (Bush et al., 1982 ; Bush, 1988).

Chez plusieurs espèces bactériennes comme *C. freundii* et *E. cloacae*, l'expression des β -lactamases AmpC est faible mais inductible en présence de certaines β -lactamines, chez d'autres comme *E. coli*, l'expression est constitutive (Jacoby, 2009).

L'expression des céphalosporinases inductibles se fait selon un mécanisme faisant intervenir en plus de la céphalosporinase AmpC, une perméase AmpG, une amidase AmpD, un régulateur transcriptionnel AmpR et un agent inducteur (céfoxitine ou imipénème) (Fig. 4) (Honoré et al., 1986 ; Lindberg et al., 1987 ; Lindquist et al., 1993 ; Jacobs et al., 1995 ; Hanson et Sanders, 1999). La perméase AmpG est chargée du transport des mucopeptides (produits de dégradation du peptidoglycane) du périplasma vers le cytoplasme, ce transport fait partie du processus de recyclage de la paroi cellulaire lors de la croissance bactérienne. En présence de β -lactamines, les mucopeptides présents en excès dans le cytoplasme, ne peuvent être tous dégradés par l'amidase AmpD, ils agissent de ce fait comme cofacteurs dans le phénomène d'induction de l'expression des gènes *bla*_{AmpC}.

Chez *E. coli*, le gène *ampR* codant le régulateur AmpR est absent, sa β -lactamase chromosomique AmpC est sous la dépendance d'un promoteur faible et d'un atténuateur transcriptionnel, ce qui explique son expression constitutive à bas niveau (Caroff et al., 2000).

L'hyperproduction des céphalosporinases chromosomiques confère la résistance à la plupart des β -lactamines excepté le céfepime, le ceftiofime et les carbapénèmes (Thomson et Smith Moland, 2000). Ces derniers pénètrent de façon très efficace à travers la membrane externe des bactéries à Gram- et sont généralement de mauvais substrats pour les β -lactamases AmpC (Hancock et Bellido, 1996). Chez *E. cloacae*, l'hyperproduction des céphalosporinases est due à des mutations dans des gènes régulateurs dont *ampD* (Hanson et Sanders, 1999) tandis que chez *E. coli*, l'hyperproduction résulte de mutations spontanées affectant la région promotrice du gène *bla*_{AmpC} (Caroff et al., 2000 ; Mulvey et al., 2005). En présence d'autres mécanismes de résistance (impermeabilité membranaire), l'hyperproduction des céphalosporinases chromosomiques peut conférer une résistance élargie aux carbapénèmes (Bradford et al., 1997 ; Jacoby et al., 2004 ; Quale et al., 2006).

II. 2. 1. 2. Les céphalosporinases plasmidiques

Elles ont été rapportées suite à l'émergence de souches productrices de céphalosporinases chez des espèces habituellement dépourvues du gène *bla*_{AmpC} (Medeiros, 1997 ; Philippon et Arlet, 1997).

Les premières études rapportant des céphalosporinases plasmidiques ont été publiées par Bobrowski et al. (1976), Levesque et al. (1982) et Knothe et al. (1983). En 1989, Bauernfeind et ses collaborateurs ont rapporté le transfert de la résistance à la céfoxitine et au céfotetan, aux pénicillines, aux C3G et aux monobactames d'une souche de *K. pneumoniae* à *E. coli* (Bauernfeind et al., 1989). Cette enzyme fut appelée CMY-1 pour son activité céphamycinase, elle est plus sensible à l'inhibition par le sulbactam que l'acide clavulanique ou le tazobactam laissant suggérer son appartenance à la classe C. Cependant, la première preuve de l'existence d'une β -lactamase plasmidique de la classe C a été apportée par Papanicolaou et al. (1990) qui ont rapporté un transfert de résistance aux céphamycines et aux C3G médiée par une enzyme qui fut nommée MIR-1 présentant un pourcentage d'identité de 90 % avec le gène *bla*_{AmpC} de *E. cloacae*.

Par la suite, plusieurs types de β -lactamases plasmidiques de la classe C ont été décrits et désignés différemment selon leur profil de résistance (CMY, FOX, MOX ou LAT), leur type de β -lactamase (ACT, ACC), leur site de découverte (MIR-1, DHA) et le nom du patient chez qui ils ont été retrouvés (BIL-1) (Philippon et al., 2002). La majorité de ces enzymes ont été

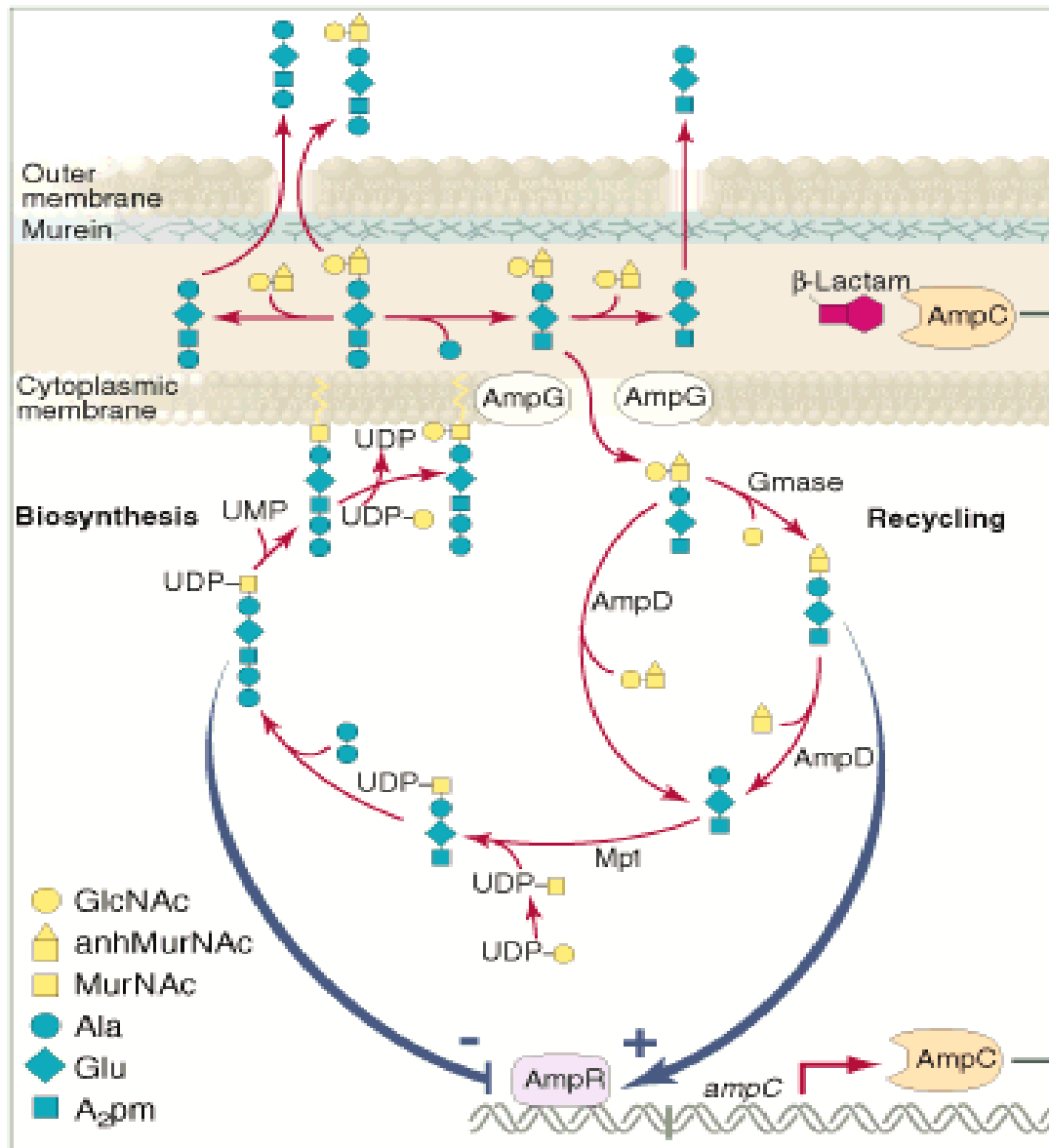


Fig. 4 : Modèle de voie de régulation des céphalosporinases AmpC inducibles d'après Jacobs (1997)

Selon ce modèle, AmpR joue un double rôle dans la régulation de l'expression de l'opéron céphalosporinase. En absence de β -lactamine inductrice, AmpR agit comme répresseur du gène *bla*_{AmpC} en fixant l'UDP-MurNAc-pentapeptide, un précurseur du peptidoglycane. En présence de β -lactamine inductrice, AmpR agit comme activateur en fixant les muropeptides, produits de dégradation du peptidoglycane non clivés par l'amidase.

rapportées chez des souches nosocomiales de *E. coli* et de *K. pneumoniae* (Barnaud et al., 1998), elles ont été également détectées chez d'autres espèces d'entérobactéries (Gazouli et al., 1996) dans plusieurs zones géographiques du monde : le Royaume uni, les Etats-Unis, l'Asie, l'Afrique y compris l'Algérie (Lee et al., 2005 ; Moland et al., 2006 ; Koh et al., 2007 ; Pitout et al., 2007 ; Woodford et al., 2007 ; Iabadene et al., 2009).

Les gènes *bla*_{AmpC} plasmidiques dérivent de leurs homologues chromosomiques suite à une mobilisation via des séquences IS, notamment *ISEcp1* qui semble aussi impliquée dans leur hyperexpression grâce au promoteur fort qu'elle leur fournit (Fig. 5) (Cao et al., 2002 ; Philippon et al., 2002). Pour certains gènes (MOX-1, CMY-1 et DHA-1) la mobilisation implique les séquences *ISCR*, ceux-ci ont été retrouvés associés aux intégrons complexes de classe 1 sous forme de gènes non cassettes localisés en aval de ces séquences (Fig. 6) (Doi et al., 2002 ; Philippon et al., 2002). Les gènes *bla*_{AmpC} chromosomiques de certaines espèces d'entérobactéries comme *E. aerogenes*, *S. marcescens*, *Proteus* spp. à indole-positive et *E. coli* n'ont jamais été détectés sur des plasmides (Bauernfeind et al., 1998). Vingt neuf gènes de céphalosporinases plasmidiques ont été identifiés (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>), ils sont répartis en 6 groupes sur la base de leur pourcentage de similarité: MOX (origine : *Aeromonas*, comprend MOX, CMY-1, -8, -9, -10, -11 et -19), CIT (origine : *C. freundii*, comprend les autres types de CMY), DHA (origine : *M. morgani*), ACC (origine : *H. alvei*), EBC (origine : *E. cloacae*) et FOX (origine inconnue) (Jacoby, 2009).

L'expression des céphalosporinases plasmidiques est constitutive dans la majorité des cas du fait de l'absence des gènes *ampR* plasmidiques. Cependant, depuis 1998, trois gènes *bla*_{AmpC} plasmidiques inductibles ont été rapportés : *bla*_{DHA-1}, *bla*_{DHA-2} et *bla*_{ACT-1} (Barnaud et al., 1998 ; Fortineau et al., 2001). L'organisation de ces gènes est similaire à celle de leurs homologues chromosomiques, avec la présence de *ampR* codé par une unité de transcription divergente (Fig. 6).

L'Hyperexpression des céphalosporinases plasmidiques en absence de *ampR* serait due à leur localisation sur des plasmides multi-copies (Bush, 2001) et à l'absence de régulation par AmpR (Lindberg et al., 1985 ; Poirel et al., 1999a).

II. 2. 1. 3. Les céphalosporinases à spectre élargi

Récemment, un nouveau mécanisme de résistance due à la production de céphalosporinases à spectre élargi (ESAC pour « *Expanded-Spectrum AmpC β -lactamases* ») a été rapporté chez différentes souches cliniques de *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens* et *E. coli* (Mammeri et Nordmann, 2007). Les ESAC confèrent une sensibilité diminuée à toutes les céphalosporines y compris le céfépime et le ceftiprome ; elles correspondent à des variants mutés des céphalosporinases chromosomiques par substitutions, insertion ou délétion de certains acides aminés au voisinage du site actif (Mammeri et al., 2007). Parmi ces enzymes, on cite GC1 (Nukaga et al., 1995), CMY-10 (Lee et al., 2003), CMY-19 (Wachino et al., 2006) et CMY-37 (Ahmed et Shimamoto, 2008).

II. 2. 2. Les β -lactamases à spectre élargi « BLSE »

Les BLSE constituent un groupe d'enzymes qui confèrent la résistance aux pénicillines, aux céphalosporines y compris celles de 3^{ème} et 4^{ème} génération et aux monobactames. Cependant, elles ne sont pas actives sur les céphamycines et les carbapénèmes et elles sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases, comme l'acide clavulanique (Livermore, 2008).

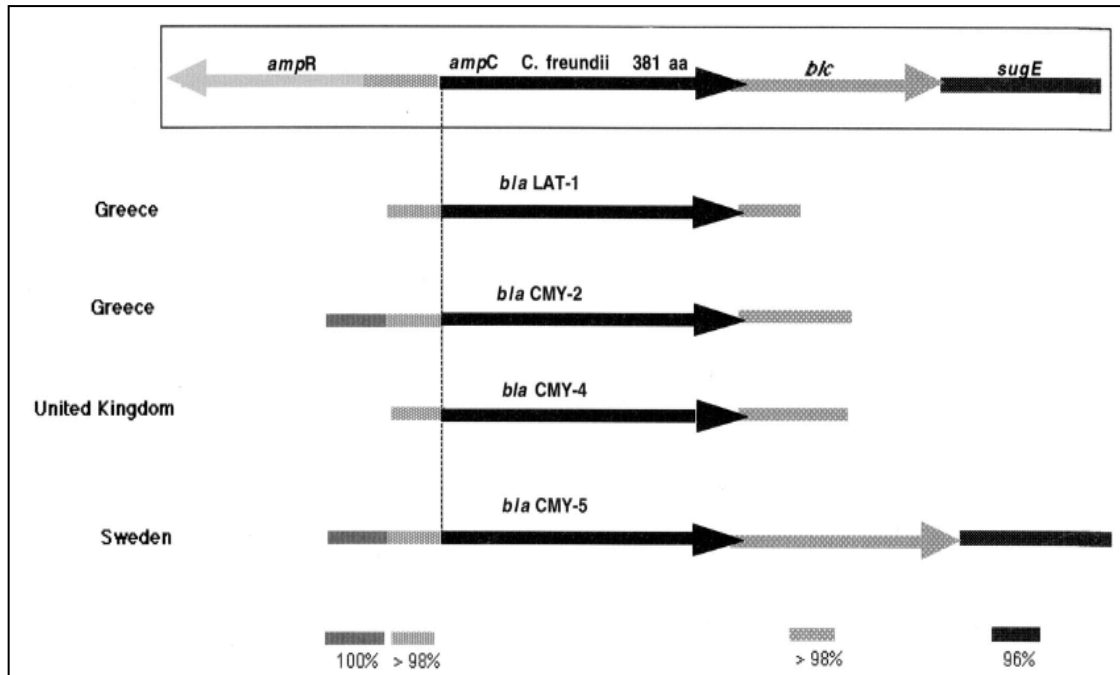


Fig. 5 : Organisation des gènes de céphalosporinases AmpC plasmidiques du groupe CIT dérivés du gène *bla*_{AmpC} chromosomique de *C. freundii* (Philippon et al., 2002)

La figure montre que l'homologie de séquence des gènes *bla*_{AmpC} plasmidiques à leur homologue chromosomique est supérieure à 94 %. L'environnement des gènes *bla*_{AmpC} plasmidiques est similaire à celui du gène *bla*_{AmpC} chromosomique, tous deux sont adjacents aux gènes *blc* et *sugE*. Le gène *ampR*, présent au niveau de l'opéron *ampC* chromosomique est absent dans l'opéron plasmidique, il est remplacé par une séquence IS putative qui serait impliquée dans la mobilité et l'hyperexpression des gènes *bla*_{AmpC}.

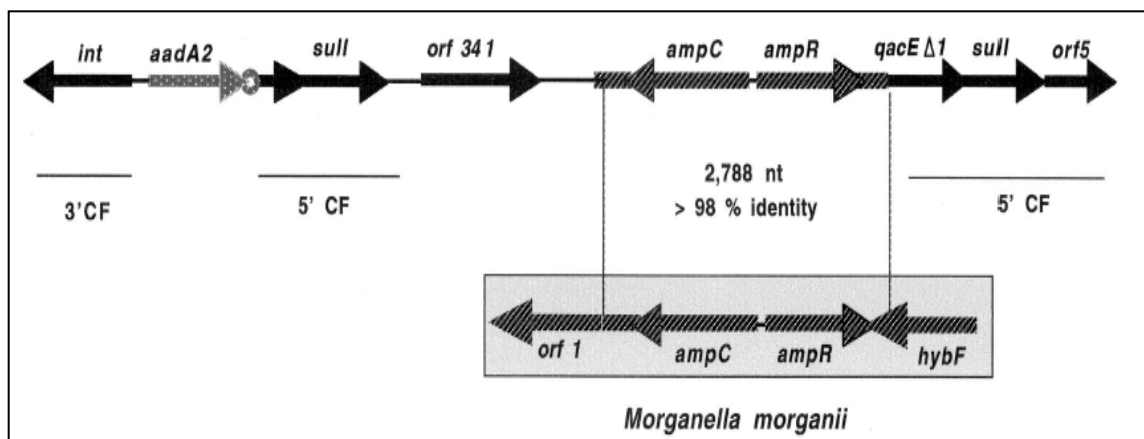


Fig. 6 : Structure de l'intégon complexe de classe 1 porteur du gène *bla*_{DHA-1} sous forme de gène non cassette au sein de la duplication de la région 3'-CS (Philippon et al., 2002)

L'organisation du gène *bla*_{DHA-1} est similaire à celle du gène *bla*_{AmpC} chromosomique de *M. morganii*. La séquence ISCR (orf 341) serait impliquée dans la mobilisation plasmidique des gènes *bla*_{AmpC} et *ampR* chromosomiques, d'où l'expression inductible de DHA-1.

II. 2. 2. 1. BLSE de types TEM et SHV

Jusqu'à la fin des années 90, les BLSE étaient principalement identifiées chez des souches de *K. pneumoniae* en milieu hospitalier. Ces enzymes dérivait des pénicillinases à spectre restreint TEM-1, TEM-2 et SHV-1 dont l'activité était élargie par la sélection de mutations ponctuelles au niveau du site actif (Carrer et Nordmann, 2009).

La première BLSE de type TEM (TEM-3) a été décrite en 1987, chez des souches cliniques de *K. pneumoniae* isolées en France. TEM-3 diffère de TEM-2 par la substitution de deux acides aminés (Sougakoff et al., 1988). Depuis, plusieurs autres β -lactamases dérivées de TEM-1 et TEM-2 ont été rapportées ; à l'heure actuelle, leur nombre est estimé à plus de 100 enzymes (<http://www.lahey.org/studies/Webt.stm>). Les principales mutations responsables du phénotype BLSE sont : Glu104Lys, Arg164Ser/His, Gly238Ser, Glu240Lys (Bradford, 2001).

La découverte des BLSE de type SHV remonte à 1983 quand une β -lactamase ayant une activité catalytique sur le céfotaxime et à faible degré sur la ceftazidime a été découverte chez des souches de *K. ozaenae* (Knothe et al., 1983). Celle-ci diffère de SHV-1 par la substitution Gly238Ser donnant lieu à un variant SHV-2 ayant des propriétés BLSE. Les BLSE de type SHV sont actuellement au nombre de 100 variants (www.lahey.org/studies/Webt.stm), détectés parmi de nombreuses souches d'entérobactéries, notamment *K. pneumoniae*, mais aussi chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. (Bradford, 2001 ; Paterson et Bonomo, 2005).

II. 2. 2. 2. BLSE non TEM non SHV

II. 2. 2. 2. 1. Type CTX-M

Les premières souches de *E. coli* communautaires productrices de BLSE de type CTX-M ont été identifiées au début des années 2000 (Pitout et al., 2005 ; Livermore et al., 2007). Très rapidement, des infections nosocomiales due à *E. coli* productrices de CTX-M ont été mondialement décrites (Kassis-Chikhani et al., 2004 ; Pai et al., 2006).

Les BLSE de type CTX-M sont différentes des BLSE de type TEM et SHV (pourcentage d'identité < 40 %) (Bonnet, 2004). Ces enzymes, au nombre de plus de 50, sont subdivisées en six sous-groupes phylogénétiquement distincts : CTX-M1, -2, -8, -9, -25 et -45 (Rossolini et al., 2008). Elles doivent initialement leur dénomination pour leur plus forte hydrolyse du céfotaxime que les autres C3G ; néanmoins, Certains variants hydrolysent plus fortement la ceftazidime, c'est le cas de CTX-M15 qui dérive de CTX-M3 par mutation ponctuelle en position 240 (Poirel et al., 2002a). Les β -lactamases CTX-M sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases tels que l'acide clavulanique et le tazobactame (Bush et al., 1993).

Les enzymes CTX-M semblent dériver des β -lactamases chromosomiques des espèces du genre *Kluyvera* suite à leur mobilisation par différents éléments génétiques, notamment les séquences d'insertion (Humeniuk et al., 2002 ; Poirel et al., 2002b). En effet, des séquences *ISEcp1*-like ont été retrouvées associées à la majorité des gènes des groupes CTX-M1, -2 et -9 (Levesque et al., 1994 ; Canton et Coque, 2006). Certains gènes *bla*_{CTX-M} ont été trouvés flanqués par des séquences IS de type IS26 et IS903 et d'autres dans des structures complexes d'intégrons de classe 1 près des séquences *ISCR1* (Olivier et al., 2001 ; Cao et al., 2002 ; Garcia et al., 2005 ; Canton et Coque, 2006).

II. 2. 2. 2. 2. Autres types

En plus des CTX-M, on assiste également à une émergence d'autres enzymes BLSE non TEM non SHV comme OXA et VEB.

- **OXA** : les β -lactamases de type OXA sont caractérisées par une forte activité hydrolytique des pénicillines M (oxacilline et cloxacilline) en plus de leur capacité à conférer la résistance à l'ampicilline et la céfalotine ; de plus, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique (Paterson et Bonomo, 2005). Détectées principalement chez *P. aeruginosa*, ces enzymes ont été également retrouvées chez d'autres bactéries à Gram négatif (Livermore, 1995 ; Weldhagen *et al.*, 2003). Bien que la plupart des β -lactamases de type OXA n'hydrolysent pas de façon significative les céphalosporines à spectre élargi, certains variants (BLSE OXA) montrent un spectre élargi aux C3G, il s'agit principalement de OXA-11, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -28, -31, -32, -35, et -45 (Toleman *et al.*, 2003). Les gènes de BLSE OXA sont principalement portés par les intégrons de classe 1 aussi bien chez *P. aeruginosa* que certaines espèces d'entérobactéries comme *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium et *E. aerogenes* (Weldhagen, 2004).
- **VEB** : VEB-1 a été le premier membre VEB découvert chez une souche de *E. coli* MG-1 isolée d'un patient vietnamien, d'où la dénomination « *Vietnamese extended β -lactamase* ». Il s'agit de la première β -lactamase de classe A qui a été trouvée codée par un gène cassette inséré dans un intégron de classe 1 porté par un plasmide conjugatif (Poirel *et al.*, 1999b). Des études ultérieures ont rapporté la présence du gène *bla*_{VEB-1} chez différentes espèces bactériennes isolées dans divers pays (Zong *et al.*, 2009). Huit autres gènes cassettes *bla*_{VEB} (1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6 et 7) ont été décrits (www.lahey.org/studies/Webt.stm), ce sont des variants mineurs de *bla*_{VEB-1} dont le support génétique est plasmidique mais aussi chromosomique. Les gènes cassettes *bla*_{VEB-1a}, *bla*_{VEB-1b} et *bla*_{VEB-6} se distinguent des autres gènes *bla*_{VEB} par leur localisation en dehors de la région variable des intégrons de classe 1, au sein d'une structure complexe impliquant des duplications d'éléments répétés et de régions 3'-CS (Aubert *et al.*, 2004 ; Aubert *et al.*, 2005 ; Zong *et al.*, 2009). Ces derniers seraient impliqués dans leur mouvement par recombinaison homologue et dans leur hyperexpression (Aubert *et al.*, 2004 ; Zong *et al.*, 2009).

II. 2. 3. Les carbapénèmases

Les carbapénèmases décrites chez les entérobactéries sont soit des métallob- β -lactamases (classe B), soit des oxacillinases à spectre étendu (classe D), soit des β -lactamases dont l'activité est inhibée par l'acide clavulanique (classe A) (Queenan et Bush, 2007). Les métalloenzymes sont essentiellement des enzymes de type IMP ou VIM responsables d'épidémies hospitalières sévères dans certains pays, particulièrement en Asie et en Europe du Sud (Loli *et al.*, 2006). L'oxacillinase OXA-48 a été décrite majoritairement chez des souches de *K. pneumoniae*, en particulier en Turquie et plus récemment au Liban et en Belgique (Carrer *et al.*, 2008 ; Cuzon *et al.*, 2008 ; Matar *et al.*, 2008). Parmi les carbapénèmases inhibées par l'acide clavulanique, les plus importantes sont celles à codage plasmidique. Parmi ces dernières, les plus répandues chez les entérobactéries sont les enzymes de type KPC, celles-ci ont été principalement décrites chez *K. pneumoniae*, elles possèdent un pouvoir de dissémination important et sont émergentes dans de nombreux pays (Nordmann *et al.*, 2009). Nous évoquerons dans la suite de ce paragraphe un bref historique sur les premières découvertes des enzymes KPC, leur spectre d'hydrolyse, leur épidémiologie et enfin leur support génétique.

- **Première découverte** : La première carbapénèmase de type KPC, KPC-1 (ou KPC-2), a été décrite chez une souche de *K. pneumoniae* isolée en 1996 en Caroline du Sud (Yigit *et al.*, 2001). Cette enzyme confère la résistance à toutes les β -lactamines et est codée par un gène localisé sur un plasmide non conjugatif. Huit autres variants ont été également rapportés (KPC-3 à KPC-10), ils se distinguent par au moins deux substitutions d'acides aminées (www.lahey.org/Studies/Webt.stm).

- **Spectre d'hydrolyse** : les enzymes de type KPC ont un spectre d'hydrolyse comparable à celui des BLSE (hydrolyse des céphalosporines exceptées les céphamycines et sensibilité à l'acide clavulanique) avec, en plus, une extension aux carbapénèmes (Cuzon et *al.*, 2010).
- **Epidémiologie** : depuis le début des années 2000, les souches d'entérobactéries productrices d'enzymes KPC ont d'abord été décrites dans l'est des Etats-Unis, puis ont été rapidement disséminées dans de nombreuses régions du monde où elles ont été décrites chez plusieurs espèces d'entérobactéries mais également chez *P. aeruginosa*. Ces souches sont essentiellement responsables d'infections systémiques nosocomiales (Cuzon et *al.*, 2010).
- **Support génétique** : l'environnement génétique des gènes *bla_{KPC-2}* de plusieurs souches de *K. pneumoniae* et de *P. aeruginosa* d'origines géographiques diverses a montré leur association au transposon Tn4401, un transposon de type Tn3, long de 10 kb. Tn4401 est flanqué par une duplication de 5 pb du site cible dont la séquence est variable, ce qui explique son insertion dans différentes ORF localisées sur différents plasmides (Fig. 7). La Fig. 8 montre le modèle de la mobilisation des gènes *bla_{KPC-2}* et de leur insertion sur divers plasmides (Naas et *al.*, 2008).

L'étude de la région génétique encadrant le gène *bla_{KPC-3}* a montré sa localisation sur le transposon Tn4401. Cependant, ce dernier est à son tour inséré dans un autre transposon Tn1331 au niveau duquel un gène *qnrB19* (déterminant de résistance aux fluoroquinolones) mobilisé par la séquence *ISEcpI*, est également intégré. Tn1331 possède également plusieurs gènes de résistance aux aminosides ainsi que d'autres gènes de β -lactamases. Cette structure génétique complexe, portée par le plasmide pLRM24, offre la possibilité d'un co-transfert de résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones entre souches bactériennes (Rice et *al.*, 2008).

A la différence des autres gènes *bla_{KPC}*, le gène *bla_{KPC-5}* a été trouvé associé au transposon Tn5563 qui semble être responsable de la mobilisation et de l'hyperexpression de ce gène (Wolter et *al.*, 2009).

II. 3. Résistances à d'autres familles d'antibiotiques « les quinolones »

La résistance par production de β -lactamases peut être associée à la résistance à d'autres familles d'antibiotiques, notamment les quinolones (Strahilevitz et *al.*, 2009).

Les quinolones sont une des principales familles d'antibiotiques utilisées en thérapeutique humaine. Ce sont des antibactériens de synthèse dérivés de l'acide nalidixique, chef de file des quinolones classiques longtemps indiquées dans le traitement des infections urinaires mais qui ont été remplacées dans cette utilisation thérapeutique par les fluoroquinolones, cent fois plus actives (Honoré et *al.*, 2006). Après avoir pénétré à l'intérieur des cellules bactériennes par des protéines de perméabilité spécifiques, ces molécules hydrophiles inhibent les topo-isomérases de type II empêchant leur action dans le déroulement harmonieux de l'ADN qui est nécessaire à sa réplication (Hooper, 2001). Malheureusement, la prévalence de la résistance aux fluoroquinolones a augmenté très rapidement au cours des dix dernières années chez les bactéries responsables d'infections humaines et en particulier les entérobactéries du fait de l'usage intensif et inapproprié de ces antibiotiques en ville et à l'hôpital (Ruiz, 2003 ; Honoré et *al.*, 2006 ; Mérens et Servonnet, 2010 ; www.onerba.org).

II. 3. 1. Mode d'action des quinolones

Pour atteindre leur cible, les quinolones doivent traverser la paroi bactérienne et la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif. Chez les bactéries à Gram négatif, elles doivent aussi traverser la membrane externe, mais cette étape est facilitée par une

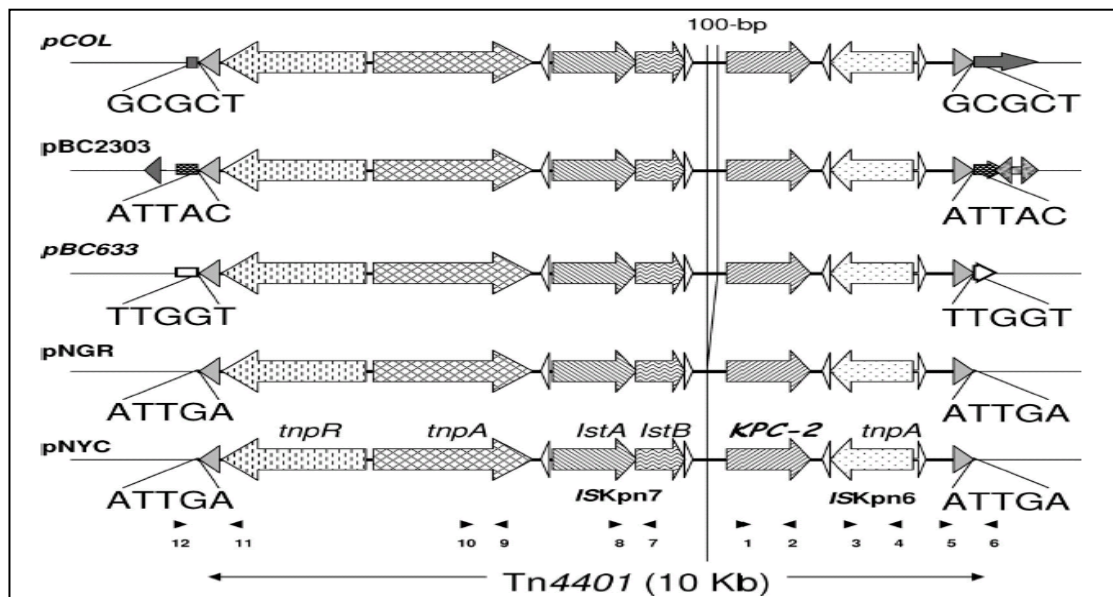


Fig. 7 : Structure du transposon Tn4401 porteur des gènes *bla*_{KPC-2} (Naas et al., 2008)

Tn4401 est délimité par des séquences IR de 39 bp (triangles gris) et porte, en plus du gène *bla*_{KPC}, un gène de transposase (*tnpA*), un gène de résolvasse (*tnpR*) et 2 nouvelles séquences d'insertion IS nommées *ISKpn6* et *ISKpn7*, respectivement, situées immédiatement en aval et en amont de *bla*_{KPC-2}. Les différents isoformes de ce transposon se distinguent par une délétion de 100 ou 200 pb (ligne verticale) en amont du gène *bla*_{KPC-2}

Les duplications du site cible de Tn4401 ainsi que les ORFs interrompues suite à l'insertion de ce transposon sont indiquées

pCOL, pBC2303, pBC633, pNGR et pNYC-1 : plasmides porteurs du transposon Tn4401

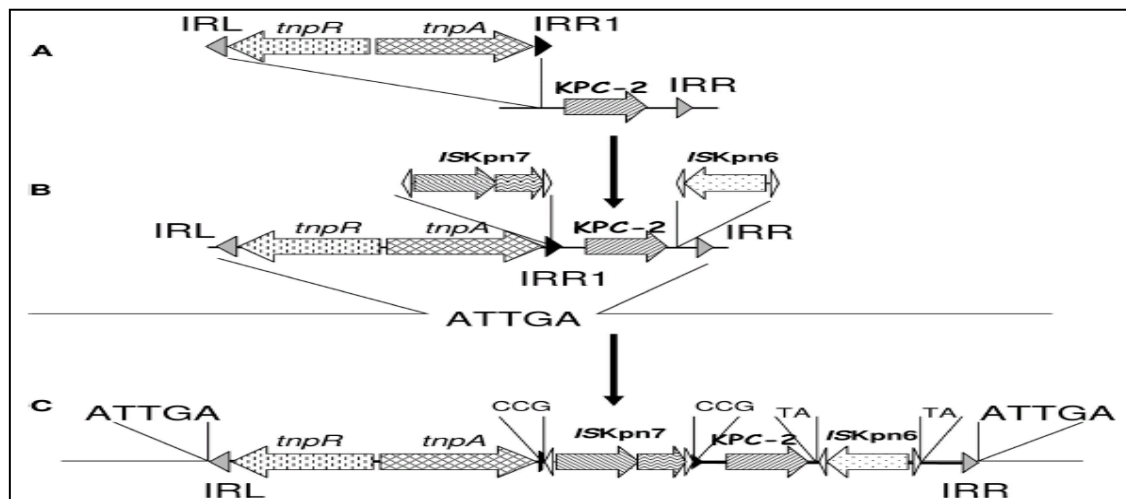


Fig. 8 : Modèle de mobilisation des gènes *bla*_{KPC} (Naas et al., 2008)

La mobilisation des gènes *bla*_{KPC} implique plusieurs étapes :

(A) : Insertion du transposon Tn4401 en amont du gène *bla*_{KPC-2}

(B) : Insertion des séquences *ISKpn6* et *ISKpn7* en aval et en amont du gène *bla*_{KPC-2}

(C) : Transposition du Tn4401 porteur du gène *bla*_{KPC-2} et des séquences d'insertions IS au niveau du site cible

diffusion passive à travers les porines, en fonction de leur degré d'hydrophobicité et de leur poids moléculaire, et éventuellement par un passage direct à travers la double couche phospholipidique. Les quinolones vont alors bloquer la synthèse d'ADN en inhibant les topoisomérases de type II. A cette action bactériostatique s'ajoute une activation du système SOS, secondaire au signal engendré par le blocage de la réplication et l'accumulation d'ADN coupé, responsable de l'effet bactéricide (Mérens et Servonnet, 2010).

Les topoisomérases II (ADN gyrase et topoisomérase IV) sont des enzymes impliquées dans le compactage et la régulation de la conformation de l'ADN lors de la réplication, la transcription et la recombinaison. Il s'agit d'enzymes hétérotétramériques composées de paires de 2 sous-unités : GyrA et GyrB pour l'ADN gyrase et ParC et ParE pour la topoisomérase IV. L'ADN gyrase contrôle le surenroulement de l'ADN et diminue les contraintes topologiques exercées sur cette molécule au cours de la transcription et de la réplication, la topoisomérase IV à une activité de décaténation, permettant la séparation des molécules d'ADN filles à la fin de la réplication (Drlica et Zhao, 1997). Chez les bactéries à Gram négatif, l'ADN gyrase est plus sensible à l'inhibition par les quinolones que la topoisomérase IV, contrairement aux bactéries à Gram positif où la topoisomérase IV est généralement la première cible des quinolones (Jacoby, 2005).

Chez *E. coli*, la sous-unité A de GyrA est constituée de 850 acides aminés et possède deux domaines : le domaine N-terminal (59 kDa) comprend le site catalytique de l'enzyme (tyrosine 122), responsable de la coupure et de la ligature de l'ADN ; le domaine C-terminal (33 kDa) a une structure de type « protéine liant l'ADN » et permet la stabilisation du complexe ADN/ADN gyrase. La sous-unité B (GyrB, 800 acides aminés) comprend un domaine N-terminal permettant la fixation et l'hydrolyse de l'ATP et un domaine C-terminal nécessaire à l'interaction avec la sous-unité GyrA. L'ADN gyrase catalyse la coupure du double brin d'ADN, un segment d'ADN passe à travers cette coupure puis l'ADN coupé est religaturé. L'hydrolyse de l'ATP permet à l'ADN gyrase de revenir à sa conformation initiale (Mérens et Servonnet, 2010).

Les quinolones interagissent avec le complexe ADN/ADN gyrase en formant un complexe ternaire ADN-ADN gyrase-quinolone. L'hypothèse du mode d'action des quinolones est le blocage du changement conformationnel de l'enzyme, l'ADN serait ainsi stabilisé au moment de la coupure et ne pourrait être religaturé (Fig. 9) (Mérens et Servonnet, 2010).

Deux modèles ont été proposés pour expliquer l'effet bactéricide des quinolones (Drlica et Zhao, 1997 ; Strahilevitz *et al.*, 2009). Dans le premier, les complexes Topoisomérase II-fluoroquinolones sont libérés laissant des bouts d'ADN clivés. Cette réaction est sensible à un inhibiteur de la synthèse des protéines (chloramphénicol), suggérant leur nécessité pour cette réaction. Dans le deuxième modèle, les fluoroquinolones, à très hautes concentrations, pourraient provoquer la dissociation des sous-unités des Topoisomérases II ce qui entraînerait la libération de l'ADN doublement coupé. Cette réaction insensible au chloramphénicol, n'impliquerait pas de néosynthèse de protéines (Cm-insensible) (Fig. 10).

II. 3. 2. Mécanismes de résistance aux quinolones

Classiquement, les mécanismes de résistance aux quinolones chez les entérobactéries résultent essentiellement de modifications ponctuelles des cibles, les topoisomérases, et plus rarement d'une diminution de la concentration intracellulaire de ces antibiotiques par imperméabilité membranaire et/ou surexpression des systèmes efflux (Hooper, 2001). Les déterminants de ces mécanismes de résistance sont chromosomiques et ne sont pas associés à des gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques (Nordmann, 2006).

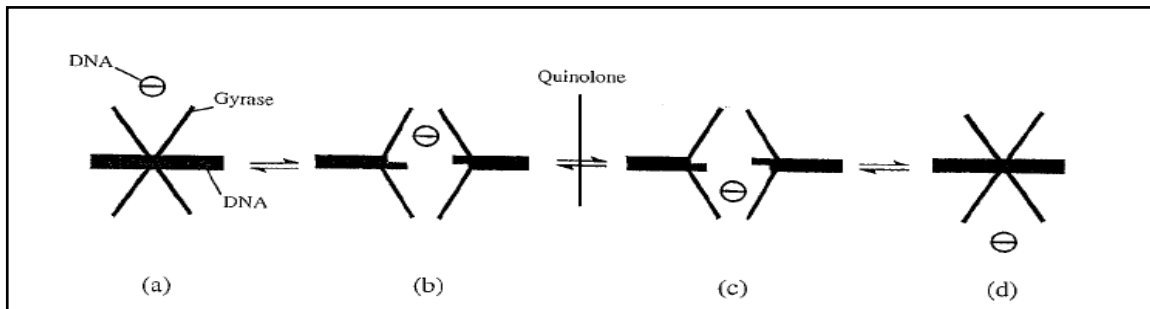


Fig. 9 : Mode d'action des quinolones par blocage de l'ADN gyrase (Drlica et Zhao, 1997)

- (a) : L'ADN gyrase et l'ADN avant la coupure double brin
- (b) : Coupure du premier segment d'ADN par l'ADN gyrase et passage du deuxième segment. Pendant cette étape, l'ADN gyrase subit un changement conformationnel au cours duquel les quinolones agissent et bloquent cette enzyme
- (c) : Passage du deuxième segment d'ADN à travers la coupure du premier segment
- (d) : L'ADN gyrase sous sa conformation initiale

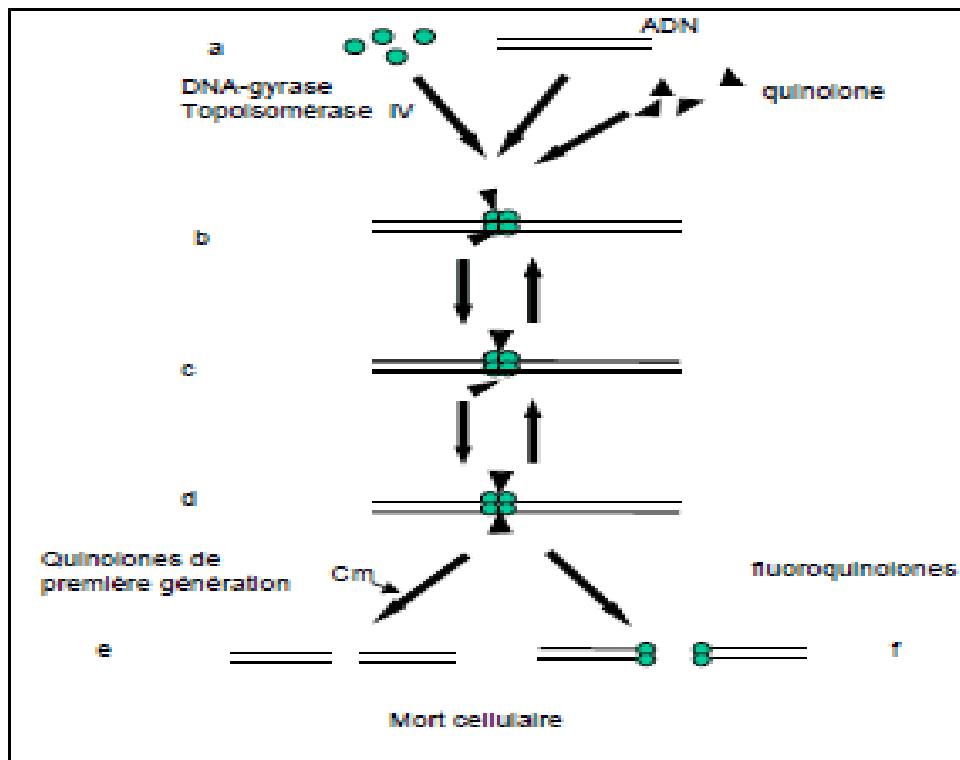


Fig. 10 : Mode d'action des quinolones sur l'ADN gyrase et la topoisomérase VI (Drlica et Zhao, 1997)

- (a) : Formation d'un complexe ternaire entre l'ADN gyrase ou la topoisomérase VI, l'ADN et les quinolones
- (b) : Liaison des quinolones aux sous unités GyrA ou ParC
- (c) : Coupure du premier brin d'ADN
- (d) : Coupure du deuxième brin d'ADN
- (e,f) : Effet bactéricide des quinolones sensibles (e) ou non (f) au chloramphénicol (Cm)

Jusqu'à 1998, il était admis que la résistance aux quinolones était exclusivement chromosomique. Depuis, on a mis en évidence une large diffusion de gènes de résistance aux quinolones au sein d'éléments génétiques mobiles (Martinez-Martinez et al., 1998). En effet, trois familles de gènes de résistance de support plasmidique, transférables horizontalement, ont été décrites ; ces gènes codent pour des produits qui agissent par protection de la cible, par acétylation de l'antibiotique ou pour des systèmes efflux spécifiques (Mérens et Servonnet, 2010). Cette localisation plasmidique explique l'association de ces gènes à des gènes codant la résistance à d'autres familles d'antibiotiques (Nordmann, 2006).

II. 3. 2. 1. Diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique

La diminution de la concentration intracellulaire des quinolones pouvant atteindre la cible peut être liée soit à une imperméabilité par disparition des porines soit à une hyperexpression des pompes efflux. Ce mécanisme entraîne une résistance pour les quinolones hydrophiles et également une résistance (résistance croisée) à d'autres familles d'antibiotiques qui ont les mêmes voies de pénétration ou d'efflux (Honoré et al., 2006).

La disparition des porines fait intervenir l'opéron chromosomique *mar* « *multiple antibiotic resistance* » codant la multirésistance aux antibiotiques. Ce dernier a été décrit chez différentes espèces d'entérobactéries (George et Levy, 1983a et 1983b ; Cohen et al., 1993), Il est constitué de quatre gènes (*marR*, *A*, *B* et *marC*) où seules les fonctions de *marR* et *marA*, codant respectivement un represseur et un activateur de l'opéron, sont connues (Randall et Woodward, 2002 ; Pagès et Garnotel, 2003). L'expression de l'opéron *mar* est induite par certains signaux qui provoquent un changement conformationnel de la protéine MarR diminuant son affinité à l'ADN et levant ainsi la répression de l'opéron. La transcription de cet opéron conduit à la synthèse de la protéine MarA qui induit non seulement l'expression de l'opéron *mar* mais aussi d'une quarantaine de gènes possédant des sites Marbox (sites de liaison de MarA) dont *micF* qui code pour un petit ARN régulateur (*small RNA*). Ce dernier est partiellement complémentaire à l'extrémité 5' de l'ARNm *ompF* (site de liaison des ribosomes) inhibant ainsi sa traduction (Andersen et Delihias, 1990). La résistance aux antibiotiques dont les quinolones, liée à l'expression de l'opéron *mar*, est due à des mutations dans le gène *marR* qui induisent son inactivation (Randall et Woodward, 2002).

Chez *E. coli*, le système efflux AcrAB-ToIC participe à la résistance de bas niveau aux quinolones. Une mutation dans le represseur de ce système (AcrR) ou dans le represseur MarR, entraîne une hyperproduction de la pompe efflux. En effet, en plus de l'induction de *micF*, on a montré que MarA induit l'expression des composants du système efflux AcrAB, permettant l'expulsion des drogues et assurant ainsi une protection non seulement par imperméabilité mais aussi par expulsion (Pagès et Garnotel, 2003).

Récemment, une pompe efflux appartenant à la famille MFS (*Major facilitator Superfamily*) à 14 segments transmembranaires, QepA, spécifique des quinolones et codée par un gène de support plasmidique, a été décrite chez les entérobactéries (Périchon et al., 2007).

Dans tous les cas, ces mécanismes d'efflux confèrent une résistance de bas niveau aux fluoroquinolones, variable selon la molécule, mais pouvant se cumuler avec d'autres mécanismes pour conférer une résistance de haut niveau (Mérens et Servonnet, 2010).

II. 3. 2. 2. Inactivation de l'antibiotique

Ce mécanisme de découverte récente pour les quinolones n'est décrit pour l'instant que chez les entérobactéries, il est lié à la présence d'une enzyme qui acétyle l'atome d'azote présent sur le noyau piperazinyl de certaines quinolones (ciprofloxacine, norfloxacine) ce qui

confère une résistance de bas niveau à ces molécules (Poirel et al., 2008). Cette enzyme, codée par un gène *aac-(6')-Ib-cr* de support plasmidique, est un des variant de la famille *aac-(6')-Ib* connue pour être en cause dans la résistance aux aminosides, son activité sur les quinolones est le résultat de deux substitutions d'acides aminées: Trp102Arg et Asp179Tyr (Calbo et al., 2006 ; Robicsek et al., 2006a).

Le gène *aac (6')-Ib-cr* a été trouvé associé à d'autres déterminants PMQR et à certains gènes de β -lactamases (Soge et al., 2006 ; Jiang et al., 2008 ; Picao et al., 2008 ; Ma et al., 2009 ; Pomba et al., 2009).

II. 3. 2. 3. Protection de la cible

Les quinolones arrivent intactes au niveau de l'ADN gyrase et de la topoisomérase, cependant une protéine, nommée Qnr interfère dans le complexe ADN gyrase/ADN/quinolones et inhibe l'action des quinolones sur leur cible. En présence de la protéine Qnr, les fonctions de l'ADN gyrase sont rétablies (Tran et al., 2005).

La première description des gènes codant les protéines Qnr a été rapportée aux États-Unis en 1998 (Martinez-Martinez et al., 1998). Le plasmide pMG252 porteur de ces gènes et retrouvé chez une souche clinique de *K. pneumoniae* conférait une augmentation jusqu'à 20 fois des concentrations minimales inhibitrices aux quinolones. En 2002, la protéine QnrA de 218 acide-aminés codée par le gène *qnr* a été décrite (Tran et Jacoby, 2002). Quelques années après la découverte du gène *qnrA*, nommée *qnrA1*, cinq autres variants ont été décrits (*qnrA2*, -3, -4, -5 et -6). *qnrA2* diffère de *qnrA1* par 4 acides aminés, il a été rapporté chez une souche de *K. oxytoca* isolée en Chine (Nordmann et Poirel, 2005). Les variants *qnrA3*, -4 et -5 différents de *qnrA1* par 2 à 4 codons ont été décrits chez *Shewanella algae*, une espèce environnementale (Poirel et al., 2005a). Les variants *qnrA3* et *qnrA6* ont été aussi identifiés chez des souches cliniques d'entérobactéries (Cheung et al., 2005 ; Cambau et al., 2006).

Des études ultérieures portant sur la recherche de plasmides codant la résistance transférable aux quinolones ont permis la découverte de 4 protéines similaires à QnrA : QnrS (Hata et al., 2005), QnrB (Jacoby et al., 2006), QnrC (Wang et al., 2009) et QnrD (Cavaco et al., 2009).

- **QnrS** : le premier gène (*qnrS1*) a été décrit en 2003, au Japon, chez une souche de *Shigella flexneri*, à l'origine de toxi-infections alimentaires. Ce gène est porté par un plasmide conjugatif et code pour une protéine de 218 acides aminés appartenant à la famille des pentapeptides et ayant une similarité en acides aminés de 59 % avec QnrA1 (Hata et al., 2005). Deux variants *qnrS*, codant pour des protéines QnrS2 et QnrS3, ont été aussi découverts chez des souches cliniques de *Salmonella enterica* serovar Anatum aux États-Unis et des souches vétérinaires de *E. coli* en Chine, respectivement (Gay et al., 2006 ; Strahilevitz et al., 2009). Récemment, un autre variant *qnrS* (*qnrS4*) a été décrit chez une souche de *Salmonella* isolée au Danemark (Torpdahl et al., 2009).

- **QnrB** : est de loin la famille la plus diversifiée vu le grand nombre de variants qu'elle regroupe. Le premier membre de cette famille, *qnrB1* a été décrit par Jacoby et al. (2006) chez des souches de *K. pneumoniae* isolées en Inde. Ce gène code pour une protéine pentapeptide de 214 acides aminés dont l'identité est de 43 % et 44 % aux protéines QnrA et QnrS, respectivement (Jacoby et al., 2006). Dix huit autres allèles *qnrB* ont été décrits ; ceux-ci diffèrent de *qnrB1* par 2 à plusieurs codons, ils ont été rapportés chez différentes espèces d'entérobactéries isolées dans divers pays y compris l'Algérie (Jacoby et al., 2006 ; Robicsek et al., 2006b ; Quiroga et al., 2007 ; Cattoir et al., 2008 ; Ibadene et al., 2008 ; Jacoby et al., 2008 ; Kehrenberg et al., 2008 ; Touati et al., 2008a ; Meradi et al., 2009).

- **QnrC** : le gène *qnrC* a été découvert chez une souche clinique de *P. mirabilis* transférant la résistance à bas niveau aux quinolones. Ce gène, nommé *qnrC1* est porté par un plasmide de 120 kb, il code pour une protéine de 221 acides aminés présentant une similarité de 64, 41, 59 et 43 % avec QnrA1, QnrB1, QnrS1 et QnrD, respectivement (Wang et al., 2009).
- **QnrD** : le gène *qnrD* a été retrouvé chez des souches de *S. enterica* sur un plasmide transférable de 4.3 kb. Ce gène a une similarité de 48, 61 et 32 % avec *qnrA1*, *qnrB1* et *qnrS1*, respectivement et code pour une protéine de 214 acides aminés (Cavaco et al., 2009).

La dissémination de la résistance aux quinolones est due à leur localisation sur différents plasmides et à leur association à des éléments mobiles. En effet, certains gènes *qnr* comme *qnrA1* et *qnrB2* ont été trouvés sur des intégrons complexes de classe 1 où ils sont associés à la séquence *ISCR1* localisée en aval ou de part et d'autre de ces gènes (Garnier et al., 2006 ; Robicsek et al., 2006c ; Toleman et al., 2006 ; Espedido et al., 2008). Les intégrons porteurs des gènes *qnr* portent des gènes cassettes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques, ils sont localisés sur des plasmides qui codent souvent pour des BLSE et des β -lactamases de type AmpC (Rodriguez-Martinez et al., 2003 ; Pai et al., 2007 ; Chmelnitsky et al., 2008 ; Yang et al., 2008). Certains gènes *qnr*, notamment *qnrB1* ne sont pas associés à la séquence *ISCR1* mais à une autre transposase, appelée Orf 1005 (Jacoby et al., 2006). D'autres gènes *qnr* ont été trouvés localisés dans des éléments génétiques mobiles très complexes, c'est le cas de *qnrB19* retrouvé associé à la séquence *ISEcp1* dans un transposon lui-même inséré dans un autre transposon porteur d'autres gènes de résistance ou d'autres transposons (Cattoir et al., 2008 ; Rice et al., 2008). A la différence des gènes *qnrA* et *qnrB*, les gènes *qnrS* ne sont pas associés à la séquence *ISCR1* et ne sont pas localisés dans les intégrons complexes de classe 1. Ces gènes sont portés par de petits plasmides non conjugatifs non porteurs de gènes de BLSE ou de β -lactamases AmpC (Bonemann et al., 2006 ; Kehrenberg et al., 2007 ; Wu et al., 2007 ; Wu et al., 2008 ; Garcia-Fernandez et al., 2009). L'étude de l'environnement génétique de ces gènes a montré leur localisation au voisinage de la β -lactamase TEM-1 codée par le transposon Tn3 ou d'autres gènes de β -lactamases comme *bla_{LAP-1}* et *bla_{LAP-2}* (Hata et al., 2005 ; Kehrenberg et al., 2006 ; Poirel et al., 2007 ; Garcia-Fernandez et al., 2009). Des séquences IS de type IS2, *ISEc12* et *IS26* ont été aussi rapportés au voisinage de ces gènes (Kehrenberg et al., 2007 ; Poirel et al., 2007).

L'environnement aquatique serait le réservoir des gènes *qnr* et le lieu de leur transfert à d'autres bactéries y compris celles qui sont pathogènes. Cette hypothèse se base sur la mise en évidence, chez les bactéries de cet environnement, de gènes *qnr* chromosomiques (*qnrA*) et plasmidiques (*qnrB* et *qnrS*). S'ajoute à cela, la pression de sélection exercée par les quinolones qui seraient présents dans l'environnement aquatique à des concentrations sub-inhibitrices favorisant les processus de sélection et de transfert, aux entérobactéries, des déterminants de résistance naturelles présents chez les bactéries de l'environnement hydrique, comme les *Vibrionaceae* (Poirel et al., 2005b).

La fonction naturelle des protéines Qnr est inconnue, Ellington et Woodford (2006) ont supposé que ces protéines joueraient le rôle d'antitoxines qui protègent l'ADN gyrase et la topoisomérase IV contre l'action de certaines toxines naturelles. Les toxines naturelles sont généralement couplées à des anti-toxines codées par le même opéron (Critchlow et al., 1997 ; Jiang et al., 2002). Les protéines Qnr seraient analogues à l'une de ces antitoxines, cependant, la nature de la toxine vis-à-vis de laquelle les Qnr protègent la cellule reste inconnue (Strahilevitz et al., 2009).

II. 3. 2. 4. Modifications de la cible par mutation des gènes de structure

Les mutations diminuant l'affinité des quinolones à leur cible constituent le mécanisme principal chez toutes les espèces bactériennes. Ces mutations surviennent principalement dans les gènes de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV, selon la cible préférentielle de la molécule et selon l'espèce bactérienne (Mérens et Servonnet, 2010). Chez les bactéries à Gram négatif, le premier site de mutations est l'ADN gyrase, cible principale des quinolones, avec une prévalence dans *gyrA* chez les souches cliniques (Vila et al., 1994 ; Everett et al., 1996). Les mutations de *gyrA* chez *E. coli* prédominent dans la région dite QRDR « *quinolone-resistance determining region* » (Yoshida et al., 1990), située entre les acides aminés 67 et 106, au voisinage du site actif (principalement au niveau des positions 81, 83, 84, 87 pour les souches cliniques) (Oram et Fisher, 1991 ; Cambau et al., 1993 ; Vila et al., 1994 ; Everett et al., 1996 ; Tavio et al., 1999). Ces mutations par substitutions affectent l'interaction entre GyrA et les quinolones (Ruiz, 2003). Les résidus les plus fréquemment modifiés sont situés aux positions 83 et 87 de la sous-unité GyrA. L'effet de ces mutations sur l'activité des quinolones dépend de leur type, de leur nombre et de la molécule concernée. En effet, la présence d'une seule mutation au niveau de la région QRDR confère une résistance à haut niveau à l'acide nalidixique mais la présence de mutations additionnelles dans *gyrA* et/ou un autre gène cible comme *parC* est nécessaire pour atteindre des niveaux de résistance élevées aux fluoroquinolones (Vila et al., 1994 ; Ruiz et al., 2002). La résistance s'établit ainsi par paliers successifs, par accumulation d'événements mutationnels, avec des mutants du 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} niveau (Mérens et Servonnet, 2010).

II. 3. 3. Rôle des déterminants PMQR dans la sélection de mutants résistants aux quinolones

Les mutations de résistance surviennent spontanément avant l'exposition à l'antibiotique. Un mutant de résistance n'est sélectionné que lorsqu'il est en présence de concentrations en antibiotiques se situant dans la fenêtre de sélection des mutants ou MSW « *mutant selection window* ». Cette fenêtre est comprise entre la CMI de la souche parentale et la concentration de prévention de mutants (CPM) qui correspond à la CMI des mutants les plus résistants au sein d'une population de 10^{10} UFC de la souche parentale.

Dans une population bactérienne issue d'une souche sensible aux quinolones, deux types de mutants peuvent être sélectionnés, les premiers sont des mutants de la cible et les seconds sont principalement des mutants efflux. Les mutants de la cible sont peu nombreux mais le niveau de résistance conféré par les mutants issus d'un événement mutationnel est plus élevé pour les mutants *gyrA* comparés aux mutants efflux. Par conséquent, le type et le nombre de mutants sélectionnés dépendent de la pression de sélection exercée sur cette population bactérienne ; des concentrations basses dans la fenêtre MSW favorisent la sélection de nombreux et divers mutants dont la majorité sont des mutants efflux ; au contraire les mutants *gyrA* sont plus prévalents en présence de concentrations en antibiotiques plus élevées. *In vivo*, des gradients de concentrations en antibiotiques s'établissent au cours du temps et dans l'espace, ils sont à l'origine de la sélection de divers types de mutants résistants aux quinolones. Il faut souligner que la pression de sélection ne concerne pas exclusivement la bactérie visée par l'antibiothérapie, mais aussi la flore commensale (Fantin et al., 2009 ; Yagci et al., 2009).

Les déterminants PMQR confèrent une sensibilité diminuée aux quinolones qui n'atteint pas la résistance clinique définie par les concentrations critiques. Ces résistances qui peuvent passer inaperçues au niveau de l'antibiogramme, augmentent la CPM et concourent à une augmentation de la fréquence de sélection des mutants résistants par des mécanismes de mutation chromosomique (Martinez-Martinez et al., 1998 ; Rodriguez-Martinez et al., 2007).

III. La résistance aux antibiotiques dans l'environnement

La résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène adaptatif naturel aussi ancien que le monde vivant, ce phénomène est devenu un sujet de préoccupation mondial dans les domaines de l'environnement et de la santé publique vu la dissémination de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les matrices environnementales aqueuses et telluriques.

Plusieurs sources peuvent être à l'origine de la dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques dans l'environnement. Des études portant sur des échantillons provenant de différentes origines (effluents urbains et hospitaliers, stations d'épuration, rivières,...) ont rapporté la présence de plusieurs bactéries résistantes aux antibiotiques (Fuentefria et *al.*, 2011). Parmi ces sources, les effluents hospitaliers constituent un environnement hautement sélectif qui contribue à la libération d'un taux élevé de bactéries résistantes dans le milieu naturel (Meirelles-Pereira et *al.*, 2002 ; Prado et *al.*, 2008 ; Yang et *al.*, 2009).

Les échanges génétiques, via les transferts horizontaux chez les bactéries, sont à l'origine de nouveaux assortiments suite à l'acquisition de plasmides de résistance et aux divers mécanismes de recombinaison mis en jeu par les bactéries, comme la transposition et la recombinaison site-spécifique. Ces échanges participent à la dissémination de la résistance dans l'environnement aquatique et contribuent de manière significative à l'évolution et l'adaptation des bactéries qui deviennent aptes à coloniser de nouveaux milieux et s'adapter à des conditions hostiles (Davies, 1994 ; Hall et Collis, 1995 ; Bennett, 1999 ; Davison, 1999 ; Mazel et Davies, 1999 ; Rowe-Magnus et Mazel, 1999 ; Seveno et *al.*, 2002).

Les plasmides sont de loin le support génétique le plus fréquent de la résistance aux antibiotiques. Ils sont également le support de nombreuses autres propriétés permettant une meilleure adaptation des bactéries comme la résistance aux désinfectants ou aux métaux lourds (Franke et Clewell, 1980 ; Bingen et *al.*, 1993 ; Clewell, 1993). Bien que normalement non essentiels à la bactérie et donc constituant un fardeau pour la cellule qui ralentit sa croissance, les plasmides arrivent à se maintenir même dans des conditions non sélectives. Divers mécanismes codés par les plasmides eux-mêmes sont impliqués dans leur ségrégation équitable et leur maintien: ségrégation aléatoire des plasmides à nombre de copies élevé, partition active pour les plasmides à nombre de copies bas et existence de systèmes d'addiction « *Post-segregational killing* » comme le système toxine-antidote ou le système de restriction-modification. En plus de ces gènes, les plasmides portent des gènes impliqués dans leur réplication et leur auto-transfert par conjugaison (Clewell, 1993). Ces plasmides dits conjuguatifs sont à différencier des plasmides non conjuguatifs mais pouvant être transférables par mobilisation ou co-intégration (Davison, 1999 ; Dutta et Pan, 2002). La conjugaison et le transfert des plasmides de résistance sont des phénomènes qui se produisent entre des bactéries non apparentées et de diverses origines : humaine, animale, environnementale et ce, même en absence d'antibiotiques. Ainsi, la contamination de l'environnement par des bactéries pathogènes résistantes aux agents antimicrobiens constitue une réelle menace non seulement du fait des maladies qu'elles provoquent mais aussi de leur capacité de transfert des plasmides de résistance aux autres bactéries pathogènes de diverses origines (Kruse et Sorum, 1994 ; Droge et *al.*, 2000 ; Tennstedt et *al.*, 2003 ; Szczepanowski et *al.*, 2004).

Dans une étude sur le métagénome plasmidique d'une station de traitement urbaine recevant des rejets hospitaliers en Allemagne, Szczepanowski et *al.* (2009) ont été les premiers à décrire des gènes de résistance plasmidique à toutes les classes majeures d'antibiotiques. Parmi 192 gènes recherchés par PCR, 140 et 123 ont été respectivement détectés dans les boues activées et dans les effluents finaux de la station. Ces gènes codent pour la résistance aux aminosides, β -lactames, chloramphénicol, fluoroquinolones, macrolides, rifampicine,

tétracycline, triméthoprimine et sulfamides. Ce pool de gènes, comprend, entre autres, les gènes des 4 classes moléculaires de β -lactamases, y compris celles à spectre élargi, ainsi que les déterminants *qnr* de résistance aux quinolones. Certains gènes de découverte récente chez des souches cliniques ont été aussi retrouvés chez les bactéries de la station, ce qui est indicateur des possibilités d'échanges génétiques entre souches de différentes origines. La présence de ces gènes de résistance plasmidique dans les effluents finaux de la station confirme leur libération dans l'environnement, facilitant ainsi leur dissémination chez les bactéries environnementales.

Les bactéries disposent de divers mécanismes de recombinaison permettant la mobilisation des gènes de résistance sur le même réplicon ou entre différents réplicons. Parmi ces mécanismes, on distingue la transposition qui correspond à un événement au cours duquel une enzyme de recombinaison spécialisée, ou transposase, reconnaît deux catégories distinctes de sites, d'une part les extrémités de l'élément transposable et d'autre part un site cible et catalyse le transfert de cet élément vers ce site qui est généralement aléatoire. Les éléments transposables les plus simples sont les séquences d'insertion (IS) qui ne contiennent que les informations génétiques nécessaires à leur mobilité. Bien qu'étant phénotypiquement cryptiques, les IS peuvent en se déplaçant mobiliser des gènes de résistance localisés à proximité. C'est ainsi que certains gènes de résistance chromosomiques peuvent passer sur des plasmides et se disséminer dans le monde bactérien. En plus des fonctions de transposition, les transposons portent des gènes de résistance aux antibiotiques (Merlin et Toussaint, 1999). Certains transposons comme le Tn7 utilisent deux modes de transposition, le premier est l'insertion préférentielle sur les plasmides conjugatifs, permettant ainsi la dissémination de ce transposon ; le deuxième correspond à l'insertion spécifique du Tn7 en aval d'un gène chromosomique essentiel conservé chez de nombreuses espèces, assurant ainsi un transfert vertical au cours des divisions cellulaires.

La recombinaison site spécifique est un autre mécanisme de recombinaison mis en jeu par les bactéries pour l'acquisition de gènes de résistance. Ce mécanisme est utilisé par les bactéries pour capturer des gènes de résistance sous forme de cassettes au sein d'une plate forme constitué par les intégrons (Carattoli, 2001 ; Ploy et *al.*, 2005). Ces structures dont disposent les bactéries correspondent à des vecteurs naturels de clonage et d'expression qui jouent un rôle important dans la résistance bactérienne. En effet, les intégrons sont des systèmes de capture de gènes cassettes de résistance aux antibiotiques dépourvus de promoteurs qui sont ainsi convertis en gènes fonctionnels. Ils sont principalement retrouvés chez des bactéries à Gram négatif et généralement portés par des plasmides et mobilisés par les transposons.

La recombinaison site spécifique est utilisée par un autre type d'élément mobile, les transposons conjugatifs, une famille de grands éléments transposables qui ont été initialement identifiés comme éléments responsables de la dissémination de la résistance aux antibiotiques parmi les bactéries à Gram positif en milieu hospitalier, puis retrouvés même chez les bactéries à Gram négatif. Leur originalité réside dans leur capacité de propagation verticale et horizontale. Ces éléments portent, en plus des gènes de résistance aux antibiotiques et métaux lourds, des gènes codant pour leur intégration/excision, analogues à ceux du phage lambda et des gènes de transfert similaires à ceux portés par les plasmides conjugatifs de *E. coli*. Les transposons conjugatifs existent sous 2 formes, une forme intégrée au génome et une forme circulaire libre correspondant à la forme conjugative (Salyers et *al.*, 1995).

Les bactéries résistantes peuvent se développer suite à leur exposition aux faibles doses d'antibiotiques présents dans l'environnement (eaux usées et eaux de surface) (Brown et *al.*, 2006). La présence d'antibiotiques dans l'environnement peut avoir plusieurs origines, tels que les molécules non métabolisées excrétées par l'homme et l'animal, ainsi que les effluents

industriels, domestiques et hospitaliers (Brown et *al.*, 2006 ; Kummerer, 2009). Les effluents hospitaliers et industriels en sont la source la plus importante comme l'ont rapporté plusieurs études (Guiliani et *al.*, 1996 ; Guardabassi et *al.*, 1998 ; Hartmann et *al.*, 1998 ; Alder et *al.*, 2003 ; Brown et *al.*, 2006), en particulier s'ils ne subissent pas de traitement avant leur rejet dans le milieu naturel, comme c'est le cas dans beaucoup de pays en développement (Duong et *al.*, 2008). De plus, en raison de traitement inadéquat des eaux usées, il a été montré que certains agents antimicrobiens ne sont pas éliminés et atteignent l'environnement aquatique. Dans ce sens, Larsson et *al.* (2007) ont rapporté la présence de taux élevés d'antibiotiques à large spectre dans une station d'épuration d'effluents d'industrie pharmaceutique, en Inde. Cette étude a montré que l'addition des effluents domestiques aux effluents industriels, pour augmenter l'efficacité de leur traitement biologique, présente le risque d'exposition prolongée des germes pathogènes aux antibiotiques et donc la sélection de souches résistantes. D'autre part, ce traitement peut affecter l'efficacité de la station en raison de la toxicité des substances pharmaceutiques sur les microorganismes. Le rejet des agents antimicrobiens résiduels dans le milieu naturel peut aussi contribuer à la sélection et la dissémination de la résistance au sein de la flore microbienne autochtone. En effet, la détection des antibiotiques dans le milieu aquatique naturel est due à leur persistance dans l'environnement. Les sulfamides, les fluoroquinolones et les macrolides sont les plus persistants et les plus fréquemment détectés dans les eaux usées et les eaux de surface (Huang et *al.*, 2001). Bien que les aminosides et les β -lactames soient les antibiotiques les moins persistants, leur détection serait due à leur apport régulier dans l'environnement (Daughton et Ternes, 1999). En plus de leur rôle dans le développement de la résistance dans l'environnement, certains antibiotiques comme les fluoroquinolones ont des effets génotoxiques (Brown et *al.*, 2006 ; Crane et *al.*, 2006 ; Kemper, 2008 ; Kummerer, 2009).

D'autres agents antimicrobiens comme les détergents, les désinfectants, les antiseptiques et les métaux lourds présents dans les effluents hospitaliers peuvent contaminer les milieux aquatiques (Darsy et *al.*, 2002). Les gènes de résistance à certains de ces antibactériens sont plasmidiques et souvent associés à la résistance aux antibiotiques, d'où leur rôle dans l'exacerbation et la dissémination de cette dernière dans l'environnement (McDonnell et Russell, 1999). La corésistance aux antiseptiques et aux antibiotiques a été déjà rapportée chez les germes isolés des effluents hospitaliers (Adelowo et *al.*, 2008).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Souches étudiées

L'étude a porté sur une collection de 109 souches d'entérobactéries résistantes au céfotaxime. Ces souches ont été isolées à partir d'un prélèvement d'effluents de l'hôpital Zmirli (Alger) réalisé le 9 Mars 2010 (matin). Cet hôpital a une contenance de 251 lits avec un personnel de 900 membres, il comprend 5 services médicaux (chirurgie générale, neuro-chirurgie, médecine interne, orthopédie et réanimation), un service de radiologie, une pharmacie, un centre de transfusion, un laboratoire de biochimie et microbiologie, une laverie, des cuisines et un service d'entretien des véhicules. La méthode de concentration utilisée a été la filtration sur membrane et le milieu utilisé pour la sélection de ces souches a été la gélose lactosée au tergitol 7 additionnée de céfotaxime (4 µg/ml).

- **Prélèvement** : le prélèvement a été réalisé au niveau du collecteur principal de l'hôpital afin d'avoir des échantillons représentatifs sur l'ensemble des rejets. Immédiatement après le prélèvement et dans le but de limiter l'évolution des échantillons, ces derniers ont été transportés et conservés dans une glacière à 4°C.
- **Filtration** : la filtration est une technique permettant de séparer les bactéries du milieu à analyser et donc, des éventuels inhibiteurs contenus dans ce milieu. Le principe de cette technique repose sur la concentration des cellules bactériennes sur une membrane en ester de cellulose, de porosité 0,22 µm ou 0,45 µm. Dans notre étude, la filtration des échantillons prélevés a été réalisée sous vide dans un appareil de filtration stérile en utilisant une membrane de porosité 0,22 µm. La filtration a été effectuée sur des volumes de 50 ml (échantillon mère) et de 100 ml (dilutions 1/10 et 1/100), trois heures après le recueil des échantillons. Après filtration et dès que la membrane paraît sèche, cette dernière est prélevée stérilement avec une pince et déposée directement sur une gélose lactosée au tergitol 7 additionnée de céfotaxime (4 µg/ml), ce milieu permet la sélection des coliformes résistants à cet antibiotique.
- **Isolement** : après incubation de 24 h sur gélose lactosée au tergitol 7 additionnée de 4 µg/ml de céfotaxime, on a procédé à l'isolement des bactéries résistantes sur le même milieu. Les souches pures ont été conservées à 4°C sur gélose de conservation.

II. Identification par Galerie API 20^E

L'identification des souches a été réalisée par le système des galeries API 20^E (Biomérieux). Ce système permet l'identification des bacilles à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il est composé de 20 microtubes contenant des milieux déshydratés, ceux-ci sont inoculés, selon les recommandations du fournisseur, avec une suspension bactérienne préparée dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 %. Ces dernières sont incubées 24 h à 37°C. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de la galerie est réalisée en se référant au tableau de lecture fournit par le fabricant. Les résultats obtenus sont interprétés sous forme de code numérique dont la comparaison à ceux référencés dans le catalogue analytique permet l'identification de la souche étudiée.

III. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques

III. 1. Antibiogramme « méthode de diffusion sur milieu gélosé »

L'antibiogramme est un test qui permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne *in vitro*. Parmi les méthodes utilisées, celle de la diffusion

sur gélose est la plus courante (Courvalin et al., 1985 ; CA-SFM, 2010). Le principe de cette méthode consiste à tester la sensibilité d'une souche bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique, obtenu par diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé.

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode de diffusion sur gélose, une suspension bactérienne est préparée dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 %, à partir d'une culture de 24 h sur gélose non sélective. La densité de cette suspension est ajustée entre 0,08 et 0,10 à 625 nm, ce qui correspond à 10^8 cellules/ml. La suspension est ensuite diluée à 10^7 cellules/ml et ensemencée par écouvillonnage sur une gélose Mueller Hinton de 4 mm d'épaisseur. Les disques d'antibiotiques, indiqués dans le Tableau I, sont ensuite déposés sur la gélose ensemencée, en les séparant d'un espace de 30 mm les uns des autres. Après prédiffusion pendant 15 min à température ambiante, les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C.

La lecture de l'antibiogramme est réalisée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle précise. Les résultats sont interprétés selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010). Trois catégories de souches sont définies en fonction du diamètre des zones d'inhibition : Sensible (S), Intermédiaire (I) et Résistant (R).

Les résultats de l'antibiogramme sont validés en utilisant une souche de référence sensible (*E. coli* K12 BM21) aux antibiotiques.

Tableau I : Liste des disques d'antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme

Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque	
Céphalosporines de 2^{ème} Génération	Céfoxitine	FOX	30 µg
Céphalosporines de 3^{ème} Génération	Céfotaxime	CTX	30 µg
	Céftriaxone	CI	30 µg
	Céftazidime	CAZ	30 µg
Association pénicilline/inhibiteur de β-lactamases	Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	20/10 µg
Aminosides	Gentamicine	GM	10 UI (15 µg)
Quinolones	Acide nalidixique	Nal	30 µg
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5 µg

III. 2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice « CMI » des antibiotiques

La détermination de la concentration minimale inhibitrice des antibiotiques a été réalisée par la méthode de dilution en milieu gélosé (CA-SFM, 2010). Pour cela, une suspension bactérienne de 10^7 cellules /ml est préparée dans 5 ml du bouillon LB. Cette dernière est ensuite ensemencée en spot de 2 µl sur gélose Mueller Hinton additionnée de l'antibiotique à tester (gamme de concentrations croissante à raison géométrique 2). Après séchage des inoculums spotés, les boîtes sont incubées 24 h à 37°C. La CMI correspond à la concentration la plus faible en antibiotique où aucune croissance n'est observée. Un contrôle

de qualité a été effectué en utilisant une souche de référence (*E. coli* K12 BM21) comme témoin sensible aux antibiotiques.

IV. Détection des β -lactamases à spectre élargi « BLSE »

La détection des BLSE a été effectuée par la méthode DDS « *Double Disk Synergy* » (Jarlier et al., 1988 ; Vedel et al., 1994). Le principe de cette méthode consiste à déposer des disques d'antibiotiques marqueurs de l'activité BLSE sur une gélose Mueller Hintonensemencée par écouvillonnage d'une suspension bactérienne de 10^7 cellules/ml. Dans ce test, l'acide clavulanique est utilisé comme inhibiteur des BLSE, son disque (utilisé sous forme d'association avec l'amoxicilline : AMC) est placé à 30 mm de distance centre à centre des disques contenant les antibiotiques indicateurs de l'activité BLSE : céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) (céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone) et/ou l'aztréonam. Après prédiffusion des antibiotiques pendant 15 min à température ambiante, les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C, la présence des BLSE est détectée par l'augmentation de la zone d'inhibition autour des disques de C3G et/ou l'aztréonam en direction du disque d'AMC contenant l'acide clavulanique. L'augmentation de la zone d'inhibition est due à une synergie entre l'acide clavulanique et les C3G et/ou l'aztréonam, cette synergie se traduit par des images caractéristiques, en forme de bouchon de champagne, de bâtonnets, d'entonnoir, ... etc.

V. Transfert des gènes de résistance par conjugaison

Le support plasmidique de la résistance aux antibiotiques a été recherché par des essais de transfert par conjugaison sur milieu solide (Bakour et al., 1983 ; Courvalin et al., 1985). La conjugaison consiste en un transfert unidirectionnel du matériel génétique (plasmide) qui s'effectue par l'intermédiaire d'un pont cytoplasmique entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice. Deux souches de *E. coli* K12 BM21 (*E. coli* K12 Na^R et *E. coli* K12 AzNa^R) sont utilisées comme réceptrices, ces dernières sont dépourvues de plasmides et possèdent un caractère de résistance chromosomique à l'acide nalidixique et à l'azide de sodium, respectivement.

Afin de réaliser le transfert par conjugaison, des cultures de souches parentales (donatrice et réceptrice) sont réalisées dans 5 ml de bouillon BHIB, à partir de colonies bactériennes de 18 à 24 h sur gélose Mueller Hinton. Après incubation, pendant 24 h à 37°C, le contact entre les souches parentales est réalisé en mélangeant 1 volume de la souche donatrice et 2 volumes de la souche réceptrice ; 100 μ l de la culture mixte obtenue sont alorsensemencés par spot sur une gélose Mueller Hinton. Après une nuit de contact entre les souches parentales, la culture mixte est raclée et mise en suspension dans l'eau physiologique stérile à 0,9 %. A partir de cette suspension, un ensemencement en stries est effectué sur une gélose Mueller Hinton additionnée de céfotaxime (4 μ g/ml) et d'acide nalidixique (50 μ g/ml) ou d'azide de sodium (300 μ g/ml), selon la souche réceptrice utilisée. Sur la même gélose, les suspensions des souches parentales sont aussiensemencées en spot de 2 μ l pour le contrôle. Après incubation de 24 h à 37°C, on procède à la sélection des souches réceptrices ayant acquis le caractère de résistance au céfotaxime (clones transconjugants). Ces derniers, sont alors conservés à 4°C sur gélose de conservation.

VI. Préparation de l'ADN pour la PCR

L'ADN utilisé comme matrice dans les réactions PCR a été obtenu par chauffage selon le protocole de Feria et al. (2002). Le principe de cette technique consiste à préparer une suspension bactérienne dans 100 μ l d'eau distillée ultra-pure, à partir de quelques colonies isolées d'une culture de 24 h sur gélose Mueller Hinton. La suspension est ensuite chauffée 10

min à 95°C pour permettre la lyse cellulaire et la libération de l'ADN. Cette étape est suivie d'une centrifugation de 2 min à 12000 rpm afin d'éliminer les débris cellulaires, le surnageant obtenu est alors conservé à -20°C.

VII. Caractérisation des gènes de β -lactamases

Deux types de gènes codant pour les BLSE de type CTX-M et pour les céphalosporinases de type AmpC ont été recherchés par PCR en utilisant des amorces spécifiques (Tableaux II et III).

Pour les gènes de BLSE, des amorces spécifiques de la famille CTX-M et du groupe CTX-M1 ont été utilisées. Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume final de 12.5 μ l composé du Master Mix 1X (Proméga), de 0.5 μ M des amorces sens et anti sens (Sigma) et de 2.5 μ l d'ADN.

Pour les gènes *bla*_{AmpC}, l'amplification a été réalisée par PCR multiplex dont le principe consiste à amplifier plusieurs segments d'ADN distincts en une seule réaction. 6 groupes de gènes *bla*_{AmpC} ont été recherchés: MOX, CIT, DHA, ACC, EBC et FOX à l'aide de couples d'amorces spécifiques (Eurofins MWG). La PCR multiplex a été réalisée dans un volume final de 12.5 μ l contenant le Master Mix 1X (Proméga), 0.6 μ M des amorces MOXF/MOXR, CITF/CITR et DHAF/DHAR, 0.5 μ M des amorces ACCF/ACCR et EBCF/EBCR, 0.4 μ M des amorces FOXF/FOXR et 2.5 μ l d'ADN.

VIII. Etude de l'environnement génétique des gènes *bla*_{CTX-M}

Afin d'étudier l'environnement génétique des gènes *bla*_{CTX-M}, la présence de séquences de mobilisation de gènes, dites *ISEcp1*, a été recherchée dans un premier temps par PCR en ciblant le gène *ISEcp1B* codant pour sa transposase. Dans un deuxième temps, l'association gènes *bla*_{CTX-M}/séquences *ISEcp1* a été recherchée en utilisant l'amorce CTX-MR, spécifique du gène *bla*_{CTX-M} et l'amorce PROM+, spécifique de l'extrémité droite de la séquence *ISEcp1*. Les deux réactions PCR sont réalisées dans un volume final de 12,5 μ l composé du Master Mix 1X (Proméga), de 0,5 μ M de chacune des deux amorces (Sigma) et de 2,5 μ l d'ADN. Les séquences des couples d'amorces utilisés ainsi que les conditions de ces PCR sont décrites dans les Tableaux II et III.

IX. Caractérisation des déterminants PMQR « *plasmid-mediated quinolone resistance* » de résistance aux quinolones

Trois types de déterminants PMQR codent pour la résistance aux quinolones : *qnr*, *aac (6')-Ib-cr* et *qepA*.

Pour les déterminants *qnr*, une PCR multiplex a été réalisée afin d'amplifier simultanément les gènes *qnrA*, *qnrB* et *qnrS* (Tableau III) à l'aide d'amorces (Eurofins MWG) couvrant les différents allèles de ces groupes (6 allèles *qnrA*, 19 allèles *qnrB* et 3 allèles *qnrS*) (Tableau II). L'amplification des deux autres déterminants (*qepA* et *aac (6')-Ib*) a été réalisée par PCR simplex en utilisant des couples d'amorces spécifiques (Eurofins MWG) (Tableaux II et III).

Les réactions PCR sont réalisées dans un volume final de 12.5 μ l (pour *aac (6')-Ib* et *qepA*) ou 25 μ l (*qnr*) composé du Master Mix 1X (Proméga) et d'amorces sens et anti-sens (chacune à 0.2 μ M pour les PCR *aac (6')-Ib* et *qepA* ou 0,4 μ M pour la PCR *qnr*).

X. Typage moléculaire des souches par ERIC-PCR

Le typage moléculaire des souches a été réalisé par ERIC-PCR qui consiste à amplifier des régions d'ADN intergéniques situées entre des séquences dites ERIC « *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* ». Ces séquences sont hautement conservées et répétées dans le génome de la plupart des genres bactériens, leurs nombres et leurs positions sur le génome sont généralement différents d'une souche à l'autre. L'amplification des régions intergéniques situées entre ces séquences, permet selon la fréquence et la position de ces dernières sur le génome, d'obtenir des fragments d'ADN de tailles et de nombres variables permettant de différencier les souches.

La réaction ERIC-PCR est réalisée dans un volume final de 25 µl contenant le Master Mix 1X (Proméga), 1 µM d'amorce ERIC (Sigma) et 5 µl d'ADN. La séquence ERIC et le programme utilisé sont décrits dans le Tableau II et III.

XI. Extraction de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique a été extrait par lyse alcaline suivant le protocole décrit par Kado et Liu (1981). Cette méthode, bien adaptée à l'extraction de grands plasmides, est basée sur la dénaturation alcaline du chromosome bactérien qui précipite avec les protéines complexées par le SDS, alors que l'ADN plasmidique est renaturé et reste soluble.

L'extraction a été réalisée sur 3 ml de culture bactérienne d'une nuit dans du bouillon LB supplémenté d'antibiotiques. Après avoir séparé les cellules du milieu par une centrifugation de 2 min à 12000 rpm, celles-ci sont remises en suspension dans 100 µl de TE (Tris 50 mM, EDTA 10 mM). La suspension obtenue est alors fortement agitée puis additionnée de 200 µl d'une solution de lyse extemporanément préparée (SDS 3 %, Tris 50 mM pH 12.6). Après mélange par retournement du microtube une dizaine de fois, le lysat est chauffé au bain marie 25 min à 60°C. L'ADN plasmidique est séparé du reste des composants cellulaires après extraction au phéno-chloroforme (600 µl) et centrifugation pendant 20 min à 12000 rpm. La phase aqueuse supérieure contenant l'ADN plasmidique est alors récupérée et conservée à -20°C.

XII. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification ainsi que les extraits d'ADN plasmidique ont été soumis à des électrophorèses sur gel d'agarose.

L'électrophorèse des produits de PCR est réalisée sur gel d'agarose (cuve de 20 cm x 25 cm) sous une tension de 60 volts pour les produits de l'ERIC-PCR et de 90 volts pour le reste des produits. Le tampon de migration utilisé est le tampon TBE 0.5 X (Tris 45 mM, Borate 45 mM, EDTA 1 mM). Les différents fragments d'ADN sont visualisés à l'aide du bromure d'éthidium sous irradiation UV, celui-ci est incorporé dans le gel à une concentration de 0.5 µg/ml. La co-migration d'un ADN marqueur : 100 bp DNA Ladder ou 1 kb DNA Step Ladder (Proméga) permet d'estimer la taille des bandes obtenues (Fig. 1 en annexe).

Pour les extraits d'ADN plasmidique, l'électrophorèse est réalisée durant 1h.30 à 2h sur gel d'agarose (cuve de 10 cm x 8 cm) à 0,7% sous une tension de 50 volts dans du tampon TBE 0.5 X (Tris 45 mM, Borate 45 mM, EDTA 1 mM). L'ADN plasmidique est visualisé sous irradiation UV, après immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium à 1 µg/ml pendant 45 min. La taille des plasmides est déterminée grâce à des plasmides de tailles connues : RP4 (54 kb), pBR322 (4,4 kb) et piP113 (128 kb).

Tableau II : Couples d'amorces utilisées pour l'amplification des différents gènes par PCR

Cible	Taille (pb)	Couples d'amorces et séquences (5' → 3')	Références
<i>bla</i> _{CTX-M}	550	CTX-MF : ACCGCGATATCGTTGGT CTX-MR : CGCTTTGCGATGTGCAG	Bonnet et al. (2001)
<i>bla</i> _{CTX-M1}	863	CTX-M1F : GGTTAAAAAATCACTGCGTC CTX-M1R : TTGGTGACGATTTTAGCCGC	Jiang et al. (2005)
<i>bla</i> _{AmpC}	MOX	520 MOXF : GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT MOXR : CACATTGACATAGGTGTGGTGC	Pérez-Pérez et Hanson (2002)
	CIT	462 CITF : TGGCCAGAACTGACAGGCAA CITR : TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	Pérez-Pérez et Hanson (2002)
	DHA	405 DHAF : AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT DHAR : CCGTACGCATACTGGCTTTGC	Pérez-Pérez et Hanson (2002)
	ACC	346 ACCF : AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA ACCR : TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	Pérez-Pérez et Hanson (2002)
	EBC	302 EBCF : TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG EBCR : CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	Pérez-Pérez et Hanson (2002)
	FOX	190 FOXF : AACATGGGGTATCAGGGAGATG FOXR : CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	Pérez-Pérez et Hanson (2002)
<i>ISEcp1</i>	527	ISEcp1F : GCAGGTCTTTTTC'TGCTCC ISEcp1R : TTTCCGCAGCACCGTTTGC	Poirel et al. (2003)
<i>bla</i> _{CTX-M/} <i>ISEcp1</i>	1100	PROM₊ : TGCTCTGTGGATAACTTGC CTX-MR : CGCTTTGCGATGTGCAG	Poirel et al. (2003), Bonnet et al. (2001)
ERIC	/	ERIC : AAGTAAGTGACTGGGGTGACGC	Decré et al. (2004)
<i>qnr</i>	A	580 qnrAF : AGAGGATTTCTCACGCCAGG qnrAR : TGCCAGGCACAGATCTTGAC	Cattoir et al. (2007a)
	B	264 qnrBF : GGMATHGAAATTCGCCACTG* qnrBR : TTTGCYGYCGCCAGTCGAA*	Cattoir et al. (2007b)
	S	428 qnrSF : GCAAGTTCATTGAACAGGGT qnrSR : TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	Cattoir et al. (2007a)
<i>qepA</i>	199	qepAF : GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG qepAR : CTCCTGCCCGAGTATCGTG	Yamane et al. (2008)
<i>aac</i> (6')-Ib	482	aac(6')F : TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA aac(6')R : CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	Park et al. (2006)

* : M=A ou C, H= A ou C ou T, Y= C ou T

Tableau III : Conditions des réactions PCR selon le type de gène amplifié

Cycles	Température/durée								
	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-MI}	<i>bla</i> _{AmpC}	<i>ISEcp1</i>	<i>bla</i> _{CTX-M} / <i>ISEcp1</i>	ERIC-PCR	<i>qnr</i> (A, B, S)	<i>qepA</i>	<i>aac</i> (6')-Ib
Dénaturation initiale	94°C/5 min	94°C/5 min	94°C/3 min	94°C/5 min	94°C/5 min	95°C/3 min	95°C/10 min	96°C/1 min	94°C/10 min
Dénaturation	94°C/30 sec	94°C/30 sec	94°C/30 sec	94°C/30 sec	94°C/45 sec	92°C/30 sec	95°C/1 min	96°C/1 min	94°C/45 sec
Hybridation	60°C/30 sec	55°C/40 sec	64°C/30 sec	58°C/30 sec	56°C/30 sec	52°C/1 min	54°C/1 min	60°C/1 min	55°C/45 sec
Elongation	72°C/30 sec	72°C/1 min	72°C/1 min	72°C/30 sec	72°C/2 min	65°C/8 min	72°C/1 min	72°C/1 min	72°C/45 sec
Elongation finale	72°C/10 min	72°C/7 min	72°C/7 min	72°C/10 min	72°C/10 min	65°C/16 min	72°C/10 min	72°C/5 min	72°C/10 min
Nombre de cycles	30	30	25	30	35	40	35	30	34

RÉSULTATS

Cette étude a été réalisée sur une collection de 109 souches d'entérobactéries résistantes au céfotaxime isolées des effluents de l'hôpital Zmirli (Alger). La technique de concentration utilisée a été la filtration sur membrane et le milieu de sélection et d'isolement de ces bactéries a été la gélose lactosée au tergitol 7 additionnée de céfotaxime à 4 µg/ml. Cette concentration correspond au double de la plus basse concentration critique selon le CA-SFM (CA-SFM, 2010). Une souche dont la croissance est inhibée à cette concentration est considérée comme sensible à cet antibiotique.

L'objectif de notre travail a été la détection et la caractérisation de la résistance aux antibiotiques dans les effluents hospitaliers. Nous nous sommes intéressés tout particulièrement aux β-lactamines, en particulier les molécules à large spectre couramment utilisées en milieu hospitalier.

I. Identification biochimique des souches bactériennes

L'identification biochimique des 109 souches par galerie API 20^E nous a permis de mettre en évidence 7 espèces d'entérobactéries : *Klebsiella pneumoniae* (n=71), *Citrobacter freundii* (n=13), *Klebsiella oxytoca* (n=8), *Enterobacter sakazakii* (n=8), *Escherichia coli* (n=7), *Enterobacter cloacae* (n=1) et *Citrobacter braakii* (n=1). L'ensemble des résultats de l'identification est présenté dans le Tableau I en annexe.

II. Sensibilité des bactéries aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des 109 souches aux antibiotiques a été réalisée par antibiogramme « méthode de diffusion sur gélose ». Au total, 7 antibiotiques ont été testés. Parmi ces derniers, 4 sont des molécules β-lactames : céphalosporines de deuxième génération (C2G) représentées par la céfoxitine, céphalosporines de troisième génération (C3G) dont le céfotaxime, le ceftriaxone et la ceftazidime ; le reste sont des molécules non β-lactames représentées par les aminosides (gentamicine) et les quinolones/fluoroquinolones (acide nalidixique et ciprofloxacine).

Les résultats de l'antibiogramme sont présentés dans le Tableau II en annexe et sont récapitulés dans le Tableau IV. Ils montrent que toutes les souches ont présenté une résistance élevée (zone d'inhibition faible ou absente) vis-à-vis des céphalosporines de troisième génération, notamment le céfotaxime et le ceftriaxone avec des taux de résistance très élevés de 100 % et 97.2 % respectivement. Le taux de résistance à la ceftazidime a été plus faible, 58.7 % des souches ont été résistantes et 22 % ont présenté une résistance intermédiaire à cette molécule. Contrairement aux C3G, la céfoxitine s'est avérée plus active sur nos souches, elle a exercé une action inhibitrice sur 76 souches (69.7 %) dont la majorité appartiennent au genre *Klebsiella*. Pour le reste des souches (n=33), 31 ont montré une zone d'inhibition avec un diamètre < 18 mm ; parmi ces dernières, une résistance à haut (aucune zone d'inhibition) ou à bas niveau (faible zone d'inhibition) a été observée chez toutes les souches des genres *Citrobacter* et *Enterobacter* et chez quatre souches de *K. pneumoniae* (S18 et S41O, S63 et S107) (Fig. 11a). Le reste des souches ont été résistantes intermédiaires : *K. pneumoniae* S79 et *E.coli* (S41T, S72 et S80).

Concernant les antibiotiques non β-lactames (Tableau IV, Fig. 11b), des taux de résistance élevés ont été observés avec la gentamicine (84.4%) et la ciprofloxacine (85.3%). Au contraire, l'acide nalidixique a montré une bonne activité sur nos souches, seules 28.2 % ont été résistantes à cette molécule.

Tableau IV : Profils de sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques

Antibiotiques	Charge	Diamètres critiques ^a (mm)		Phénotype ^b		
		S	R	R	I	S
Céfoxitine	30 µg	≥ 22	< 15	27 (24.8)	6 (5.5)	76 (69.7)
Céfotaxime	30 µg	≥ 26	< 23	109 (100)	0 (0)	0 (0)
Ceftriaxone	30 µg	≥ 26	< 23	104/107 (97.2)	3/107 (2.8)	0/107(0)
Ceftazidime	30 µg	≥ 21	< 19	64 (58.7)	24(22)	21(19.3)
Gentamicine	10 UI (15 µg)	≥ 18	< 16	92 (84.4)	0 (0)	17 (15.6)
Acide nalidixique	30 µg	≥ 20	< 15	24/85 (28.2)	53/85 (62.3)	8/85 (9.4)
Ciprofloxacine	5 µg	≥ 25	< 22	93 (85.3)	6 (5.5)	10 (9.2)

S : Sensible, **R :** Résistant, **I :** Intermédiaire ; ^a : diamètres critiques déterminés selon les recommandations du CA-SFM (2010) ; ^b : nombre de souches (%).

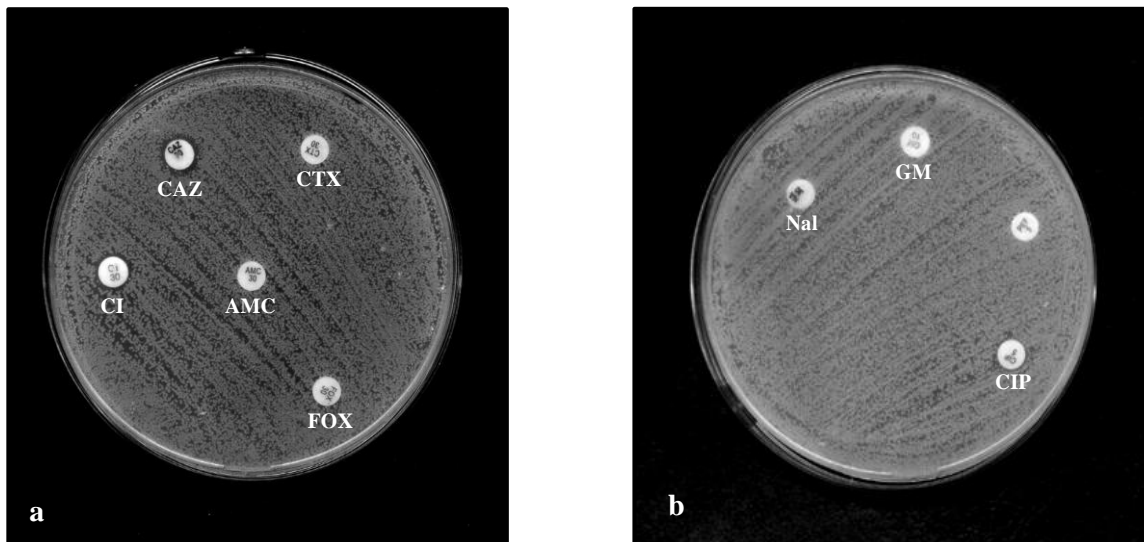


Fig. 11 : Sensibilité vis-à-vis des antibiotiques β-lactames (a) et non β-lactames (b) chez une souche de *C. freundii* (S101), (méthode de diffusion en milieu gélosé)

CTX : céfotaxime, **CAZ :** ceftazidime, **CI :** ceftriaxone, **FOX :** céfoxitine, **AMC :** amoxicilline/acide clavulanique, **GM :** gentamicine, **Nal :** acide nalidixique, **CIP :** ciprofloxacine

III. Production de β -lactamases à spectre élargi « BLSE »

La détection des BLSE par le test DDS « *Double Disk Synergy* » a été positive chez 93 souches (85.3 %) (Tableau III en annexe). Différentes images de synergie, en forme de bâtonnet, de bouchon de champagne ou d'entonnoir, suggérant la production de BLSE, ont été observées avec au moins une C3G (Fig. 12). Le taux de souches BLSE+ a été élevé chez le genre *Klebsiella* (68/71, 95.8 % chez *K. pneumoniae* et 100 % chez *K. oxytoca*), chez *E. coli* (100 %) et chez *E. sakazakii* (7/8, 87.5 %) ; cependant, seules 3/13 souches de *C. freundii* ont été positives au test DDS. Les 16 souches négatives pour ce test ont été *K. pneumoniae* (S18, S63 et S107), *E. sakazakii* S22, *E. cloacae* S108, *C. braakii* S106 et *C. freundii* (S29, S30, S36, S57, S71, S96, S99, S101, S104 et S105).

IV. Transfert des gènes de résistance

Le transfert des gènes de résistance a été réalisé par conjugaison sur gélose Mueller Hinton additionnée de céfotaxime (4 $\mu\text{g/ml}$) et d'acide nalidixique (50 $\mu\text{g/ml}$) ou d'azide de sodium (300 $\mu\text{g/ml}$), selon la souche réceptrice utilisée. Parmi les 109 souches testées, 15 ont transféré la résistance au céfotaxime à *E. coli* K12 BM21 ; ces souches appartiennent aux espèces *C. freundii* (toutes exceptée S96), *K. oxytoca* (S6 et S9) et *K. pneumoniae* (S79) (Tableau IV en annexe). Au total, 21 clones transconjugants (1 à 3 par souche) ont été sélectionnés et retenus pour les études ultérieures.

Les résultats de l'antibiogramme sur l'ensemble des clones transconjugants sont récapitulés dans le Tableau V. Ils ont montré le transfert de la résistance au céfotaxime et au ceftriaxone chez tous les clones transconjugants. Concernant la ceftazidime, la résistance a été aussi transférable mais la plupart des clones transconjugants ont présenté un profil de résistance intermédiaire ou sensible avec une zone d'inhibition de diamètre inférieur à celui de la souche réceptrice. La résistance à haut niveau à la céfoxitine a été transférable chez 4/12 souches de *C. freundii* : S57 (clone TC3), S71, S99 et S105 qui ont aussi acquis une résistance à haut niveau à la ceftazidime ; la résistance intermédiaire de la souche de *K. pneumoniae* S79 à la céfoxitine n'a pas été transférée. Concernant les antibiotiques non β -lactames, la résistance à la gentamicine a été acquise par tous les clones transconjugants, à l'exception de TC3 S57 et TC1 S99 ; pour la ciprofloxacine, la résistance n'a pas été transférable (Fig. 13).

Les résultats du test de synergie (Tableau VI) ont été positifs chez tous les clones transconjugants issus des 6 souches positives pour ce test (*K. pneumoniae* : S79, *K. oxytoca* : S6 et S9, *C. freundii* : S20, S89 et S132). Nous avons aussi noté la présence d'une image de synergie chez les clones transconjugants de 6 sur les 9 souches DDS- (*C. freundii* S29, S30, S36, S57 (clones TC2 et TC4), S101 et S104) (Fig. 13).

V. Caractérisation des gènes de β -lactamases

Afin de caractériser les gènes de résistance aux β -lactamines, nous avons recherché par PCR ceux codant les β -lactamases à spectre élargi de type CTX-M et les céphalosporinases AmpC des groupes MOX, CIT, DHA, ACC, EBC et FOX. Les résultats sont récapitulés dans le Tableau V en annexe.

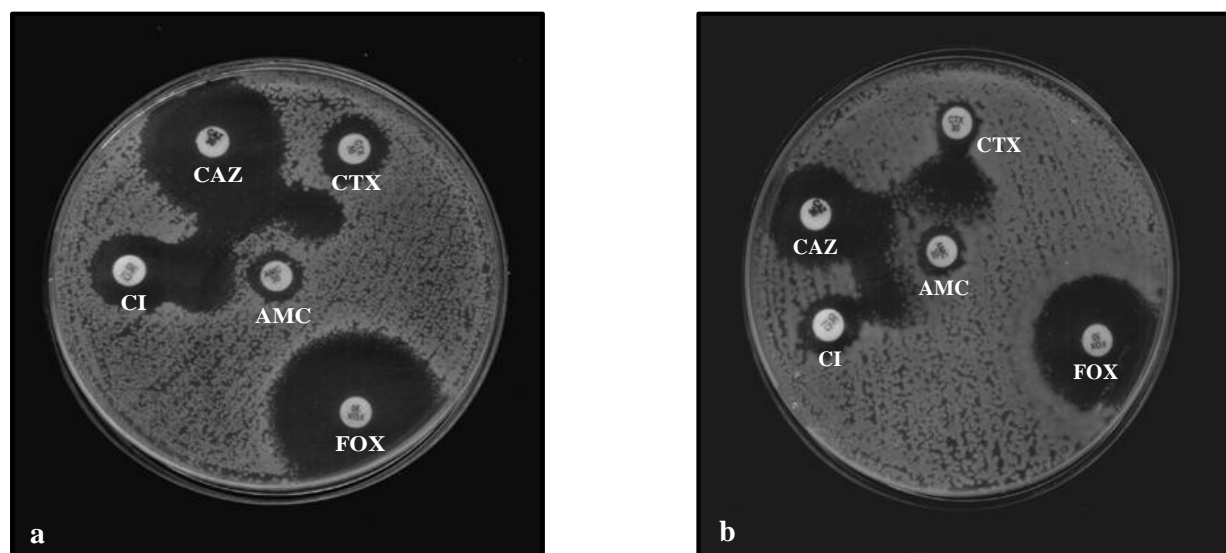


Fig. 12 : Production de β -lactamases à spectre élargi (test DDS)

(a) : image de synergie en forme de bouchon de champagne avec CAZ et CI et en forme de bâtonnet avec CTX

(b) : image de synergie en forme d'entonnoir avec CTX

CTX : céfotaxime, **CAZ** : ceftazidime, **CI** : ceftriaxone, **FOX** : céfoxitine, **AMC** : amoxicilline/acide clavulanique

Tableau V : Résultats de l'antibiogramme des souches donatrices et leurs clones transconjugants

Souches	Antibiotiques*													
	CTX		CAZ		CI		FOX		GM		Nal		CIP	
	≥ 26S	< 23R	≥ 21S	< 19R	≥ 26S	< 23R	≥ 22S	< 15R	≥ 18S	< 16R	≥ 20S	< 15R	≥ 25S	< 22R
S79	0 R		16 R		10 R		17 I		0 R		0 R		0 R	
TC1 S79	12 R		23 S		16 R		30 S		9 R		0 R		36 S	
S6	20 R		24 S		18 R		28 S		0 R		/		26 S	
TC1 S6	18 R		28 S		16 R		24 S		13 R		0 R		25 S	
S9	16 R		23 S		14 R		26 S		7 R		/		27 S	
TC1 S9	19 R		30 S		15 R		21 I		15 R		0 R		25 S	
TC2 S9	17 R		29 S		19 R		27 S		12 R		0 R		26 S	
TC3 S9	18 R		30 S		18 R		30 S		12 R		0 R		35 S	
S20	7 R		0 R		11 R		10 R		0 R		/		12 R	
TC3 S20	18 R		32 S		20 R		23 S		15 R		0 R		30 S	
TC4 S20	20 R		33 S		20 R		28 S		12 R		0 R		33 S	
S29	0 R		0 R		7 R		0 R		0 R		/		0 R	
TC1 S29	8 R		20 I		12 R		27 S		0 R		0 R		27 S	
S30	0 R		0 R		8 R		0 R		0 R		/		7 R	
TC3 S30	10 R		18 R		12 R		26 S		0 R		0 R		35 S	
S36	0 R		0 R		9 R		0 R		0 R		/		0 R	
TC3 S36	10 R		30 S		12 R		30 S		0 R		0 R		30 S	

CTX : céfotaxime, CAZ : ceftazidime, CI : ceftriaxone, FOX : céfoxitine, GM : gentamicine, Nal : acide nalidixique, CIP : ciprofloxacine, * : diamètres critiques d'inhibition en mm, déterminés selon le CA-SFM (2010), R : Résistant, S : Sensible, I : Intermédiaire, / : non réalisé

Tableau V : Résultats de l'antibiogramme des souches donatrices et leurs clones transconjugants (suite)

Souches	Antibiotiques*													
	CTX		CAZ		CI		FOX		GM		Nal		CIP	
	≥ 26S	< 23R	≥ 21S	< 19R	≥ 26S	< 23R	≥ 22S	< 15R	≥ 18S	< 16R	≥ 20S	< 15R	≥ 25S	< 22R
S57	0 R		8 R		8 R		0 R		0 R		0 R		8 R	
TC2 S57	9 R		20 I		13 R		27 S		0 R		0 R		32 S	
TC3 S57	13 R		9 R		15 R		10 R		33 S		0 R		28 S	
TC4 S57	10 R		20 I		12 R		30 S		0 R		0 R		30 S	
S71	8 R		0 R		14 R		0 R		10 R		0 R		15 R	
TC1 S71	12 R		9 R		14 R		8 R		15 R		0 R		32 S	
S89	10 R		22 S		12 R		7 R		0 R		0 R		23 I	
TC1 S89	20 R		30 S		21 R		29 S		0 R		0 R		34 S	
S99	11 R		10 R		16 R		8 R		14 R		0 R		7 R	
TC1 S99	10 R		9 R		15 R		9 R		31 S		0 R		25 S	
TC2 S99	13 R		11 R		13 R		10 R		13 R		0 R		27 S	
S101	0 R		7 R		8 R		0 R		0 R		0 R		0 R	
TC3 S101	7 R		17 R		11 R		27 S		0 R		0 R		30 S	
S104	15 R		28 S		17 R		11 R		0 R		0 R		16 R	
TC1 S104	18 R		30 S		21 R		28 S		0 R		0 R		34 S	
S105	0 R		9 R		8 R		0 R		0 R		0 R		0 R	
TC1 S105	0 R		0 R		9 R		8 R		0 R		0 R		30 S	
S132	10 R		15 R		13 R		14 R		0 R		0 R		22 I	
TC1 S132	19 R		28 S		17 R		28 S		0 R		0 R		33 S	

CTX : céfotaxime, **CAZ** : ceftazidime, **CI** : ceftriaxone, **FOX** : céfoxitine, **GM** : gentamicine, **Nal** : acide nalidixique, **CIP** : ciprofloxacine, * : diamètres critiques d'inhibition en mm, déterminés selon le CA-SFM (2010), **R** : Résistant, **S** : Sensible, **I** : Intermédiaire, / : non réalisé

Tableau VI : Résultats du test de synergie chez les souches donatrices et leurs clones transconjugants

Souches	CTX	CAZ	CI	Test DDS
S79	-	+	-	+
TC1 S79	+	+	+	+
S6	+	+	+	+
TC1 S6	+	-	+	+
S9	+	-	+	+
TC1 S9	+	-	+	+
TC2 S9	+	+	+	+
TC3 S9	+	-	+	+
S20	-	-	+	+
TC3 S20	+	-	+	+
TC4 S20	+	+	+	+
S29	-	-	-	-
TC1 S29	+	+	+	+
S30	-	-	-	-
TC3 S30	+	+	+	+
S36	-	-	-	-
TC3 S36	+	+	+	+
S57	-	-	-	-
TC2 S57	-	+	-	+
TC3 S57	-	-	-	-
TC4 S57	+	+	-	+
S71	-	-	-	-
TC1 S71	-	-	-	-
S89	-	+	-	+
TC1 S89	+	+	+	+

CTX : céfotaxime, **CAZ** : ceftazidime, **CI** : ceftriaxone, **DDS** : *Double Disk Synergy*, + : présence d'une image de synergie suggérant la production de BLSE, - : absence d'image de synergie suggérant la non production de BLSE

Résultats

Tableau VI : Résultats du test de synergie chez les souches donatrices et leurs clones transconjugants (suite)

Souches	CTX	CAZ	CI	Test DDS
S99	-	-	-	-
TC1 S99	-	-	-	-
TC2 S99	-	-	-	-
S101	-	-	-	-
TC3 S101	+	+	+	+
S104	-	-	-	-
TC1 S104	+	+	+	+
S105	-	-	-	-
TC1 S105	-	-	-	-
S132	-	-	+	+
TC1 S132	+	+	+	+

CTX : céfotaxime, **CAZ :** ceftazidime, **CI :** ceftriaxone, **DDS :** *Double Disk Synergy*, **+** : présence d'une image de synergie suggérant la production de BLSE, **-** : absence d'image de synergie suggérant la non production de BLSE

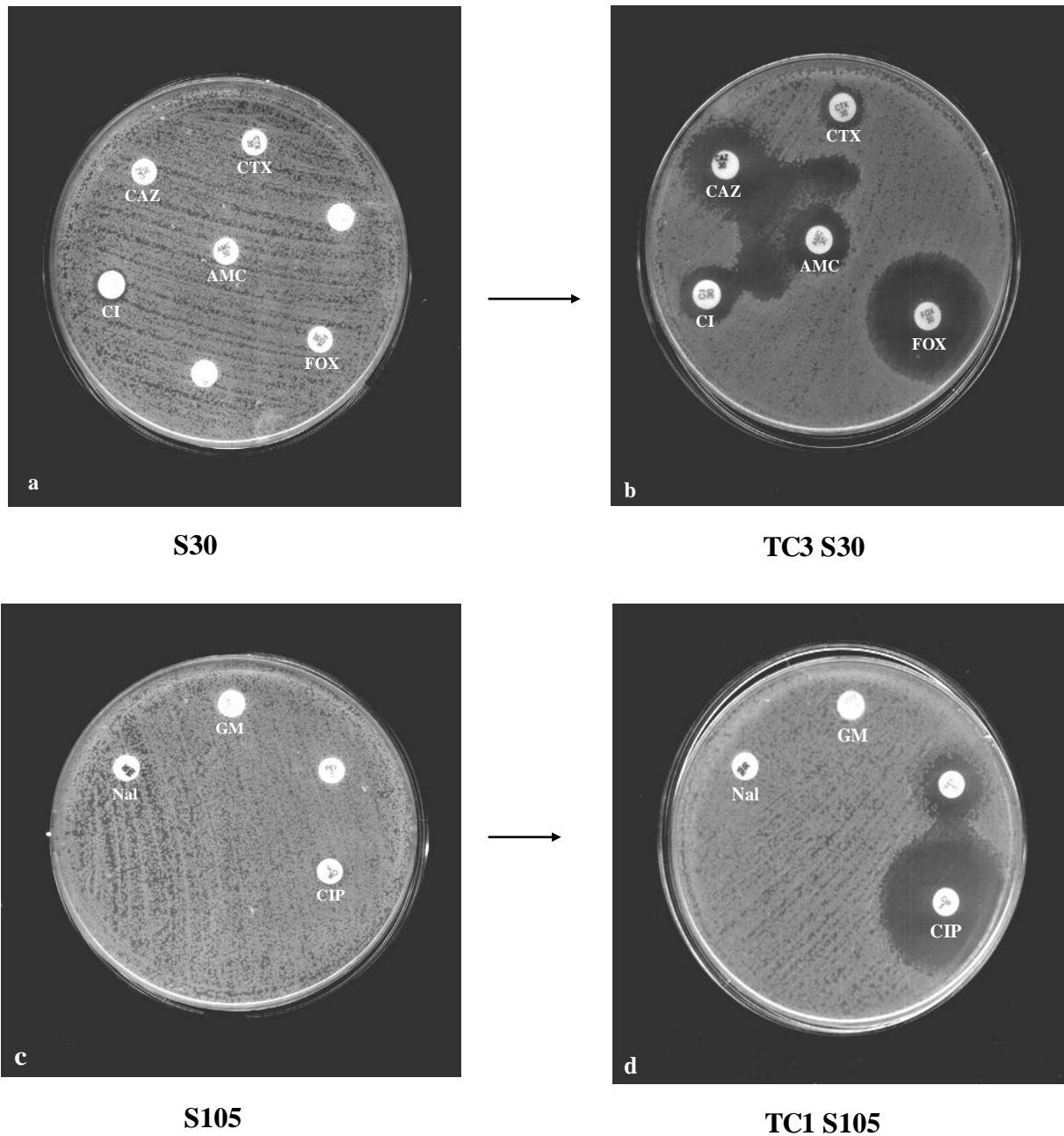


Fig. 13 : Sensibilité vis-à-vis des antibiotiques β -lactames (a,b) et non β -lactames (c,d) (méthode de diffusion en milieu gélosé) de deux souches de *C. freundii* et leurs clones transconjugants

(a et b) : transfert de la résistance aux C3G (CTX, CAZ et CI) mais pas celle à la céfoxitine

(c et d) : transfert de la résistance à la gentamicine mais pas celle à la ciprofloxacine

Présence d'une image de synergie caractéristique de l'activité BLSE chez le clone TC3 S30 mais pas chez la souche parentale S30 (Faux négatif au test DDS)

CTX : céfotaxime, **CAZ :** ceftazidime, **CI :** ceftriaxone, **FOX :** céfoxitine, **AMC :** amoxicilline/acide clavulanique, **Nal :** acide nalidixique, **GM :** gentamicine, **CIP :** ciprofloxacine

V. 1. Gènes de β -lactamases à spectre élargi

La recherche des gènes bla_{CTX-M} a concerné d'abord les 109 souches. Les résultats de la PCR ont été positifs chez 97 souches (88 parmi les 93 DDS+ et 9 parmi les 16 DDS-). Les souches DDS+CTX-M- sont celles de *K. pneumoniae* (S13) et de *K. oxytoca* (S51, S84, S86, S111) et les souches DDS-CTX-M+ sont celles de *C. freundii* (S29, S30, S36, S57, S96, S101, S104 et S105) et *E. sakazakii* S22 (Fig. 14). L'utilisation d'amorces spécifiques de groupes a montré l'appartenance des gènes bla_{CTX-M} des 97 souches au groupe CTX-M1 (Fig. 15). La recherche des gènes bla_{CTX-M} (groupe CTX-M1) a ensuite concerné tous les clones transconjugants (18 clones) des 13 souches CTX-M+. Les résultats ont montré l'acquisition de ce gène par les 18 clones (Tableau VI en annexe).

V. 2. Gènes de céphalosporinases AmpC

La recherche des gènes de céphalosporinases AmpC a été effectuée par PCR multiplex en utilisant des amorces spécifiques des 6 groupes de gènes bla_{AmpC} : MOX, CIT, DHA, ACC, EBC et FOX. Cette recherche a concerné toutes les souches ayant montré une zone d'inhibition d'un diamètre < 18 mm pour la céfoxitine (Iabadene et al., 2009). Ces souches au nombre de 31 (16 souches DDS- et 15 souches DDS+) appartiennent aux espèces *K. pneumoniae* (5 souches), *C. freundii* (13 souches), *C. braakii* (1 souche), *E. sakazakii* (8 souches), *E. cloacae* (1 souche) et *E. coli* (3 souches). Les résultats ont montré la présence des gènes bla_{AmpC} chez 18 souches, ceux-ci sont du groupe CIT chez 16 souches (12 *C. freundii*, 1 *C. braakii*, 3 *K. pneumoniae*), du groupe EBC chez la souche de *E. cloacae* et des groupes CIT et FOX chez la souche *C. freundii* S132. Les souches AmpC- appartiennent aux espèces *E. sakazakii* (8 souches), *E. coli* (3 souches) et *K. pneumoniae* (2 souches) (Tableau V en annexe, Fig. 16).

La recherche des gènes bla_{AmpC} a aussi concerné tous les clones transconjugants (16 clones) issus de souches AmpC+ (12 souches de *C. freundii*). Les résultats ont montré que les gènes du groupe CIT sont transférables chez 4 souches (S57, S71, S99, S105), tandis que les gènes des groupes EBC et FOX ne sont pas transférables (Tableau VI en annexe, Fig. 17).

VI. Association des gènes bla_{CTX-M} avec la séquence *ISEcp1*

La séquence *ISEcp1* a été recherchée chez toutes les souches par PCR en ciblant le gène *ISEcp1B* codant pour sa transposase. Les résultats ont montré la présence de cette séquence chez 78 souches toutes CTX-M+ : *K. pneumoniae* (n=48), *K. oxytoca* (n=4), *C. freundii* (n=11), *E. sakazakii* (n=8) et *E. coli* (n=7). La PCR a été négative pour le reste des souches CTX-M+ (19 souches) et chez toutes les souches CTX-M- (12 souches) (Tableau V en annexe, Fig. 18).

L'association gène bla_{CTX-M} /séquence *ISEcp1* a été recherchée chez toutes les souches CTX-M+, en utilisant deux amorces, l'une est spécifique des gènes bla_{CTX-M} et l'autre est spécifique de l'extrémité droite de la séquence *ISEcp1*. Cette association a été retrouvée chez toutes les souches y compris celles qui ont été négatives pour la PCR ciblant la séquence *ISEcp1*. Deux produits d'amplification de tailles différentes ont été obtenus, un de 1000 pb chez 81 souches dont 64 *K. pneumoniae*, 2 *K. oxytoca*, 8 *E. sakazakii* et 7 *E. coli* et un de 1100 pb chez 16 souches dont 11 *C. freundii*, 3 *K. pneumoniae* et 2 *K. oxytoca* (Tableau V en annexe, Fig. 19).

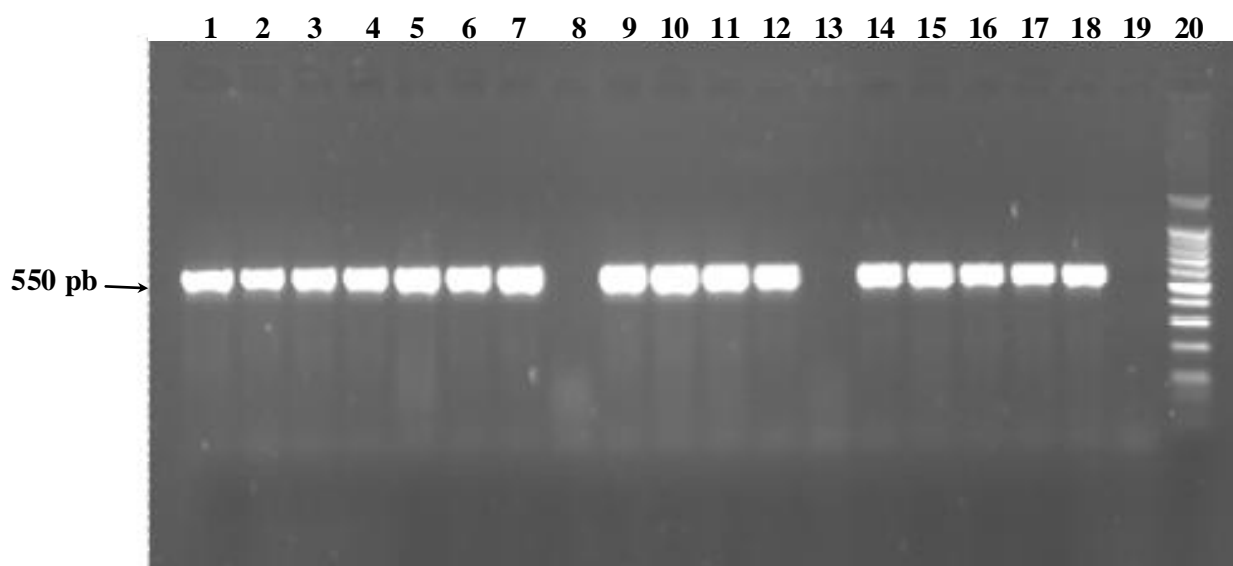


Fig. 14 : Détection par PCR des gènes de la famille *bla*_{CTX-M}

1-7, 9-12 et 14-17 : souches CTX-M+.

8 et 13 : souches CTX-M- (S18 et S63 respectivement).

18 : T⁺, 19 : T⁻, 20 : 100 bp DNA Ladder.

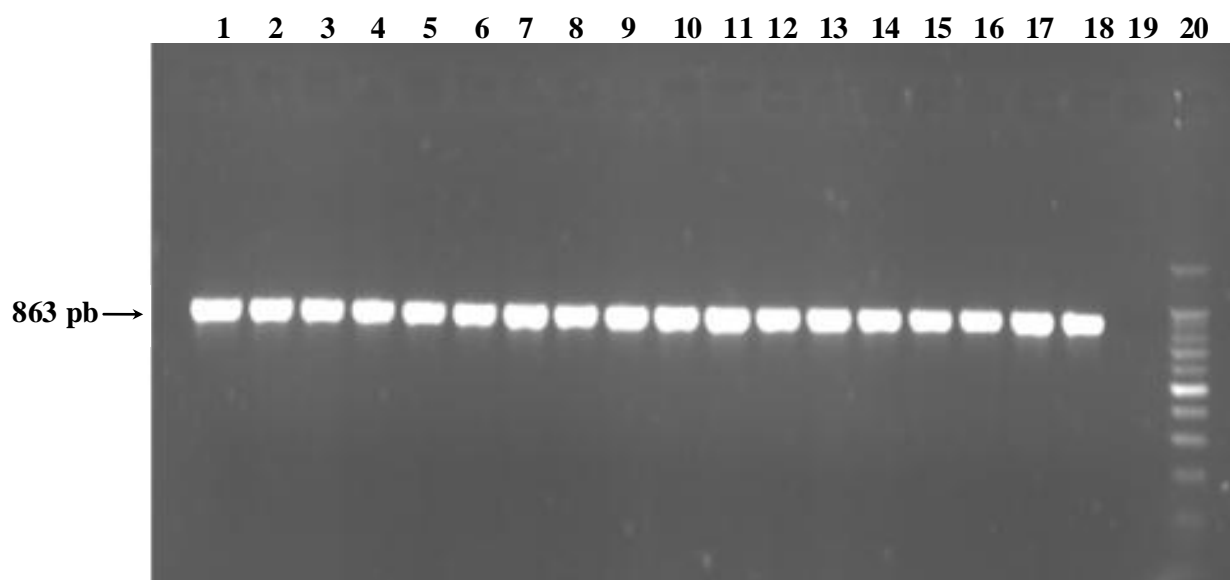


Fig. 15 : Détection par PCR des gènes du groupe CTX-M1

1-17 : souches CTX-M1+.

18 : T⁺, 19 : T⁻, 20 : 100 bp DNA Ladder.

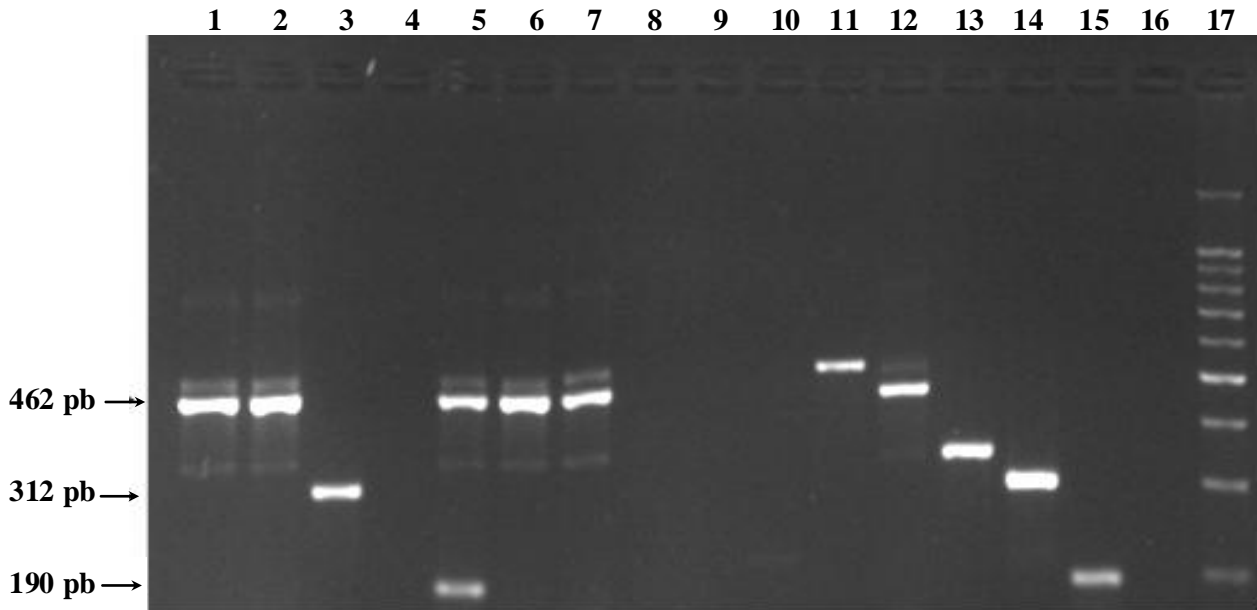


Fig. 16 : Détection des gènes *bla*_{AmpC} par PCR multiplex

- 1, 2, 6 et 7 : souches CIT+ (S106, S107, S20, S29)
- 3 : souche EBC+ (S108)
- 5 : souche CIT+, FOX+ (S132)
- 4, 8, 9 et 10 : souches AmpC- (S22, S24, S147, S26)
- 11-15 : T⁺ (MOX, CIT, AAC, EBC, FOX)
- 16 : T, 17 : 100 bp DNA Ladder

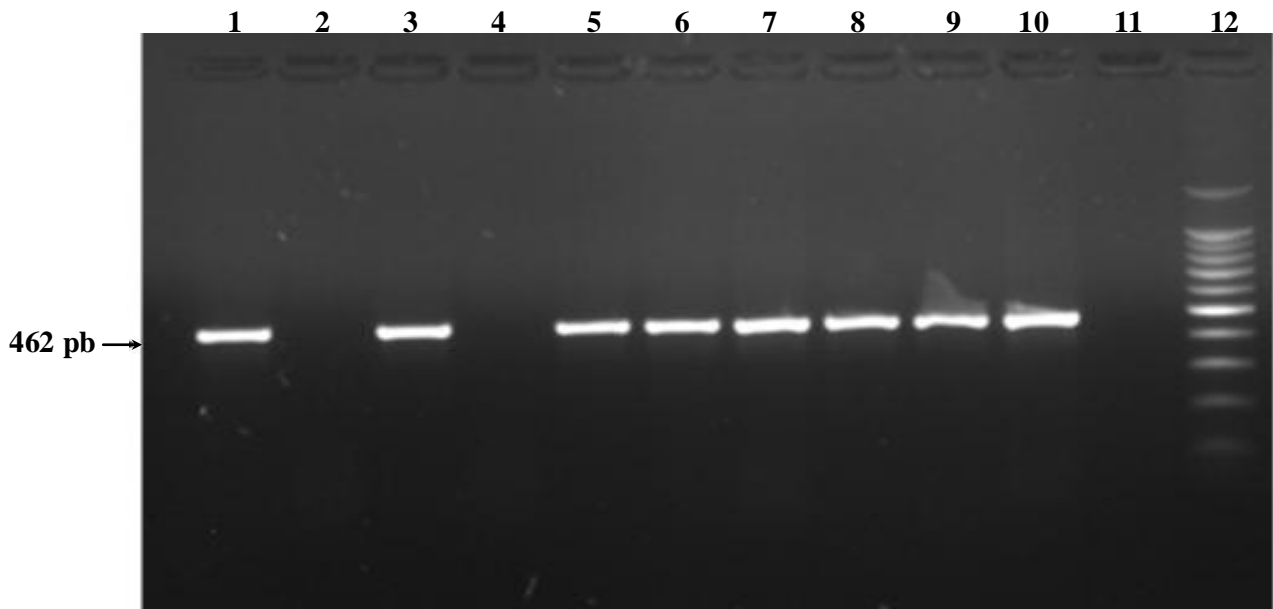


Fig. 17 : Détection des gènes *bla*_{AmpC} du groupe CIT chez les clones transconjugants

- 1-4 : souche S57 et ses clones transconjugants (TC2 S57, TC3 S57 et TC4 S57)
- 5-7 : souche S71 et ses clones transconjugants (TC1 S71 et TC2 S71)
- 8-10 : souche S99 et ses clones transconjugants (TC1 S99 et TC2 S99)
- 11 : T, 12 : 100 bp DNA Ladder

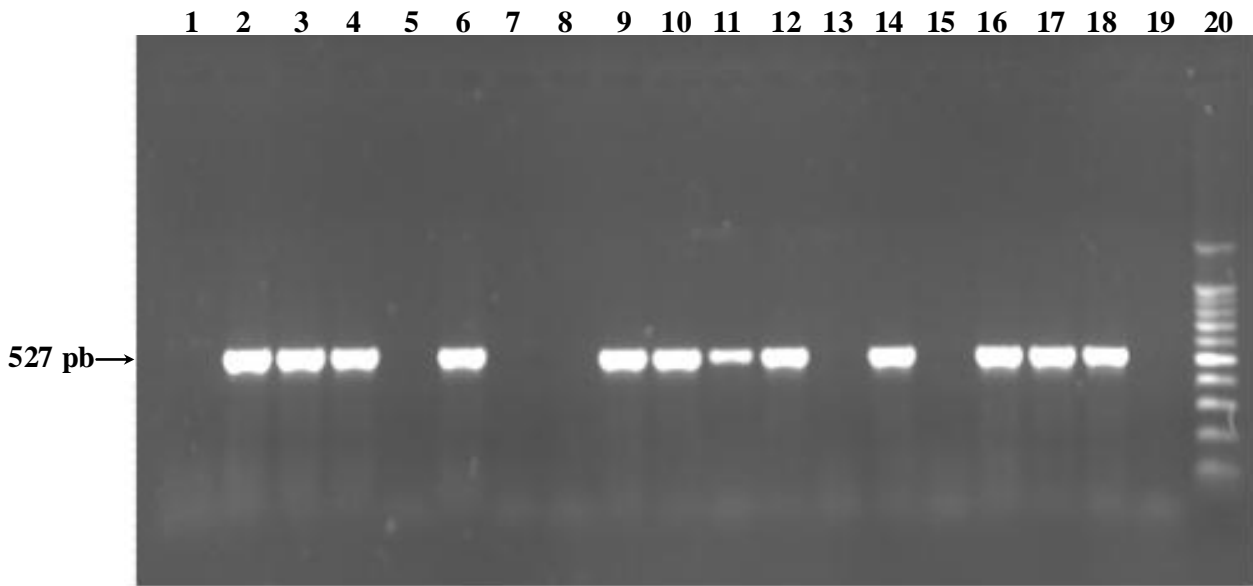


Fig. 18 : Détection par PCR de la séquence *ISEcp1*

2-4, 6, 9-12, 14, 16-17 : souches *ISEcp1+*

1, 5, 7-8, 13, 15 : souches *ISEcp1-* (S81, S97, S113, S116, S121 et S123, respectivement)

18 : T⁺, 19 : T⁻, 20 : 100 bp DNA Ladder

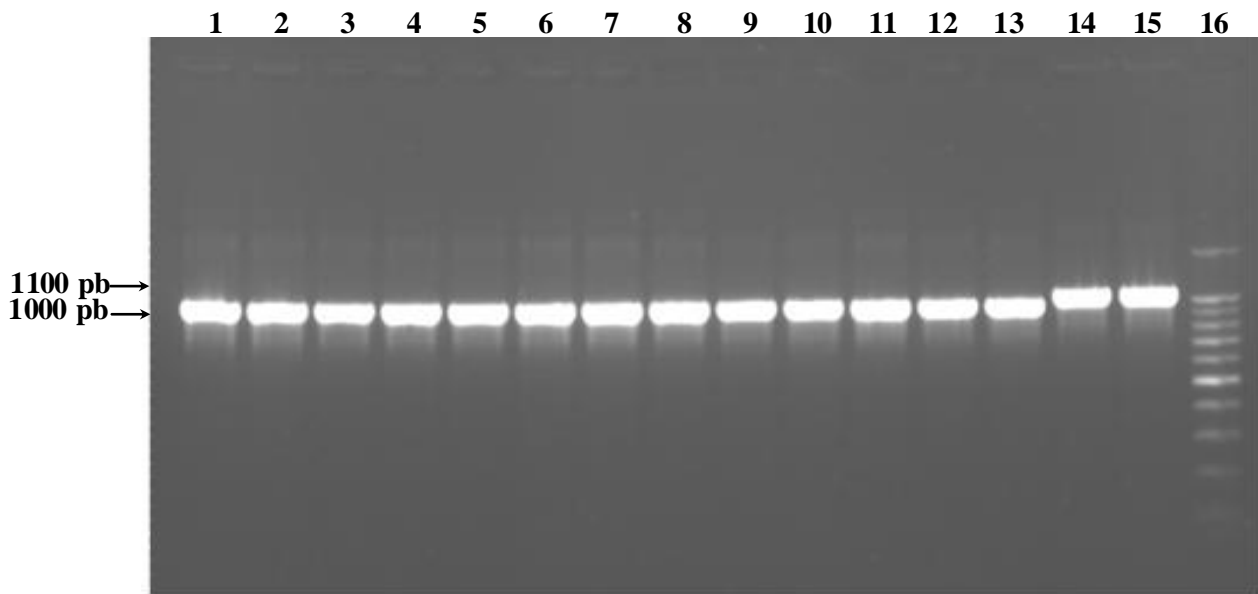


Fig. 19 : Détection par PCR de l'association gène *bla*_{CTX-M}/séquence *ISEcp1*

1-13 : souches positives pour l'association gène *bla*_{CTX-M}/séquence *ISEcp1* avec un produit d'amplification de 1000 pb

14 : souche positive pour l'association gène *bla*_{CTX-M}/séquence *ISEcp1* avec un produit d'amplification de 1100 pb (S6)

15 : T⁺, 16 : 100 pb DNA Ladder.

VII. Typage moléculaire des souches par ERIC-PCR

Le typage moléculaire des souches a été réalisé par ERIC-PCR. Les résultats ont montré une similarité de profils chez la plupart des souches appartenant à la même espèce (Tableau VII en annexe).

- Chez *K. pneumoniae* (71 souches), 5 profils ERIC ont été obtenus : K1 (n=1), K2 (n=64), K3 (n=2), K4 (n=3) et K5 (n=1) (Fig. 20).
- Chez *K. oxytoca* (8 souches), les profils ERIC ont été au nombre de trois : O1 (n=2), O2 (n=4) et O3 (n=2) (Fig. 21).
- Pour *C. freundii* (13 souches), 4 profils différents ont été obtenus : C1 (n=1), C2 (n=9), C3 (n=2) et C4 (n=1) (Fig. 22).
- Les souches appartenant aux espèces *E. sakazakii* (8 souches) et *E. coli* (7 souches) ont été toutes du même profil, S1 et E1 respectivement (Fig. 23 et 21).

Sur les 109 souches étudiées, 22 profils génétiques différents ont été obtenus (Tableau VIII en annexe). Pour la suite de notre travail, nous avons retenu une souche par profil : *K. pneumoniae* (n=7), *C. freundii* (n=8), *K. oxytoca* (n=3), *E. cloacae* (n=1), *E. coli* (n=1), *C. braakii* (n=1) et *E. sakazakii* (n=1) (Tableau VII). La suite de l'étude sur les 22 souches retenues a porté sur la détermination de la CMI des molécules β -lactames (céfoxitine, céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime et imipénème) et non β -lactames (gentamicine et ciprofloxacine), la recherche des déterminants de résistance plasmidiques aux quinolones et l'analyse des plasmides porteurs de la résistance aux antibiotiques.

VIII. Concentration minimale inhibitrice « CMI » des antibiotiques

La CMI de 7 antibiotiques (molécules β -lactames et non β -lactames) a été déterminée chez les 22 souches par la méthode de dilution en milieu gélosé, les résultats présentés dans le Tableau VIII ont montré que :

- **pour les C2G (céfoxitine)**, les souches de *C. freundii* (CMI de 64 à 512 $\mu\text{g/ml}$), *C. braakii* (CMI de 128 $\mu\text{g/ml}$), *E. sakazakii* (CMI de 512 $\mu\text{g/ml}$) et *E. cloacae* (CMI de 1024 $\mu\text{g/ml}$) étaient résistantes à la céfoxitine avec des valeurs de CMI élevées, contrairement aux souches de *Klebsiella* et de *E. coli* qui ont été résistantes intermédiaires (n=4 : CMI de 16 à 32 $\mu\text{g/ml}$) ou sensibles (n=7 : CMI \leq 8 $\mu\text{g/ml}$) à l'action de cet antibiotique. Les souches qui ont été résistantes intermédiaires sont : *K. pneumoniae* S18, S41O et S79 et *E. coli* S72.
- **pour les C3G**, toutes les souches étaient résistantes au céfotaxime et au ceftriaxone avec des CMI allant de 16 à plus de 1024 $\mu\text{g/ml}$. Pour la ceftazidime, les souches étaient aussi résistantes avec des CMI variant de 16 à 512 $\mu\text{g/ml}$ à l'exception de celles de *K. oxytoca* qui étaient entre résistants intermédiaires (S51 et S94 : CMI de 8 $\mu\text{g/ml}$) et sensibles (S9 : CMI \leq 4 $\mu\text{g/ml}$).
- **pour l'imipénème**, toutes les souches ont été sensibles avec des CMI de \leq 0.5 à 2 $\mu\text{g/ml}$.
- **pour les molécules non β -lactames**, la plupart des souches (16/22) étaient résistantes à la gentamicine avec des CMI allant de 16 à plus de 1024 $\mu\text{g/ml}$, les 6 souches restantes ont été toutes sensibles avec des CMI \leq 1 $\mu\text{g/ml}$ (S13 et S18 de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* S51, *C. braakii* S106, *E. cloacae* S108 et *E. coli* S72). Pour la ciprofloxacine, toutes les souches ont été résistantes avec des CMI variant de 2 à 128 $\mu\text{g/ml}$ à l'exception de 3 souches de *K. pneumoniae* (S13, S18 et S50), 2 souches de *K. oxytoca* (S9 et S51) qui ont été sensibles (CMI allant de \leq 0.125 à 0.5 $\mu\text{g/ml}$) et une souche de *C. freundii* (S132) qui a été résistante intermédiaire (CMI de 1 $\mu\text{g/ml}$).

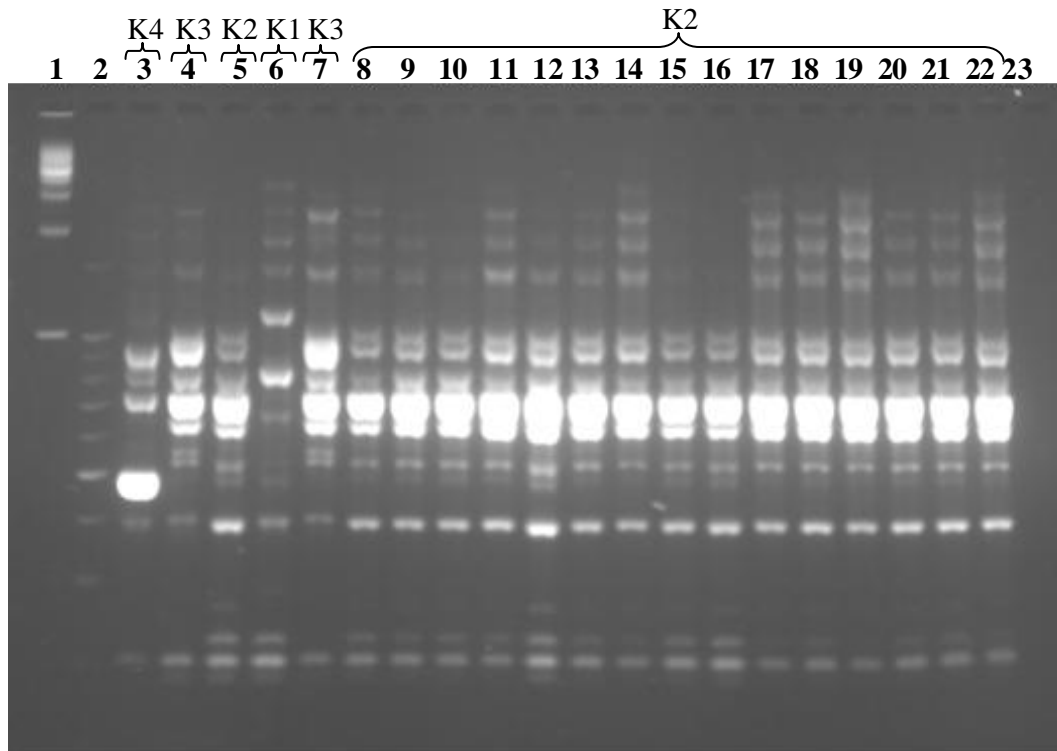


Fig. 20 : Profils ERIC des souches de *K. pneumoniae*.

1: 1 kb DNA Step Ladder, 2: 100 bp DNA Ladder, 3: S18, 4: S41O, 5: S46, 6: S50, 7: S79, 8: S1, 9: S14, 10: S40, 11: S119, 12: S10, 13: S47, 14: S113, 15: S143, 16: S48, 17: S82, 18: S124, 19: S76, 20: S73, 21: S122, 22: S133, 23: T.

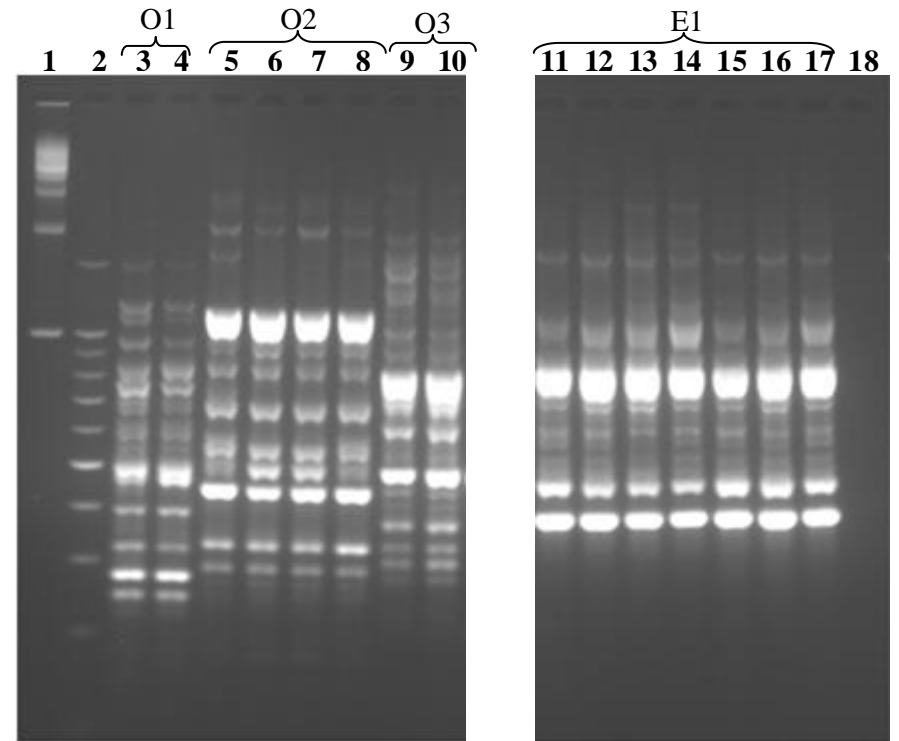


Fig. 21 : Profils ERIC des souches de *K. oxytoca* (3-10) et *E. coli* (11-17).

1: 1 kb DNA Step Ladder , 2: 100 bp DNA Ladder, 3: S6, 4: S9, 5: S51, 6: S84, 7: S86, 8: S111, 9: S94, 10: S114, 11: S41T, 12: S72, 13: S80, 14: S53, 15: S59, 16: S100, 17: S112, 18: T .

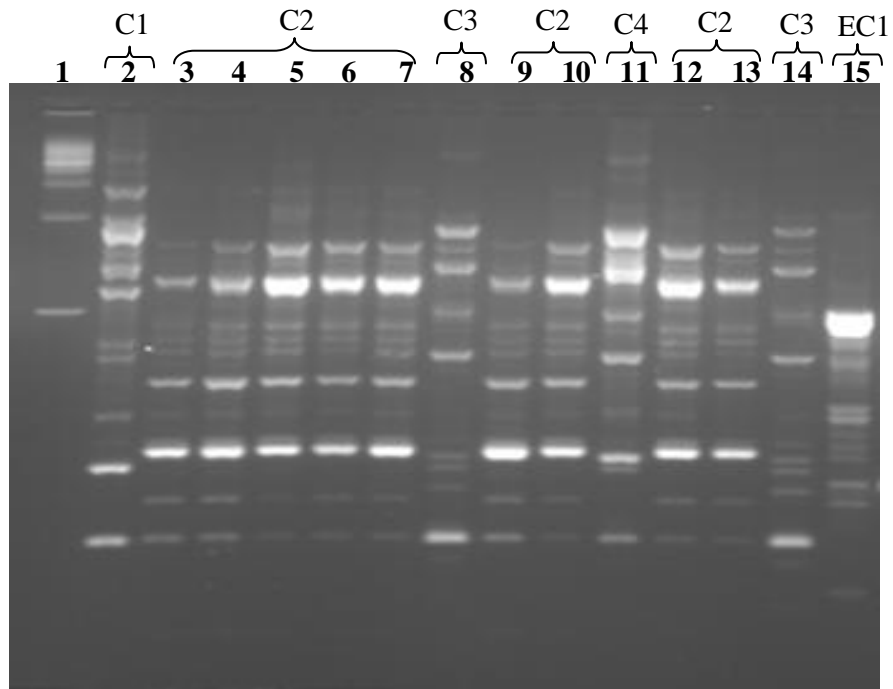


Fig. 22 : Profils ERIC des souches de *C. freundii* (2-14) et *E. cloacae* (15)

1: 1 Kb DNA Step Ladder, 2: S20, 3: S29, 4: S30, 5: S36, 6: S101, 7: S104, 8: S89, 9: S57, 10: S105, 11: S71, 12: S99, 13: S96, 14: S132, 15: S108

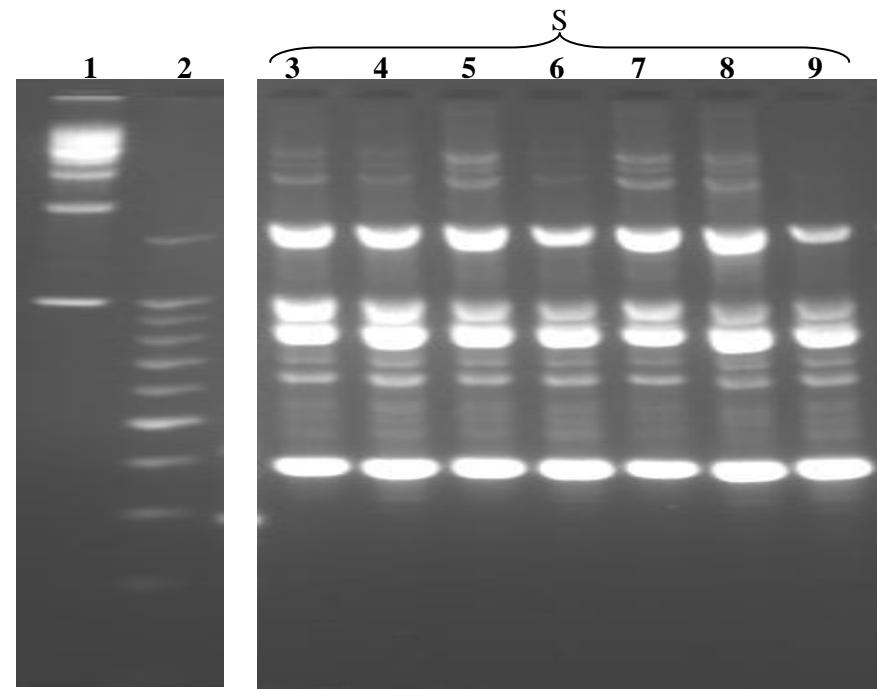


Fig. 23 : Profils ERIC des souches de *E. sakazakii*

1 : 1Kb DNA Step Ladder, 2 : 100 pb DNA Ladder, 3: S22, 4: S24, 5: S26, 6: S32, 7: S33, 8: S34, 9: S68

Tableau VII : Profils génétiques des 22 souches retenues

Espèce	Souches	Profil ERIC	Profil génétique
<i>K. pneumoniae</i> (n=7)	S1	K2	bla_{CTX-M}^{NT} , ISEcp1
	S13	K5	BLSE+
	S18	K4	CIT ^{NT}
	S410	K3	bla_{CTX-M}^{NT}
	S46	K2	bla_{CTX-M}^{NT}
	S50	K1	bla_{CTX-M}^{NT}
	S79	K3	bla_{CTX-M}^T
<i>K. oxytoca</i> (n=3)	S9	O1	bla_{CTX-M}^T , ISEcp1
	S51	O2	OXY
	S94	O3	bla_{CTX-M}^{NT} , ISEcp1
<i>C. freundii</i> (n=8)	S20	C1	bla_{CTX-M}^T , CIT ^{NT} , ISEcp1
	S29	C2	bla_{CTX-M}^T , CIT ^{NT} , ISEcp1
	S57	C2	bla_{CTX-M}^T , CIT ^T , ISEcp1
	S71	C4	CIT ^T
	S89	C3	bla_{CTX-M}^T , CIT ^{NT} , ISEcp1
	S96	C2	bla_{CTX-M}^{NT} , CIT ^{NT} , ISEcp1
	S99	C2	CIT ^T
	S132	C3	bla_{CTX-M}^T , CIT ^{NT} , FOX ^{NT} , ISEcp1
<i>C. braakii</i> (n=1)	S106	CB1	CIT ^{NT}
<i>E. sakazakii</i> (n=1)	S22	S1	bla_{CTX-M}^{NT} , ISEcp1
<i>E. cloacae</i> (n=1)	S108	EC1	EBC
<i>E. coli</i> (n=1)	S72	E1	bla_{CTX-M}^{NT} , ISEcp1

^{NT} : gène de résistance non transférable, ^T : gène de résistance transférable.

Tableau VIII : Concentration minimale inhibitrice des antibiotiques chez les 22 souches

Espèce	Souche	Antibiotiques*													
		FOX		CTX		CI		CAZ		GM		IMP		CIP	
		≤8S	>32R	≤1S	>2R	≤1S	>2R	≤4S	>8R	≤2S	>4R	≤2S	>8R	≤0.5S	>1R
<i>K. pneumoniae</i>	(FOX ^R)	S18	32 I	32 R	32 R	128 R	≤ 1 S	1 S	≤ 0.125 S						
		S410	32 I	256 R	512 R	64 R	256 R	≤ 0.5 S	64 R						
		S79	32 I	512 R	1024 R	64 R	512 R	≤ 0.5 S	64 R						
	(FOX ^S)	S1	≤ 8 S	512 R	1024 R	64 R	64 R	1 S	4 R						
		S13	≤ 8 S	16 R	32 R	16 R	≤ 1 S	1 S	≤ 0.125 S						
		S46	≤ 8 S	512 R	1024 R	128 R	64 R	1 S	4 R						
		S50	≤ 8 S	512 R	1024 R	32 R	128 R	1 S	≤ 0.125 S						
<i>K. oxytoca</i>	(FOX ^S)	S9	≤ 8 S	64 R	256 R	≤ 4 S	64 R	1 S	0.25 S						
		S51	≤ 8 S	16 R	16 R	8 I	≤ 1 S	1 S	0.5 S						
		S94	≤ 8 S	512 R	1024 R	8 I	256 R	≤ 0.5 S	32 R						
<i>C. freundii</i>	(FOX ^R)	S20	128 R	256 R	512 R	64 R	64 R	2 S	16 R						
		S29	256 R	1024 R	1024 R	256 R	> 1024 R	2 S	32 R						
		S57	256 R	512 R	1024 R	256 R	> 1024 R	2 S	32 R						
		S71	512 R	128 R	128 R	256 R	64 R	2 S	4 R						
		S89	128 R	1024 R	1024 R	64 R	> 1024 R	1 S	4 R						
		S96	256 R	> 1024 R	> 1024 R	512 R	> 1024 R	1 S	16 R						
		S99	256 R	64 R	64 R	128 R	128 R	≤ 0.5 S	16 R						
		S132	64 R	256 R	1024 R	64 R	> 1024 R	2 S	1 I						
<i>C. braakii</i> (FOX ^R)	S106	128 R	128 R	128 R	256 R	≤ 1 S	1 S	2 R							
<i>E. sakazakii</i> (FOX ^R)	S22	512 R	256 R	256 R	64 R	16 R	2 S	2 R							
<i>E. cloacae</i> (FOX ^R)	S108	1024 R	32 R	32 R	16 R	≤ 1 S	1 S	2 R							
<i>E. coli</i> (FOX ^R)	S72	16 I	512 R	1024 R	32 R	≤ 1 S	≤ 0.5 S	128 R							
<i>E. coli</i> K12 BM21		≤ 8 S	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 4 S	≤ 1 S	≤ 0.5 S	≤ 0.125 S							

FOX : céfoxitine, CTX : céfotaxime, CI : ceftriaxone, CAZ : ceftazidime, GM : gentamicine, IMP : imipénème, CIP : ciprofloxacine, * : concentrations critiques déterminées selon le CA-SFM (2010), R : Résistant, S : Sensible, I : Intermédiaire, FOX^R : diamètre de la zone d'inhibition de FOX < 18 mm, FOX^S : diamètre de la zone d'inhibition de FOX > 18 mm

Les résultats de la détermination de la CMI chez les clones transconjugants (Tableau IX) a montré que :

- **pour les C3G**, le transfert de la résistance au céfotaxime et au ceftriaxone a été positif ; pour la ceftazidime, la résistance a été transférable chez 5 sur les 8 souches résistantes (*K. pneumoniae* S79 et *C. freundii* S29, S57, S71 et S99).
- **pour la céfoxitine**, la résistance n'a été transférable que chez les souches S57 (clone TC3), S71 et S99 de *C. freundii*.
- **pour les antibiotiques non β -lactames**, la résistance à la gentamicine a été acquise par tous les clones transconjugants à l'exception de TC3 S57 et TC1 S99. Concernant la ciprofloxacine, tous les clones ont été sensibles ; cependant, les CMI de certains clones ont été plus élevées (0.5 $\mu\text{g/ml}$: clones transconjugants des souches S79, S9 (TC1 et TC2), S29, S57 et S99) que la CMI de la souche réceptrice *E. coli* K12 BM21 ($\leq 0.125 \mu\text{g/ml}$).

IX. Déterminants PMQR « *plasmid-mediated quinolone resistance* » de résistance aux quinolones

Pour les déterminants *qnr*, les résultats ont été positifs chez 15 souches, avec la présence des gènes *qnrB* chez 12 souches (7 *C. freundii*, 2 *K. pneumoniae*, 2 *K. oxytoca*, 1 *E. sakazakii*), *qnrS* chez 2 souches (*K. oxytoca* et *E. cloacae*) et *qnrB+qnrS* chez une souche de *C. freundii* (Tableau X, Fig. 24). Les gènes *aac (6')-Ib* ont été présents chez 9 souches (5 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 2 *C. freundii*, 1 *E. sakazakii*) (Tableau X, Fig. 25). Contrairement aux gènes *qnr* et *aac (6')-Ib*, le gène *qepA* a été absent chez toutes les souches.

La recherche des gènes *qnr* chez les clones transconjugants a montré l'acquisition des gènes *qnrB* par tous les clones transconjugants des souches S9, S29, S57 et S99 excepté le clone TC3 S9 ; par contre, les gènes *qnrS* n'ont pas été transférables. Les gènes *aac (6')-Ib* n'ont été transférables que chez la souche S79 (Tableau XI).

X. Caractérisation des plasmides porteurs des gènes de résistance aux antibiotiques

L'analyse des profils plasmidiques n'a concerné que les souches (n=9) qui ont montré un transfert positif par conjugaison sur milieu supplémenté de céfotaxime ainsi que tous leurs clones transconjugants (n=15).

Les Fig. 26, 27 et Fig. 2 en annexe montrent les résultats obtenus sur les souches sauvages, leurs profils plasmidiques, résumés dans le Tableau XII, indiquent la présence de 10 grands plasmides de taille variant de 34 à 155 Kb et de 13 petits plasmides de taille comprise entre 2.8 à 22 kb.

Les Fig. 28 et 29 montrent les résultats obtenus sur les clones transconjugants. La comparaison des profils plasmidiques (Tableau XIII) de ces clones par rapport à leurs souches parentales indique que certains plasmides sont transférables.

Tableau IX : Concentration minimale inhibitrice des antibiotiques chez les souches donatrices et leurs clones transconjugants

Souches	Antibiotiques*											
	FOX		CTX		CI		CAZ		GM		CIP	
	≤8S	>32R	≤1S	>2R	≤1S	>2R	≤4S	>8R	≤2S	>4R	≤0.5S	>1R
S79	32 I		512 R		1024 R		64 R		512 R		64 R	
TC1 S79	≤ 8 S		256 R		256 R		16 R		128 R		0.5 S	
S9	≤ 8 S		64 R		256 R		≤ 4 S		64 R		0.25 S	
TC1 S9	≤ 8 S		64 R		128 R		≤ 4 S		16 R		0.5 S	
TC2 S9	≤ 8 S		32 R		256 R		≤ 4 S		16 R		0.5 S	
TC3 S9	≤ 8 S		32 R		256 R		≤ 4 S		16 R		≤ 0.125 S	
S20	128 R		256 R		512 R		64 R		64 R		16 R	
TC3 S20	≤ 8 S		64 R		256 R		≤ 4 S		16 R		≤ 0.125 S	
TC4 S20	≤ 8 S		32 R		128 R		≤ 4 S		16 R		≤ 0.125 S	
S29	256 R		1024 R		1024 R		256 R		> 1024 R		32 R	
TC1 S29	≤ 8 S		256 R		512 R		32 R		> 1024 R		0.5 S	
S57	256 R		512 R		1024 R		256 R		> 1024 R		32 R	
TC2 S57	≤ 8 S		256 R		512 R		64 R		> 1024 R		0.5 S	
TC3 S57	64 R		128 R		128 R		256 R		2 S		0.5 S	
TC4 S57	≤ 8 S		256 R		512 R		64 R		> 1024 R		0.5 S	
S71	512 R		128 R		128 R		256 R		64 R		4 R	
TC1 S71	64 R		64 R		64 R		128 R		16 R		≤ 0.125 S	
S89	128 R		1024 R		1024 R		64 R		> 1024 R		4 R	
TC1 S89	≤ 8 S		32 R		128 R		≤ 4 S		> 1024 R		≤ 0.125 S	
S99	256 R		64 R		64 R		128 R		128 R		16 R	
TC1 S99	64 R		64 R		64 R		128 R		≤ 1 S		0.5 S	
TC2 S99	64 R		32 R		64 R		128 R		32 R		0.5 S	
S132	64 R		256 R		1024 R		64 R		> 1024 R		1 I	
TC1 S132	≤ 8 S		32 R		128 R		≤ 4 S		> 1024 R		≤ 0.125 S	
<i>E. coli</i> K12 BM21	≤ 8 S		≤ 1 S		≤ 1 S		≤ 4 S		≤ 1 S		≤ 0.125 S	

FOX : céfoxitine, CTX : céfotaxime, CI : ceftriaxone, CAZ : ceftazidime, GM : gentamicine, CIP : ciprofloxacine, * : concentrations critiques déterminées selon le CA-SFM (2010), R : Résistant, S : Sensible, I : Intermédiaire

Tableau X : Résultats de l'amplification par PCR des déterminants PMQR

Espèce	Souche	Déterminants PMQR		
		<i>qnr</i> (A, B, S)	<i>qepA</i>	<i>aac</i> (6')-Ib
<i>K. pneumoniae</i>	S18	-	-	-
	S410	-	-	+
	S79	-	-	+
	S1	+ (B)	-	+
	S13	-	-	-
	S46	+ (B)	-	+
	S50	-	-	+
<i>K. oxytoca</i>	S9	+ (B)	-	-
	S51	+ (S)	-	-
	S94	+ (B)	-	+
<i>C. freundii</i>	S20	+ (B)	-	+
	S29	+ (B)	-	-
	S57	+ (B)	-	-
	S71	+ (B)	-	-
	S89	+ (B)	-	-
	S96	+ (B)	-	-
	S99	+ (B)	-	-
	S132	+ (B, S)	-	+
<i>C. braakii</i>	S106	-	-	-
<i>E. sakazakii</i>	S22	+ (B)	-	+
<i>E. cloacae</i>	S108	+ (S)	-	-
<i>E. coli</i>	S72	-	-	-

+ : présence du produit d'amplification, - : absence du produit d'amplification

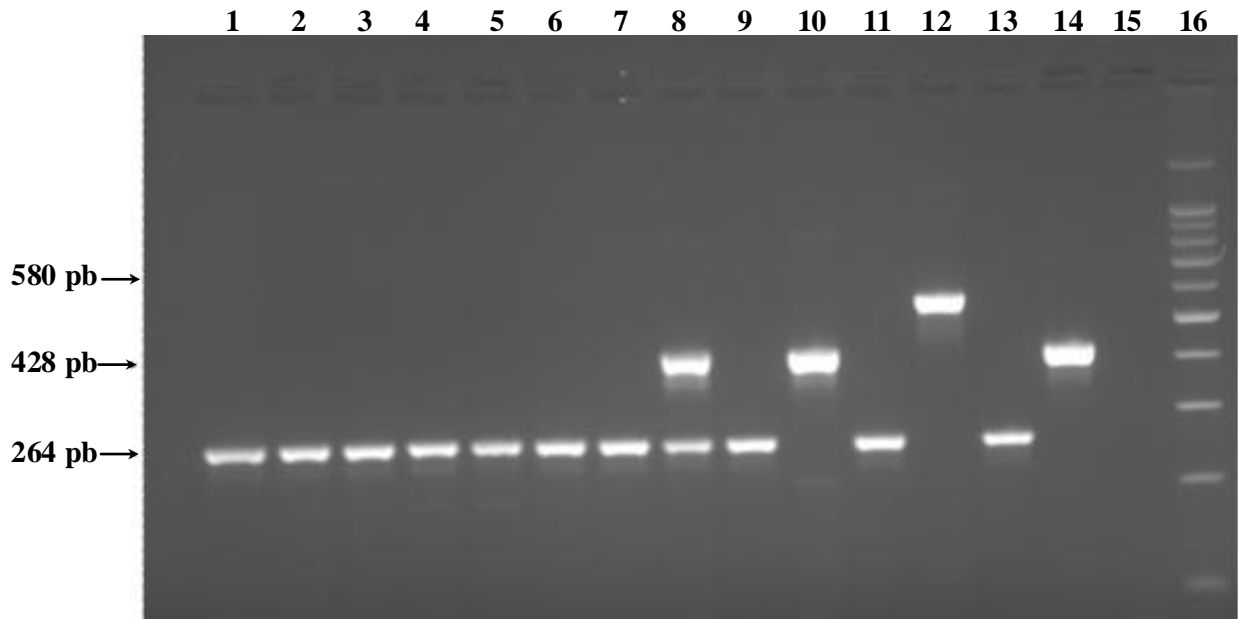


Fig. 24 : Détection des gènes *qnr* (*A*, *B* et *S*) par PCR multiplex

1-7, 9 et 11 : souches *qnrB*⁺ (S20, S29, S57, S71, S89, S96, S99, S22 et S147 respectivement)

8 : souche *qnrB*⁺*qnrS*⁺ (S132)

10 : souche *qnrS*⁺ (S108)

12 : T⁺ *qnrA*, 13 : T⁺ *qnrB*, 14 : T⁺ *qnrS*, 15 : T, 16 : 100 bp DNA Ladder

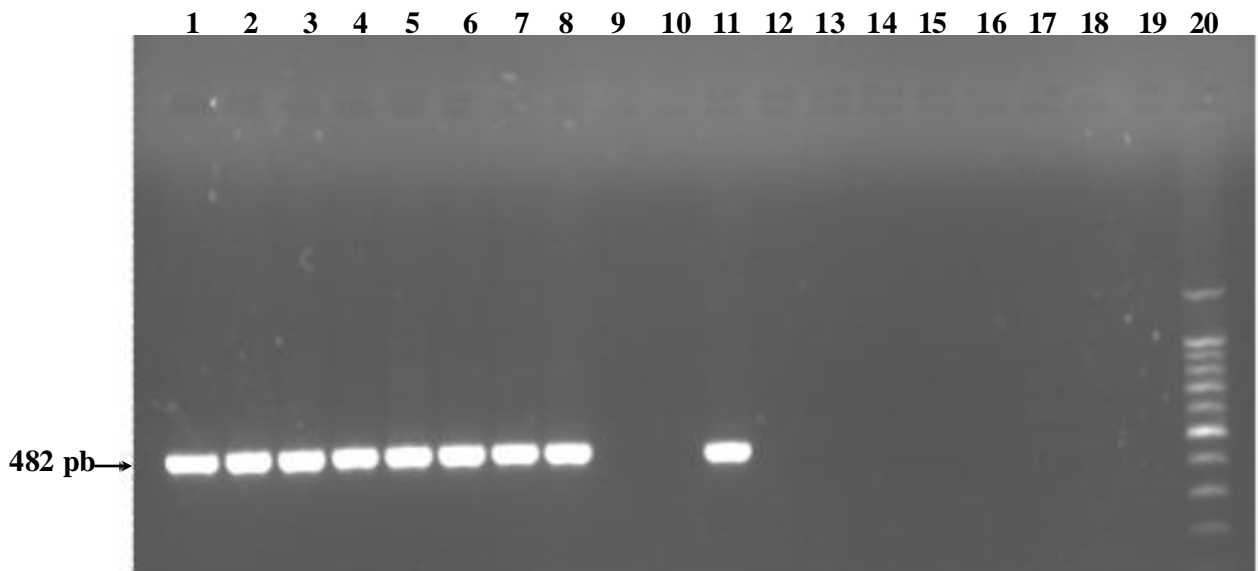


Fig. 25 : Détection par PCR des gènes *aac* (6')-Ib

1-8 et 11 : souches *aac* (6')-Ib⁺ (S46, S73, S94, S145, S20, S132, S22, S147 et S50 respectivement)

9-10, 12-18 : souches *aac* (6')-Ib⁻ (S18, S13, S9, S51, S63, S106, S108, S72 et S53 respectivement)

19 : T, 20 : 100 bp DNA Ladder

Tableau XI : Résultats de l'amplification par PCR des déterminants *qnr* et *aac (6')-Ib* chez les souches donatrices et leurs clones transconjugants

Souches	<i>qnr (B, S)</i>	<i>aac (6')-Ib</i>
S79	-	+
TC1 S79	/	+
S9	+ (B)	-
TC1 S9	+ (B)	/
TC2 S9	+ (B)	/
TC3 S9	-	/
S20	+ (B)	+
TC3 S20	-	-
TC4 S20	-	-
S29	+ (B)	-
TC1 S29	+ (B)	/
S57	+ (B)	-
TC2 S57	+ (B)	/
TC3 S57	+ (B)	/
TC4 S57	+ (B)	/
S71	+ (B)	-
TC1 S71	-	/
S89	+ (B)	-
TC1 S89	-	/
S99	+ (B)	-
TC1 S99	+ (B)	/
TC2 S99	+ (B)	/
S132	+ (B, S)	+
TC1 S132	-	-

+ : présence du produit d'amplification, - : absence du produit d'amplification, / : PCR non réalisée.

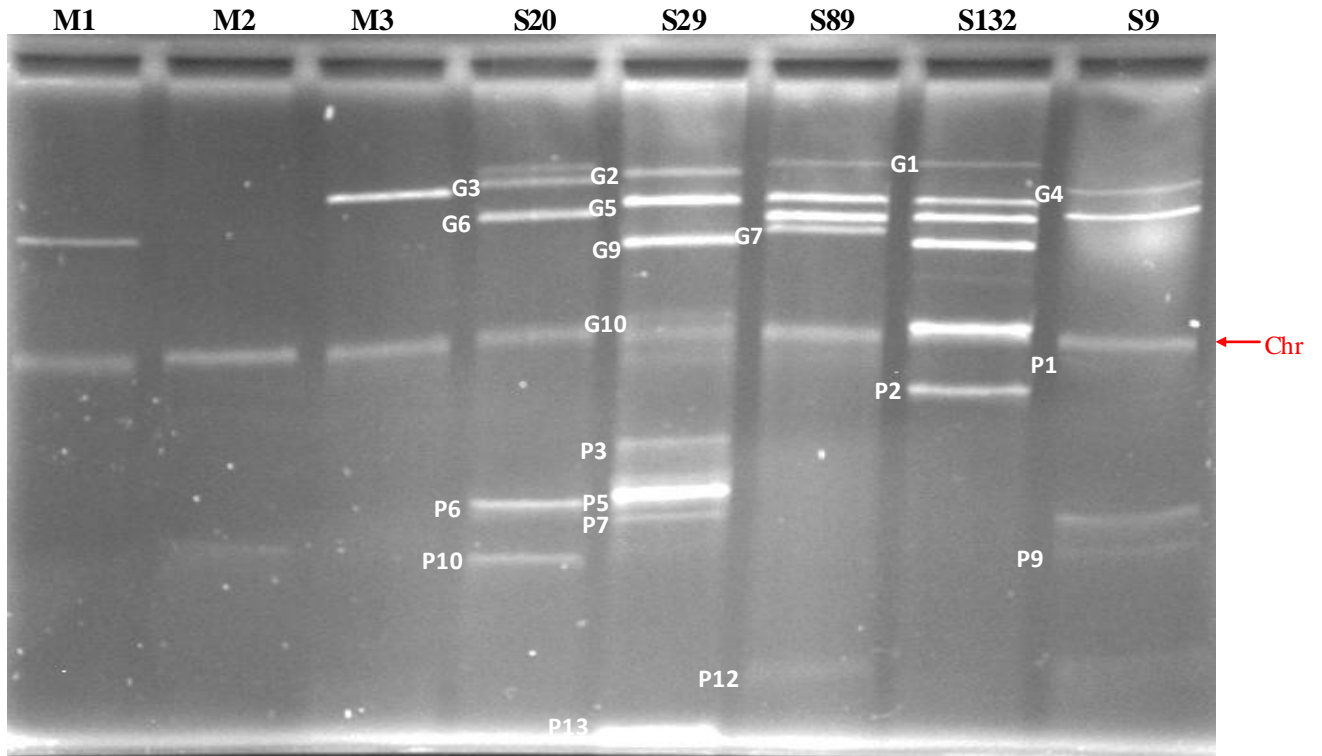


Fig. 26 : Profils plasmidiques des souches productrices de BLSE CTX-M transférables

M1: RP4 (54 kb), **M2:** pBR322 (4.36 kb), **M3:** pIP113 (128 kb).

Cette figure montre les plasmides : G4 (128 kb), p1 (22 kb) et p9 (4.4 kb) spécifiques à la souche S9 en plus des plasmides G6 (81 kb), p7 (4.6 kb) et p12 (3.3 kb) communs aux autres souches

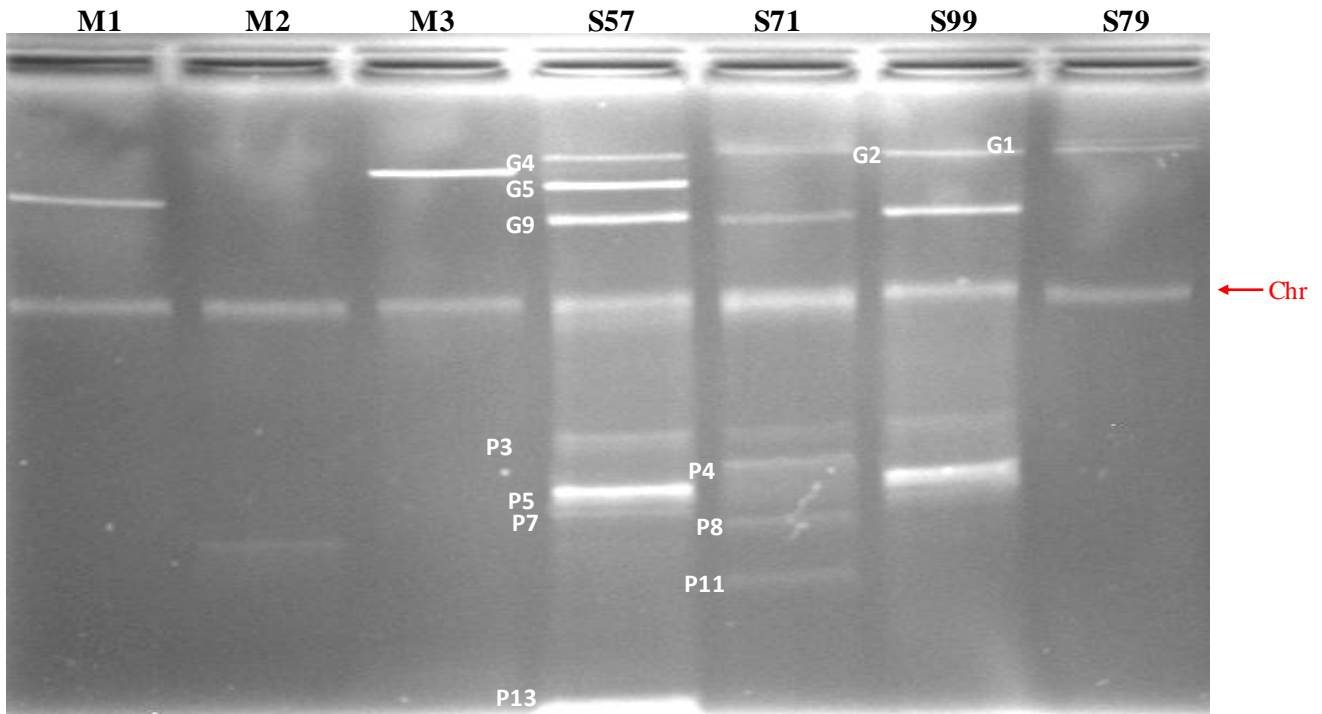


Fig. 27 : Profils plasmidiques des souches productrices de céphalosporinases AmpC transférables du groupe CIT (S71 et S99), BLSE CTX-M transférable (S79) et AmpC transférable du groupe CIT + BLSE CTX-M transférable (S57)

Cette figure indique les plasmides G1 (155 kb) et G2 (148 kb) de la souche S79

M1: RP4 (54 kb), **M2:** pBR322 (4.36 kb), **M3:** pIP113 (128 kb)

Tableau XII : Profils plasmidiques des souches sauvages

Plasmides (kb)	S20	S29	S89	S132	S57	S71	S99	S9	S79
G1 (155)	█		█	█		█			█
G2 (148)		█			█		█		█
G3 (135)	█								
G4 (128)					█			█	
G5 (95)		█	█	█	█				
G6 (81)	█		█	█				█	
G7 (77)			█						
G8 (65)		█			█		█		
G9 (54)		█		█	█	█	█		
G10 (34)		█		█					
Chromosome	█	█	█	█	█	█	█	█	█
P1 (22)								█	
P2 (12)				█					
P3 (5.5)		█			█	█	█		
P4 (4.9)						█			
P5 (4.8)		█			█		█		
P6 (4.7)	█								
P7 (4.6)		█			█		█	█	
P8 (4.5)						█			
P9 (4.4)								█	
P10 (4.3)	█								
P11 (4)						█			
P12 (3.3)			█					█	
P13 (2.8)		█			█				

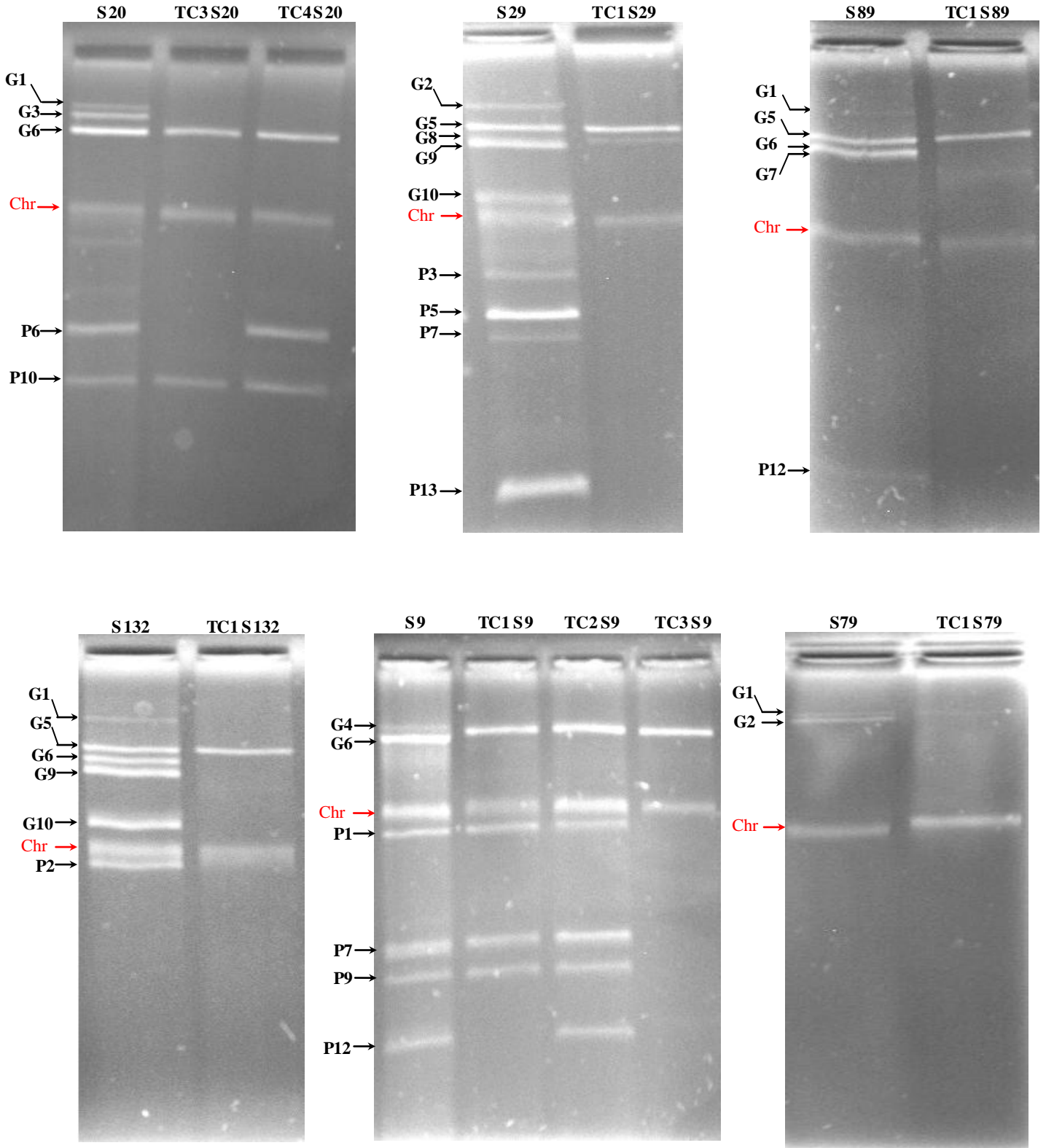


Fig. 28 : Profils plasmidiques des souches productrices de BLSE CTX-M transférables ainsi que leurs clones transconjugants

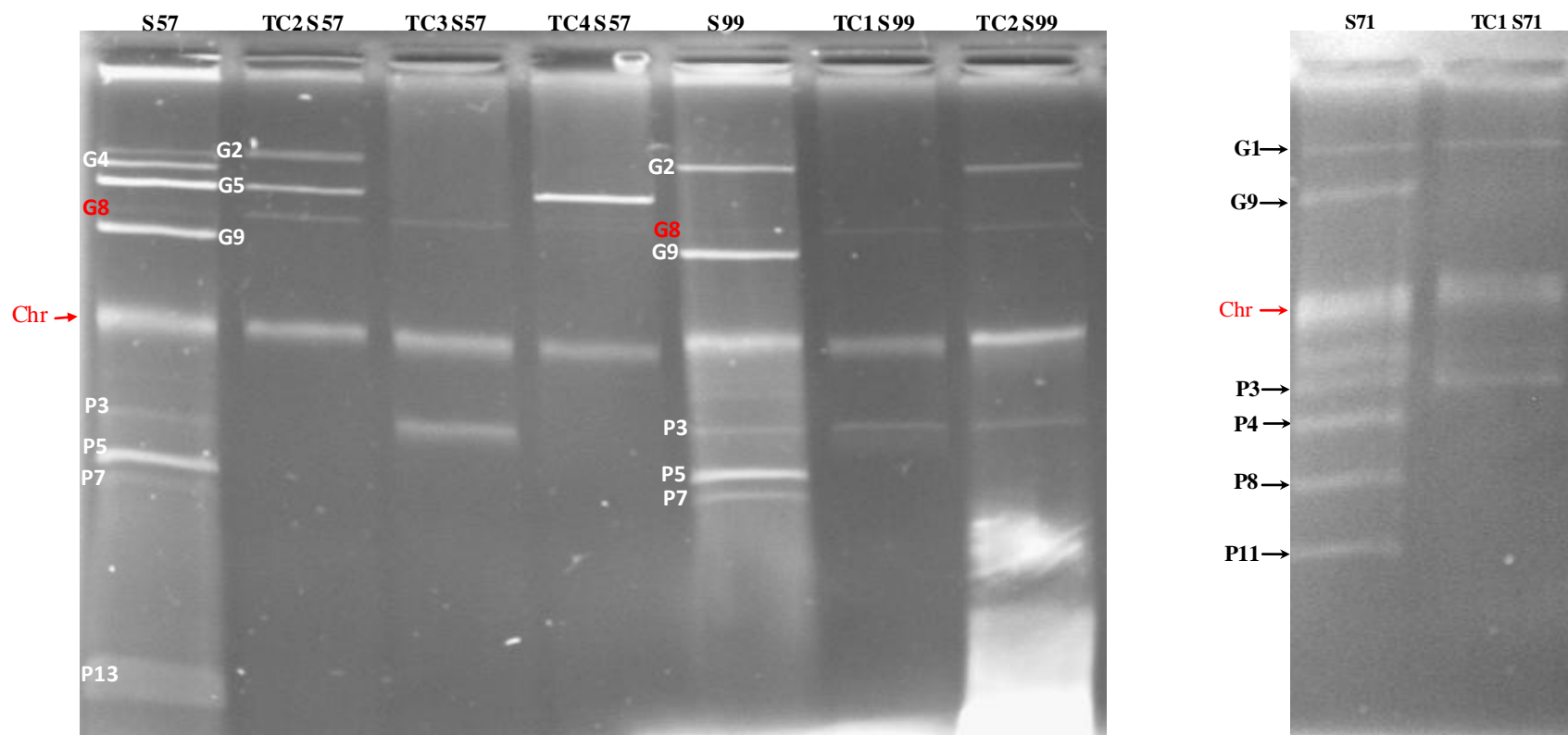


Fig. 29 : Profils plasmidiques des souches productrices de céphalosporinases AmpC plasmidiques transférables du groupe CIT seules (S71 et S99) ou associées aux BLSE CTX-M transférables (S57) ainsi que leurs clones transconjugants

Pour S99, un autre grand plasmide (G8) a été détecté après une longue migration, ce dernier a été transféré aux deux clones transconjugants. Celui-ci serait le plasmide mobilisateur du plasmide P3 porteur des gènes *bla*_{AmpC} plasmidiques chez le clone TC1 S99. Ce plasmide n'a pas été détecté dans les anciens profils, il serait porteur des gènes *qnr*

Pour S57, le plasmide (G8) a été également retrouvé et est transférable aux trois clones transconjugants. Chez cette souche, seul TC3 S57 est AmpC+, il se distingue des deux autres clones par le plasmide P3 qui serait porteur de ces gènes. Comparé aux anciens profils, ce clone a été curé pour le plasmide porteur du gène *bla*_{CTX-M}

Tableau XIII : Profils plasmidiques des souches sauvages et leurs clones transconjugants

Souches	Génotype de résistance	Profil plasmidique	Plasmides transférables	Génotype de résistance
S20	CTX-M, CIT, QnrB, aac (6')-Ib, GM ^R	155 - 135 - 81 - 4.7 - 4.3	TC3 : 81- 4.3 TC4 : 81 - 4.7 - 4.3	TC3 : CTX-M, GM ^R TC4 : CTX-M, GM ^R
S29	CTX-M, CIT, QnrB, GM ^R	148 - 95 - 65- 54 - 34 - 5.5 - 4.8 - 4.6 - 2.8	TC1 : 95 - 65	TC1 : CTX-M, QnrB, GM ^R
S89	CTX-M, CIT, QnrB, GM ^R	155 - 95 - 81 - 77 - 3.3	TC1 : 95	TC1 : CTX-M, GM ^R
S132	CTX-M, CIT, FOX, QnrB, QnrS, aac (6')-Ib, GM ^R	155 - 95 - 81 - 54 - 34 - 12	TC1 : 95	TC1 : CTX-M, GM ^R
S57	CTX-M, CIT, QnrB, GM ^R	148 - 128 - 95 - 65 - 54 - 5.5 - 4.8 - 4.6 - 2.8	TC2 : 148 - 95 - 65 TC3 : 5.5 - 65 TC4 : 95 - 65	TC2 : CTX-M, QnrB, GM ^R TC3 : CIT, QnrB, GM ^S TC4 : CTX-M, QnrB, GM ^R
S71	CIT, QnrB, GM ^R	155 - 54 - 5.5 - 4.9 - 4.5 - 4	TC1 : 155 - 5.5	TC1 : CIT, GM ^R
S99	CIT, QnrB, GM ^R	148 - 65 - 54 - 5.5 - 4.8 - 4.6	TC1 : 5.5 - 65 TC2 : 148 - 5.5 - 65	TC1 : CIT, QnrB, GM ^S TC2 : CIT, QnrB, GM ^R
S9	CTX-M, QnrB, GM ^R	128 - 81 - 22 - 4.6 - 4.4 - 3.3	TC1 : 128 - 22 - 4.6 - 4.4 TC2 : 128 - 22 - 4.6 - 4.4 - 3.3 TC3 : 128	TC1 : CTX-M, QnrB, GM ^R TC2 : CTX-M, QnrB, GM ^R TC3 : CTX-M, GM ^R
S79	CTX-M, aac (6')-Ib, GM ^R	155 - 148	TC1 : 155	TC1 : CTX-M, aac (6')-Ib, GM ^R

DISCUSSION

Notre étude a porté sur la caractérisation de la résistance aux β -lactamines dans les effluents de l'hôpital Zmirli (Alger). Pour cela, un prélèvement au niveau du collecteur principal de cet hôpital a été réalisé au mois de Mars 2010. Après concentration par filtration sur membrane et sélection sur gélose lactosée au tergitol 7 additionnée de 4 μ g/ml de céfotaxime, nous avons retenus pour notre étude 109 souches résistantes au céfotaxime. Ces dernières appartiennent à 7 espèces d'entérobactéries avec une prédominance de *K. pneumoniae* (n=71), le reste des souches est représenté par les espèces : *C. freundii* (n=13), *K. oxytoca* (n=8), *E. sakazakii* (n=8), *E. coli* (n=7), *E. cloacae* (n=1) et *C. braakii* (n=1). Ces bactéries sont associées à divers types d'infections, leur présence dans les effluents étudiés présente un risque pour la santé publique. En effet :

- Parmi les espèces du genre *Klebsiella*, *K. pneumoniae* a été majoritaire, il s'agit d'un pathogène opportuniste à l'origine de nombreuses infections nosocomiales : pulmonaires, urinaires, intra-abdominales, septicémiques et chirurgicales (Kotapati et al., 2005 ; Lopes et al., 2005 ; Grover et al., 2006 ; Sun et al., 2006). Il s'agit d'une espèce très ubiquitaire qui est retrouvée aussi bien chez l'homme que l'animal. Elle est également présente dans l'environnement où elle est capable de proliférer et coloniser différents milieux (eaux de surface, eaux usées, terre, plantes,...) (Knittel et al., 1977).

La résistance aux antibiotiques chez *Klebsiella* constitue un sérieux problème dans le traitement des infections humaines et animales. Le transfert de cette résistance chez les souches cliniques a été démontré à plusieurs occasions avec *E. coli*, ce transfert est médié par des plasmides R largement distribués chez les entérobactéries (Allison et al., 1969 ; Gardner et Smith, 1969 ; Hinshaw et al., 1969). Le transfert des gènes de résistance chez *Klebsiella* est également possible entre souches cliniques et environnementales (Talbot et al., 1980).

- Les espèces du genre *Citrobacter* sont importantes mais moins fréquemment responsables d'infections nosocomiales. Bien que rares, des cas d'infections septicémiques provoquées par *C. freundii* ont été rapportés (Liu et al., 2007).

- *E. coli* représente un élément important de la flore intestinale humaine et animale, son pouvoir pathogène est associé aux infections gastro-intestinales, urinaires et extra-intestinales (Donnenberg, 2005). Il a été également rapporté que cette espèce peut survivre longtemps dans l'environnement (Flint, 1987 ; Rhodes et Kator, 1988 ; McQuaig et al., 2006).

Notre étude a montré non seulement la présence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques dans les effluents hospitaliers mais aussi de germes typiquement hospitaliers comme *E. sakazakii* (Leprat, 1998 ; Schwartz et al., 2003 ; Hartemann et al., 2005).

L'évaluation de la sensibilité des 109 souches aux β -lactamines autre que le céfotaxime, a montré une résistance élevée au ceftriaxone (97.2 %) et relativement moyenne pour la ceftazidime (58.7 %). La résistance de nos souches aux C3G est due principalement à la production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) ; ces enzymes sont en effet capables d'hydrolyser plusieurs molécules β -lactames, y compris les C3G (Bush et al., 1995) et constituent de loin le mécanisme le plus répandu chez les bactéries à Gram négatif (Livermore, 1995 ; Bradford, 2001). L'identification génique des BLSE a révélé leur appartenance à la famille CTX-M et au groupe CTX-M1 chez 97 souches. Pour les 12 souches restantes, la PCR a été négative. Il faut cependant noter que 5 souches parmi ces dernières (*K. pneumoniae* S13, *K. oxytoca* S51, S84, S86 et S111) ont été positives au test DDS, ce qui laisse suggérer soit la production par ces souches d'un autre type de BLSE non CTX-M ou bien une hyperproduction d'une β -lactamase chromosomique de type OXY par les souches de *K. oxytoca* (Fournier et al., 1996 ; Fournier et Roy, 1997). Les 7 souches CTX-M- et DDS- ont présenté une résistance supplémentaire à la céfoxitine, ce qui laisse suggérer l'implication d'autres mécanismes de résistance aux C3G comme la production de

céphalosporinases acquises et/ou l'imperméabilité membranaire. En effet, à la différence des BLSE qui ne sont pas actives sur les céphamycines (céfoxitine) (Bush *et al.*, 1995), ces mécanismes confèrent une résistance supplémentaire à la céfoxitine (Philippon *et al.*, 2002). Ces souches sont :

- *E. cloacae* S108 et *C. braakii* S106 dont les céphalosporinases chromosomiques respectives EBC et CIT, mises en évidence par PCR, seraient hyperproduites,
- *K. pneumoniae* S18, S63 et S107 qui ont été productrices de céphalosporinases plasmidiques de type CIT,
- et enfin *C. freundii* S71 et S99, qui, en plus de leurs céphalosporinases chromosomiques CIT caractéristiques du genre *Citrobacter*, ont été producteurs de céphalosporinases plasmidiques du même type.

Comparée aux C3G, la céfoxitine a été plus active sur nos souches (69.7 % en sont sensibles), en particulier chez le genre *Klebsiella*. Cependant, une sensibilité diminuée à cette molécule (diamètre d'inhibition < 18 mm) a concerné, en plus des 7 souches CTX-M-, 24 souches parmi les 97 souches CTX-M+. Cette résistance est naturelle chez les espèces productrices de céphalosporinases chromosomiques comme c'est le cas de toutes les souches des genres *Citrobacter* et *Enterobacter* (Jacoby, 2009), elle est associée chez certaines souches de *C. freundii* à la production de céphalosporinases plasmidiques de type CIT (S57 et S105) et FOX (S132). Chez *K. pneumoniae* (S410 et S79), espèce naturellement sensible à la céfoxitine, le mécanisme de résistance serait non enzymatique et lié à une diminution de la perméabilité membranaire comme cela a été décrit par Chen *et al.* (2010). Enfin, chez *E. coli* (S41T, S72 et S80), la résistance à la céfoxitine serait le résultat de l'hyperproduction de sa céphalosporinase chromosomique qui serait due à un promoteur fort ou à des mutations dans l'atténuateur de transcription (Bergstrom et Normark, 1979 ; Olsson *et al.*, 1982 ; Olsson *et al.*, 1983 ; Caroff *et al.*, 1999 ; Caroff *et al.*, 2000 ; Forward *et al.*, 2001 ; Siu *et al.*, 2003). La production simultanée de BLSE et de céphalosporinases chez une même souche permet d'expliquer les résultats négatifs du test DDS chez 9 parmi les 97 souches CTX-M+ (*C. freundii* S29, S30, S36, S57, S96, S101, S104, S105, *E. sakazakii* S22). En effet, dans le test DDS, le clavulanate induit l'expression des gènes *bla*_{AmpC}, ce qui augmente la résistance aux C3G et masque l'effet synergique de cet inhibiteur (Pitout *et al.*, 1997 ; Thomson, 2001).

Pour les antibiotiques non β -lactames, les taux de résistance ont été élevés vis-à-vis de la gentamicine (84.4 %) et de la ciprofloxacine (85.3 %), comparées à l'acide nalidixique (28.2 %). Ces résultats indiquent que nos souches sont dotées de gènes de résistance aux aminosides, aux quinolones et aux fluoroquinolones en plus des gènes codant les BLSE et les céphalosporinases AmpC. Cette multirésistance témoigne de l'usage intensif de ces antibiotiques en milieu hospitalier.

Le transfert par conjugaison des gènes de résistance aux céphalosporines à large spectre a été positif chez 15 souches. Les résultats ont montré l'acquisition de la résistance aux C3G par tous les clones transconjugants qui ont été tous CTX-M+. La résistance à la céfoxitine n'a été transférable que chez 4 souches (*C. freundii* (S57 (clone TC3), S71, S99 et S105) en association avec le gène *bla*_{AmpC} du groupe CIT codant une céphalosporinase plasmidique originaire du gène chromosomique de *Citrobacter*. Pour les antibiotiques non β -lactames, la résistance à la gentamicine a été transférable pour toutes les souches contrairement à celle de la ciprofloxacine qui n'a pas été transférable.

Le non transfert des gènes *bla*_{CTX-M} chez la majorité des souches BLSE+ (84 souches) pourrait être dû à leur localisation sur de petits plasmides non auto-transférables ou sur de grands plasmides déficients en gènes de transfert (Cao *et al.*, 2002 ; Dimitrov *et al.*, 2006).

Cependant, des plasmides non auto-transférables codant les BLSE peuvent être transférés par mobilisation (Tassios et al., 1999). De plus, différents éléments génétiques comme les séquences d'insertion et les intégrons peuvent être impliqués dans la mobilité des gènes *bla*_{CTX-M} (Karim et al., 2001 ; Sabaté et al., 2002), ce qui est le cas pour nos souches dont les gènes *bla*_{CTX-M} ont été retrouvés associés aux séquences d'insertion *ISEcp1* like.

Le typage moléculaire des 109 souches par ERIC-PCR a montré une très forte similarité au sein de la même espèce. De ce fait, nous n'avons retenu pour la suite de notre étude que des souches non clonales ou clonales ayant des mécanismes de résistance différents. Celles-ci ont été au nombre de 22 souches réparties dans les espèces *C. freundii* (n=8) avec 4 profils ERIC, *K. pneumoniae* (n=7) avec 5 profils ERIC, *K. oxytoca* (n=3) avec 3 profils ERIC, *E. cloacae* (n=1), *C. braakii* (n=1), *E. sakazakii* (n=1) et *E. coli* (n=1).

La majorité des souches clonales ont été retrouvées parmi *K. pneumoniae* ; en effet, la quasi-totalité de ces dernières ont été du même profil ERIC (K2). Ce résultat pourrait être en relation avec le fort potentiel épidémique de cette espèce favorisant la dissémination des enzymes CTX-M en milieu hospitalier. Cette situation est similaire à celle décrite en Hongrie ou une population clonale majeure de *K. pneumoniae* productrices de BLSE CTX-M15 a été identifiée et baptisée *Hungarian epidemic clone* (HEC) (Damjanova et al., 2006).

La détermination des CMI chez les 22 souches retenues a confirmé les résultats de l'antibiogramme et a montré que ces dernières résistent à des concentrations d'antibiotiques très élevées. Ces résultats seraient en relation avec la nature plus fréquemment plasmidique des résistances développées à l'hôpital, mécanisme qui peut entraîner des niveaux de résistance importants. En effet, les 22 souches ont présenté une résistance aux C3G et 15 parmi elles ont montré une sensibilité diminuée à la céfoxitine. Les CMI sont de 16 à plus de 1024 µg/ml pour le céfotaxime et le ceftriaxone, de ≤ 4 à 512 µg/ml pour la ceftazidime et de ≤ 8 à 1024 µg/ml pour la céfoxitine. L'imipénème, quant à lui, a été actif sur toutes les souches, les CMI ont été de ≤ 0.5 à 2 µg/ml. Les mécanismes de résistance mis en jeu sont principalement les BLSE et les céphalosporinases acquises connues pour leur spectre élargi aux céphalosporines à large spectre mais pas aux carbapénèmes qui représentent souvent l'unique alternative thérapeutique dans le traitement des infections dues aux souches productrices de BLSE et de céphalosporinases acquises (Carrer et Nordmann, 2009).

D'après les résultats de notre étude, la majorité des souches sont productrices de BLSE. Le type CTX-M est majoritaire, il est présent chez 15 parmi les 22 souches (5 *K. pneumoniae*, 2 *K. oxytoca*, 6 *C. freundii*, 1 *E. sakazakii*, 1 *E. coli*). Chez ces dernières, les CMI des C3G ont été plus élevées avec le céfotaxime (64 à >1024 µg/ml) et le ceftriaxone (256 à >1024 µg/ml) qu'avec la ceftazidime (≤ 4 à 512 µg/ml). Ceci s'explique par le profil de substrats des enzymes CTX-M caractérisé généralement par l'hydrolyse préférentielle du céfotaxime et du ceftriaxone (Quinteros et al., 2003 ; Bonnet, 2004 ; Eckert et al., 2004 ; Chen et al., 2005). Nos résultats sont en accord avec les données indiquant que actuellement, les BLSE de type CTX-M sont les plus fréquemment isolées et que la dissémination de ces enzymes, décrites initialement chez des souches de *E. coli* communautaires, concerne maintenant l'ensemble des entérobactéries y compris celles responsables d'infections nosocomiales (Paterson et al., 2003). Les β-lactamases CTX-M sont subdivisées en six groupes (Rossolini et al., 2008), nos souches produisent des enzymes du groupe 1 dont la prédominance a été rapportée par plusieurs études (Lartigue et al., 2007 ; Holstein et al., 2010). En Algérie, les études relatives à la prévalence et à la diversité des BLSE chez les entérobactéries ont montré la présence des enzymes CTX-M3 et CTX-M15 (Messai et al., 2008 ; Touati et al., 2008b). En plus du type CTX-M, un autre type de BLSE serait produit par une souche de *K. pneumoniae* (S13).

La présence de bactéries productrices de BLSE dans les effluents hospitaliers libérés dans l'environnement sans aucun traitement laisse suggérer leur présence dans le milieu aquatique naturel. Dans ce sens Prado et *al.* (2008) ont rapporté la présence de souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE dans les effluents hospitaliers et ont aussi montré que les traitements inadéquats de ces effluents sont à l'origine de la dissémination des gènes de résistance dans l'environnement. Très récemment, la présence de gènes *bla*_{CTX-M} a été rapportée chez des bactéries isolées des boues activées (Reinthal et *al.*, 2010) et dans les sédiments d'une rivière urbaine en Chine située à proximité d'un grand centre hospitalier universitaire (Lu et *al.*, 2010).

L'étude de l'environnement génétique des gènes *bla*_{CTX-M} a montré qu'ils sont tous associés à la séquence *ISEcp1* (détection directe ou indirecte), ces résultats concordent avec les travaux qui indiquent que la plupart de ces gènes, notamment ceux du groupe CTX-M1 sont associés aux séquences d'insertion de type *ISEcp1*-like qui seraient impliquées dans leur mobilisation et leur expression (Poirel et *al.*, 2001 ; Baraniak *al.*, 2002 ; Cao *al.*, 2002 ; Canton et Coque, 2006). Les produits d'amplification obtenus ont une taille de 1000 pb (5 souches) ou 1100 pb (10 souches), ce qui indique une différence de taille dans la région intercalaire entre *bla*_{CTX-M} et *ISEcp1*. Une étude réalisée en France a montré que cette région pourrait être, pour certains gènes comme *bla*_{CTX-M3}, de 127 pb avec la présence de 2 séquences nommées V et W alors que pour d'autres comme *bla*_{CTX-M15}, elle n'est que de 48 pb avec la seule présence de la séquence W (Eckert et *al.*, 2006). La détection directe de la séquence *ISEcp1* par PCR a été positive pour toutes les souches CTX-M+ sauf 4 (*K. pneumoniae* S410, S46, S50 et S79), ce qui laisse suggérer l'altération de cette séquence dans le gène codant sa transposase. Ces données correspondent à celles d'Eckert et *al.* (2006) où le gène de la transposase de *ISEcp1* associé aux gènes *bla*_{CTX-M}, a été trouvé interrompu par IS26.

Le transfert des gènes CTX-M par conjugaison a été positif chez 7 souches, en association avec les plasmides de 155 kb (*K. pneumoniae* S79), 128 kb (*K. oxytoca* S9), 95 kb (*C. freundii* S29, S57, S89 et S132) et 81 kb (*C. freundii* S20).

En plus de la production de BLSE, d'autres mécanismes de résistance aux β -lactamines ont été également retrouvés chez nos souches : production de céphalosporinases plasmidiques, hyperproduction de céphalosporinases chromosomiques et imperméabilité.

Les céphalosporinases plasmidiques ont été retrouvées chez 5 souches, elles sont de type CIT (*K. pneumoniae* S18, *C. freundii* S57, S71 et S99) ou FOX (*C. freundii* S132). Les gènes CIT de *Citrobacter* ont été transférables en association avec un plasmide mobilisable de 5.5 kb ; cependant, les gènes CIT de *K. pneumoniae* S18 et FOX de *C. freundii* S132 n'ont pas été transférables. Chez deux souches de *C. freundii* (S57 et S132), la production de ces enzymes est associée à celle des BLSE de type CTX-M. En plus des CMI élevées vis-à-vis des C3G, ces souches ont montré une résistance additionnelle à la céfoxitine avec des CMI de 32 à 512 μ g/ml.

La résistance aux C3G chez les souches de *C. braakii* S106 et de *E. cloacae* S108 serait due à l'hyperproduction de leur céphalosporinases chromosomiques. Ce mécanisme serait également à l'origine de la résistance de la souche de *E. coli* S72 à la céfoxitine.

La résistance à la céfoxitine a concerné également deux souches de *K. pneumoniae* (S410 et S79) en plus des autres souches de *Citrobacter* (S20, S29, S89 et S96) et de *Enterobacter* (S22). Comme cela a été déjà signalé, Chez *Citrobacter* et *Enterobacter*, cette résistance est naturelle et est codée par les gènes chromosomiques CIT et EBC, respectivement (Henriques-Normark et Normark, 2002 ; Jacoby, 2009). Les 2 souches de *K. pneumoniae* (S410 et S79) ne produisant pas de céphalosporinases présenteraient une diminution de la perméabilité membranaire. En effet, plusieurs études ont rapporté que la perte des porines ompK35 et

ompK36 chez *K. pneumoniae* augmente de façon significative la CMI de la céfoxitine ; cette résistance peut être élargie aux C3G lorsque la perte des porines est associée à la production de BLSE, comme c'est le cas de nos deux souches de *K. pneumoniae* qui sont CTX-M+ (Yigit et al., 2003 ; Kim et al., 2007).

Pour *K. oxytoca* S51, la résistance aux C3G serait due à l'hyperproduction de sa β -lactamase chromosomique OXY suite à des mutations dans le promoteur de leurs gènes (Fournier et al., 1996 ; Fournier et Roy, 1997).

En résumé, 8 mécanismes de résistance aux β -lactamines ont été mis en évidence chez les 22 souches :

- Production de BLSE de type CTX-M (n=10) : *K. pneumoniae* S1, S46 et S50, *K. oxytoca* S9 et S94, *C. freundii* S20, S29, S89 et S96 et *E. sakazakii* S22.
- Production de BLSE non CTX-M (n=1) : *K. pneumoniae* S13.
- Hyperproduction de la β -lactamase chromosomique OXY (n=1) : *K. oxytoca* S51.
- Production de céphalosporinases AmpC plasmidiques (n=3) : *K. pneumoniae* S18, *C. freundii* S71 et S99.
- Hyperproduction de céphalosporinases AmpC chromosomique (n=2) : *C. braakii* S106 et *E. cloacae* S108.
- Production de CTX-M associée à des céphalosporinases AmpC chromosomiques CIT (*C. freundii* S132) et plasmidique de type CIT (*C. freundii* S57) ou FOX (*C. freundii* S132) (n=2).
- Production de CTX-M associée à l'imperméabilité membranaire (n=2) : *K. pneumoniae* S410 et S79.
- Production de CTX-M associée à l'hyperproduction de céphalosporinases AmpC chromosomiques (n= 1) : *E. coli* S72.

La résistance à la gentamicine a concerné toutes les souches CTX-M+ à l'exception de *E. coli* S72, cette résistance a été transférable en association avec le plasmide porteur des gènes *bla*_{CTX-M}. La résistance à la gentamicine a concernée également les deux souches de *C. freundii* productrices de céphalosporinases plasmidiques de type CIT (S71 et S99), cette résistance a été transférée en association avec les plasmides de 155 kb et 148 kb respectivement. La résistance à la ciprofloxacine a concerné toutes les souches CTX-M+ à l'exception de *K. pneumoniae* S50 et *K. oxytoca* S9. Cette résistance a concerné également les 2 souches productrices de céphalosporinases plasmidiques de type CIT (*C. freundii* S71 et S99) et les souches de *C. braakii* (S106) et *E. cloacae* (S108) hyperproducteurs de céphalosporinases chromosomiques. L'association des gènes de BLSE et/ou céphalosporinases plasmidiques à des gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques, notamment les quinolones et les aminosides a été déjà décrite par plusieurs auteurs (Martinez-Martinez et al., 1998 ; Rodriguez-Martinez et al., 2003 ; Li, 2005 ; Aogain et al., 2010).

Pour les quinolones, jusqu'à 1998, il était admis que les déterminants de résistance étaient exclusivement chromosomiques et donc non associés à des gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques (Nordmann, 2006). Depuis, des déterminants de résistance plasmidiques aux quinolones (PMQR) ont été découverts, ce qui explique leur association à des gènes de résistances à d'autres familles d'antibiotiques dont les BLSE et les céphalosporinases plasmidiques (Nordmann, 2006).

Les gènes *qnr* ont été retrouvés chez les espèces *K. pneumoniae* (2 souches), *K. oxytoca* (3 souches), *C. freundii* (8 souches), *E. sakazakii* (1 souche) et *E. cloacae* (1 souche). En effet,

ces gènes ont été décrits mondialement chez différentes espèces d'entérobactéries (Honoré et al., 2006). Nos résultats montrent la prédominance des déterminants *qnrB* qui ont été retrouvés chez 13 souches, toutes *bla*_{CTX-M+} et/ou *bla*_{AmpC+}. La présence des déterminants *qnrB* en association avec les gènes *bla*_{CTX-M} a été déjà décrite chez des souches cliniques isolées dans plusieurs hôpitaux en Algérie (Iabadene et al., 2008 ; Touati et al., 2008a ; Meradi et al., 2009). Le type *qnrA* a été absent, ce qui est en accord avec les travaux de Iabadene et al. (2008) et Meradi et al. (2009) ; la seule étude rapportant la présence des gènes *qnrA* concerne une souche clinique de *A. baumannii* isolée en Algérie (Touati et al., 2008a). Le type *qnrS* a été présent chez 3 souches (*K. oxytoca* S51, *C. freundii* S132 et *E. cloacae* S108) dont une seule coproduit CTX-M (S132) ; en effet, ce gène, initialement découvert chez *Shigella flexneri* au Japon, est rarement retrouvé et est principalement identifié chez des souches non BLSE (Hata et al., 2005 ; Poirel et al., 2006). En Algérie, ce gène a été déjà rapporté chez des souches cliniques de *E. cloacae* (Iabadene et al., 2008).

Les gènes *qnrB* ont été transférables chez 4/15 souches (*K. oxytoca* S9, *C. freundii* S29, S57 et S99). Les gènes *qnrS* n'ont pas été transférables, ce qui est en accord avec les données indiquant que les plasmides porteurs de ces gènes sont généralement petits et non conjugatifs contrairement aux plasmides porteurs des autres gènes *qnr* (Bonemann et al., 2006 ; Kehrenberg et al., 2007 ; Wu et al., 2007 ; Wu et al., 2008 ; Garcia-Fernandez et al., 2009).

Le gène *qepA* a été absent chez nos souches, ce qui est en accord avec les données indiquant que ce mécanisme de résistance est très rare, sauf en Chine où il prédomine chez les souches animales d'entérobactéries (Liu et al., 2008 ; Ma et al., 2009). Le type *aac* (6')-Ib a été retrouvé chez 9/22 souches ; le séquençage des produits d'amplification de ce gène n'ayant pas été effectué, la prévalence du variant *aac* (6')-Ib-cr n'a pu être déterminée.

Les CMI de la ciprofloxacine chez les clones transconjugants *qnr+* sont de 0,5 µg/ml, soit 4 fois plus élevées que la CMI de la souche réceptrice *E. coli* K12 BM21 (≤0.125 µg/ml), ce qui avait été observé dès les premiers transferts de *qnr* de *K. pneumoniae* à *E. coli* (Martinez-Martinez et al., 1998 ; Martinez-Martinez et al., 2003 ; Wang et al., 2004). En effet, l'acquisition de plasmides porteurs de gènes *qnr* augmente la CMI des fluoroquinolones mais ne confère pas une résistance clinique à ces molécules. Bien que cette résistance soit de bas niveau, son importance clinique repose sur sa capacité à faciliter la sélection de mutations chromosomiques entraînant une augmentation de la résistance aux quinolones et fluoroquinolones (Jacoby et al., 2003). La CMI de la ciprofloxacine chez la souche S132 possédant deux gènes *qnr* (B et S) est comparable à celle des clones transconjugants ayant acquis un seul gène *qnr*. Ceci laisse suggérer que la présence de 2 gènes *qnr* n'a pas un effet additif sur la CMI de la ciprofloxacine comme cela a été déjà rapporté par Cattoir et al. (2007c) et Hu et al. (2008) et expliqué par la compétition entre les produits des 2 gènes pour la fixation à l'ADN gyrase. La résistance élevée à la ciprofloxacine observée chez les souches sauvages par comparaison aux clones transconjugants *qnr+*, peut s'expliquer par la présence de mutations de l'ADN gyrase ou de la topo-isomérase IV, comme cela a été décrit par Nordmann et Poirel (2005).

L'association de la résistance aux C3G avec la résistance à d'autres familles d'antibiotiques est due à la présence des gènes codant ces résistances sur un même plasmide ou des plasmides différents chez la même souche (Jacoby et Sutton, 1991 ; Boyd et al., 2004 ; Nordmann et Poirel, 2005 ; Paterson, 2006). Ceci constitue un mode de diffusion efficace de plusieurs mécanismes simultanément. En effet, les gènes *qnrB* ont été transférables en association avec un plasmide différent de celui codant les β-lactamases de types CTX-M et AmpC et ceux codant la résistance aux aminosides le sont en association avec les plasmides porteurs des gènes *bla*_{CTX-M}.

CONCLUSION

Les effluents générés par l'activité hospitalière présentent un danger potentiel pour l'homme et son environnement en raison de la nature et de l'importance des substances qu'ils véhiculent et de leur évacuation au même titre que les rejets urbains vers les réseaux d'assainissement. En plus des substances chimiques qui peuvent être générées par l'activité hospitalière, la diffusion de bactéries multirésistantes dans l'environnement est une préoccupation de santé publique. L'objectif du travail était de rechercher la présence de la résistance bactérienne aux β -lactamines, aux quinolones et aux aminosides dans les effluents de l'hôpital Zmirli (Alger).

Les résultats ont révélé une résistance aux molécules β -lactames, notamment celles à large spectre. Le principal mécanisme de cette résistance a été la production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) de type CTX-M (groupe CTX-M1). Une autre classe de β -lactamases plasmidiques aussi importante a été retrouvée chez nos souches, il s'agit des céphalosporinases AmpC qui confèrent une résistance additionnelle aux céphamycines (céfoxitine). Les gènes *bla*_{CTX-M} ont été retrouvés au voisinage de séquences d'insertion (*ISEcp1*) sur des plasmides conjugatifs ou non conjugatifs et certains gènes *bla*_{AmpC} ont été également retrouvés sur des plasmides mobilisables de petite taille. Ces données traduisent l'incidence préjudiciable de ces gènes par leur potentiel de diffusion dans le monde bactérien. La résistance aux β -lactamines de nos souches a été retrouvée associée à la résistance aux aminosides et aux quinolones. En effet, la présence de déterminants PMQR de résistance plasmidique aux quinolones a été mise en évidence. Bien que ces gènes ne confèrent qu'une résistance à bas niveau aux quinolones, leur importance réside dans la sélection de mutants chromosomiques de résistance.

La multirésistance observée chez nos souches est inquiétante du fait qu'elle réduit les alternatives thérapeutiques disponibles pour le traitement des affections dues à ces bactéries émergentes dans l'environnement et incriminées dans les infections. Cette multirésistance témoigne également de l'usage inapproprié de ces classes d'antibiotiques dans les milieux hospitaliers, d'où la nécessité d'une réglementation stricte régissant leur prescription et leur élimination. Les risques sanitaires potentiels des rejets hospitaliers, doivent inciter, comme de par le monde, à s'intéresser en Algérie à leur étude écotoxicologique, par une évaluation régulière globale en terme de charge chimique et microbienne et spécifique en termes de gènes et de supports génétiques. Leur gestion rationnelle passe par un tri des rejets à la source et l'installation de dispositif d'assainissement adéquat au sein de nos hôpitaux.

En perspective de ce travail, il est nécessaire :

- d'identifier les allèles des gènes de résistance
- de déterminer la traçabilité de ces gènes par rapport à leur origine et leur devenir, par l'analyse de leur environnement génétique et la phylogénie des plasmides porteurs.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Abraham E.P. and E. Chain. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146 : 837.

Adelowo O.O., O.E. Fagade and A.J. Oke. (2008). Prevalence of co-resistance to disinfectants and clinically relevant antibiotics in bacterial isolates from three hospital laboratory waste waters in South western Nigeria. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24 : 1993-1997.

Ahmed A.M. and T. Shimamoto. (2008). Emergence of a cefepime- and ceftazidime-resistant *Citrobacter freundii* clinical isolate harbouring a novel chromosomally encoded AmpC β -lactamase, CMY-37. *I. J. Antimicrob. Agents*, 32 : 256-261.

Alder A.C., C.S. McArdell, E.M. Golet, E.M. Molnar, H.M. Kuch and W. Giger. (2003). Environmental exposure of antibacterial agents in hospital and municipal wastewater and river water in Switzerland. Proceedings of 3rd international conference on pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals in water, 19-21 March 2003, Minneapolis, MN. p. 236-237.

Allison M.J., J.D. Punch and H.P. Dalton. (1969). Frequency of transferable drug resistance in clinical isolates of *Klebsiella*, *Aerobacter*, and *Escherichia*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 9 : 94-99.

Ambler R.P. (1980). The structure of β -lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Biol.*, 289 : 321-331.

Andersen J. and N. Delihias. (1990). MicF RNA binds to the 5' end of ompF mRNA and to a protein from *Escherichia coli*. *Biochem.*, 29 : 9249-9256.

Antignac A., P. Kriz, G. Tzanakaki, J.M. Alonso and M.K. Taha. (2001). Polymorphism of *Neisseria meningitidis penA* gene associated with reduced susceptibility to penicillin. *J. Antimicrob. Chemother.*, 47 : 285-296.

Aogain M.M., M.J. Mooij, C. Adams, J. Clair and F. O'Gara. (2010). Emergence of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes among Irish multidrug-resistant isolates. *Diag. Microbiol. Infect. Des.*, 67 : 106-109.

Aubert D., D. Girlich, T. Naas, S. Nagarajan and P. Nordmann. (2004). Functional and structural characterization of the genetic environment of an extended-spectrum β -lactamase *bla*_{VEB} gene from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate obtained in India. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 : 3284-3290.

Aubert D., T. Naas, M.F. Lartigue and P. Nordmann. (2005). Novel genetic structure associated with an extended-spectrum β -lactamase *bla*_{VEB} gene in a *Providencia stuartii* clinical isolate from Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 : 3590-3592.

Babic M.A., M. Hujer and R.A. Bonomo. (2006). What's new in antibiotic resistance ? Focus on beta-lactamase. *Drug. resist. Updat.*, 9 : 142-156.

Bakour R., Y. Laroche and G. Cornelis. (1983). Studies of the incompatibility and replication of the 70 kb virulence plasmids of *Yersinia*. *Plasmid*, 10 : 279-289.

Baraniak A., J. Fiett, W. Hryniewicz, P. Nordmann and M. Gniadkowski. (2002). Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50 : 393-396.

Barnaud G., G. Arlet, C. Verdet, O. Gaillot, P.H. Lagrange and A. Philippon. (1998). *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamase (DHA-1) with an *ampR* gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 : 2352-2358.

Bauernfeind A., Y. Chong and S. Schweighart. (1989). Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection*, 17 : 316-321.

Bauernfeind A., Y. Chong and K. Lee. (1998). Plasmid-encoded AmpC beta-lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery? *Yonsei Med. J.*, 39 : 520-525.

Bennett P.M. (1999). Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 43 : 1-4.

Bergstrom S. and S. Normark. (1979). β -lactam resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* caused by elevated production of the *ampC*-mediated chromosomal β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16 : 427-433.

Bingen E.H., P. Desjardins, G. Arlet, F. Bourgeois, P. Mariana-Kurkdjian, N.Y. Lambert-Zechovsky, E. Denamur, A. Philippon and J. Elion. (1993). Molecular epidemiology of plasmid spread among broad-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.*, 31 : 179-184.

Bobrowski M.M., M. Matthew, P.T. Barth, N. Datta, N.J. Grinter, A.E. Jacob, P. Kontomichalou, J.W. Dale and J.T. Smith. (1976). Plasmid determined β -lactamase indistinguishable from the chromosomal β -lactamase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 125 : 149-157.

Bonemann G., M. Stiens, A. Puhler and A. Schluter. (2006). Mobilizable IncQ-related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, *qnrS2*, isolated from the bacterial community of a wastewater treatment plant. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50 : 3075-3080.

Bonnet R. (2004). Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 : 1-14.

Bonnet R., C. Dutour, J.L.M. Sampaio, C. Chanal, D. Sirot, R. Labia, C. De Champs and J. Sirot. (2001). Novel cefotaximase CTX-M16 with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-Gly. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 : 2269-2275.

Boyd D.A., S. Tyler, S. Christianson, A. McGeer, M.P. Muller, B.M. Willey, E. Bryce, M. Gardam, P. Nordmann and M.R. Mulvey. (2004). 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.*, 48 : 3758-3764.

Bradford P.A. (2001). Extended spectrum β -lactamases in the 21st century : characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14 : 933-951.

Bradford P.A., C. Urban, N. Mariano, S.J. Projan, J.J. Rahal and K. Bush. (1997). Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 : 563-569.

Brown K.D., J. Kulis, B. Thomson, T.H. Chapman and D.B. Mawhinney. (2006). Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sc. Tot. Environ.*, 366 : 772-783.

Bryskier A. (1999). Pénicillines in Bryskier A, editor. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. *Paris, Ellipse édition*, 157-224.

Bryskier A. and J. Aszodi. (1999). Céphèmes à usage parentérale. In Bryskier A, éditeur. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. *Paris, Ellipse édition*, 225-285.

Bush K. (1988). β -lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1: 109-123.

Bush K. (1998). Metallo- β -lactamases: a class apart. *Clin. Infect. Dis.*, 27 : 48-53.

Bush K. (2001). New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.*, 32 : 1085-1089.

Bush K. and G.A. Jacoby. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 54 : 969-976.

Bush K., J.S. Freudenberger and R.B. Sykes. (1982). Interaction of aztreonam and related monobactams with β -lactamases from gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22 : 414-420.

Bush K., C. Macalintal, B.A. Rasmussen, V.J. Lee and Y. Yang. (1993). Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37 : 851-858.

Bush K., G.A. Jacoby and A.A. Medeiros. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39 : 1211-1233.

Calbo E., V. Romani, M. Xercavins, L. Gomez, C.G. Vidal, S. Quintana, J. Vila and J. Garau. (2006). Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57 : 780-783.

Cambau E., F. Bordon, E. Collatz and L. Gutmann. (1993). Novel *gyrA* point mutation in a strain of *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones but not to nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37 : 1247-1252.

Cambau E., C. Lascols, W. Sougakoff, C. Bebear, R. Bonnet, J.D. Cavallo, L. Gutmann, M.C. Ploy, V. Jarlier, C.J. Soussy and J. Robert. (2006). Occurrence of *qnrA*-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005. *Clin. Microbiol. Infect.*, 12 : 1013-1020.

Canton R. and T.M. Coque. (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9 : 466-475.

Cao V., T. Lambert and P. Courvalin. (2002). ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum β -lactamase CTX-M-17. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 : 1212-1217.

Carattoli A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.*, 32 : 243-259.

Caroff N., E. Espaze, I. Berard, H. Richet and A. Reynaud. (1999). Mutations in the *ampC* promoter of *Escherichia coli* isolates resistant to oxyimino-cephalosporins without extended spectrum β -lactamase production. *FEMS Microbiol. Lett.*, 173 : 459-465.

Caroff N., E. Espaze, D. Gautreau, H. Richet and A. Reynaud. (2000). Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing *ampC*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 45 : 783-788.

Carrer A. and P. Nordmann. (2009). *Klebsiella pneumoniae* CTX-M15 : vers une modification de l'épidémiologie des β -lactamases à spectre étendu. *Pathol. Biol.*

Carrer A, L. Poirel, H. Eraksoy, A.A. Cagatay, S. Badur and P. Nordmann. (2008). Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52 : 2950-2954.

CA-SFM. (2010). Communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, [http : //www.sfm.asso.fr/](http://www.sfm.asso.fr/).

Cattoir V., L. Poirel, V. Rotimi, C.J. Soussy and P. Nordmann. (2007a). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 60 : 394-397.

Cattoir V, F.X. Weill, L. Poirel, L. Fabre, C.J. Soussy and P. Nordmann. (2007b). Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. *J. Antimicrob. Chemother.*, 59 : 751-754.

Cattoir V., L. Poirel and P. Nordmann. (2007c). Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrB4* identified in France in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate coexpressing a *qnrS1* determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 : 2652-2653.

Cattoir V., P. Nordmann, J. Silva-Sanchez, P. Espinal and L. Poirel. (2008). ISEcp1-mediated transposition of *qnrB*-like gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52 : 2929-2932.

Cavaco L.M., H. Hasman, S. Xia and F.M. Aarestrup. (2009). *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Kentucky and Bovismorbificans of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53 : 603-608.

Cavallo J.D., R. Fabre, F. Jehl, C. Rapp and E. Garrabé. (2004). Bêtalactamines. *Ency. Med. Chirurg.*, 8-004-C-10.

- Chen Y., J. Delmas, J. Sirot, B. Shoichet and R. Bonnet. (2005).** Atomic resolution structures of CTX-M beta-lactamases; extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability. *J. Mol. Biol.*, 348 : 349-362.
- Chen J.H., L.K. Siu, C.P. Fung, J.C. Lin, K.M. Yeh, T.L. Chen, Y.K. Tsai and F.Y. Chang. (2010).** Contribution of outer membrane protein K36 to antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 65 : 986-990.
- Cheung T.K., Y.W. Chu, M.Y. Chu, C.H. Ma, R.W. Yung and K.M. Kam. (2005).** Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56 : 586-589.
- Chmelnitsky I., S. Navon-Venezia, J. Strahilevitz and Y. Carmeli. (2008).** Plasmid-mediated *qnrB2* and carbapenemase gene *bla_{KPC-2}* carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52 : 2962-2965.
- Clewell D.B. (1993).** Bacterial conjugation. *Plenum Press, New York*.
- Cohen S.P., W. Yan and S.B. Levy. (1993).** A multidrug resistance regulatory chromosome is widespread among enteric bacteria. *J. Infect. Dis.*, 168 : 484-488.
- Courvalin P., F. Goldstein, A. Philippon and J. Sirot. (1985).** L'antibiogramme. *Ed. MPC-Vigot, Paris-Bruxelles*.
- Crane M., C. Watts and T. Boucard. (2006).** Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sc. Tot. Env.*, 367 : 23-41.
- Critchlow S.E., M.H. O'Dea, A.J. Howells, M. Couturier, M. Gellert and A. Maxwell. (1997).** The interaction of the F plasmid killer protein, CcdB, with DNA gyrase: induction of DNA cleavage and blocking of transcription. *J. Mol. Biol.*, 273 : 826-839.
- Cuzon G., T. Naas, P. Bogaerts, Y. Glupczynski, T.D. Huang, P. Nordmann. (2008).** Plasmid encoded carbapenem-hydrolyzing β -lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52 : 3463-3464.
- Cuzon G., T. Naas and P. Nordmann. (2010).** Carbapénémases de type KPC : quel enjeu en microbiologie clinique. *Pathol. Biol.*, 58 : 39-45.
- Damjanova I., A. Toth, J. Paszti, A. Bauernfeind, M. Fuzi. (2006).** Nationwide spread of clonally related CTX-M-15-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in Hungary. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 25 : 275-278.
- Darsy C., I. Lescure, V. Payot and G. Rouland. (2002).** Effluents des établissements hospitaliers : teneur en microorganismes pathogènes, risques sanitaires, procédures particulières d'épuration et de gestion des boues. *Office international de l'eau, SNIDE*.
- Daughton C.G. and T.A. Ternes. (1999).** Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect.*, 107 : 907-938.
- Davies J. (1994).** Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264 : 375-382.

Davison J. (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, 42 : 73-91.

Decré D., B. Burghoffer, V. Gautier, J.C. Petit and G. Arlet. (2004). Outbreak of multi-resistant *Klebsiella oxytoca* involving strains with extended-spectrum β -lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54 : 881-888.

Dimitrov T.S., E.E. Udo, T. Verghese, M. Emara and A. Al-Saleh. (2006). Plasmid-mediated high-level ceftriaxone resistance in a *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolate. *Med. Princ. Pract.*, 15 : 145-148.

Doi Y., N. Shibata, K. Shibayama, K. Kamachi, H. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Yagi and Y. Arakawa. (2002). Characterization of a novel plasmid-mediated cephalosporinase (CMY-9) and its genetic environment in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 : 2427-2434.

Doménech-Sanchez A., S. Hernandez-Allès, L. Martinez-Martinez, V.J. Benedi and S. Alberti. (1999). Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae* : its role in β -lactam antibiotic resistance. *J. Bactériol.*, 181 : 2726-2732.

Donnenberg M.S. (2005). *Enterobacteriaceae*, p. 2386-2392. In G.L. Mandell, J.E. Bennett and R. Dolin (ed.), Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 6th ed, vol. II. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, PA.

Drawz S.M. and R.A. Bonomo. (2010). Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.*, 160-201.

Drlica K. and X. Zhao. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61 : 377-392.

Droge M., A. Puhler and W. Selbitschka. (2000). Phenotypic and molecular characterization of conjugative antibiotic resistance plasmids isolated from bacterial communities of activated sludge. *Mol. Gen. Genet.*, 263 : 471-482.

Duong H.A., N.H. Pham, H.T. Nguyen, T.T. Hoang, H.V. Pham, V.C. Pham, M. Berg, W. Giger and A.C. Alder. (2008). Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere*, 72 : 968-973.

Dutta C. and A. Pan. (2002). Horizontal gene transfer and bacterial diversity. *J. Biosci.*, 27 : 27-33.

Eckert C., V. Gautier, M. Saladin-Allard, N. Hidri, C. Verdet, Z. Ould-Hocine, G. Barnaud, F. Delisle, A. Rossier, T. Lambert, A. Philippon and G. Arlet. (2004). Dissemination of CTX-M-type β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 : 1249-1255.

Eckert C., V. Gautier and G. Arlet. (2006). DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*_{CTX-M} genes. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57 : 14-23.

Ellington M.J. and N. Woodford. (2006). Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure? *J. Antimicrob. Chemother.*, 57 : 1026-1029.

Espedido B.A., S.R. Partridge and J.R. Iredell. (2008). *bla*_{IMP-4} in different genetic contexts in *Enterobacteriaceae* isolates from Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52 : 2984-2987.

Everett M.J., Y.F. Jin, V. Ricci and L.J.V. Piddock. (1996). Contribution of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 : 2380-2386.

Fantin B., X. Duval, L. Massias, L. Alavoine, F. Chau, S. Retout, A. Andreumont and F. Mentré. (2009). Ciprofloxacin dosage and emergence of resistance in human commensal bacteria. *J. Infect. Dis.*, 200 : 390-398.

Feria C., E. Ferreira, J.D. Correia, J. Gonçalves and M. Coniça. (2002). Patterns and mechanisms of resistance to β -lactams and β -lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.*, 49 : 77-85.

Fiett J., A. Palucha, B. Miaczynska, M. Stankiewicz, H. Przondo-Mordarska, W. Hryniewicz and M. Gniadkowski. (2000). A novel complex mutant β -lactamase, TEM-68, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44 : 1499-1505.

Flint K.P. (1987). The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. *J. Appl. Bacteriol.*, 63 : 261-270.

Fortineau N., L. Poirel and P. Nordmann. (2001). Plasmid mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 47 : 207-210.

Forward K.R., B.M. Willey, D.E. Low, A. McGeer, M.A. Kapala, M.M. Kapala and L.L. Burrows. (2001). Molecular mechanisms of cefoxitin resistance in *Escherichia coli* from the Toronto area hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 41 : 57-63.

Fournier B. and P.H Roy. (1997). Variability of chromosomally encoded beta-lactamases from *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 : 1641-1648.

Fournier B., P.H. Lagrange and A. Philippon. (1996). Beta-lactamase gene promoters on 71 clinical strains of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 : 460-463.

Franke A. and D.B. Clewell. (1980). Evidence for conjugal transfer of a *Streptococcus faecalis* transposon (Tn916) from a chromosomal site in the absence of plasmid DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 45 : 77-80.

Fuentefria D.B., A.E. Ferreira and G. Corcao. (2011). Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water : are they genetically related ? *J. Env. Management*, 92 : 250-255.

Garcia A., F. Navarro, E. Miro, B. Mirelis, S. Campoy and P. Coll. (2005). Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*_{CTX-M-9} gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56 : 819-826.

Garcia-Fernandez A., D. Fortini, K. Veldman, D. Mevius and A. Carattoli. (2009). Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63 : 274-281.

Gardner P. and D.H. Smith. (1969). Studies on the epidemiology of resistance (R) factors. I. Analysis of *Klebsiella* isolates in a general hospital. II. A prospective study of R factor transfer in the host. *Ann. Intern. Med.*, 71 : 1-9.

Garnier F., N. Raked, A. Gassama, F. Denis and M.C. Ploy. (2006). Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sull*-type integron in the newly described *Salmonella enterica* serovar Keurmassar. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50 : 3200-3202.

Gay K., A. Robicsek, J. Strahilevitz, C.H. Park, G. Jacoby, T.J. Barrett, F. Medalla, T. M. Chiller and D.C. Hooper. (2006). Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin. Infect. Dis.*, 43 : 297-304.

Gazouli M., L.S. Tzouveleakis, E. Prinarakis, V. Miriagou and E. Tzelepi. (1996). Transferable cefoxitin resistance in enterobacteria from Greek hospitals and characterization of a plasmid-mediated group 1 beta-lactamase (LAT-2). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 : 1736-1740.

George A.M. and S.B. Levy. (1983a). Gene in the major cotransduction gap of *Escherichia coli* K-12 linkage map required for expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J. Bacteriol.*, 155 : 541-548.

George A.M. and S.B. Levy. (1983b). Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol and other antibiotics in *Escherichia coli* : involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. *J. Bacteriol.*, 155 : 531-540.

Grover S.S., M. Sharma, D. Chattopadhyaya, H. Kapoor, S.T. Pasha and G. Singh. (2006). Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: emergence of high resistance against cefepime, the fourth generation cephalosporin. *J. Infect.*, 53 : 279-288.

Guardabassi L., A. Petersen, J.E. Olsen and A. Dalsgaard. (1998). Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 : 3499-3502.

Guiliani F., T. Koller, F.E. Wurgler and R.M. Widmer. (1996). Detection of genotoxic activity in native hospital waste water by the *umuC* test. *Mutat. Res.*, 368 : 49-57.

Hall R.M. and C.M. Collis. (1995). Mobile gene cassettes and integrons : capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.*, 15 : 593-600.

Hancock R.E. and F. Bellido. (1996). Antibacterial in vitro activity of fourth generation cephalosporins. *J. Chemother.*, 8 : 31-36.

Hanson N.D. and C.C. Sanders. (1999). Regulation of inducible AmpC β -lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Curr. Pharm. Des.*, 5 : 881-894.

Hartmann A., A. Alder, T. Koller and R. Widmer. (1998). Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of *umuC* genotoxicity in native hospital wastewater. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17 : 377-382.

Hartemann P., A. Hautemaniere and M. Joyeux. (2005). La problématique des effluents hospitaliers. *Hygiène*, 13 : 369-374.

Hata M., M. Suzuki, M. Matsumoto, M. Takahashi, K. Sato, S. Ibe and K. Sakae. (2005). Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 : 801-803.

Henriques-Normark B. and S. Normark. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.*, 252 : 91-106.

Hinshaw V., J. Punch, M.J. Allison and H.P. Dalton. (1969). Frequency of R-factor-mediated multiple drug resistance in *Klebsiella* and *Aerobacter*. *Appl. Microbiol.*, 17 : 214-218.

Hiramatsu K., Y. Katayama, H. Yuzawa and T. Ito. (2002). Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 292 : 67-74.

Holstein A., A. Grillon, L. Yzon, V. Morange, G. Baty, M.F. Lartigue, L. Mereghetti, A. Goudeau and P. Lanotte. (2010). Prévalence des souches de *Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* productrices de β -lactamases à spectre étendu de type CTX-M à l'hôpital Bretonneau (CHRU de Tours). *Pathol. Biol.*, 58 : 67-69.

Honoré N., M.H. Nicolas and S.T. Cole. (1986). Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *EMBO Journal*, 5 : 3709-3714.

Honoré S., C. Lascols, D. Malin, R. Targaouchi, V. Cattoir, P. Legrand, C.J. Soussy and E. Cambau. (2006). Emergence et diffusion chez les entérobactéries du nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones Qnr (résultats hôpital Henri-Mondor 2002-2005). *Pathol. Biol.*, 54 : 270-279.

Hooper D.C. (2001). Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, 7 : 337-341.

Hu F.P., X.G. Xu, D.M. Zhu and M.G. Wang. (2008). Coexistence of *qnrB4* and *qnrS1* in a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 29 : 320-324.

Huang C.H., J.E. Renew, K.L. Smeby, K. Pinkerston and D.L. Sedlak. (2001). Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. *Water Resour. Update*, 120 : 30-40.

Humeniuk C., G. Arlet, V. Gautier, P. Grimont, R. Labia and A. Philippon. (2002). β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 : 3045-3049.

Iabadene H., Y. Messai, H. Ammari, N. Ramdani-Bougoussa, S. Lounes, R. Bakour and G. Arlet. (2008). Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62 : 133-136.

Iabadene H., Y. Messai, H. Ammari, S. Alouache, C. Verdet, R. Bakour and G. Arlet. (2009). Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among *Enterobacteriaceae* in Algiers hospitals. *I. J. Antimicrob. Agents*, 34 : 340-342.

Jacobs C. (1997). Life in the Balance : Cell Walls and Antibiotic Resistance. *Science*, 278 : 1731.

Jacobs C., B. Joris, M. Jamin, K. Klarsov, J. Van Beeumen, D. Mengin-Lecreulx, J. Van Heijenoort, J.T. Park, S. Normark and J.M. Frère. (1995). AmpD, essential for both β -lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic n-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Mol. Microbiol.*, 15 : 553-559.

Jacoby G.A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 41 : 120-126.

Jacoby G.A. (2009). AmpC β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 22 : 161-182.

Jacoby G.A. and A.A. Medeiros. (1991). More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 : 1697-1704.

Jacoby G.A. and L. Sutton. (1991). Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 : 164-169.

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

Jacoby G.A., D.M. Mills and N. Chow. (2004). Role of β -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 : 3203-3206.

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

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

Jaffe A., Y.A. Chabbert and O. Semonin. (1982). Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of β -lactam. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22 : 942-948.

Jarlier V., M.H. Nicolas, G. Fournier and A. Philippon. (1988). Extended spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae* : hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.*, 10 : 867-878.

Jiang Y., J. Pogliano, D.R. Helinski and I. Konieczny. (2002). ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Mol. Microbiol.*, 44 : 971-979.

Jiang X., Y. Ni and Y. Jiang. (2005). Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 β -lactamase in China. *J. Clin. Microbiol.*, 43 : 826-831.

Jiang Y., Z. Zhou, Y. Qian, Z. Wei, Y. Yu, S. Hu and L. Li. (2008). Plasmid mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extended- spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J. Antimicrob. Chemother.*, 61 : 1003-1006.

Kado C.I. and S.T. Liu. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 45 : 1365-1373.

Karim A., L. Poirel, S. Nagarajan and P. Nordmann. (2001). Plasmid-mediated extended spectrum β -lactamase (CTX-M-3-like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 201 : 237-241.

Kassis-Chikhani N., S. Vimont, K. Asselat, C. Trivalle, B. Minassian, C. Sengelin, V. Gautier, D. Mathieu, E. Dussaix and G. Arlet. (2004). CTX-M β -lactamase-producing *Escherichia coli* in long-term care facilities, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 10 : 1697-1698.

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

Kehrenberg C., K.L. Hopkins, E.J. Threlfall and S. Schwarz. (2007). Complete nucleotide sequence of a small *qnrS1*-carrying plasmid from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium DT193. *J. Antimicrob. Chemother.*, 60 : 903-905.

Kehrenberg C., S. Friederichs, A. de Jong and S. Schwarz. (2008). Novel variant of the *qnrB* gene, *qnrB12*, in *Citrobacter werkmanii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52 : 1206-1207.

Kemper N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8 : 1-13.

Kim S.Y., Y.J. Park, J.K. Yu, H.S. Kim, Y.S. Park, J.B. Yoon, J.Y. Yoo and K. Lee. (2007). Prevalence and mechanisms of decreased susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 57 : 85-91.

Kishii K., N. Chiba, M. Morozumi, K. Hamano-Hasegawa, I. Kurokawa, J. Masaki and K. Ubukata. (2010). Diverse mutations in the *ftsI* gene in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with acute otitis media. *J. Infect. Chemother.*, 16 : 87-93.

Knittel M.D., R.J. Seidler, C. Eby and L.M. Cabe. (1977). Colonization of the botanical environment by *Klebsiella* isolates of pathogenic origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34 : 557-563.

Knothe H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal and S. Mitsuhashi. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11 : 315-317.

Koh T.H., L.H. Sng, G. Wang, L.Y. Hsu, R.T. Lin and N.W. Tee. (2007). Emerging problems with plasmid-mediated DHA and CMY AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Singapore. *I. J. Antimicrob. Agents*, 30 : 278-280.

Kotapati S., J.L. Kuti and C.H. Nightingale. (2005). Clinical implications of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Klebsiella* species and *Escherichia coli* on cefepime effectiveness. *J. Infect.*, 51 : 211-217.

Kruse H. and H. Sorum. (1994). Transfert of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *App. Env. Microbiol.*, 60 : 4015-4021.

Kummerer K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment-Part I, Part II-. *Chemosphere*, 75 : 417-434.

Laraki N., N. Franceschini, G.M. Rossolini, P. Santucci, C. Meunier, E. de Pauw, G. Amicosante, J.M. Frère and M. Galleni. (1999). Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 : 902-906.

Larsson D.G.J., C. de Pedro and N. Paxeus. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J. Haz. Mat.*, 148 : 751-755.

Lartigue M.F., C. Zinsius, A. Wenger, J. Bille, L. Poirel and P. Nordmann. (2007). Extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M type now in Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 : 2855-2860.

Lee S.H., S.H Jeong and Y.M Park. (2003). Characterization of *bla*_{CMY-10} a novel, plasmid-encoded AmpC-type β -lactamase gene in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes*. *J. Appl. Microbiol.*, 95 : 744-752.

Lee K., S.G. Hong, Y.J. Park, H.S. Lee, W. Song, J. Jeong, D. Yong and Y. Chong. (2005). Evaluation of phenotypic screening methods for detecting plasmid-mediated AmpC beta-lactamases-producing isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 53 : 319-323.

Leprat P. (1998). Les rejets liquides hospitaliers, quels agents et quelles solutions techniques? les Assises Nationales QUALIBO 1998. *Santé et environnement hospitalier*, Caen, p. 10-13.

Levesque R., P.H. Roy, R. Letarte and J.C. Pechère. (1982). A plasmid mediated cephalosporinase from *Achromobacter* species. *J. Infect. Dis.*, 145 : 753-761.

Levesque C., S. Brassard, J. Lapointe and P.H. Roy. (1994). Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene*, 142 : 49-54.

Li X.Z. (2005). Quinolone resistance in bacteria : emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *I. J. Antimicrob. Agents*, 25 : 453-463.

Lindberg F., L. Westman and S. Normark. (1985). Regulatory components in *Citrobacter freundii* AmpC β -lactamase induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 82 : 4620-4624.

Lindberg F., S. Lindquist and S. Normark. (1987). Inactivation of the *ampD* gene causes semiconstitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii* β -lactamase. *J. Bacteriol.*, 169 : 1923-1928.

Lindquist S., K. Weston-Hafer, H. Schmidt, C. Pul, G. Korfmann, J. Erickson, C. Sanders, H.H. Martin and S. Normark. (1993). AmpG, a signal transducer in chromosomal beta-lactamase induction. *Mol. Microbiol.*, 9 : 703-715.

Liu C.P., L.C. Weng, H.K. Tseng, N.Y. Wang, C.M. Lee. (2007). Cefotaxime-resistant *Citrobacter freundii* in isolates from blood in a tertiary teaching hospital in Northern Taiwan. *J. infection*, 55 : 363-368.

Liu J.H., Y.T. Deng, Z.L. Zeng, J.H. Gao, L. Chen, Y. Arakawa and al. (2008). Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr and AAC(60)-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52 : 2992-2993.

Livermore D.M. (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8 : 557-584.

Livermore D.M. (2008). Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14 : 3-10.

Livermore D. and J.D. Williams. (1996). β -lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins, 502-578.

Livermore D.M, R. Canton, M. Gniadkowski, P. Nordmann, G.M. Rossolini, G. Arlet, J. Ayala, T.M. Coque, I. Kern-Zdanowicz, F. Luzzaro, L. Poirel and N. Woodford. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.*, 59 : 165-174.

Llarrull L.I., S.A. Testero, J.F. Fisher and S. Mobashery. (2010). The future of the β -lactams. *Curr. Opin. Microbiol.*, 13 : 551-557.

Loli A., L.S. Tzouveleakis, E. Tzelepi, A. Carattoli, A.C. Vatopoulos, P.T. Tassios and V. Miriagou. (2006). Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{VIM-1}. *J. Antimicrob. Chemother.*, 58 : 669-672.

Lopes A.C.S., J.F. Rodrigues and M.A. Morais Junior. (2005). Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. *Microbiol. Res.*, 160 : 37-46.

Lu S.Y., Y.L Zhang, S.N Geng, T.Y. Li, Z.M. Ye, D.S. Zhang, F. Zou and H.W. Zhou. (2010). High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. *App. Env. Microbiol.*, 76 : 5972-5976.

Ma J., Z. Zeng, Z. Chen, X. Xu, X. Wang, Y. Deng, D. Lu, L. Huang, Y. Zhang, J. Liu and M. Wang. (2009). High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac* (*6'*)-*Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53 : 519-524.

Malouin F. and L.E. Bryan. (1986). Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of β -lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30 : 1-5.

Mammeri H. and P. Nordmann. (2007). Extended-spectrum cephalosporinases in *Enterobacteriaceae*. *Anti-infect. Agents Med. Chem.*, 6 : 71-82.

Mammeri H., L. Poirel and P. Nordmann. (2007). Extension of the hydrolysis spectrum of AmpC β -lactamase of *Escherichia coli* due to amino acid insertion in the H-10 helix. *J. Antimicrob. Chemother.*, 60 : 490-494.

Marchiaro P., V. Ballerini, T. Spalding, G. Cera, M.A. Mussi, J. Moran-Barrio, A.J. Vila, A.M. Viale and A.S. Limansky. (2008). A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62 : 336-344.

Martinez-Martinez L., A. Pascual and G.A. Jacoby. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351 : 797-799.

Martinez-Martinez L., A. Pascual, I. Garcia, J. Tran and G.A. Jacoby. (2003). Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51 : 1037-1039.

Masuda N., E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, H. Tsujimoto and T. Nishino. (2000). Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44 : 3322-3327.

Matagne A., J. Lamotte-Brasseur and J.M. Frère. (1998). Catalytic properties of class A β -lactamase : efficiency and diversity. *Biochem. J.*, 330 : 581-598.

Matar G.M., G. Cuzon, G.F. Araj, T. Naas, J. Corkill, M.M. Kattar and P. Nordmann. (2008). Oxacillinase mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Lebanon. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14 : 887-888.

Matthew M. (1979). Plasmid mediated β -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. *J. Antimicrob. Chemother.*, 5 : 349-358.

Mazel D. and J. Davies. (1999). Antibiotic resistance in microbes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 56 : 742-754.

Mazzariol A., G. Cornaglia and H. Nikaido. (2000). Contribution of the AmpC β -lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *E. coli* K12 to β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44 : 1387-1390.

McDonnell G. and A.D. Russell. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12 : 147-179.

McQuaig S.M., T.M. Scott, V.J. Harwood, S.R. Farrah and J.O. Lukasik. (2006). Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 : 7567-7574.

Medeiros A.A. (1997). Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generation of β -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.*, 24 : 19-45.

- Meirelles-Pereira F., A.M.S. Pereira, M.C.G. Silva, V.D. Gonçalves, P.R. Brum, E.A.R. Castro, A.A. Pereira, F.A. Esteves and J.A.A. Pereira. (2002).** Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. *Braz. J. Microbiol.*, 33: 287-293.
- Mendelmann P.M., D. Chaffin and G. Kalaizoglou. (1990).** Penicillin binding proteins and ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 25 : 525-534.
- Meradi L., A. Djahoudi, A. Abdi, M. Bouchakour, J.D. Perrier Gros Claude and M. Timinouni. (2009).** Résistance aux quinolones de type *qnr*, *aac (6')-Ib-cr* chez les entérobactéries isolées à Annaba en Algérie. *Pathol. Biol.*, 1-6.
- Mérens A. and A. Servonnet. (2010).** Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. *Revue francophone des laboratoires.*, 422 : 33-41.
- Merlin C. and A. Toussaint. (1999).** Les éléments transposables bactériens. *Société Française de Génétique*. m/s n° 8-9, 15 : I-XIII.
- Messai Y., H. Iabadene, T. Benhassine, S. Alouache, M. Tazir, V. Gautier, G. Arlet and R. Bakour. (2008).** Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathol. Biol.*, 56 : 319-325.
- Moland E.S., N.D. Hanson, J.A. Black, A. Hossain, W. Song and K.S. Thomson. (2006).** Prevalence of newer beta-lactamases in gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002. *J. Clin. Microbiol.*, 44 : 3318-3324.
- Moya B., A. Dotsch, C. Juan, J. Blazquez, L. Zamorano, S. Haussler and A. Oliver. (2009).** β -Lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS. Pathog.*, 5 : e1000353.
- Mulvey M.R., E. Bryce, D.A. Boyd, M. Ofner-Agostini, A.M. Land, A.E. Simor and S. Paton. (2005).** Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 : 358-365.
- Naas T., G. Cuzon, M.V. Villegas, M.F. Lartigue, J.P. Quinn and P. Nordmann. (2008).** Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55 : 1257-1263.
- Nagai K., T.A. Davies, M.R. Jacobs and P.C. Appelbaum. (2002).** Effects of amino acid alterations in penicillin-binding-proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate and resistant pneumococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 : 1273-1280.
- Nikaido H. (1985).** Role of permeability barriers in resistance to β -lactam antibiotics. *Pharm. Ther.*, 27 : 197-231.
- Nikaido H. (1998).** Antibiotic resistance caused by Gram negative multidrug efflux pumps. *Clin. Infect. Dis.*, 27 : 32-41.
- Nikaido H. (2003).** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67 : 593-656.

Nikaido H., M. Basina, V. Nguyen, E.Y. Rosenberg. (1998). Multidrug efflux pumps AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those β -lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J. Bacteriol.*, 180 : 4686-4692.

Nordmann P. (2006). L'émergence de la résistance plasmidique aux quinolones chez les entérobactéries. *Pathol. Biol.*, 54 : 7-9.

Nordmann P. and L. Poirel. (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56 : 463-469.

Nordmann P., G. Cuzon and T. Naas. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.*, 9 : 28-36.

Nukaga M., S. Haruta, K. Tanimoto, K. Kogure, K. Taniguchi, M. Tamaki and T. Sawai. (1995). Molecular evolution of a class C β -lactamase extending its substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, 270 : 5729-5735.

Olivier A., J.C. Perez-Diaz, T.M. Coque, F. Baquero and R. Canton. (2001). Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaximase-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 : 616-620.

Olsson O., S. Bergstrom and S. Normark. (1982). Identification of a novel *ampC* β -lactamase promoter in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 1 : 1411-1416.

Olsson O., S. Bergstrom, F.P. Lindberg and S. Normark. (1983). *ampC* β -lactamase hyperproduction in *Escherichia coli*: natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from *Shigella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80 : 7556-7560.

Oppenheim B.A. (1997). Antibiotic resistance in *Neisseria meningitidis*. *Clin. Infect. Dis.*, 24: 98-101.

Oram M. and L.M. Fisher. (1991). 4-Quinolone resistance mutations in the DNA Gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 : 387-389.

Pagès J.M. and E. Garnotel. (2003). Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif. *Revue française des laboratoires*, numéro spécial : résistance aux antibiotiques. 352 : 57-63.

Pai H., M.R. Kim, M.R. Seo, T.Y. Choi and S.H. Oh. (2006). A nosocomial outbreak of *Escherichia coli* producing CTX-M-15 and OXA-30 β -lactamase. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 27 : 312-314.

Pai H., M. R. Seo and T.Y. Choi. (2007). Association of QnrB determinants and production of extended-spectrum β -lactamases or plasmid-mediated AmpC β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 : 366-368.

Papanicolaou G.A., A.A. Medeiros and G.A. Jacoby. (1990). Novel plasmid mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and α - methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34 : 2200-2209.

Park C.H., A. Robicsek, G.A. Jacoby, D. Sahn and D.C. Hooper. (2006). Prevalence in the united states of *aac-(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50 : 3953-3955.

Paterson D.L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am. J. Med.*, 119 : 20-28.

Paterson D.L. and R.A. Bonomo. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18 : 657-686.

Paterson D.L., K.M. Hujer, A.M. Hujer, B. Yeiser, M.D. Bonomo, L.B. Rice and R.A. Bonomo. (2003). Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47 : 3554-3560.

Pérez-Pérez F.J. and N.D. Hanson. (2002). Detection of plasmid-Mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 40 : 2153-2162.

Périchon B., P. Courvalin and M. Galimand. (2007). Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 : 2464-2469.

Petitjean O. and M.A. Rosset. (1988). Aztréonam. In: Pharmacologie clinique. *Paris, Expansion Scientifique Française*, 1393-1397.

Philippon A. and G. Arlet. (1997). Les céphalosporinases plasmidiques de type AmpC: présent et futur. *Lett. Infectiol.*, 12 : 263-268.

Philippon A.M, R. Labia and G.A. Jacoby. (1989). Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 : 1131-1136.

Philippon A., G. Arlet and B. Schlemmer. (1993). Bêta-lactamines (I). *Encycl.Med.Chir. (Paris-France). Maladies infectieuses.*, 8-004-C-10. 25 p.

Philippon A., G. Arlet and G.A. Jacoby. (2002). Plasmid-determined AmpC-Type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 : 1-11.

Picao R.C., L. Poirel, A. Demarta, C.S. Silva, A.R. Corvaglia, O. Petrini and P. Nordmann. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62 : 948-950.

Pitout J.D., C.C. Sanders and W.E.Jr. Sanders. (1997). Antimicrobial resistance with focus on β -lactam resistance in Gram-negative bacilli. *Am. J. Med.*, 103 : 51-59.

Pitout J.D., P. Nordmann, K.B. Laupland and L. Poirel. (2005). Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56 : 52-59.

Pitout J.D., D.B. Gregson, D.L. Church and K.B. Laupland. (2007). Population-based laboratory surveillance for AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, Calgary. *Emerg. Infect. Dis.*, 13 : 443-448.

Ploy M.C, A. Gassama, D. Chainier and F. Denis. (2005). Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse et Biologie spécialisée*, 20 : 343-352.

Poirel L., M. Guibert, D. Girlich, T. Naas and P. Nordmann. (1999a). Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of *ampC-ampR* from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 : 769-776.

Poirel L., T. Naas, M. Guibert, E.B. Chaibi, R. Labia and P. Nordmann. (1999b). Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 : 573-581.

Poirel L., T. Naas, I. Le Thomas, A. Karim, E. Bingen and P. Nordmann. (2001). CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 : 3355-3361.

Poirel L., M. Gniadkowski and P. Nordmann. (2002a). Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTXM-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50 : 1031-1034.

Poirel L., P. Kampfer and P. Nordmann. (2002b). Chromosome encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera Georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 : 4038-4040.

Poirel L., J.W. Decousser and P. Nordmann. (2003). Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilisation of a *bla*_{CTX-M} β -lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47 : 2938-2945.

Poirel L., C. Heritier, V. Tolun and P. Nordmann. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 : 15-22.

Poirel L., J.M. Rodriguez-Martinez, H. Mammeri, A. Liard and P. Nordmann. (2005a). Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 : 3523-3525.

Poirel L., A. Liard, J.M. Rodriguez-Martinez and P. Nordmann. (2005b). *Vibrionaceae* as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56 : 1118-1121.

Poirel L., C. Leviandier and P. Nordmann. (2006). Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnrA* and *qnrS* in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50 : 3992-3997.

Poirel L., V. Cattoir, A. Soares, C.J. Soussy and P. Nordmann. (2007). Novel Ambler class A β -lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrS1. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 : 631-637.

Poirel L., V. Cattoir and P. Nordmann. (2008). Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14 : 295-297.

Pomba C., J.D. da Fonseca, B.C. Baptista, J.D. Correia and L. Martinez-Martinez. (2009). Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the *qnrB2* and *aac (6')-Ib-cr* genes in a dog. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53 : 327-328.

Prado T., W.C. Pereira, M.D. Silva, L.M. Seki, A.P.D.A. Carvalho and M.D. Asensi. (2008). Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett. Appl. Microbiol.*, 46 : 136-141.

Quale J., S. Bratu, J. Gupta and D. Landman. (2006). Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50 : 1633-1641.

Queenan A.M. and K. Bush. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20 : 440-458.

Queenan A.M., B. Foleo, C. Gownley, E. Wira and K. Bush. (2004). Effects of inoculum and β -lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum- β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *J. Clin. Microbiol.*, 42 : 269-275.

Quinn J.P., C.A. Di Vincenzo, D.A. Lucks, R.L. Luskin, K.L. Shatzer and S.A. Lerner. (1988). Serious infections due to penicillin resistant strains of viridans streptococci with altered penicillin-binding-proteins. *J. Infect. Dis.*, 157 : 764-769.

Quinteros M., M. Radice, N. Gardella, M.M. Rodriguez, N. Costa, D. Korbenfeld, E. Couto, G. Gutkind and the Microbiology Study Group. (2003). Extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47 : 2864-2867.

Quiroga M.P., P. Andres, A. Petroni, A.J. Soler Bistué, L. Guerriero, L.J. Vargas, A. Zorreguieta, M. Tokumoto, C. Quiroga, M.E. Tolmasky, M. Galas and D. Centron. (2007). Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac (6')-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 : 4466-4470.

Randall L.P. and M.J. Woodward. (2002). The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res. Vet. Sci.*, 72 : 87-93.

Reinthaler F.F., G. Feierl, H. Galler, D. Haas, E. Leitner, F. Mascher, A. Melkes, J. Posch, I. Winter, G. Zarfel and E. Marth. (2010). ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res.*, 44 : 1981-1985.

Rhodes M.W. and H. Kator. (1988). Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 : 2902-2907.

- Rice L.B., L.L. Carias, R.A. Hutton, S.D. Rudin, A. Endimiani and R.A. Bonomo. (2008).** The KQ element, a complex genetic region conferring transferable resistance to carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52 : 3427-3429.
- Robicsek A., J. Strahilevitz, G.A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C.H. Park, K. Bush and D.C. Hooper. (2006a).** Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.*, 12 : 83-88.
- Robicsek A., J. Strahilevitz, D.F. Sahn, G.A. Jacoby and D.C. Hooper. (2006b).** *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50 : 2872-2874.
- Robicsek A., G.A. Jacoby and D.C. Hooper. (2006c).** The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.*, 6 : 629-640.
- Robin F., J. Delmas, C. Chanal, D. Sirot, J. Sirot and R. Bonnet. (2005).** TEM-109 (CMT-5), a natural complex mutant of TEM-1 β -lactamase combining the amino acid substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 : 4443-4447.
- Rodriguez-Martinez J.M., A. Pascual, I. Garcia and L. Martinez-Martinez. (2003).** Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.*, 52 : 703-706.
- Rodriguez-Martinez J.M., C. Velasco, I. Garcia, M.E. Cano, L. Martinez-Martinez and A. Pascual. (2007).** Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for *Enterobacteriaceae* expressing the plasmid-carried quinolone resistance determinant *qnrA1*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 : 2236-2239.
- Rolinson N. (1986).** β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 17 : 5-36.
- Rossolini G.M., M.M. D'Andrea and C. Mugnaioli. (2008).** The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14 : 33-41.
- Rowe-Magnus D.A. and D. Mazel. (1999).** Resistance gene capture. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2 : 483-488.
- Roy C., A. Foz, C. Segura, M. Tirado, C. Fuster and R. Reig. (1983).** Plasmid determined β -lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 12 : 507-510.
- Ruiz J. (2003).** Mechanisms of resistance to quinolones : target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51 : 1109-1117.
- Ruiz J., J. Gomez, M.M. Navia, A. Ribera, J.M. Sierra, F. Marco, J. Mensa and J. Vila. (2002).** High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 42 : 257-261.

Russo T.A., U. MacDonald, J.M. Beanan, R. Olson, I.J. MacDonald, S.L. Sauberan, N.R. Luke, L.W. Schultz and T.C. Umland. (2009). Penicillin binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. *J. Infect. Dis.*, 199 : 513-521.

Rybkin T., J.L. Mainardi, W. Sougakoff, E. Collatz and L. Gutmann. (1998). Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of β -lactam resistance. *J. Infect. Dis.*, 178 : 159-163.

Sabaté M., F. Navarro, E. Miro, S. Campoy, B. Mirelis, J. Barbe and G. Prats. (2002). Novel complex sulI-type integron in *Escherichia coli* carrying bla (CTX-M-9). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 : 2656-2661.

Salys A.A., N.B. Shoemaker, A.M. Stevens and L.Y. Li. (1995). Conjugative Transposons: an Unusual and Diverse Set of Integrated Gene Transfer Elements. *Microbiol. Rev.*, 59 : 579-590.

Sanders C.C. (1987). Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer β -lactam antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.*, 41 : 573-593.

Schwartz T., W. Kohnen, B. Jansen and U. Obst. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43 : 325-335.

Seveno N.A., D. Kallifidas, K. Smalla, J.D. van Elsas, J.M. Collard, A.D. Karagouni and E.M.H. Wellington. (2002). Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. *Rev. Med. Microbiol.*, 13 : 15-27.

Sirot D., C. Recule, E.B. Chaibi, L. Bret, J. Croize, C. Chanal-Claris, R. Labia and J. Sirot. (1997). A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 : 1322-1325.

Siu L.K., P.L. Lu, J.Y. Chen, F.M. Lin and S.C. Chang. (2003). High-level expression of ampC β -lactamase due to insertion of nucleotides between -10 and -35 promoter sequences in *Escherichia coli* clinical isolates: cases not responsive to extended-spectrum-cephalosporin treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47 : 2138-2144.

Soge O.O., B.A. Adeniyi and M.C. Roberts. (2006). New antibiotic resistance genes associated with CTX-M plasmids from uropathogenic Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 58 : 1048-1053.

Sougakoff W., S. Goussard, G. Gerbaud and P. Courvalin. (1988). Plasmid mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev. Infect. Dis.*, 10 : 879-884.

Spratt B.G. (1988). Hybrid penicillin binding proteins in penicillin resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature*, 332 : 173-176.

Strahilevitz J., G.A. Jacoby, D.C. Hooper and A. Robicsek. (2009). Plasmid mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 22 : 664-689.

Sun H.Y., S.Y. Chen, S.C. Chang, S.C. Pan, C.P. Su and Y.C. Chen. (2006). Community-onset *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: influence of health care exposure on antimicrobial susceptibility. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 55 : 135-141.

Szczepanowski R., I. Krahn, B. Linke, A. Goesmann, A. Puhler and A. Schluter. (2004). Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiol.*, 150 : 3613-3630.

Szczepanowski R., B. Linke, I. Krahn, K.H. Gartemann, T. Gutzkow, W. Eichler, A. Puhler and A. Schluter. (2009). Detection of 140 clinically relevant antibiotic resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiol.*, 155 : 2306-2319.

Talbot H.W.Jr., D.K. Yamamoto, M.W. Smith and R.J. Seidler. (1980). Antibiotic resistance and its transfer among clinical and nonclinical *Klebsiella* strains in botanical environments. *App. Envi. Microbiol.*, 39 : 97-104.

Tankovic J. (2000). Mécanismes d'action des antibiotiques. In: Freney J, Renaud F, Hansen W, Boillet C, eds. *Précis de bactériologie clinique*. Paris: ESKA- Alexandre Lacassagne, 583-595.

Tassios P.T., M. Gazouli, E. Tzelepi, H. Milch, N. Kozlova, S. Sidorenko, N.J. Legakis and L.S. Tzouveleakis. (1999). Spread of *Salmonella typhimurium* clone resistant to extended-spectrum cephalosporins in three European countries. *J. Clin. Microbiol.*, 37 : 3774-3777.

Tavio M.M., J. Vila, J. Ruiz, A.M. Martín-Sanchez and M.T. Jiménez de Anta. (1999). Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* strains. *J. Antimicrob. Chemother.*, 44 : 735-742.

Tennstedt T., R. Szczepanowski, S. Braun, A. Puhler and A. Schluter. (2003). Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 45 : 239-252.

Thomson K.S. (2001). Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerg. Infect. Dis.*, 7 : 333-336.

Thomson K.S. and E. Smith Moland. (2000). Version 2000: the new β -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes and Infection*, 2 : 1225-1235.

Toleman M.A., K. Rolston, R.N. Jones and T.R. Walsh. (2003). Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d- beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47 : 2859-2863.

Toleman M.A., P.M. Bennett and T.R. Walsh. (2006). ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70 : 296-316.

Torpdahl M., A.M. Hammerum, C. Zachariasen and E.M. Nielsen. (2009). Detection of *qnr* genes in *Salmonella* isolated from humans in Denmark. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63 : 406-408.

Touati A., L. Brasme, S. Benallaoua, A. Gharout, J. Madoux, C. De Champs. (2008a). First report of *qnrB*-producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA*-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diag. Microbiol. Infect. dis.*, 60 : 287-290.

Touati A., L. Brasme, S. Benallaoua, J. Madoux, A. Gharout and C. de Champs. (2008b). *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing CTX-M-15 recovered from hospital environmental surfaces from Algeria. *J. Hosp. Infect.*, 68 : 183-185.

Tran J.H. and G.A. Jacoby. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 : 5638-5642.

Tran J.H., G.A. Jacoby and D.C. Hooper. (2005). Interaction of the plasmid encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 : 118-125.

Vandenesch F. and J. Etienne. (1997). Protéines liant la pénicilline : cibles des β -lactamines. *Médecines thérapeutiques*, 3 : 61-65.

Veal W.L., R.A. Nicholas and W.M. Shafer. (2002). Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump due to a *mtrR* mutation is required for chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.*, 184 : 5619-5624.

Vedel G., D. Ratovohery, G. Paul and P. Nevot. (1994). Phénotypes de résistance des Entérobactéries aux bêta-lactamines. Laboratoire jouveimal, eds. Pyramide. Santé Paris. 1-103.

Vila J., J. Ruiz, F. Marco, A. Barcelo, P. Goni, E. Giralt and T. Jimenez de Anta. (1994). Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and minimal inhibitory concentration. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38: 2477-2479.

Wachino J., H. Kurokawa, S. Suzuki, K. Yamane, N. Shibata, K. Kimura, Y. Ike and Y. Arakawa. (2006). Horizontal transfer of *bla*CMY-bearing plasmids among clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50 : 534-541.

Walther-Rasmussen J. and N. Hoiby. (2004). Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum β -lactamases. *Can. J. Microbiol.*, 50 : 137-165.

Walther-Rasmussen J. and N. Hoiby. (2006). OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57 : 373-383.

Wang M., D.F. Sahn, G.A. Jacoby, Y. Zhang and D.C. Hooper. (2004). Activities of newer quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 : 1400-1401.

Wang M., Q. Guo, X. Xu, X. Wang, X. Ye, S. Wu, D.C. Hooper and M. Wang. (2009). New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC1*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53 : 1892-1897.

Weldhagen G.F. (2004). Integrons and β -lactamases-a novel perspective on resistance. *I. J. Antimicrob. Agents.*, 23 : 556-562.

Weldhagen G.F., L. Poirel and P. Nordmann. (2003). Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47 : 2385-2392.

Wolter D.J., P.M. Kurpiel, N. Woodford, M.F.I. Palepou, R.V. Georing and N.D. Hanson. (2009). Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53 : 557-562.

Woodford N., S. Reddy, E.J. Fagan, R.L. Hill, K.L. Hopkins, M.E. Kaufmann, J. Kistler, M.F. Palepou, R. Pike, M.E. Ward, J. Cheesbrough and D.M. Livermore. (2007). Wide geographic spread of diverse acquired AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in the UK and Ireland. *J. Antimicrob. Chemother.*, 59 : 102-105.

Wu J.J., W.C. Ko, S.H. Tsai and J.J. Yan. (2007). Prevalence of plasmid mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51 : 1223-1227.

Wu J.J., W.C. Ko, C.S. Chiou, H.M. Chen, L.R. Wang and J.J. Yan. (2008). Emergence of Qnr determinants in human *Salmonella* isolates in Taiwan. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62 : 1269-1272.

Yagci D., F. Yoruk, A. Azap and O. Memikoglu. (2009). Prevalence and risk factors for selection of quinolone-resistant *Escherichia coli* strains in fecal flora of patients receiving quinolone therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53 : 1287-1289.

Yamane K., J.I. Wachino, S. Suzuki and Y. Arakawa. (2008). Plasmid-mediated *qepA* genes among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52 : 1564-1566.

Yang H., H. Chen, Q. Yang, M. Chen and H. Wang. (2008). High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnr* and *aac (6')-Ib-cr* in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from nine teaching hospitals in China. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52 : 4268-4273.

Yang C.M., M.F. Lin, P.C. Liao, H.W. Yeh, B.V. Chang, T.K. Tang, C. Cheng, C.H. Sung and M.L. Liou. (2009). Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and wastewater strains in a regional hospital in Taiwan. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48 : 560-565.

Yigit H., A.M. Queenan, G.J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J.W. Biddle, C.D. Steward, S. Alberti, K. Bush and F.C. Tenover. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 : 1151-1161.

Yigit H., A.M. Queenan, J.K. Rasheed, J.W. Biddle, A. Domenech-Sanchez, S. Alberti, K. Bush and F.C. Tenover. (2003). Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47 : 3881-3889.

Yoshida H., M. Bogaki, M. Nakamura and S. Nakamura. (1990). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34 : 1271-1272.

Zamorano L., B. Moya, C. Juan and A. Oliver. (2010). Differential beta-lactam resistance response driven by *ampD* or *dacB* (PBP4) inactivation in genetically diverse *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Antimicrob. Chemother.*, 65 : 1540-1542.

Zong Z., S.R. Partridge and J.R. Iredell. (2009). A *bla*_{VEB-1} variant, *bla*_{VEB-6}, associated with repeated elements in a complex genetic structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53 : 1693-1697.

ANNEXE

Tableau I : Résultats de l'identification biochimique des souches par galerie API 20^E

Espèce	Souches	Biotypes
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=71)	S1	5 215 773
	S2	5 215 773
	S3	5 215 773
	S5	5 215 773
	S7	5 215 773
	S10	5 215 773
	S11	5 215 773
	S12	5 215 773
	S13	5 215 573
	S14	5 215 773
	S15	5 215 773
	S16	5 215 773
	S18	5 214 773
	S38	5 215 773
	S39	5 215 773
	S40	5 215 773
	S41O	5 215 773
	S42	5 215 773
	S43	5 215 773
	S44	5 215 773
	S45	5 215 773
	S46	5 215 773
	S47	5 215 773
	S48	5 215 773
	S50	5 215 773
	S55	5 215 773
	S60	5 215 773
	S63	5 214 773
	S64	5 215 773
	S65	5 215 773
	S66	5 215 773
S67	5 215 773	
S73	5 215 773	
S74	5 215 773	
S75	5 215 773	

Tableau I : Résultats de l'identification biochimique des souches par galerie API 20^E (suite)

Espèce	Souches	Biotypes
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=71)	S76	5 215 773
	S77	5 215 773
	S78	5 215 773
	S79	5 214 773
	S81	5 215 773
	S82	5 215 773
	S87	5 215 773
	S93	5 215 773
	S97	5 215 773
	S103	5 215 773
	S107	5 214 773
	S113	5 215 773
	S116	5 215 773
	S117	5 215 773
	S118	5 215 773
	S119	5 215 773
	S120	5 215 773
	S121	5 215 773
	S122	5 215 773
	S123	5 215 773
	S124	5 215 773
	S125	5 215 773
	S126	5 215 773
	S127	5 215 773
	S128	5 215 773
	S129	5 215 773
	S133	5 215 773
	S135	5 215 773
	S137	5 215 773
	S142	5 215 773
	S143	5 215 773
S145	5 215 773	
S146	5 215 773	
S149	5 215 773	
S151	5 215 773	
S152	5 215 773	

Tableau I : Résultats de l'identification biochimique des souches par galerie API 20^E (suite)

Espèce	Souches	Biotypes
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=8)	S6	5 244 773
	S9	5 244 773
	S51	1 255 773
	S84	5 255 773
	S86	5 255 773
	S94	5 245 773
	S111	1 255 773
	S114	5 245 773
<i>Escherichia coli</i> (n=7)	S41T	5 144 572
	S53	5 144 572
	S59	5 144 572
	S72	5 144 572
	S80	5 144 572
	S100	5 144 572
	S112	5 144 572
<i>Citrobacter freundii</i> (n=13)	S20	1 404 773
	S29	1 404 772
	S30	1 404 773
	S36	1 404 772
	S57	3 604 772
	S71	1 204 772
	S89	1 004 772
	S96	1 404 772
	S99	1 404 772
	S101	3 404 772
	S104	3 404 772
	S105	1 604 772
	S132	1 004 772
<i>Citrobacter braakii</i> (n=1)	S106	3 704 573
<i>Enterobacter sakazakii</i> (n=8)	S22	3 305 173
	S24	3 305 173
	S26	3 305 173
	S32	3 305 173
	S33	3 305 173
	S34	3 305 173
	S68	3 305 173
	S147	3 305 173
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=1)	S108	3 304 773

Tableau II : Résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé

Espèce	Souche	Antibiotiques*													
		CTX		CAZ		CI		FOX		GM		Nal		CIP	
		≥ 26S	< 23R	≥ 21S	< 19R	≥ 26S	< 23R	≥ 22S	< 15R	≥ 18S	< 16R	≥ 20S	< 15R	≥ 25S	< 22R
<i>K. pneumoniae</i>	S1	8 R		0 R		10 R		23 S		8 R		/		18 R	
	S2	8 R		10 R		12 R		26 S		8 R		/		16 R	
	S3	8 R		0 R		10 R		25 S		8 R		/		19 R	
	S5	14 R		11 R		15 R		24 S		8 R		/		18 R	
	S7	0 R		0 R		0 R		23 S		7 R		/		0 R	
	S10	7 R		0 R		10 R		26 S		8 R		/		18 R	
	S11	8 R		0 R		10 R		24 S		7 R		/		17 R	
	S12	0 R		0 R		10 R		23 S		8 R		/		20 R	
	S13	21 R		21 S		22 R		26 S		26 S		24 S		35 S	
	S14	10 R		10 R		12 R		26 S		7 R		/		19 R	
	S15	8 R		0 R		11 R		26 S		8 R		/		20 R	
	S16	9 R		8 R		12 R		26 S		7 R		/		19 R	
	S18	15 R		0 R		18 R		14 R		26 S		/		32 S	
	S38	11 R		9 R		12 R		24 S		8 R		17 I		18 R	
S39	12 R		10 R		14 R		26 S		7 R		16 I		17 R		
S40	11 R		11 R		14 R		24 S		8 R		18 I		20 R		

CTX : céfotaxime, CAZ : ceftazidime, CI : ceftriaxone, FOX : céfoxitine, GM : gentamicine, Nal : acide nalidixique, CIP : ciprofloxacine,

* : diamètres critiques en mm, déterminés selon le CA-SFM (2010), R : Résistant, S : Sensible, I : Intermédiaire, / : non réalisé.

Tableau II : Résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé (suite)

Espèce	Souche	Antibiotiques*													
		CTX		CAZ		CI		FOX		GM		Nal		CIP	
		≥ 26S	< 23R	≥ 21S	< 19R	≥ 26S	< 23R	≥ 22S	< 15R	≥ 18S	< 16R	≥ 20S	< 15R	≥ 25S	< 22R
<i>K. pneumoniae</i>	S410	0 R		0 R		9 R		13 R		0 R		0 R		0 R	
	S42	8 R		0 R		10 R		22 S		7 R		17 I		17 R	
	S43	9 R		0 R		10 R		23 S		7 R		16 I		16 R	
	S44	0 R		0 R		10 R		25 S		8 R		18 I		18 R	
	S45	7 R		0 R		10 R		23 S		8 R		17 I		19 R	
	S46	8 R		0 R		10 R		22 S		9 R		16 I		19 R	
	S47	8 R		0 R		9 R		22 S		8 R		17 I		17 R	
	S48	11 R		19 I		/		23 S		7 R		16 I		17 R	
	S50	8 R		17 R		/		24 S		0 R		24 S		30 S	
	S55	8 R		17 R		11 R		24 S		8 R		17 I		18 R	
	S60	7 R		16 R		9 R		24 S		7 R		17 I		13 R	
	S63	15 R		10 R		19 R		8 R		23 S		25 S		30 S	
	S64	0 R		16 R		10 R		24 S		8 R		18 I		14 R	
	S65	10 R		19 I		12 R		24 S		0 R		17 I		17 R	
	S66	11 R		20 I		13 R		24 S		7 R		17 I		16 R	
S67	11 R		20 I		14 R		24 S		0 R		17 I		16 R		
S73	11 R		21 S		14 R		24 S		11 R		15 I		18 R		

CTX : céfotaxime, CAZ : ceftazidime, CI : ceftriaxone, FOX : céfoxitine, GM : gentamicine, Nal : acide nalidixique, CIP : ciprofloxacine,
 * : diamètres critiques en mm, déterminés selon le CA-SFM (2010), R : Résistant, S : Sensible, I : Intermédiaire, / : non réalisé.

Tableau II : Résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé (suite)

Espèce	Souche	Antibiotiques*													
		CTX		CAZ		CI		FOX		GM		Nal		CIP	
		≥ 26S	< 23R	≥ 21S	< 19R	≥ 26S	< 23R	≥ 22S	< 15R	≥ 18S	< 16R	≥ 20S	< 15R	≥ 25S	< 22R
<i>K. pneumoniae</i>	S74	6 R		16 R		11 R		28 S		8 R		16 I		19 R	
	S75	7 R		18 R		12 R		24 S		9 R		16 I		19 R	
	S76	9 R		19 I		12 R		24 S		8 R		16 I		18 R	
	S77	0 R		16 R		10 R		24 S		8 R		19 I		16 R	
	S78	10 R		22 S		14 R		24 S		7 R		18 I		17 R	
	S79	0 R		16 R		10 R		17 I		0 R		0 R		0 R	
	S81	7 R		15 R		9 R		22 S		8 R		16 I		17 R	
	S82	11 R		20 I		13 R		23 S		9 R		15 I		17 R	
	S87	11 R		19 I		11 R		23 S		8 R		15 I		18 R	
	S93	12 R		21 S		15 R		26 S		9 R		15 I		18 R	
	S97	8 R		16 R		10 R		24 S		10 R		15 I		18 R	
	S103	12 R		21 S		14 R		27 S		7 R		18 I		19 R	
	S107	14 R		9 R		17 R		13 R		28 S		23 S		34 S	
	S113	7 R		18 R		10 R		28 S		9 R		18 I		20 R	
	S116	0 R		18 R		12 R		26 S		10 R		18 I		19 R	
S117	13 R		22 S		16 R		28 S		10 R		17 I		19 R		
S118	8 R		20 I		11 R		26 S		9 R		14 R		18 R		

CTX : céfotaxime, **CAZ** : ceftazidime, **CI** : ceftriaxone, **FOX** : céfoxitine, **GM** : gentamicine, **Nal** : acide nalidixique, **CIP** : ciprofloxacine,
* : diamètres critiques en mm, déterminés selon le CA-SFM (2010), **R** : Résistant, **S** : Sensible, **I** : Intermédiaire, / : non réalisé.

Tableau II : Résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé (suite)

Espèce	Souche	Antibiotiques*													
		CTX		CAZ		CI		FOX		GM		Nal		CIP	
		≥ 26S	< 23R	≥ 21S	< 19R	≥ 26S	< 23R	≥ 22S	< 15R	≥ 18S	< 16R	≥ 20S	< 15R	≥ 25S	< 22R
<i>K. pneumoniae</i>	S119	8 R		17 R		10 R		26 S		10 R		17 I		19 R	
	S120	10 R		20 I		12 R		27 S		9 R		17 I		21 R	
	S121	0 R		16 R		9 R		24 S		9 R		16 I		20 R	
	S122	10 R		22 S		14 R		25 S		8 R		15 I		19 R	
	S123	7 R		17 R		10 R		25 S		9 R		17 I		19 R	
	S124	9 R		19 I		11 R		24 S		9 R		15 I		18 R	
	S125	9 R		20 I		13 R		27 S		9 R		16 I		19 R	
	S126	0 R		16 R		10 R		25 S		9 R		17 I		19 R	
	S127	10 R		19 I		12 R		25 S		9 R		16 I		18 R	
	S128	11 R		20 I		13 R		27 S		9 R		16 I		17 R	
	S129	12 R		21 S		15 R		25 S		9 R		16 I		21 R	
	S133	11 R		21 S		15 R		25 S		9 R		17 I		18 R	
	S135	10 R		18 R		12 R		24 S		9 R		16 I		17 R	
	S137	13 R		20 I		13 R		26 S		9 R		16 I		18 R	
	S142	9 R		18 R		11 R		27 S		9 R		17 I		20 R	
	S143	9 R		17 R		7 R		25 S		9 R		17 I		21 R	
	S145	10 R		19 I		10 R		25 S		9 R		16 I		18 R	
	S146	10 R		19 I		12 R		26 S		9 R		15 I		17 R	
S149	9 R		18 R		10 R		26 S		10 R		16 I		20 R		
S151	9 R		20 I		11 R		27 S		9 R		17 I		20 R		
S152	11 R		22 S		16 R		25 S		10 R		16 I		20 R		

CTX : céfotaxime, CAZ : ceftazidime, CI : ceftriaxone, FOX : céfoxitine, GM : gentamicine, Nal : acide nalidixique, CIP : ciprofloxacine,
 * : diamètres critiques en mm, déterminés selon le CA-SFM (2010), R : Résistant, S : Sensible, I : Intermédiaire, / : non réalisé.

Tableau II : Résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé (suite)

Espèce	Souche	Antibiotiques*													
		CTX		CAZ		CI		FOX		GM		Nal		CIP	
		≥ 26S	< 23R	≥ 21S	< 19R	≥ 26S	< 23R	≥ 22S	< 15R	≥ 18S	< 16R	≥ 20S	< 15R	≥ 25S	< 22R
<i>K. oxytoca</i>	S6	20 R		24 S		18 R		28 S		0 R		/		26 S	
	S9	16 R		23 S		14 R		26 S		7 R		/		27 S	
	S51	20 R		21 S		25 S		27 S		25 S		22 S		27 S	
	S84	20 R		20 I		21 R		25 S		26 S		20 S		23 I	
	S86	18 R		19 I		22 R		26 S		24 S		20 S		24 I	
	S94	10 R		20 I		12 R		31 S		0 R		0 R		0 R	
	S111	22 R		22 S		23 I		27 S		25 S		22 S		25 S	
	S114	12 R		25 S		15 R		31 S		0 R		0 R		8 R	
<i>E. coli</i>	S41T	8 R		12 R		12 R		17 I		24 S		0 R		0 R	
	S53	9 R		22 S		14 R		19 I		30 S		0 R		0 R	
	S59	8 R		20 I		12 R		24 S		24 S		0 R		0 R	
	S72	11 R		25 S		15 R		17 I		27 S		0 R		0 R	
	S80	8 R		20 I		12 R		17 I		25 S		0 R		0 R	
	S100	8 R		20 I		12 R		19 I		30 S		0 R		0 R	
	S112	8 R		23 S		14 R		22 S		29 S		0 R		0 R	

CTX : céfotaxime, **CAZ** : ceftazidime, **CI** : ceftriaxone, **FOX** : céfoxitine, **GM** : gentamicine, **Nal** : acide nalidixique, **CIP** : ciprofloxacine,
 * : diamètres critiques en mm, déterminés selon le CA-SFM (2010), **R** : Résistant, **S** : Sensible, **I** : Intermédiaire, / : non réalisé.

Tableau II : Résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé (suite)

Espèce	Souche	Antibiotiques*													
		CTX		CAZ		CI		FOX		GM		Nal		CIP	
		≥ 26S	< 23R	≥ 21S	< 19R	≥ 26S	< 23R	≥ 22S	< 15R	≥ 18S	< 16R	≥ 20S	< 15R	≥ 25S	< 22R
<i>C. freundii</i>	S20	7 R		0 R		11 R		10 R		0 R		/		12 R	
	S29	0 R		0 R		7 R		0 R		0 R		/		0 R	
	S30	0 R		0 R		8 R		0 R		0 R		/		7 R	
	S36	0 R		0 R		9 R		0 R		0 R		/		0 R	
	S57	0 R		8 R		8 R		0 R		0 R		0 R		8 R	
	S71	8 R		0 R		14 R		0 R		10 R		0 R		15 R	
	S89	10 R		22 S		12 R		7 R		0 R		0 R		23 I	
	S96	0 R		9 R		7 R		0 R		0 R		0 R		9 R	
	S99	11 R		10 R		16 R		8 R		14 R		0 R		7 R	
	S101	0 R		7 R		8 R		0 R		0 R		0 R		0 R	
	S104	15 R		28 S		17 R		11 R		0 R		0 R		16 R	
	S105	0 R		9 R		8 R		0 R		0 R		0 R		0 R	
S132	10 R		15 R		13 R		14 R		0 R		0 R		22 I		
<i>C. braakii</i>	S106	0 R		0 R		13 R		0 R		32 S		0 R		25 S	

CTX : céfotaxime, **CAZ** : ceftazidime, **CI** : ceftriaxone, **FOX** : céfoxitine, **GM** : gentamicine, **Nal** : acide nalidixique, **CIP** : ciprofloxacine, * : diamètres critiques en mm, déterminés selon le CA-SFM (2010), **R** : Résistant, **S** : Sensible, **I** : Intermédiaire, / : non réalisé.

Tableau II : Résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé (suite)

Espèce	Souche	Antibiotiques*													
		CTX		CAZ		CI		FOX		GM		Nal		CIP	
		≥ 26S	< 23R	≥ 21S	< 19R	≥ 26S	< 23R	≥ 22S	< 15R	≥ 18S	< 16R	≥ 20S	< 15R	≥ 25S	< 22R
<i>E. sakazakii</i>	S22	0 R		0 R		8 R		0 R		9 R		/		15 R	
	S24	0 R		0 R		11 R		0 R		12 R		/		20 R	
	S26	8 R		9 R		11 R		0 R		13 R		/		17 R	
	S32	7 R		7 R		11 R		0 R		12 R		/		20 R	
	S33	0 R		9 R		11 R		0 R		13 R		/		20 R	
	S34	7 R		0 R		11 R		0 R		13 R		/		22 I	
	S68	7 R		17 R		10 R		0 R		12 R		16 I		16 R	
	S147	8 R		20 I		13 R		0 R		14 R		14 R		19 R	
<i>E. cloacae</i>	S108	20 R		21 S		23 I		0 R		30 S		10 R		24 I	
<i>E. coli</i>	K12 BM21	40 S		40 S		40 S		28 S		31 S		0 R		30 S	

CTX : céfotaxime, **CAZ** : ceftazidime, **CI** : ceftriaxone, **FOX** : céfoxitine, **GM** : gentamicine, **Nal** : acide nalidixique, **CIP** : ciprofloxacine, * : diamètres critiques en mm, déterminés selon le CA-SFM (2010), **R** : Résistant, **S** : Sensible, **I** : Intermédiaire, / : non réalisé.

Tableau III : Résultats du test de synergie

Espèce	Souches	CTX	CAZ	CI	Test DDS
<i>K. pneumoniae</i>	S1	+	-	-	+
	S2	+	+	+	+
	S3	+	-	+	+
	S5	+	+	+	+
	S7	-	-	+	+
	S10	+	-	+	+
	S11	+	+	+	+
	S12	+	-	+	+
	S13	+	+	+	+
	S14	+	+	+	+
	S15	+	+	+	+
	S16	+	+	+	+
	S18	-	-	-	-
	S38	+	+	+	+
	S39	+	+	+	+
	S40	+	-	+	+
	S410	-	-	+	+
	S42	+	+	+	+
	S43	+	+	-	+
	S44	+	+	+	+
	S45	+	+	-	+
	S46	-	-	+	+
	S47	+	-	-	+
	S48	+	+	/	+
	S50	-	+	/	+
	S55	-	+	+	+
	S60	-	+	-	+
	S63	-	-	-	-
S64	+	+	+	+	
S65	+	+	+	+	
S66	+	+	+	+	
S67	+	+	+	+	
S73	+	+	+	+	
S74	+	+	-	+	
S75	-	+	-	+	

CTX : céfotaxime, CAZ : ceftazidime, CI : ceftriaxone, DDS : *Double Disk Synergy*, / : non réalisé, + : présence d'une image de synergie suggérant la production de BLSE, - : absence d'image de synergie suggérant la non production de BLSE.

Tableau III : Résultats du test de synergie (suite)

Espèce	Souches	CTX	CAZ	CI	Test DDS
<i>K. pneumoniae</i>	S76	+	+	-	+
	S77	-	+	-	+
	S78	+	+	+	+
	S79	-	+	-	+
	S81	-	+	+	+
	S82	+	+	+	+
	S87	+	+	+	+
	S93	+	+	+	+
	S97	-	+	-	+
	S103	+	+	+	+
	S107	-	-	-	-
	S113	+	+	+	+
	S116	-	+	+	+
	S117	+	+	+	+
	S118	+	+	+	+
	S119	+	+	+	+
	S120	+	+	+	+
	S121	-	+	+	+
	S122	+	+	+	+
	S123	+	+	+	+
	S124	-	+	+	+
	S125	+	+	+	+
	S126	+	+	+	+
	S127	+	+	+	+
	S128	+	+	+	+
	S129	+	+	+	+
	S133	+	+	+	+
	S135	+	+	+	+
	S137	+	+	+	+
	S142	-	+	-	+
S143	-	+	+	+	
S145	+	+	+	+	
S146	+	+	+	+	
S149	+	+	+	+	
S151	+	+	+	+	
S152	+	+	+	+	

CTX : céfotaxime, CAZ : ceftazidime, CI : ceftriaxone, DDS : *Double Disk Synergy*, / : non réalisé, + : présence d'une image de synergie suggérant la production de BLSE, - : absence d'image de synergie suggérant la non production de BLSE.

Tableau III : Résultats du test de synergie (suite)

Espèce	Souches	CTX	CAZ	CI	Test DDS
<i>K. oxytoca</i>	S6	+	+	+	+
	S9	+	-	+	+
	S51	+	+	+	+
	S84	+	+	+	+
	S86	+	+	+	+
	S94	+	+	+	+
	S111	+	+	+	+
	S114	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	S41T	+	+	+	+
	S53	+	+	+	+
	S59	-	+	+	+
	S72	+	+	+	+
	S80	+	+	+	+
	S100	-	+	-	+
	S112	+	+	+	+
<i>C. freundii</i>	S20	-	-	+	+
	S29	-	-	-	-
	S30	-	-	-	-
	S36	-	-	-	-
	S57	-	-	-	-
	S71	-	-	-	-
	S89	-	+	-	+
	S96	-	-	-	-
	S99	-	-	-	-
	S101	-	-	-	-
	S104	-	-	-	-
	S105	-	-	-	-
S132	-	-	+	+	
<i>C. braakii</i>	S106	-	-	-	-
<i>E. sakazakii</i>	S22	-	-	-	-
	S24	+	+	+	+
	S26	-	-	+	+
	S32	+	-	-	+
	S33	+	+	+	+
	S34	+	-	+	+
	S68	+	+	-	+
	S147	+	+	+	+
<i>E. cloacae</i>	S108	-	-	-	-

CTX : céfotaxime, CAZ : ceftazidime, CI : ceftriaxone, DDS : Double Disk Synergy, / : non réalisé, + : présence d'une image de synergie suggérant la production de BLSE, - : absence d'image de synergie suggérant la non production de BLSE.

Tableau IV : Résultats du transfert des gènes de résistance par conjugaison

Espèce	Souches	Transfert
<i>K. pneumoniae</i>	S1	-
	S2	-
	S3	-
	S5	-
	S7	-
	S10	-
	S11	-
	S12	-
	S13	-
	S14	-
	S15	-
	S16	-
	S18	-
	S38	-
	S39	-
	S40	-
	S410	-
	S42	-
	S43	-
	S44	-
	S45	-
	S46	-
	S47	-
	S48	-
	S50	-
	S55	-
	S60	-
	S63	-
	S64	-
	S65	-
S66	-	
S67	-	
S73	-	
S74	-	
S75	-	

+ : transfert positif, - : transfert négatif, / : non réalisé

Tableau IV : Résultats du transfert des gènes de résistance par conjugaison (suite)

Espèce	Souches	Transfert
<i>K. pneumoniae</i>	S76	-
	S77	-
	S78	-
	S79	+
	S81	-
	S82	-
	S87	-
	S93	-
	S97	-
	S103	-
	S107	-
	S113	-
	S116	-
	S117	-
	S118	-
	S119	-
	S120	-
	S121	-
	S122	-
	S123	-
	S124	-
	S125	-
	S126	-
	S127	-
	S128	-
	S129	-
	S133	-
	S135	-
	S137	-
	S142	-
S143	-	
S145	-	
S146	-	
S149	-	
S151	-	
S152	-	

+ : transfert positif, - : transfert négatif, / : non réalisé

Tableau IV : Résultats du transfert des gènes de résistance par conjugaison (suite)

Espèce	Souches	Transfert
<i>K. oxytoca</i>	S6	+
	S9	+
	S51	-
	S84	-
	S86	-
	S94	-
	S111	-
	S114	-
<i>E. coli</i>	S41T	-
	S53	-
	S59	-
	S72	-
	S80	-
	S100	-
	S112	-
<i>C. freundii</i>	S20	+
	S29	+
	S30	+
	S36	+
	S57	+
	S71	+
	S89	+
	S96	-
	S99	+
	S101	+
	S104	+
	S105	+
S132	+	
<i>C. braakii</i>	S106	-
<i>E. sakazakii</i>	S22	-
	S24	-
	S26	-
	S32	-
	S33	-
	S34	-
	S68	-
	S147	-
<i>E. cloacae</i>	S108	-

+ : transfert positif, - : transfert négatif, / : non réalisé.

Tableau V : Résultats de l'amplification des gènes de β -lactamases CTX-M et AmpC, de la séquence *ISEcp1* et de l'association gène *bla*_{CTX-M}/ séquence *ISEcp1*

Espèce	Souches	CTX-M	CTX-M1	AmpC	<i>ISEcp1</i>	CTX-M/ <i>ISEcp1</i> (pb)
<i>K. pneumoniae</i>	S1	+	+	/	+	+ (1000)
	S2	+	+	/	+	+ (1000)
	S3	+	+	/	+	+ (1000)
	S5	+	+	/	+	+ (1000)
	S7	+	+	/	+	+ (1000)
	S10	+	+	/	-	+ (1000)
	S11	+	+	/	+	+ (1000)
	S12	+	+	/	+	+ (1000)
	S13	-	/	/	-	/
	S14	+	+	/	+	+ (1000)
	S15	+	+	/	+	+ (1000)
	S16	+	+	/	+	+ (1000)
	S18	-	/	+ (CIT)	-	/
	S38	+	+	/	+	+ (1000)
	S39	+	+	/	+	+ (1000)
	S40	+	+	/	+	+ (1000)
	S41O	+	+	-	-	+ (1100)
	S42	+	+	/	+	+ (1000)
	S43	+	+	/	+	+ (1000)
	S44	+	+	/	-	+ (1000)
	S45	+	+	/	-	+ (1000)
	S46	+	+	/	-	+ (1000)
	S47	+	+	/	-	+ (1000)
	S48	+	+	/	+	+ (1000)
	S50	+	+	/	-	+ (1100)
	S55	+	+	/	+	+ (1000)
	S60	+	+	/	-	+ (1000)
	S63	-	/	+ (CIT)	-	/
S64	+	+	/	-	+ (1000)	
S65	+	+	/	+	+ (1000)	
S66	+	+	/	+	+ (1000)	
S67	+	+	/	+	+ (1000)	
S73	+	+	/	+	+ (1000)	
S74	+	+	/	+	+ (1000)	
S75	+	+	/	+	+ (1000)	

+ : présence du produit d'amplification, - : absence du produit d'amplification, / : PCR non réalisée.

Tableau V : Résultats de l'amplification des gènes de β -lactamases CTX-M et AmpC, de la séquence *ISEcp1* et de l'association gène *bla*_{CTX-M}/ séquence *ISEcp1* (suite)

Espèce	Souches	CTX-M	CTX-M1	AmpC	<i>ISEcp1</i>	CTX-M/ <i>ISEcp1</i> (pb)
<i>K. pneumoniae</i>	S76	+	+	/	-	+ (1000)
	S77	+	+	/	+	+ (1000)
	S78	+	+	/	+	+ (1000)
	S79	+	+	-	-	+ (1100)
	S81	+	+	/	-	+ (1000)
	S82	+	+	/	+	+ (1000)
	S87	+	+	/	+	+ (1000)
	S93	+	+	/	+	+ (1000)
	S97	+	+	/	-	+ (1000)
	S103	+	+	/	+	+ (1000)
	S107	-	/	+ (CIT)	-	/
	S113	+	+	/	-	+ (1000)
	S116	+	+	/	-	+ (1000)
	S117	+	+	/	+	+ (1000)
	S118	+	+	/	+	+ (1000)
	S119	+	+	/	+	+ (1000)
	S120	+	+	/	+	+ (1000)
	S121	+	+	/	-	+ (1000)
	S122	+	+	/	+	+ (1000)
	S123	+	+	/	-	+ (1000)
	S124	+	+	/	+	+ (1000)
	S125	+	+	/	+	+ (1000)
	S126	+	+	/	-	+ (1000)
	S127	+	+	/	+	+ (1000)
	S128	+	+	/	+	+ (1000)
	S129	+	+	/	+	+ (1000)
	S133	+	+	/	+	+ (1000)
	S135	+	+	/	+	+ (1000)
	S137	+	+	/	+	+ (1000)
	S142	+	+	/	+	+ (1000)
S143	+	+	/	-	+ (1000)	
S145	+	+	/	+	+ (1000)	
S146	+	+	/	+	+ (1000)	
S149	+	+	/	+	+ (1000)	
S151	+	+	/	+	+ (1000)	
S152	+	+	/	+	+ (1000)	

+ : présence du produit d'amplification, - : absence du produit d'amplification, / : PCR non réalisée.

Tableau V : Résultats de l'amplification des gènes de β -lactamases CTX-M et AmpC, de la séquence *ISEcp1* et de l'association gène *bla*_{CTX-M}/séquence *ISEcp1* (suite)

Espèce	Souches	CTX-M	CTX-M1	AmpC	<i>ISEcp1</i>	CTX-M/ <i>ISEcp1</i> (pb)
<i>K. oxytoca</i>	S6	+	+	/	+	+ (1100)
	S9	+	+	/	+	+ (1100)
	S51	-	/	/	-	/
	S84	-	/	/	-	/
	S86	-	/	/	-	/
	S94	+	+	/	+	+ (1000)
	S111	-	/	/	-	/
	S114	+	+	/	+	+ (1000)
<i>E. coli</i>	S41T	+	+	-	+	+ (1000)
	S53	+	+	/	+	+ (1000)
	S59	+	+	/	+	+ (1000)
	S72	+	+	-	+	+ (1000)
	S80	+	+	-	+	+ (1000)
	S100	+	+	/	+	+ (1000)
	S112	+	+	/	+	+ (1000)
<i>C. freundii</i>	S20	+	+	+ (CIT)	+	+ (1100)
	S29	+	+	+ (CIT)	+	+ (1100)
	S30	+	+	+ (CIT)	+	+ (1100)
	S36	+	+	+ (CIT)	+	+ (1100)
	S57	+	+	+ (CIT)	+	+ (1100)
	S71	-	/	+ (CIT)	-	/
	S89	+	+	+ (CIT)	+	+ (1100)
	S96	+	+	+ (CIT)	+	+ (1100)
	S99	-	/	+ (CIT)	-	/
	S101	+	+	+ (CIT)	+	+ (1100)
	S104	+	+	+ (CIT)	+	+ (1100)
	S105	+	+	+ (CIT)	+	+ (1100)
S132	+	+	+ (CIT, FOX)	+	+ (1100)	
<i>C. braakii</i>	S106	-	/	+ (CIT)	-	/
<i>E. sakazakii</i>	S22	+	+	-	+	+ (1000)
	S24	+	+	-	+	+ (1000)
	S26	+	+	-	+	+ (1000)
	S32	+	+	-	+	+ (1000)
	S33	+	+	-	+	+ (1000)
	S34	+	+	-	+	+ (1000)
	S68	+	+	-	+	+ (1000)
	S147	+	+	-	+	+ (1000)
<i>E. cloacae</i>	S108	-	/	+ EBC	-	/

+ : présence du produit d'amplification, - : absence du produit d'amplification, / : PCR non réalisée.

Tableau VI : Résultats de l'amplification des gènes de β -lactamases CTX-M et AmpC chez les souches donatrices et leurs clones transconjugants

Souches	CTX-M1	AmpC
S79	+	-
TC1 S79	+	/
S6	+	/
TC1 S6	+	/
S9	+	/
TC1 S9	+	/
TC2 S9	+	/
TC3 S9	+	/
S20	+	+ (CIT)
TC3 S20	+	-
TC4 S20	+	-
S29	+	+ (CIT)
TC1 S29	+	-
S30	+	+ (CIT)
TC3 S30	+	-
S36	+	+ (CIT)
TC3 S36	+	-
S57	+	+ (CIT)
TC2 S57	+	-
TC3 S57	+	+ (CIT)
TC4 S57	+	-
S71	-	+ (CIT)
TC1 S71	/	+ (CIT)
S89	+	+ (CIT)
TC1 S89	+	-

+ : présence du produit d'amplification, - : absence du produit d'amplification, / : PCR non réalisée.

Tableau VI : Résultats de l'amplification des gènes de β -lactamases CTX-M et AmpC chez les souches donatrices et leurs clones transconjugants (suite)

Souches	CTX-M1	AmpC
S99	-	+ (CIT)
TC1 S99	/	+ (CIT)
TC2 S99	/	+ (CIT)
S101	+	+ (CIT)
TC3 S101	+	-
S104	+	+ (CIT)
TC1 S104	+	-
S105	+	+ (CIT)
TC1 S105	+	+ (CIT)
S132	+	+ (CIT, FOX)
TC1 S132	+	-

+ : présence du produit d'amplification, - : absence du produit d'amplification, / : PCR non réalisée.

Tableau VII : Profils ERIC des 109 souches

Espèce	Souches	Profil ERIC
<i>K. pneumoniae</i>	S1	K2
	S2	K2
	S3	K2
	S5	K2
	S7	K2
	S10	K2
	S11	K2
	S12	K2
	S13	K5
	S14	K2
	S15	K2
	S16	K2
	S18	K4
	S38	K2
	S39	K2
	S40	K2
	S41O	K3
	S42	K2
	S43	K2
	S44	K2
	S45	K2
	S46	K2
	S47	K2
	S48	K2
	S50	K1
	S55	K2
	S60	K2
	S63	K4
	S64	K2
	S65	K2
S66	K2	
S67	K2	
S73	K2	
S74	K2	
S75	K2	

Tableau VII : Profils ERIC des 109 souches (suite)

Espèce	Souches	Profil ERIC
<i>K. pneumoniae</i>	S76	K2
	S77	K2
	S78	K2
	S79	K3
	S81	K2
	S82	K2
	S87	K2
	S93	K2
	S97	K2
	S103	K2
	S107	K4
	S113	K2
	S116	K2
	S117	K2
	S118	K2
	S119	K2
	S120	K2
	S121	K2
	S122	K2
	S123	K2
	S124	K2
	S125	K2
	S126	K2
	S127	K2
	S128	K2
	S129	K2
	S133	K2
	S135	K2
	S137	K2
	S142	K2
	S143	K2
S145	K2	
S146	K2	
S149	K2	
S151	K2	
S152	K2	

Tableau VII : Profils ERIC des 109 souches (suite)

Espèce	Souches	Profil ERIC
<i>K. oxytoca</i>	S6	O1
	S9	O1
	S51	O2
	S84	O2
	S86	O2
	S94	O3
	S111	O2
	S114	O3
<i>E. coli</i>	S41T	E1
	S53	E1
	S59	E1
	S72	E1
	S80	E1
	S100	E1
	S112	E1
<i>C. freundii</i>	S20	C1
	S29	C2
	S30	C2
	S36	C2
	S57	C2
	S71	C4
	S89	C3
	S96	C2
	S99	C2
	S101	C2
	S104	C2
	S105	C2
S132	C3	
<i>C. braakii</i>	S106	CB1
<i>E. sakazakii</i>	S22	S1
	S24	S1
	S26	S1
	S32	S1
	S33	S1
	S34	S1
	S68	S1
	S147	S1
<i>E. cloacae</i>	S108	EC1

Tableau VIII : Profils génétiques des 109 souches

Espèce	Souches	Profil ERIC	Profil génétique
<i>K. pneumoniae</i>	S1	K2	CTX-M^{NT}, ISEcp1
	S2	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S3	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S5	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S7	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S10	K2	CTX-M ^{NT}
	S11	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S12	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S13	K5	BLSE+
	S14	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S15	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S16	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S18	K4	CIT^{NT}
	S38	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S39	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S40	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S410	K3	CTX-M^{NT}
	S42	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S43	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S44	K2	CTX-M ^{NT}
	S45	K2	CTX-M ^{NT}
	S46	K2	CTX-M^{NT}
	S47	K2	CTX-M ^{NT}
	S48	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S50	K1	CTX-M^{NT}
	S55	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S60	K2	CTX-M ^{NT}
	S63	K4	CIT ^{NT}
	S64	K2	CTX-M ^{NT}
	S65	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
S66	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1	
S67	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1	
S73	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1	
S74	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1	
S75	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1	

^{NT} : gène de résistance non transférable, ^T : gène de résistance transférable, en jaune : souches retenues.

Tableau VIII : Profils génétiques des 109 souches (suite)

Espèce	Souches	Profil ERIC	Profil génétique
<i>K. pneumoniae</i>	S76	K2	CTX-M ^{NT}
	S77	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S78	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S79	K3	CTX-M ^T
	S81	K2	CTX-M ^{NT}
	S82	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S87	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S93	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S97	K2	CTX-M ^{NT}
	S103	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S107	K4	CIT ^{NT}
	S113	K2	CTX-M ^{NT}
	S116	K2	CTX-M ^{NT}
	S117	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S118	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S119	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S120	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S121	K2	CTX-M ^{NT}
	S122	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S123	K2	CTX-M ^{NT}
	S124	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S125	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S126	K2	CTX-M ^{NT}
	S127	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S128	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S129	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S133	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S135	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S137	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S142	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S143	K2	CTX-M ^{NT}
	S145	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
S146	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1	
S149	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1	
S151	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1	
S152	K2	CTX-M ^{NT} , ISEcp1	

^{NT} : gène de résistance non transférable, ^T : gène de résistance transférable, en jaune : souches retenues

Tableau VIII : Profils génétiques des 109 souches (suite)

Espèce	Souches	Profil ERIC	Profil génétique
<i>K. oxytoca</i>	S6	O1	CTX-M ^T , ISEcp1
	S9	O1	CTX-M ^T , ISEcp1
	S51	O2	OXY
	S84	O2	OXY
	S86	O2	OXY
	S94	O3	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S111	O2	OXY
	S114	O3	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
<i>E. coli</i>	S41T	E1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S53	E1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S59	E1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S72	E1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S80	E1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S100	E1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S112	E1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
<i>C. freundii</i>	S20	C1	CTX-M ^T , CIT ^{NT} , ISEcp1
	S29	C2	CTX-M ^T , CIT ^{NT} , ISEcp1
	S30	C2	CTX-M ^T , CIT ^{NT} , ISEcp1
	S36	C2	CTX-M ^T , CIT ^{NT} , ISEcp1
	S57	C2	CTX-M ^T , CIT ^T , ISEcp1
	S71	C4	CIT ^T
	S89	C3	CTX-M ^T , CIT ^{NT} , ISEcp1
	S96	C2	CTX-M ^{NT} , CIT ^{NT} , ISEcp1
	S99	C2	CIT ^T
	S101	C2	CTX-M ^T , CIT ^{NT} , ISEcp1
	S104	C2	CTX-M ^T , CIT ^{NT} , ISEcp1
	S105	C2	CTX-M ^T , CIT ^T , ISEcp1
	S132	C3	CTX-M ^T , CIT ^{NT} , FOX ^{NT} , ISEcp1
<i>C. braakii</i>	S106	CB1	CIT ^{NT}
<i>E. sakazakii</i>	S22	S1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S24	S1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S26	S1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S32	S1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S33	S1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S34	S1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S68	S1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
	S147	S1	CTX-M ^{NT} , ISEcp1
<i>E. cloacae</i>	S108	EC1	EBC

^{NT} : gène de résistance non transférable, ^T : gène de résistance transférable, en jaune : souches retenues

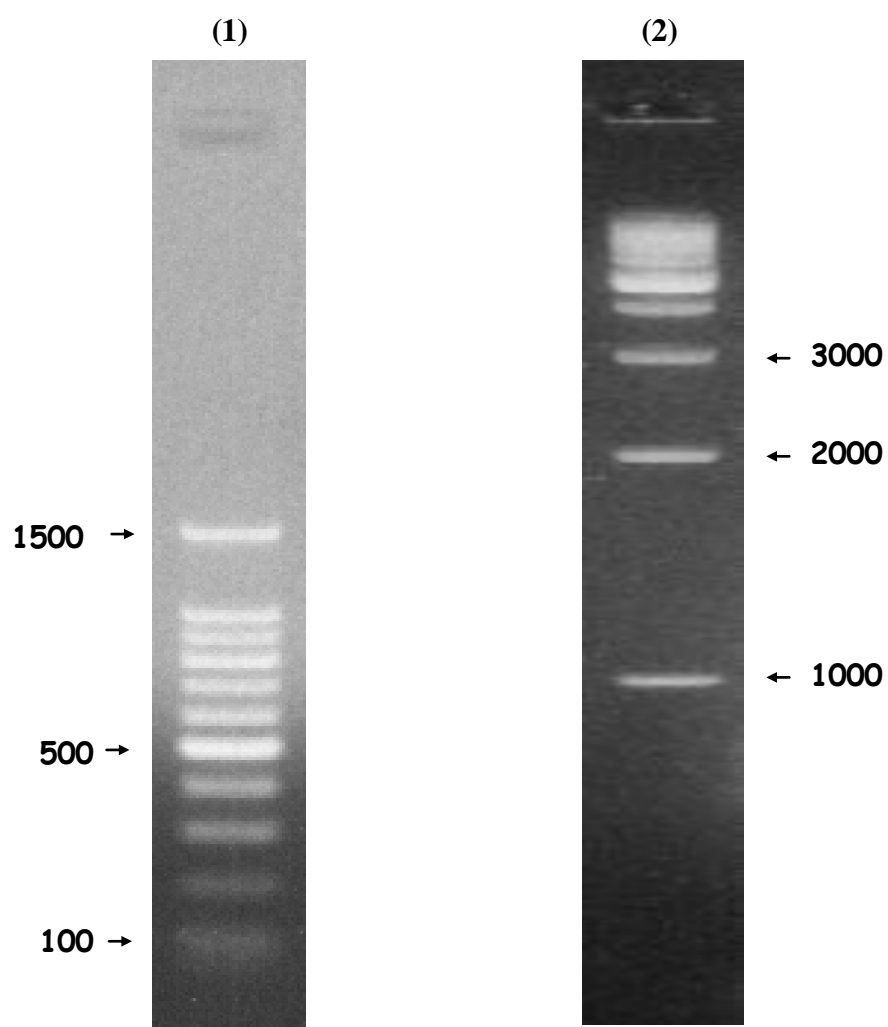


Fig. 1: Marqueurs de taille des produits d'amplification par PCR.
(1): 100 pb DNA Ladder, (2) : 1 kb DNA Step Ladder.

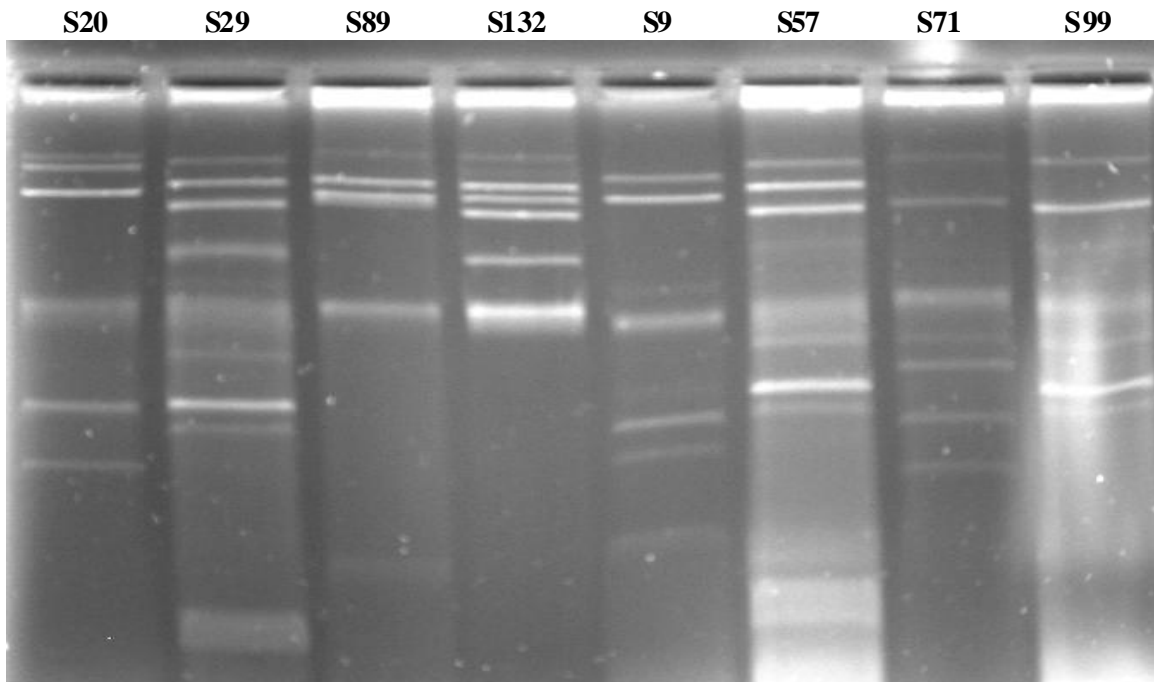


Fig. 2 : Profils plasmidiques des souches sauvages de *C. freundii* (S20, S29, S89, S132, S57, S71 et S99) et de *K. oxytoca* (S9).

S20	S29	S89	S132	S9	S57	S71	S99
155		155	155			155	
	148				148		148
135							
				128	128		
	95	95	95		95		
81		81	81	81			
		77					
	65				65		65
	54		54		54	54	54
	34		34				
Chr							
				22			
			12				
	5.5				5.5	5.5	5.5
						4.9	
	4.8				4.8		4.8
4.7							
	4.6			4.6	4.6		4.6
						4.5	
				4.4			
4.3							
						4	
		3.3		3.3			
	2.8				2.8		

ملخص

تعد مياه الصرف الناتجة عن نشاط المستشفيات م نبعاً للبكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية وتشكل خطراً حقيقياً على الصحة العمومية. الهدف من هذه الدراسة تمثل في كشف و تشخيص المقاومة للمضادات الحيوية في مياه الصرف الخاصة بمستشفى زميرلي بالجزائر العاصمة.

عزلت سلالات الأنتروبيكتيريا المقاومة للـ سيفوتاكسيم على وسط مغذي يحتوي على اللاكتوز و التارجيتول 7 مضاف إليه السيفوتاكسيم (4 مكغ/مل). التعرف على هذه السلالات تم باستعمال Galerie API 20^E و الـ BLSE تم بواسطة اختبار التآزر (test DDS). أجريت دراسة حساسية السلالات للمضادات الحيوية بطرق الانتشار و التخفيف في وسط مغذي. اختبارات نقل جينات مقاومة المضادات الحيوية أجريت بتجربة التزاوج البكتيري و البلازميدات الحاملة لهذه الجينات حددت بعد استخلاصها بتقنية التحلل في وسط قاعدي. أجري البحث عن جينات مقاومة الـ β -lactamines (bla_{AMP} ، bla_{CTX-M}) وعن محددات الـ PMQR بتقنية الـ PCR simplex أو الـ PCR multiplex. تم البحث عن سلسلة الـ *ISEcpl1* و ارتباطها بجينات الـ bla_{CTX-M} بتقنية الـ PCR. التعرف الجزيئي على السلالات تم بتقنية الـ ERIC PCR.

تم عزل 109 سلالة من الأنتروبيكتيريا المقاومة للـ سيفوتاكسيم. ه ذه الأخيرة كانت أيضا مقاومة للجانتميسين و السبيروفوكساسين و 31 سلالة من بينها كانت مقاومة للـ سيفوكسين. التعرف الجزيئي للسلالات أظهر وجود 22 مظهر مختلف، تم إختيار سلالة واحدة من كل مظهر لبقى الدراسة: 8 *C. freundii*، 7 السلالات كانت مرتفعة خاصة بالنسبة للـ سيفوتاكسيم و السيفترياكسون و معظمها أظهر مقاومة إضافية للـ سيفوكسين. تكمن الآلية الرئيسية لمقاومة سيفالوسبورينات الجيل الثالث في إفراز إنزيمات الـ BLSE من نوع CTX-M (مجموعة CTX-M1) و التي وجدت عند 15 سلالة. أظهرت دراسة المحيط الجيني لجينات الـ bla_{CTX-M} ارتباطها بسلسلة الـ *ISEcpl1*. جينات الـ bla_{CTX-M} ارتبطت من 7 سلالات عن طريق بلازميدات ذاتية الانتقال (155 kb، 128 kb، 95 kb و 81 kb). تمثلت الآلية الثانوية في إفراز إنزيمات الـ سيفالوسبوريناز البلازميدية التي وجدت عند 5 سلالات (4 من نوع CIT و 1 من نوع FOX) من بينها سلالتين أفرزتا إنزيمات الـ CTX-M. جينات الـ CIT ارتبطت من 3 سلالات عن طريق بلازميد محرك (5.5 kb). مقاومة الجانتميسين خصت 16 سلالة وكانت متنقلة بالاشتراك مع جينات الـ bla_{AMP} أو bla_{CTX-M} . لوحظت مقاومة الـ سيفروفوكساسين عند 17 سلالة ووجدت المحددات *qnr* عند 15 سلالة، تمثلت هذه المحددات في نوع *qnrB* (12 سلالة)، *qnrS* (سلالتان) و *qnrS+qnrB* (سلالة واحدة). جينات الـ *qnrB* ارتبطت من 4 سلالات بالاشتراك مع جينات الـ bla_{AMP} و bla_{CTX-M} .

أظهرت ه ذه الدراسة وجود جينات الـ bla_{AMP} ، bla_{CTX-M} و *qnr* في مياه صرف المستشفيات، حيث يكمن الخطر في انتشار و انتقال ه ذه المقاومة في الطبيعة. لذلك فإن إنشاء وحدات خاصة لتصفية ه ذه المياه و تطبيق قوانين صارمة فيما يخص كيفية صرفها، يعد ضرورة قصوى.

الكلمات المفتاحية: مياه صرف المستشفيات، الأنتروبيكتيريا، BLSE، الـ سيفالوسبوريناز، محددات PMQR.

Abstract

The hospital effluents are potential reservoirs of antibiotics resistant bacteria and could contribute in the increase of the exposure of human populations. The objective of this work was the detection and characterization of the resistance to antibiotics in effluents of Zmirli hospital (Algiers).

Cefotaxim resistant *Enterobacteriaceae* were selected on lactose tergitol agar with cefotaxim (4 µg/ml). Isolates were identified by API 20^E system and screened for ESBLs by Double-Disc Synergy Test (DDST). Antimicrobial susceptibility was determined by disc-diffusion methods and agar-dilution methods. Transfer of resistance genes was carried out by conjugation and plasmids were extracted by alkaline lysis. bla_{CTX-M} ، bla_{AMP} genes and plasmid mediated quinolone resistance determinants (PMQR) were detected by simplex or multiplex PCR. *ISEcpl1* insertion sequence and its linkage with bla_{CTX-M} genes were investigated by PCR. The molecular typing of isolates was carried out by ERIC-PCR.

A total of 109 cefotaxim resistant isolates were isolated, which are also characterized by resistance to gentamicin and ciprofloxacin, while 31 were resistant to cefoxitin. Molecular typing revealed 22 genetic profiles; one strain per profile was retained for further study : 8 *C. freundii*، 7 *K. pneumoniae*، 3 *K. oxytoca*، 1 *E. cloacae*، 1 *C. braakii*، 1 *E. sakazakii* and 1 *E. coli*. MICs of the third generation of cephalosporins (3GC) were high, particularly for cefotaxim and ceftriaxon and the majority of the isolates showed an additional resistance to cefoxitin. The main mechanism of resistance to 3GC was the production of ESBL of group-1 CTX-M, found in 15 isolates. The genetic environment of bla_{CTX-M} genes showed their association with *ISEcpl1* sequence; These genes were transferred from 7 isolates in association with self-transferable plasmids of 155 kb، 128 kb، 95 kb and 81 kb. The second mechanism was the production of plasmid-mediated cephalosporinases detected in 5 isolates (4 CIT and 1 FOX), two of them co-produce CTX-M enzymes. CIT genes were transferred from 3 isolates in association with a mobilizable plasmid of 5.5 kb. Resistance to gentamicin concerned 16 isolates and was transferred in association with bla_{CTX-M} or bla_{AMP} genes. Resistance to ciprofloxacin was observed in 17 isolates and *qnr* determinants were found in 15 isolates, they were of *qnrB* type (12 isolates)، *qnrS* (2 isolates) and *qnrB+qnrS* (1 isolate). *qnrB* genes were transferred from 4 isolates in association with bla_{CTX-M} and/or bla_{AMP} genes.

This study showed the presence of bla_{CTX-M} ، bla_{AMP} and *qnr* genes in hospital wastewaters. There is potential risk of widespread of antibiotic resistance and its transfer in the environment. In this sense, installation of hospital effluents treatment plants and establishment of strict regulation for their elimination are needed.

Key words: hospital effluents، *Enterobacteriaceae*، ESBL، cephalosporinases، PMQR determinants.