

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A.MIRA-BEJAIA  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie



# Mémoire

Présenté Par  
M. QASEM Sameer Ahmed Ali

Pour l'obtention du diplôme de Magister  
Filière : **Biologie**  
Option : **Microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes**

## Thème

Caractérisation des phénotypes de résistance  
aux antibiotiques des souches de bacilles à  
Gram négatif isolées dans quelques hôpitaux  
du Yémen.

Soutenu le : / / Devant le jury composé de :

Pr. BENALLAOUA Said	Professeur (UAM Bejaia)	Président
Pr. TOUATI Abdelaziz	Professeur (UAM Bejaia)	Rapporteur
Pr. BEDJOU Fatiha	Professeur (UAM Bejaia)	Examinatrice
Dr. Nabti El Hafid	M. conference A (UAM Bejaia)	Examineur

Année Universitaire:2013/2014

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

# Remerciements

**« Louange à Allah pour m'avoir donné le courage pour réaliser ce travail »**

*Mes remerciements s'adressent en premier lieu à mon promoteur Mr. TOUATI Abdelaziz, Professeur à l'université de Béjaia, pour avoir accepté de superviser ce travail, mais également pour la confiance qu'il m'a témoigné et la liberté qu'il m'a accordé tant dans le choix du sujet que dans la prise d'initiatives. Qu'il reçoit l'expression de ma vive gratitude.*

*Je remercie Mr. BENALLAOUA Said, professeur à l'université de Béjaia, qui m'a fait l'honneur de présider le jury. Egalement, je remercie les membres de jury, M<sup>me</sup> BEDJOU Fatiha, professeur à l'université de Béjaia, et Mr. NABTI Hafid, maitre de conférence à l'université de Bejaia, pour le temps qu'ils ont bien voulu consacrer à examiner ce document.*

*Mes remerciements vont aussi à l'égard du Dr. Hoda AL SHAMY et du Dr. Fouad BAZIL qui m'ont accueilli dans le laboratoire du centre Sana'a et à l'équipe du laboratoire avec laquelle j'ai travaillé durant mon stage.*

*Mes remerciements s'adressent aussi au Dr Abdullatif SHAMSAN et à l'équipe du laboratoire de microbiologie (Hôpital de Al Thawra Sana'a) pour l'aide qu'ils m'ont apporté dans la collecte des souches bactériennes.*

*Je tiens également à remercier tout le personnel des laboratoires à Sana'a : Al Aulaqi, Al Dobhani et les nouveaux laboratoires internationaux.*

*Je remercie également Mme. MAKHLOUF Hassina responsable de la P.G de la FSNV ainsi que tous mes collègues de l'université de Bejaia pour l'aide qu'ils m'ont apporté et leur soutien pendant ces deux années de formation.*

*Mes remerciements s'adressent aux ingénieurs et à l'équipe du laboratoire du Pr. Touati et précisément M<sup>lle</sup> YANAT. B, M<sup>me</sup> GHAROUT. A et Pr. DE CHAMPS. C.*

*Je finis par remercier toute personne que je n'ai pas cité, ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicace*

*Merci à Dieu, à qui je dois tout, d'avoir guidé mes pas et de m'avoir donné la volonté pour accomplir ce travail.*

*Je dédie ce mémoire à...*

*Mes chers parents, pour tous les efforts consentis, pour tous les conseils que vous m'avez prodigués, pour toutes les souffrances que vous avez endurées. Je vous dis infiniment merci.*

*Veillez recevoir ce modeste travail comme un début de récompense de tous vos efforts.*

*Qu'Allah vous récompense pour tout ce que vous avez fait et vous accorde encore de nombreuses et belles années de vie aux côtés de vos enfants. Nulles paroles ne peuvent exprimer ma reconnaissance.*

*Mon épouse, la personne la plus adorable et la plus gentille. Je ne saurais trouver les mots pour t'exprimer mes sentiments. Alors je te dirai tout simplement merci pour tes encouragements, ton aide et ton soutien moral et matériel. Sois assuré de mon amour infini. Merci à ta famille pour les encouragements dans notre travail et aussi de m'avoir acceptée parmi les siens. Ce travail est aussi le vôtre.*

*Mes frères Khalil et Mustapha et mes sœurs aux quels je souhaite beaucoup de réussite.*

*Mes enfants les garçons et les filles*

*Tous mes oncles, tantes, cousines et cousins. Merci pour votre gentillesse à mon égard.*

*Mes chers collègues ou plutôt mes frères et sœurs de la promotion Magister 2011 ; surtout Abdelhalim (Dr. Dark), Ilyes (Eeh Imm) pour toutes ces années passées ensemble, pour votre amitié et pour votre soutien. Vous aurez toujours une place spéciale dans mon cœur.*

*Sans oublier mes amis Yazid, Mokhtar, Saadia et Drifa, et mes collègues de la promotion 2012 ; Nadira, Yasmina, Fouzia, Addouda, Dhaouia et Noura, pour l'ambiance fraternelle et l'aide qu'ils m'ont apportés et avec qui j'ai partagé de bons moments. Je vous souhaite, à tous, une bonne continuation.*

## Liste des abréviations

**AMC:** amoxicilline/acide clavulanique

**AMK:** Amikacine

**AmpC:** Chromosomal located cephalosporinase

**ATM:** Aztréonam

**BLSE:**  $\beta$ -lactames à spectre étendu

**C1G:** Céphalosporine de 1<sup>ière</sup> génération

**C2G:** Céphalosporine de 2<sup>ième</sup> génération

**C3G :** Céphalosporine de 3<sup>ième</sup> génération

**C4G:** Céphalosporine de 4<sup>ième</sup> génération

**CA-SFM :** Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**CAZ :** Céfotaxime

**CCAZ :** Céfotaxime-Acide Clavulanique

**CIP :** Ciprofloxacine

**CCTX :** Céfotaxime-Acide Clavulanique

**CFEP :** Céfépime-Acide Clavulanique

**CHL :** Chloramphénicol

**CMI:** Concentration Minimale Inhibitrice

**CMY:** Active on cephamycine

**CTX :** Céfotaxime

**CTX-M:** Cefotaximase, first isolated at Munich

**CPO:** Cefpirome

**DOR :** Doripénème

**DD-Test:** Double Disque Test

**ERT :** Ertapénème

**EDTA:** Ethylene diamine tetra acetic acid

**FEP :** Céfépime

**FSF:** Fosfomycine

**FOX :** Céfoxitine

**GES:** Guiana extended spectrum

**GM:** Gentamycine

**IMI:** Imipeneme-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase

**IMP:** Imipenemase

**IMP:** Imipeneme

## Liste des abréviations

**Kb:** Kilo bases  
**KDa:** Kilo Dalton  
**KPC:** *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase  
**MH :** Mueller Hinton  
**MEM:** Méropénème  
**MβLs:** Métallo-β-Lactamase  
**MDR:** Multi Drug Resistance  
**NDM :** *New Dehli* metallo-β-lactamase  
**NAL :** Acide nalidixique  
**NOR :** Norfloxacin  
**OFX :** Ofloxacin  
**OmpP :** Outer membrane proteine  
**OXA:** Oxacillinase  
**PCR:** Polymerase Chain Reaction  
**PER:** *Pseudomonas* Extended Resistant  
**PIP :** Pipéracilline  
**PLP:** Protéine de liaison aux pénicillines  
**PF :** Péfloxacin  
**Qnr:** quinolone resistance  
**RA:** Rifampicine  
**RND :** Resistance Nodulation cell Division  
**SHV:** Sulphydril variable  
**SXT :** Triméthoprime/sulfaméthoxazole  
**SUL:** Sulfamides  
**TET :** Tétracycline  
**TEM:** Temoneira  
**TGC:** Tigécycline  
**TIC:** Ticarcilline  
**TCC:** Ticarcilline/ac. Clavulanique  
**TM :** Tobramycine  
**TMP :** Triméthoprime  
**TZP :** Pipéracilline/tazobactam  
**UFC:** Unité Formant colonie  
**VIM:** Verona integron-encoded metallo- β-lactamase

## Liste de tableaux

<b>Tableau N° I :</b> Classification des $\beta$ -lactamases.....	11
<b>Tableau N°II :</b> Variabilité des CMI des carbapénèmes des souches cliniques d'entérobactéries exprimant une carbapénémase.....	18
<b>Tableau N°III:</b> Interprétation phénotypique des tests de détection des carbapénémases chez les entérobactéries.....	23
<b>Tableau N°IV:</b> Liste des antibiotiques testés pour toutes les souches (résistantes au CTX et/ou CAZ).....	27
<b>Tableau N°V:</b> Liste des antibiotiques complémentaires testés pour les souches résistantes aux carbapénèmes.....	28
<b>Tableau N° VI:</b> Conditions de la PCR multiplexe pour la détection des carbapénémases.	33
<b>Tableau N°VII:</b> Conditions de la PCR multiplexe pour la détection des gènes BLSE.....	34
<b>Tableau N°VIII :</b> Conditions de la PCR multiplexe pour la détection des gènes AmpC...	34
<b>Tableau N°I X :</b> Liste des amorces utilisées.....	36
<b>Tableau N°X :</b> Répartition des souches par sexe et par catégories d'âge des patients ...	38
<b>Tableau N°XI :</b> Répartition des souches selon la nature du prélèvement.....	38
<b>Tableau N°XII :</b> Taux de résistance aux $\beta$ -lactamines par espèces.....	39
<b>Tableau N°XIII :</b> Taux de résistance aux autres familles d'antibiotiques par espèces.....	39
<b>Tableau N°XIV:</b> Caractéristiques cliniques des souches résistantes aux carbapénèmes.....	40
<b>Tableau N°XV :</b> Sensibilité des souches d'entérobactéries aux $\beta$ -lactamines testées.....	42
<b>Tableau N°XVI :</b> Sensibilité des souches d'entérobactéries aux antibiotiques autres que les $\beta$ -lactamines .....	44
<b>Tableau N°XVII :</b> CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) des souches résistantes aux $\beta$ -lactamines.....	45
<b>Tableau N°XVIII :</b> Résultats de la PCR des gènes codant pour les NDM-1, les BLSE et les Qnr.....	49
<b>Tableau N° XIX :</b> Diamètres des zones d'inhibition obtenus pour les transconjugants (en mm).....	49
<b>Tableau N°XX :</b> Dissémination mondiale des NDM-1 chez les patients ayant une relation épidémiologique avec le subcontinent indien.....	59

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structures chimiques de quelques $\beta$ -lactamines.....	6
<b>Figure2</b> : Structures chimiques des carbapénèmes .....	7
<b>Figure 3</b> : Réaction générale de l'hydrolyse d'une $\beta$ -lactamine par une $\beta$ -lactamase .....	9
<b>Figure 4</b> : Aspect des colonies de souches d'entérobactéries productrices de KPC et de BLSE sur milieux chromogènes.....	24
<b>Figure 5</b> : La disposition des disques d'antibiotiques dans le DD-Test .....	29
<b>Figure 6</b> : Technique de Hodge test .....	30
<b>Figure 7</b> : Technique d'E-Test pour détermination de la CMI.....	31
<b>Figure 8</b> : Fréquence des souches d'entérobactéries isolées.....	37
<b>Figure 9</b> : Résultat de l'antibiogramme ( $\beta$ -lactamines) de la souche d' <i>E. cloacae</i> 18B....	41
<b>Figure 10</b> : Résultat de l'antibiogramme (autres que $\beta$ -lactamines) de la souche d' <i>E. cloacae</i> 18B.....	43
<b>Figure 11</b> : Résultats de la détermination des CMI de l'imipénème par l'E-test.....	46
<b>Figure 12</b> : Résultats du test de Hodge.....	46
<b>Figure 13</b> : Résultats du test d'inhibition à l'EDTA (Souche de <i>K. pneumoniae</i> 4866).....	47
<b>Figure 14</b> : Image de synergie (Souche de <i>K. pneumoniae</i> 4866).....	48
<b>Figure15</b> : Profil RAPD des souches d' <i>E. cloacae</i> production de M $\beta$ L.....	50
<b>Figure16</b> : Profil RAPD des souches de <i>K. pneumoniae</i> production de M $\beta$ L .....	50
<b>Figure17</b> : Diffusion géographique des $\beta$ -lactamases produites chez les bacilles à Gram négatif au niveau des pays du Golf.....	60



Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	

# SOMMAIRE

Introduction.....	1
-------------------	---

## PARTIE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE I: LES $\beta$ -LACTAMINES

1. Structure et classification.....	4
2. Mode d'action des $\beta$ -lactamines.....	7
3. Mécanismes de résistance des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines .....	8
3.1. Diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique.....	8
3.1.1. Imperméabilité membranaire.....	8
3.1.2. Système d'efflux .....	8
3.2. Mécanisme enzymatique : Production de $\beta$ -lactamases.....	9
3.2.1. Généralités sur les $\beta$ -lactamases.....	9
3.2.2. Classification des $\beta$ -lactamases.....	9
3.2.3. Phénotypes de résistance naturelle des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines...12	
3.2.4. $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE).....	13

### CHAPITRE II: LES CARBAPENEMASES CHEZ LES ENTEROBACTERIES

1. Structure, activité hydrolytique et support génétique.....	15
1.1. $\beta$ -lactamases de classe A .....	15
1.1.1. Carbapénèmases de type GES.....	15
1.1.2. Carbapénèmases de type KPC.....	16
1.2. $\beta$ -lactamases de classe B.....	16
1.3. $\beta$ -lactamases de classe D.....	17
2. Épidémiologie et clinique.....	18
2.1. $\beta$ -lactamases de classe A.....	19

2.2. $\beta$ -lactamases de classe B.....	20
2.3. $\beta$ -lactamases de classe D.....	21
3. Détection.....	22

## **PARTIE II: ETUDE EXPERIMENTALE**

### **I- MATERIEL ET METHODES**

1. Présentation de l'étude .....	25
2. Isolement et identification des souches .....	25
3. Étude de la sensibilité aux antibiotiques .....	25
4. Étude des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines.....	29
4.1. Test de synergie (DD-Test).....	29
4.2. Recherche de la production d'une carbapénèmase.....	29
4.3. Recherche de la production de métallob $\beta$ -lactamases (M $\beta$ L).....	30
5. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	31
6. Étude du transfert par conjugaison.....	32
7. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques.....	33
7.1. Extraction de l'ADN génomique.....	33
7.2. PCR multiplexe pour la détection des carbapénémases.....	33
7.3. PCR simplexe pour la détection des gènes BLSE.....	33
7.4. PCR multiplexe pour la détection des gènes AmpC.....	34
7.5. Électrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification.....	34
7.6. Recherche des gènes <i>qnr</i> .....	34
8. Étude de la clonalité des souches par RAPD.....	35

### **II- RESULTATS**

1. Souches bactériennes.....	37
1.1. Répartition des souches selon l'âge et le sexe du patient.....	37
1.2. Répartition des souches selon la nature du prélèvement.....	38
2. Étude de la sensibilité aux $\beta$ -lactamines.....	38
3. Analyse des souches résistantes aux carbapénèmes.....	40
3.1. Caractéristiques des souches résistantes aux carbapénèmes.....	40
3.2. Résistance des souches aux $\beta$ -lactamines.....	40

3.3. Étude de la sensibilité aux autres familles d'antibiotiques.....	43
3.4. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).....	45
4. Caractérisation des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines.....	46
5. Caractérisation moléculaire des déterminants de la résistance aux $\beta$ -lactamines.....	48
6. Transfert des gènes de résistance par conjugaison.....	49
7. Étude de la clonalité des souches par la technique RAPD.....	50

### **III-DISCUSSION**

Discussion générale.....	52
Conclusion.....	62
Liste des références bibliographiques	
Annexes	

# **INTRODUCTION**

## Introduction

Les  $\beta$ -lactamines sont des antibiotiques les plus utilisés dans le traitement de diverses infections (Cavallo *et al.*, 2004). Les carbapénèmes demeurent, cependant, les  $\beta$ -lactamines au spectre d'activité le plus large. L'imipénème est un carbapénème actif en partie vis-à-vis de très nombreuses espèces de bacilles à Gram négatif dont les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Les carbapénèmes sont limitées à un usage hospitalier, prescrit, majoritairement, dans le cadre de traitement d'infections nosocomiales. (Nordmann *et Carrer* 2010).

L'émergence puis la dissémination de nouvelles  $\beta$ -lactamases sont strictement parallèles à la séquence d'introduction dans l'arsenal thérapeutique et à la consommation des différentes  $\beta$ -lactamines. Ainsi, l'introduction des céphalosporines de troisième génération (C3G) en pratique clinique au début des années 1980, a été suivie, dès 1983, par la description de la première  $\beta$ -lactamase à Spectre Étendu (BLSE) chez *Klebsiella pneumoniae* en Allemagne (Knoth *et al.*, 1983). Depuis, la diffusion des BLSE, en particulier du type CTX-M, ne cesse d'augmenter un peu partout dans le monde que ça soit dans le milieu hospitalier ou dans le milieu communautaire (Livermore *et al.*, 2007). Les carbapénèmes représentaient, dès lors, l'un des groupes d'antibiotiques le plus utilisé dans le traitement d'infections dues aux souches productrices de BLSE (Braykov *et al.*, 2013).

Les carbapénèmes sont connues pour leur stabilité vis-à-vis de la plupart des  $\beta$ -lactamases naturelles ou acquises. Cependant, on assiste, très récemment, à la description de plus en plus fréquente de souches résistantes à ces molécules (Grall *et al.*, 2011). L'émergence de la résistance aux carbapénèmes est l'un des problèmes les plus importants posé par la résistance aux antibiotiques car il existe peu d'alternatives thérapeutiques possibles (Nordmann, 2010).

La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries résulte essentiellement de deux mécanismes impliquant tous deux des  $\beta$ -lactamases. Le premier mécanisme associe la production d'une céphalosporinase chromosomique ou plasmidique ou une BLSE à une diminution quantitative ou qualitative de l'expression des porines. Le second est lié à l'expression de  $\beta$ -lactamases à forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes, les carbapénémases (Nordmann *et Carrer* 2010).

Jusqu'à la fin des années 1990, les carbapénèmases décrites étaient spécifiques d'espèce et d'origine chromosomique (Queenan *et* Bush, 2007). Ces souches étaient responsables d'infections sporadiques et de quelques épidémies limitées (Cornaglia *et* Rossolini, 2010). De façon plus préoccupante, des carbapénèmases plasmidiques ont ensuite émergées chez plusieurs espèces de bacilles à Gram négatif. Ces carbapénèmases constituent une famille très composite, définie sur la base d'un spectre enzymatique (hydrolyse d'au moins un carbapénème disponible) et non sur une base structurale (Grall *et al.*, 2011).

Récemment, des souches produisant une nouvelle carbapénémase de type métallo- $\beta$ -lactamase « NDM-1 » leur conférant une résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines, ont apparu pour la première fois en Inde en 2008 et se répandent depuis à travers le monde (Yong *et al.*, 2009). En Péninsule arabique, les NDM-1 connaissent une forte diffusion parmi les souches d'entérobactéries et c'est dans le sultanat d'Oman qu'ont été détectées les premières souches productrices de NDM-1 dans cette région (Poirel *et al.*, 2011). La résistance aux carbapénèmes, est à ce titre particulièrement problématique puisqu'elle diminue de façon drastique les possibilités thérapeutiques. Ainsi, la plupart des souches résistantes aux carbapénèmes présentent un phénomène de multirésistance. En outre, les gènes codant pour les carbapénèmases sont, le plus souvent, retrouvés sur un plasmide transférable, faisant craindre un fort potentiel de transmission et d'adaptation (Kumarasamy *et al.*, 2010).

A ce jour, aucune étude sur les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez des souches cliniques isolées au Yémen n'a été publiée, ce qui valorise d'autant plus nos travaux en apportant des données actualisées sur l'état de la résistance aux antibiotiques dans ce Pays. De là, s'inscrit l'objectif de notre travail qui est de déterminer les phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, en particulier aux carbapénèmes, au sein d'une collection de souches d'entérobactéries isolées au niveau de différents hôpitaux et laboratoires d'analyses médicales situés dans la région de Sana'a au Yémen. Afin de couvrir cet aspect, la méthodologie suivante a été adoptée :

- Collectes de souches d'entérobactéries résistantes au céfotaxime et/ou à la céftazidime au niveau de deux hôpitaux et de quatre laboratoires d'analyses médicales situés au Yémen.
- Identification des souches par galeries API20E.
- Étude de la sensibilité des souches aux  $\beta$ -lactamines et aux autres familles d'antibiotiques.

- Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices(CMI) aux carbapénèmes.
- Détermination des phénotypes de résistance aux carbapénèmes.
- Caractérisation moléculaire de la résistance aux carbapénèmes. Cette partie étant réalisée au niveau du laboratoire de bactériologie du CHU de Reims.
- Détermination de la clonalité des souches par RAPD.
- Transfert par conjugaison des gènes de résistance aux carbapénèmes.

**PARTIE I:**  
**SYNTHESE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**



# **CHAPITRE I**

## **LES $\beta$ - LACTAMINES**

## Chapitre I : Les $\beta$ -lactamines

### 1. Structure et classification

Les  $\beta$ -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. Cette famille est caractérisée par la présence constante du cycle  $\beta$ -lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables (Cavallo *et al.*, 2004).

La famille des  $\beta$ -lactamines regroupe : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les monobactames et les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases (Bryskier, 1999).

#### ❖ Les pénames (pénicillines)

Les pénicillines possèdent un cycle thiazolidine fixé au noyau  $\beta$ -lactame, et diffèrent par la nature de leurs chaînes latérales (figure 1). Elles renferment: les Pénicillines G, Pénicillines M (Ex. Oxacilline), aminopénicillines (Ex. Amoxicilline), carboxypénicillines (Ex. Ticarcilline) et les uréidopénicillines (Ex. Pipéracilline) (Nauciel, 2000).

Les pénicillines G ont une activité sur les cocci à Gram négatif et les bactéries à Gram positif non productrices de pénicillinases. Les pénicillines M sont des molécules antistaphylococciques résistantes aux pénicillinases. Les aminopénicillines sont des pénicillines à large spectre actives sur certains bacilles à Gram négatif non producteurs de céphalosporinases. Les carboxypénicillines et les uréidopénicillines sont actives sur les *Pseudomonas aeruginosa* (Cavallo *et al.*, 2004).

#### ❖ Les céphèmes (céphalosporines)

Elles sont constituées d'un noyau  $\beta$ -lactame associé à un noyau dihydrothiazine (figure 1). Elles sont habituellement classées en générations correspondant plus à leurs propriétés antibactériennes et pharmacocinétiques qu'à un ordre chronologique (Nauciel, 2000). Elles renferment :

- Les céphalosporines de première génération (céfalotine) qui ont un spectre limité aux cocci à Gram positif et à quelques entérobactéries ne produisant pas de céphalosporinases.
- Les céphalosporines de deuxième génération (céfuroxime) se distinguent des céphalosporines de première génération par une relative résistance à certaines céphalosporinases.

- Les céphalosporines de troisième génération (céfotaxime) sont actives sur les bacilles à Gram négatif, sur les cocci à Gram positif : Pneumocoque, Streptocoque (sauf Entérocoque) et sur les cocci à Gram négatif, et certains sont actifs sur *Pseudomonas* sp (Céftazidime).
- Le céfépime et le céfpirome appelés aussi par certains « céphalosporines de quatrième génération » présentent un gain d'activité sur les cocci à Gram positif, une activité sur *Pseudomonas aeruginosa* et une meilleure résistance à l'hydrolyse par les céphalosporinases (Cavallo *et al.*, 2004).

#### ❖ Les pénèmes

Les carbapénèmes se distinguent des pénicillines (pénames) par la présence d'un atome de carbone au lieu d'un soufre en position 1 et d'une liaison insaturée en C2—C3 (figure 1 et 2) (Wolff *et al.*, 2008).

Le spectre antibactérien des carbapénèmes est pratiquement le même pour toutes les molécules à l'exception notable de l'ertapénème qui a une faible activité sur *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Wolff *et al.*, 2008).

En raison de leur très large spectre d'activité, les carbapénèmes sont administrés lors d'infections sévères en réanimation, en particulier au cours du traitement probabiliste chez les malades à haut risque de bactéries résistantes (Wolff *et al.*, 2008).

#### ❖ Les monobactames

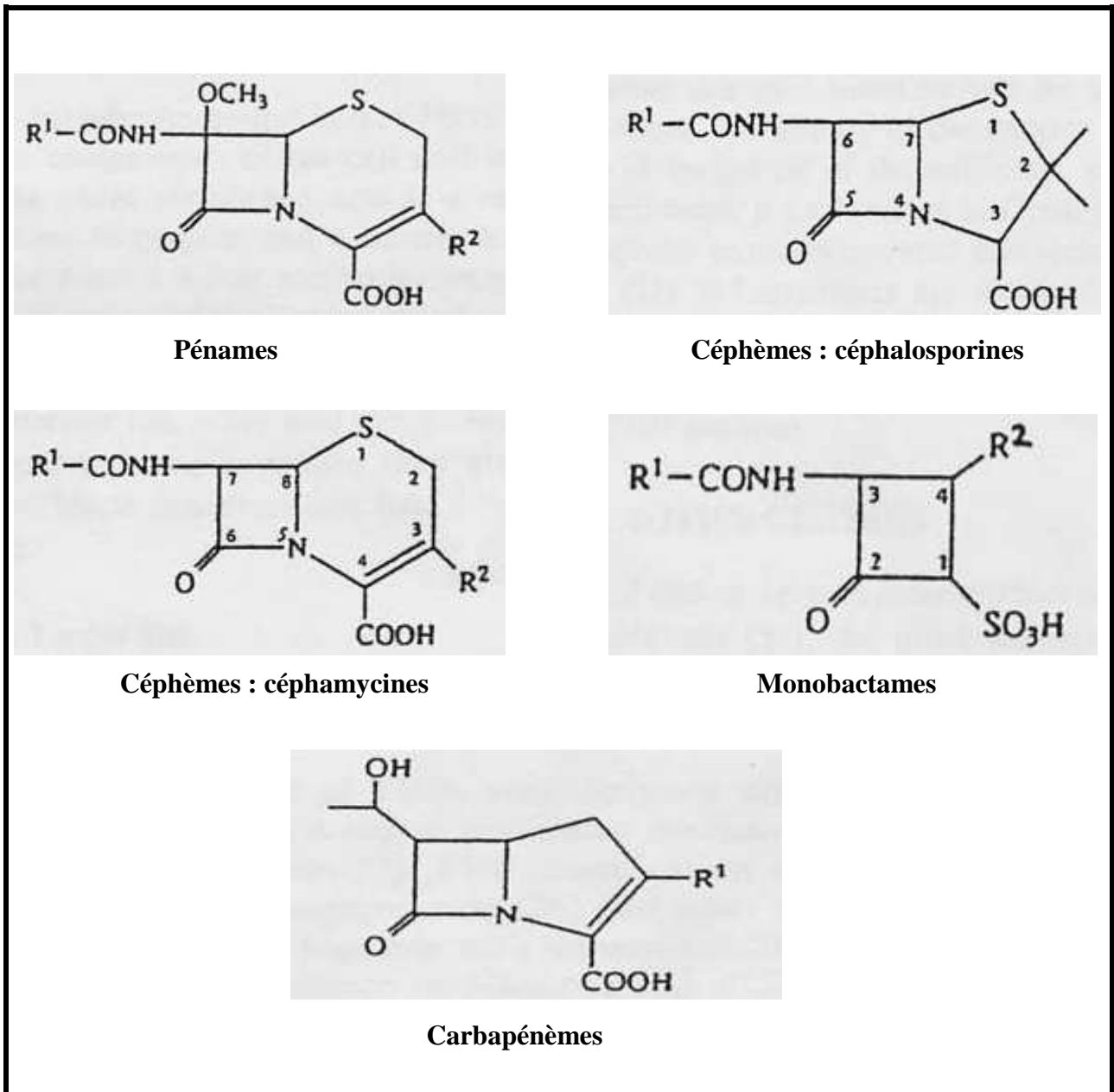
Ce groupe se caractérise par une structure monocyclique comportant uniquement le (noyau  $\beta$ -lactame) (figure 1). L'aztréonam, est le seul produit de ce groupe actuellement utilisé (Carbon *et al.*, 1995).

Il possède une très bonne activité contre les bactéries à Gram négatif aérobies et plus particulièrement contre les entérobactéries en raison de sa bonne stabilité vis-à-vis des  $\beta$ -lactamases. Il n'a, en revanche, aucune activité sur les bacilles à Gram positif et les anaérobies (Cavallo *et al.*, 2004).

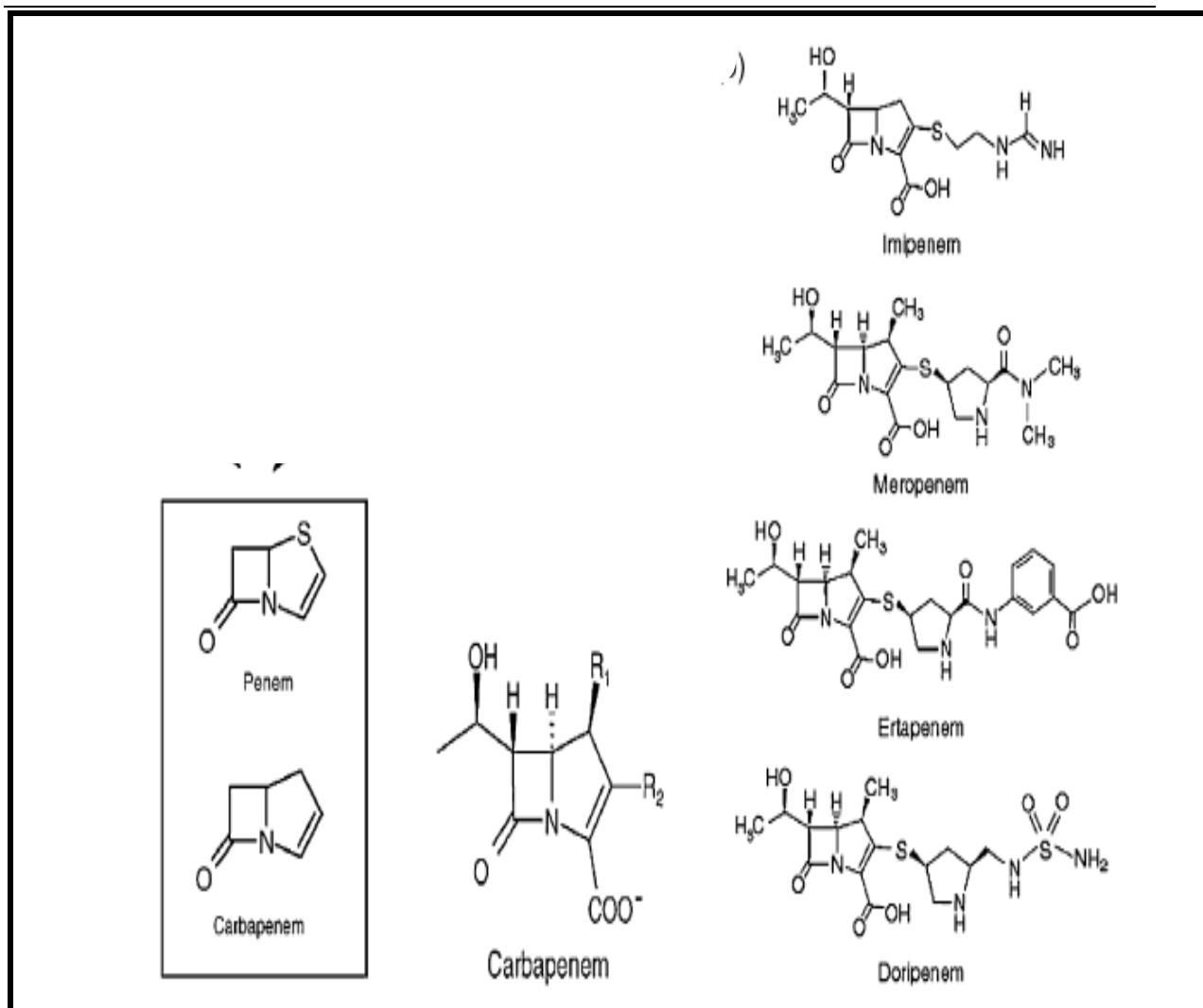
#### ❖ Les inhibiteurs de $\beta$ -lactamases

Les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases sont des molécules de  $\beta$ -lactamines dotées d'une très faible activité antibiotique mais ayant la propriété de se lier irréversiblement à certaines  $\beta$ -lactamases qu'elles inhibent. Ces molécules sont utilisées en association avec une molécule de  $\beta$ -lactamine qu'elles protègent de l'action des  $\beta$ -lactamases. L'acide

clavulanique, le sulbactam et le tazobactam, sont des inhibiteurs irréversibles de  $\beta$ -lactamases. Ils sont utilisés en association avec l'ampicilline, la ticarcilline, la céfopérazone et la pipéracilline (Auckenthaler, 1995).



**Figure 1 :** Structures chimiques de quelques  $\beta$ -lactamines (Bryskier, 1999)



**Figure 2:** Structures chimiques des carbapénèmes (Wolff *et al.*, 2008)

## 2. Mode d'action des $\beta$ -lactamines

Pour être actives, les  $\beta$ -lactamines doivent atteindre leur cible en traversant la paroi bactérienne et en se fixer sur les PLP (Protéines Liant la Pénicillines) (Cavallo *et al.*, 2004). Toutes les  $\beta$ -lactamines ont le même mécanisme d'action : Elles bloquent la synthèse du peptidoglycane, qui est le polymère spécifique de la paroi bactérienne, et inhibent certaines enzymes responsables de la transpeptidation, par analogie structurale avec le D-alanine-D-alanine terminal du pentapeptide, étape essentielle de la synthèse du peptidoglycane. La fixation est irréversible et l'antibiotique se comporte comme un substrat suicide (Chatellet, 2007). Contrairement aux céphalosporines et aux aminopénicillines qui se lient principalement à la PLP3, les carbapénèmes ont pour cibles privilégiées les PLP1a,1b et 2, avec pour conséquence une lyse bactérienne sans filamentation préalable (Wolff *et al.*, 2008).

### 3. Mécanismes de résistance des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise. La résistance naturelle est exprimée par toutes les souches d'une espèce et son support génétique est le chromosome. La résistance acquise n'est présente en revanche que chez certaines souches au sein d'une espèce donnée (Ploy *et al.*, 2005).

#### 3.1. Diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique

##### 3.1.1. Imperméabilité membranaire

La pénétration des  $\beta$ -lactamines à travers la membrane externe des bactéries Gram négatives, est assurée par la diffusion à travers des canaux protéiques « les porines ». Chez *E. coli*, OmpF est la principale porine à travers laquelle passent différents antibiotiques. Le changement dans le nombre, la taille ou la sélectivité de cette porine, peut altérer le taux de diffusion des antibiotiques et de ce fait, augmenter la résistance à ces molécules (Gootz, 2009).

Un cas de résistance aux carbapénèmes par modification de la porine a été identifié chez des souches de *Klebsiella pneumoniae* d'origine clinique. Ces souches présentaient une nouvelle variante de la porine OmpK36 appelée OmpK36V et portaient deux acides aminés additionnels (Asp-Thr) au niveau de la boucle L3 conférant une résistance à l'ertapénème et une diminution de la sensibilité au méropénème (Garcia-Fernandez *et al.*, 2010).

##### 3.1.2. Système d'efflux

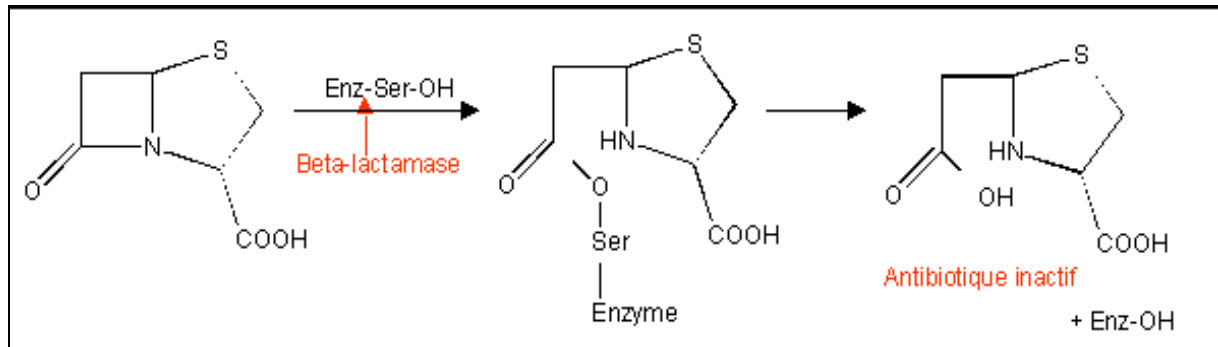
AcrAB est une pompe de type RND (Resistance Nodulation cell Division) qui joue un rôle important dans la résistance naturelle et acquise des entérobactéries aux antibiotiques tels que les  $\beta$ -lactamines, les fluoroquinolones, le chloramphénicol, les tétracyclines et les aminosides (Hoquet *et al.*, 2005 ; Kiralj *et Ferreira*, 2006).

Le niveau de résistance intrinsèque conféré par les pompes est influencé à la fois par la structure de l'antibiotique et par la régulation des gènes de structure de la pompe (Hopkins *et al.*, 2005). En effet, l'expression des gènes *acrAB* est contrôlée par *acrR* (répresseur) et par l'opéron *marRAB*, incluant l'activateur transcriptionnel MarA (Multiple antibiotic resistance) dont l'hyperproduction stimule l'expression des gènes codant pour le système AcrAB et confère de ce fait le phénotype de multirésistance (MDR) (Malléa *et al.*, 2002).

### 3.2. Mécanisme enzymatique : Production de $\beta$ -lactamases

#### 3.2.1. Généralités sur les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases constituent le principal mécanisme de la résistance naturelle et acquise aux  $\beta$ -lactamines, en particulier chez les bactéries bacilles à Gram négatif. Ces enzymes bactériennes, catalysent l'hydrolyse de la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame (figure 3) (Philippon et Arlet., 2006).



**Figure 3** : Réaction générale de l'hydrolyse d'une  $\beta$ -lactamine par une  $\beta$ -lactamase (Barrial et Scotet, 2006)

Les gènes codant pour ces enzymes peuvent être de localisation chromosomiques ou extra-chromosomiques, portés par des plasmides, des transposons ou des intégrons (Liassine, 2000). La présence de ces gènes sur les éléments génétiques transférables facilite leur transfert horizontal entre espèces phylogénétiquement éloignées (Charlier *et al.*, 1998).

#### 3.2.2. Classification des $\beta$ -lactamases

La grande diversité de ces enzymes d'inactivation a suscité, depuis 1945, la publication d'articles visant à les classer, les plus connues sont la classification de Bush et la classification de Ambler (Bush *et* Jacoby, 2010).

##### a. Classification de Bush

Cette classification a initialement été décrite par Jack et Richmond en 1970, pour ensuite être révisée à deux reprises par Bush. La version récente propose de classer ces enzymes en fonction de:

- 1) Substrat de préférence entre la pénicilline, oxacilline, carbénicilline, céphaloridine, céphalosporines à large spectre d'activité et carbapénèmes.

2) Profil d'inhibition par le clavulanate: Les céphalosporinases sont insensibles au clavulanate, les pénicillinases sont sensibles au clavulanate et les métallo-  $\beta$ -lactamases sont sensibles à l'EDTA (Tableau N°I) (Bush *et* Jacoby, 2010).

**b. Classification d'Ambller**

Fondée sur l'homologie de séquence en acides aminés (Ambller, 1980 cité par Bush *et* Jacoby, 2010), elle divise les  $\beta$ -lactamases en 4 groupes (de A à D) (tableau N° I, figure 4). Les groupes A, C et D contiennent des  $\beta$  lactamases avec la sérine dans le site actif, alors que le groupe B contient des métallo-enzymes comportant deux atomes de zinc dans le site actif (Bush *et* Jacoby, 2010).



Tableau N°I : Classification des  $\beta$ -lactamases (Bush et Jacoby, 2010).

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Classe moléculaire	Substrats préférés	Inhibition		Enzyme représentative
				Clavulanate ou tazobactam	EDTA	
1	1	C	Céphalosporines	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1 <sup>e</sup>	ND	C	Céphalosporines	-	-	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Pénicillines	+	-	PC1
2b	2b	A	Pénicillines, premières céphalosporines	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Céphalosporines à large spectre, monobactames	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Pénicillines	-	-	TEM-30, SHV-10
2ber	ND	A	céphalosporines à large spectre, monobactames	-	-	TEM-50
2c	2c	A	Carbénicilline	+	-	PSE-1, CARB-3
2ce	ND	A	Carbénicilline, céfépime	+	-	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilline	+/-	-	OXA-1, OXA-10
2de	ND	D	Céphalosporines à large spectre	+/-	-	OXA-11, OXA-15
2df	ND	D	Carbapénèmes	+/-	-	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Céphalosporines à large spectre	+	-	CepA
2f	2f	A	Carbapénèmes	+/-	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Carbapénèmes	-	+	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapénèmes	-	+	CphA, Sfh-1
ND	4	Inconnu				

ND : Non déterminé. - : non Inhibé. + : inhibé. +/- : Variable.

### 3.2.3. Phénotypes de résistance naturelle des entérobactéries aux $\beta$ -lactamines

Le comportement des entérobactéries vis-à-vis de plusieurs  $\beta$ -lactamines (aminopénicillines, carboxypénicillines, céphalosporines de première génération) a permis de caractériser dans les années 1980, quatre phénotypes de résistance naturelle :

- Phénotype du groupe 1 (sensible),
- Phénotype du groupe 2 (pénicillinase de bas niveau) : résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et aux ureidopénicillines.
- Phénotype du groupe 3 (céphalosporinase) : Résistance aux aminopénicillines, aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération et à la céfoxitine.
- Phénotype du groupe 4 (pénicillinase + céphalosporinase) : Résistance aux aminopénicillines, aux ureidopénicilline et aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération.

Actuellement, l'identification de nouvelles  $\beta$ -lactamases produites par certaines espèces d'entérobactéries, car d'isolement moins fréquent, a amené à proposer sept phénotypes de résistance naturelle (Robin et *al.*, 2012).

- **Le groupe 0:** inclut les entérobactéries ne possédant aucun gène codant pour une  $\beta$ -lactamase et donc naturellement sensibles à toutes les  $\beta$ -lactamines testées. Le genre *Salmonella* et l'espèce *Proteus mirabilis*.
- **Le groupe 1 (céphalosporinase constitutive de très bas niveau):** ce group comporte *E. coli* et le genre *Shigella* qui possèdent un gène *ampC* codant pour une céphalosporinase de la classe C d'Amblar donc résistante aux inhibiteurs. Elle est exprimée de manière constitutive à très bas niveau et les souches de ce groupe sont sensibles à toutes les  $\beta$ -lactamines.
- **Le groupe 2 (pénicillinase de bas niveau):** inclut les espèces possédant une pénicillinase chromosomique constitutive exprimée à bas niveau (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Citrobacter koseri*, *Raoultella planticola*, *R. ornithinolytica*, *R. terrigena*, *Escherichia hermannii*, *C. gillenbergii*).
- **Le groupe 3 (céphalosporinase inductible):** comprend les espèces d'entérobactéries productrices de céphalosporinase AmpC, résistantes aux inhibiteurs et inductibles. Les principales bactéries de ce groupe retrouvées en clinique humaine sont *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *E. asburiae*, *Serratia marcescens*, *C. freundii*, *C. braakii*, *C.*

*youngae*, *Morganella morgani*, *Providencia rettgeri*, *P. stuartii*, *Hafnia alvei* et *Pantoea agglomerans*.

- **Le groupe 4 (céphalosporinase inductible + enzyme sensible aux inhibiteurs):** inclut les espèces *Yersinia enterocolitica* et *Serratia fonticola*. Ces deux espèces sont caractérisées par la production de deux enzymes : une céphalosporinase inductible de classe C donc résistante aux inhibiteurs et une enzyme sensible aux inhibiteurs. Cette dernière est chez *Y. enterocolitica* une pénicillinase chromosomique de bas niveau et chez *S. fonticola* une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) chromosomique et inductible, qui hydrolyse les pénicillines et les céphalosporines.
- **Le groupe 5 (céfuroximase inductible):** rassemble les espèces produisant une enzyme chromosomique, sensible aux inhibiteurs, inductible et ayant un spectre d'activité hydrolytique proche de celui des BLSE. Ce groupe comprend *P. vulgaris* et *P. penneri*.
- **Le groupe 6 (BLSE de bas niveau/BLSE inductible):** comprend d'une part des espèces environnementales (la plupart des espèces de *Kluyvera* comme *K. ascorbata*, *K. cryocrescens*, *K. georgiana*, *Rahnella aquatilis* et *Erwinia perscinia*), rares en clinique humaine, qui produisent des BLSE de manière constitutive à bas niveau, et d'autre part des espèces de *Citrobacter* (*C. amalonaticus*, *C. farmeri* et *C. sedlakii*) qui produisent une BLSE inductible.

#### 3.2.4. $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu constituent un groupe d'enzymes ayant la propriété commune de conférer la résistance aux pénicillines, aux céphalosporines de première, deuxième et troisième génération, à l'aztréonam (mais pas les céphamycines et les carbapénèmes). Elles sont inhibées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases tel que l'acide clavulanique (Bush *et al.*, 1995).

Les BLSE ont été décrites pour la première fois chez *Klebsiella ozaniae* en 1983 en Allemagne (Knoth *et al.*, 1983), puis en 1984 chez *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli* en France et en Tunisie (Kliebe *et al.*, 1985). Ces enzymes avaient été désignées céfotaximase et céftazidimase car elles conféraient aux bactéries qui les produisaient une résistance au céfotaxime et à la céftazidime. Elles inactivaient aussi d'autres  $\beta$ -lactamines telles que le céftriaxone et l'aztréonam (Paterson et Bonomo, 2005).

La répartition de ces enzymes est aujourd'hui mondiale. Elles sont, en général, portées par des plasmides et des transposons. L'augmentation de la fréquence relative des entérobactéries productrices de BLSE a été observée aussi bien dans le milieu hospitalier que le milieu communautaire. Leur dissémination, marquée par des grandes disparités géographiques est, à l'heure actuelle, un problème mondial de santé publique (Adjidé *et al.*, 2006 ; Paterson et Bonomo, 2005 ).

L'utilisation des techniques moléculaires et la détermination des séquences peptidiques ont permis de démontrer que la plupart des BLSE dérivent des pénicillinases déjà connues (TEM-1, TEM-2, SHV-1) par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés qui leur permet d'hydrolyser les oxymino- $\beta$ -lactamines et les monobactames. Aujourd'hui, on assiste à l'émergence des BLSE non TEM et non SHV incluant les types CTX-M, PER, VEB, GES, BES, SFO... et plus récemment BEL et PME (Phillipon, 2013). Ces enzymes sont des  $\beta$ -lactamases qui appartiennent en majorité à la classes A de la classification d'Ambler et 2be de Bush-Jacoby-Medeiros. Certains auteurs considèrent également les  $\beta$ -lactamases des classes D et 2de (de type OXA) comme des BLSE (Vodovar *et al.*, 2012).

**CHAPITRE II**

**LES CARBAPENEMASES**

**CHEZ LES**

**ENTEROBACTERIES**

## Chapitre II : Les carbapénèmases chez les entérobactéries

### 1. Structure, activité hydrolytique et support génétique

Les carbapénèmases décrites chez les entérobactéries constituent une famille très composite, définie sur la base d'un spectre enzymatique (hydrolyse d'au moins une carbapénème disponible) et non sur une base structurale. Ces carbapénèmases sont ainsi retrouvées au sein des classes A, B et D d'Ambler, bien que certains auteurs incluent également la classe C du fait d'une faible activité carbapénémase de certaines céphalosporinases plasmidiques qui pourrait entraîner une augmentation des CMI aux carbapénèmes en association avec une imperméabilité (Grall *et al.*, 2011 ; Nordmann *et Carre*, 2010).

Les carbapénèmases les plus importantes, cliniquement, sont les carbapénèmases de type KPC, IMP/VIM et OXA-48. Les  $\beta$ -lactamases de classe A ont une activité qui est totalement ou partiellement inhibée *in vitro* par l'acide clavulanique et le tazobactam alors que les autres types de  $\beta$ -lactamases ne sont pas inhibés (Grall *et al.*, 2011 ; Nordmann *et Carre*, 2010).

#### 1.1. $\beta$ -lactamases de classe A

Les carbapénèmases de classe A ont été tout d'abord rapportées chez plusieurs souches d'entérobactéries isolées de l'environnement (*Serratia*, *Enterobacter*), produisant des  $\beta$ -lactamases dont l'activité est inhibée par l'acide clavulanique. Elles hydrolysent, à divers degrés, toutes les  $\beta$ -lactamines. Leurs gènes sont chromosomiques (NMCA, SME-1, SME-2/SME-3, IMI-1/IMI-2) ou plasmidiques (GES, KPC) (Queenan et Bush, 2007 ; Poirel *et al.*, 2007).

##### 1.1.1. Carbapénèmases de type GES

Les  $\beta$ -lactamases de type GES (GES-4, GES-5 et GES-6), ont été identifiées chez *K. pneumoniae* et *E. coli* et hydrolysent faiblement les carbapénèmes. Il s'agit de carbapénèmases de structure très similaire à la BLSE GES-1, dont elles ne diffèrent que par de simples changements ponctuels d'acides aminés qui expliquent l'élargissement de leur spectre de substrat (Nordmann et Carre, 2010).

### 1.1.2. Carbapénèmases de type KPC

Les carbapénèmases de classe A, les plus fréquentes, du fait de leur pouvoir de dissémination important, sont les KPC. La première souche productrice de KPC (KPC-1=KPC-2) a été identifiée en 1996 en Caroline du Nord aux États-Unis chez une souche de *K. pneumoniae* (Yigit *et al.*, 2001). Cette découverte fut rapidement suivie par la description de 4 autres variants (KPC-3 à KPC-7) (<http://www.lahey.org/Studies/>). Le spectre d'hydrolyse des KPC comprend toutes les  $\beta$ -lactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames), mais les activités des céphamycines et de la ceftazidime sont peu modifiées. Parmi les céphalosporines de troisième génération, les KPC hydrolysent le plus efficacement le céfotaxime. L'activité des KPC est partiellement inhibée par l'acide clavulanique et le tazobactam, ce dernier étant le plus actif (Grall *et al.*, 2011).

Les gènes *bla*<sub>KPC</sub> ont largement été caractérisés sur des plasmidiques. Les plasmides décrits varient dans leur nature, leur taille et sont le plus souvent transférables chez *Escherichia coli*. Ils portent fréquemment d'autres gènes de  $\beta$ -lactamases dont de nombreux types de BLSE (TEM, SHV, CTX-M) et peuvent parfois même porter des gènes codant pour la résistance à d'autres familles d'antibiotiques notamment aux aminosides et/ou aux fluoroquinolones (Wei *et al.*, 2007; Nordmann *et al.*, 2009 ; Gootz *et al.*, 2009). Les souches KPC apparaissent donc le plus souvent multi-résistantes aux bêta-lactamines, l'értapénème étant la carbapénème dont le niveau de résistance est le plus élevé (Tableau II) (Nordmann et Carre, 2010).

Les études génétiques montrent que les gènes *bla*<sub>KPC</sub> sont localisés sur une variété importante de plasmides mais qu'ils sont associés à des transposons de même nature de type Tn3, ce qui leur a permis de diffuser dans de nombreuses espèces comme *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, et même *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (Naas *et al.*, 2008 ; Grall *et al.*, 2011).

### 1.2. $\beta$ -lactamases de classe B

Ce sont des métallo-enzymes qui contiennent des ions zinc dans leur site actif. Ces enzymes hydrolysent fortement toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'aztreonam. Leur activité n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam, mais par l'EDTA, qui chélate les ions zinc présents au niveau du site actif. Les niveaux de résistance aux carbapénèmes sont assez variables. Dans de nombreux cas, les souches productrices de MBL produisent aussi des BLSE (Walsh, 2008 ; Patel *et Bonomo*, 2013).

Les premières M $\beta$ L identifiées (BCII, CcrA, CphA et L1) étaient des enzymes chromosomiques présentes chez des bactéries de l'environnement ou des pathogènes opportunistes comme *Bacillus cereus*, *Aeromonas spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* ou *Bacteroides fragilis*. Ces gènes chromosomiques de M $\beta$ L ne semblent pas être transférables, et leur prévalence est directement liée à celle des espèces productrices. L'isolement de M $\beta$ L transférables est, en revanche, de plus en plus fréquent et ce par l'association des plasmides portant les gènes M $\beta$ L au sein d'intégrons et de transposons (Grall *et al.*, 2011 ; Walsh, 2008).

Il existe de nombreuses variétés de M $\beta$ L regroupées dans plusieurs familles: VIM, IMP, GIM, SIM, SPM ou NDM. Les gènes des M $\beta$ L de type VIM ou IMP peuvent présenter des localisations plasmidiques ou chromosomiques. Ils sont habituellement décrits sous forme de gènes cassettes au sein d'intégrons de classe 1, ou plus rarement de classe 3 (Grall *et al.*, 2011).

L'enzyme NDM-1 (pour New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase) a été récemment décrite chez les entérobactéries, principalement *E. coli* et *K. pneumoniae*, d'abord en Inde et au Pakistan, puis un peu partout dans le monde. Le gène *bla*<sub>NDM-1</sub> a été retrouvé sur une grande variété de plasmides mais également inséré sur le chromosome bactérien dans quelques cas. Le plus souvent, ce gène se trouve sur un plasmide transférable et enclin aux réarrangements, faisant craindre un fort potentiel de transmission et d'adaptation (Kumarasamy *et al.*, 2010).

### 1.3. $\beta$ -lactamases de classe D

Les oxacillinases sont des pénicillinases dont le spectre s'est étendu dans certains cas aux C3G et dans d'autres aux carbapénèmes. La première carbapénémase de type OXA a été décrite en 1993, dans une souche d'*A. baumannii* multi-résistante isolée en 1985 en Ecosse (Paton *et al.*, 1993). Cette enzyme plasmidique fut nommée « *Acinetobacter* resistant to imipenem » (ARI-1), puis renommée OXA-23 après séquençage (Donald *et al.*, 2000). Il existe neuf sous-groupes de carbapénèmases de classe D, basés sur l'homologie des séquences protéiques (OXA-23, OXA-51, OXA-24, OXA-58, OXA-48, OXA-55, OXA-50, OXA-62 et OXA-60) (Grall *et al.*, 2011).



L'OXA-48, décrite pour la première fois en Turquie chez *K. pneumoniae* a pour réservoir naturel les espèces environnementales du genre *Shewanella* (Poirel *et al.*, 2004). À l'inverse des autres carbapénèmases de type OXA, principalement retrouvées chez *Acinetobacter spp*, le groupe OXA-48 n'a été décrit que chez les entérobactéries. Les carbapénèmases de type OXA présentent une grande diversité de séquences protéiques, mais ont un spectre d'activité assez proche. Ces enzymes hydrolysent les aminopénicillines, les carboxypenicillines, et seulement partiellement l'imipénème malgré une grande affinité de l'enzyme pour ce substrat. Leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam. En absence d'autres mécanismes de résistance (autres  $\beta$ -lactamases de type BLSE ou AmpC plasmidique, perte de porines, ou pompes à efflux), elles n'entraînent qu'une légère diminution de la sensibilité aux carbapénèmes. De plus, l'hydrolyse des céphalosporines est quasi-inexistante (Grall *et al.*, 2011).

**Tableau N° II:** Variabilité des CMI des carbapénèmes des souches cliniques d'entérobactéries exprimant une carbapénémase (Nordmann et Carre, 2010).

Carbapénèmases	CMI (mg/ml)		
	Imipénème	Méropénème	Ertapénème
<b>Entérobactéries KPC</b>	0,5 ; >64	1; 64	0,5 ; >64
<b>Entérobactéries M<math>\beta</math>L</b>	0,5 ; >64	0,25 ; >64	0,5 ; >32
<b>Entérobactéries OXA-48</b>	1 ; >64	0,5 ; 64	4; >64

## 2. Épidémiologie et clinique

Jusqu'à la fin des années 1990, les carbapénèmases décrites étaient spécifiques d'espèce et de déterminisme chromosomique et la prévalence de souches responsables d'infections sporadiques et de quelques petites épidémies, restait alors limitée (Grall *et al.*, 2011). De façon plus préoccupante, des carbapénèmases de support plasmidique ont ensuite été décrites: IMP-1 chez *P. aeruginosa* (Watanabe *et al.*, 1991), OXA-23 chez *A. baumannii* (Scaife *et al.*, 1995), ou KPC-1 chez *K. pneumoniae* (Yigit *et al.*, 2001). Ce qui était considéré comme un problème de diffusion clonale est donc devenu un problème plus global de diffusion interespèces. En parallèle, les carbapénèmases acquises sont devenues de plus en plus complexes, du fait des nombreux types de M $\beta$ L (IMP, VIM, SPM, GIM, SIM et NDM), de sérine-carbapénèmases de classe A (KPC, GES, NMC/IMI et SME) et d'oxacillinases de classe D (OXA-23, OXA-24, OXA-48 et OXA-58) décrites. Certaines

enzymes ont diffusé à une vitesse alarmante dans certaines régions, où elles ont atteint de hauts niveaux d'endémicité (Grall *et al.*, 2011).

La diffusion des carbapénèmases chez les entérobactéries revêt une importance clinique particulière. En effet, ces  $\beta$ -lactamases ont le spectre d'activité le plus large hydrolysant le plus souvent de nombreux types de  $\beta$ -lactamines. Les souches productrices de carbapénèmases sont en plus souvent résistantes à de multiples antibiotiques différents (aminoglycosides, fluoroquinolones...) (Miriagou *et al.*, 2010).

### 2.1. $\beta$ -lactamases de classe A

Parmi les  $\beta$ -lactamases de classe A, seules les carbapénèmases de type KPC (essentiellement KPC-2) ont été très largement rapportées dans le monde (Nordmann *et al.*, 2009). La première souche productrice de KPC a été identifiée en 1996 en Caroline du Nord. Depuis, elles semblent être endémiques de la région Est des Etats Unis avec une forte prévalence dans l'état de New York, ainsi qu'en Israël et en Grèce. Toutefois, elles connaissent, aujourd'hui, une émergence plus internationale de façon sporadique (Yigit *et al.*, 2001 ; Nordmann *et al.*, 2009).

Le gène *bla*<sub>KPC</sub>, qui est flanqué par le transposon Tn4401 est essentiellement identifié chez *K. pneumoniae* et plus rarement chez les autres entérobactéries. Les souches de *K. pneumoniae* KPC sont souvent clonalement reliées (ST-258). Cependant, une étude récente comparant des souches de *K. pneumoniae* d'origine internationale exprimant une même enzyme KPC-2 montrait une variabilité de ce fond génétique et une variabilité des plasmides possédant ce même gène de résistance. Ceci suggère l'émergence dans le monde de plusieurs clones à l'origine de cette épidémie internationale de carbapénèmases de type KPC (Nordmann *et Carre*, 2010)

En Arabie saoudite, des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de carbapénèmases de type KPC ont été identifiées en association avec une altération de la porine Omp36K (Al-Qadheeb *et al.*, 2010).

D'un point de vue clinique, les souches de *K. pneumoniae* productrices de KPC sont associées à des infections qui n'ont pas de spécificité en ce qui concerne la nature des infections ou leur terrain de survenue. Cependant, la mortalité liée à ces infections est élevée (38-57 % en Israël et aux USA), du fait de la multirésistance des souches, rendant l'antibiothérapie probabiliste incertaine et l'antibiothérapie thérapeutique difficile (Nordmann *et Carre*, 2010).

## 2.2. $\beta$ -lactamases de classe B

Les enzymes de type VIM et IMP sont très répandues. Leur hôte le plus habituel est *K. pneumoniae* avec des niveaux d'expression de la résistance aux carbapénèmes variables. Plusieurs épidémies de souches d'entérobactéries M $\beta$ L ont été identifiées, notamment au Japon, en Italie, en Espagne et en Grèce (Nordmann *et Carre*, 2010). Les sites d'isolement de ces souches sont variables : urines, sang et sécrétions bronchiques majoritairement. L'Europe du Sud contribue fortement à la diffusion de ces marqueurs de résistance (VIM-1 notamment) (Giamarellou *et al.*, 2009).

En Grèce, la proportion de souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes a augmenté considérablement passant de < 1 % en 2001 à 20 % dans les unités classiques d'hospitalisation, à 50 % dans les unités de soins intensifs en 2006. Des souches VIM ont été trouvées dans 3 hôpitaux en 2002 puis dans 40 hôpitaux en 2006 en Grèce (Giamarellou *et al.*, 2009).

Les métallo- $\beta$ -lactamases ont également étaient disséminées en Afrique du Nord. Ainsi, le premier cas de métallo  $\beta$ -lactamase, en Tunisie, a été décrit chez des souches cliniques de *K. pneumoniae* isolées en 2005 qui étaient productrices simultanément de  $\beta$ -lactamase de type VIM-4, CMY-4 et CTX-M15 (Ktari *et al.*, 2006). En Algérie, l'enzyme VIM-19 a été identifiée pour la première fois chez des souches de *K. pneumoniae* et d' *E. coli* isolées en 2008 (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2010).

La métallo- $\beta$ -lactamase NDM-1 (*New Dehli* métallo- $\beta$ -lactamase) a été identifiée tout d'abord en Suède dans deux souches isolées d'un patient d'origine indienne au début de l'année 2008 (Yong *et al.*, 2009). Ce patient avait été hospitalisé peu de temps auparavant à New Dehli à la fin de l'année 2007. La première souche NDM-1 fut une souche de *K.pneumoniae* isolée d'un prélèvement urinaire, ce même patient étant également porteur d'une souche d'*E. coli* NDM-1 au niveau de sa flore fécale (Kumarasamy *et al.*, 2010). Les deux souches étaient multirésistantes aux principaux antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, aminosides, etc.). Une analyse génétique montrait une localisation plasmidique du gène de résistance *bla*NDM-1 facilement transférable codant pour une  $\beta$ -lactamase structurellement très différente des métallo- $\beta$ -lactamases connues, mais partageant avec celles-ci les mêmes fonctions d'hydrolyse de toutes les  $\beta$ -lactamines, sauf l'aztréonam. Par la suite, une étude approfondie des souches d'entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques identifiait 37 souches d'entérobactéries, essentiellement *K. pneumoniae* et *E. coli*, mais aussi *Citrobacter*

*freundii*, *Morganella morgani*, *Providencia stuartii* et *Enterobacter cloacae* en Grande-Bretagne.

Les infections étaient associées à une certaine mortalité (Kumarasamy *et al.*, 2010). Dans cette même étude, 143 souches d'entérobactéries NDM-1 ont été identifiées (essentiellement *K. pneumoniae* et *E. coli*) en Inde et au Pakistan, permettant aux auteurs britanniques de montrer qu'il s'agissait d'une épidémie due à des souches résistantes différentes, et que le gène de résistance avait diffusé, suggérant l'origine géographique. À la fin de l'année 2009, on totalisait un nombre supérieur de souches NDM-1 en Grande-Bretagne (n = 70), en Inde et au Pakistan (n = 170). Ces souches sont de sensibilité variable aux antibiotiques mais généralement multirésistantes voire résistantes à tous les antibiotiques (Kumarasamy *et al.*, 2010 ; Nordmann, 2010). Depuis, de telles souches ont également été isolées en Europe (Royaume-Uni, Belgique, Hollande, Suède, Autriche, France), aux États-Unis, au Canada, en Australie, en Asie, en Afrique et au Moyen-Orient, chez des patients ayant été hospitalisés pour la plupart dans le sous-continent indien (Johnson *et al.*, 2013).

La prescription de  $\beta$ -lactamines ou de quinolones est un facteur de risque d'acquisition de ces souches M $\beta$ L. Les taux de mortalité associés aux infections dues à ces entérobactéries produisant des métallo-bêta-lactamases varient de 18,8 % à 66,7 %. Il a été suggéré que le taux de mortalité des infections systémiques à *K. pneumoniae* VIM-1 dépend du niveau de la CMI de l'imipénème. Si ces CMI sont inférieures à 4 mg/l, la mortalité de ces infections ne diffère pas de celle d'infections systémiques à *K. pneumoniae* non productrices de carbapénèmases (Nordmann et Carre, 2010).

### 2.3. $\beta$ -lactamases de classe D

Concernant les carbapénèmases de classe D chez les entérobactéries, l'enzyme OXA-48 est la plus fréquemment observée. Des souches de *K. pneumoniae* productrices d'OXA-48 ont le plus souvent été décrites en Turquie, où elles ont diffusé dans de nombreux hôpitaux. Sa prévalence semble élevée dans d'autres pays du pourtour méditerranéen (Liban, Tunisie, Maroc) et des cas ont également été rapportés en France et en Belgique mais aussi au Sénégal. L'émergence des gènes *bla*<sub>OXA-48</sub> est liée à la diffusion de plasmides de 62kb porteurs de ces gènes (Potron *et al.*, 2013).

Les OXA-48 sont souvent associées à d'autres carbapénèmases. En effet, la co-expression des gènes *bla*<sub>OXA48</sub> et *bla*<sub>NDM-1</sub> a été identifiée chez des souches de *K pneumoniae* isolées en Arabie Saoudite (Shibl *et al.*, 2013). L'association de OXA-181 et NDM-1 a également été identifiée (Potron *et al.*, 2011).

### 3. Détection

La détection des bactéries productrices de carbapénèmases au laboratoire est un problème d'importance majeure pour le choix d'un schéma thérapeutique approprié et la mise en place des mesures de contrôle de la dissémination. Cependant, cette détection reste difficile, car devant la multitude de phénotypes, elle ne peut pas être uniquement basée sur le profil de résistance. En effet, les CMI vis-à-vis des carbapénèmes (notamment l'imipénème et le méropénème) des souches productrices de carbapénèmases sont très variables et peuvent rester dans la zone de sensibilité selon les recommandations du CA-SFM, de l'EUCAST ou du CLSI. De plus, aucun test spécifique n'a encore été bien standardisé (Grall *et al.*, 2011). L'ertapénème, quelle que soit la carbapénémase en cause, dont les valeurs seuils sont les plus basses, est l'indicateur le plus fiable pour la détection de cette résistance (Almeida *et al.*, 2012).

La détection phénotypique des carbapénèmases peut être entreprise selon deux approches: Le test de Hodge modifié et les tests d'inhibition des carbapénèmases (Cohen Stuart *et al.*, 2010).

Le test de Hodge modifié est utilisé comme méthode phénotypique générale de détection de la production de carbapénémase diffusible. Ce test est sensible pour la détection des carbapénèmases, mais ne fournit pas d'information sur le type de carbapénémase mis en cause. Le test de Hodge peut parfois être faussement négatif, notamment avec les souches productrices de carbapénèmases de type NDM-1. L'ajout de ZnSO<sub>4</sub> (100 µg/ml) dans le milieu permet d'augmenter très notablement la sensibilité du test dans ce cas. Un test d'inhibition par des inhibiteurs spécifiques des β-lactamases de classe B (EDTA ou acide dipicolinique) est également utile dans ce cas (CASFM, 2012). La spécificité de ce test peut être aussi augmentée pour les carbapénémase de classe A en y incorporant l'acide boronique tel qu'il a été décrit par Pasteran *et al.*, 2010.

Le test de Hodge peut parfois être faussement positif pour les souches ayant un défaut d'accumulation des carbapénèmes associé à la production de céphalosporinases et/ou de BLSE. La réalisation du test de Hodge modifié en ajoutant de la cloxacilline sur le disque d'ertapénème (déposer 10 µl d'une solution aqueuse à 75 mg/ml de cloxacilline sur le disque d'ertapénème) permet d'éliminer les faux positifs liés à la production de céphalosporinase (CASFM, 2012).

Les tests d'inhibition reposent sur l'augmentation du diamètre d'inhibition autour d'un disque combinant une carbapénème (méropénème ou imipénème) et un inhibiteur ou la diminution de la CMI de ces molécules en présence d'inhibiteurs spécifiques de  $\beta$  lactamases (tableau N°III) (Cohen Stuart *et al.*, 2010).

En testant les carbapénèmes sur un milieu contenant de la cloxacilline (inhibiteur de céphalosporinase) et, comparativement sur un milieu sans cloxacilline, on peut détecter une résistance aux carbapénèmes non liée à la production d'une carbapénèmase mais à l'association de céphalosporinase et de défaut d'accumulation des carbapénèmes, qui se traduit par une augmentation importante des diamètres d'inhibition sur le premier milieu.

Il faut signaler que certains des inhibiteurs ci-dessus cités manquent de spécificité : les acides boroniques peuvent inhiber des céphalosporinases et l'EDTA peut avoir une activité antibiotique intrinsèque sur certaines souches (CASFM, 2012).

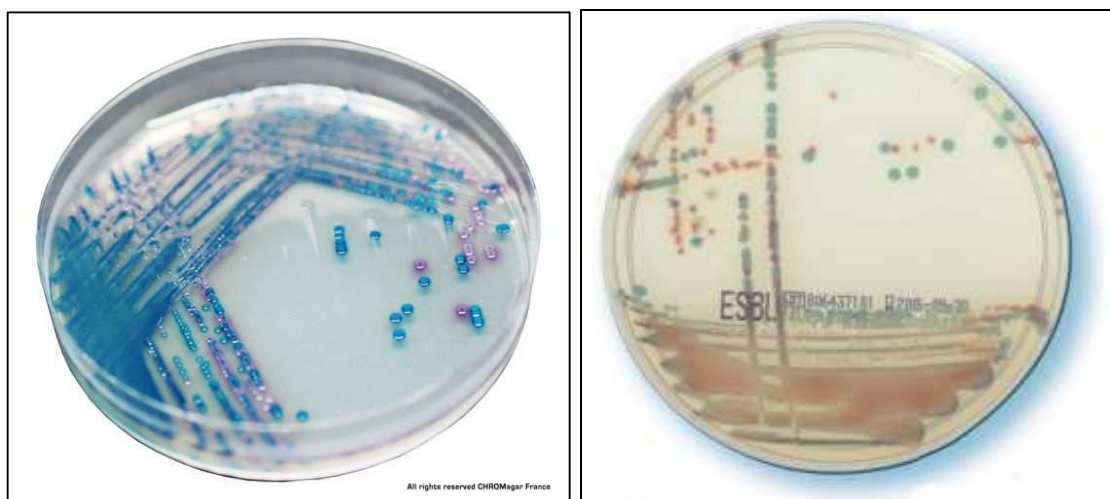
A ce jour, il n'existe pas de test d'inhibition spécifique des carbapénèmases de classe D (ex. OXA-48). La production de ces enzymes est suspectée si tous les tests d'inhibition cités ci-dessus sont négatifs. Dans ce cas le test de Hodge est particulièrement utile (CASFM, 2012).

**Tableau N°III :** Interprétation phénotypique des tests de détection des carbapénèmases chez les entérobactéries (Cohen-Stuart *et al.*, 2010)

Tests	Carbapénèmases			AmpC avec réduction de perméabilité	BLSE avec réduction de perméabilité
	Classe A	Classe B	Classe D		
Hodge test modifié	+	+	+	+/-	+/-
Méropénème + acide boronique	+	-	-	+/-	-
Méropénème + cloxacilline	-	-	-	+/-	-
Imipénème + EDTA	-	+	-	-	-
Méropénème +DPA	-	+	-	-	-

**BLSE:**  $\beta$ -lactamase à spectre étendu ; **EDTA :** Ethylene diamine tetra-acetic acid; **DPA :** Acide dipicolinique.

Deux milieux de screening ont été évalués, le milieu « Chromagar KPC » (Chromagar, France) et le milieu « ChromID ESBLs » (bioMérieux, France) (figure 4). Le milieu Chromagar KPC (Chromagar, France) permet une bonne détection des souches exprimant KPC. Le milieu ChromID ESBLs contient une céphalosporine sélective. Il permet la détection de toute souche ayant un certain degré de résistance aux céphalosporines. Dans la mesure où la plupart des souches ayant une carbapénémase sont également résistantes aux céphalosporines (spectre propre d'activité de la carbapénémase ou association de BLSE), ce milieu est actuellement le milieu le plus adapté pour détecter les porteurs de souches produisant une carbapénémase. Seules les souches de *K. pneumoniae* n'exprimant qu'OXA-48 sans BLSE associée ne seraient pas isolées sur ce milieu sélectif. Le délai d'obtention des résultats utilisant ces techniques de screening reste de 48 heures (Carrère *et al.*, 2010 ; Nordmann et Carre, 2010).



**Chromagar KPC™**

**ChromID ESBLs®**

**Figure 4:** Aspect des colonies de souches d'entérobactérie productrices de KPC ET de BLSE sur milieux chromogènes

Enfin, à l'heure actuelle, seule l'utilisation de techniques moléculaires basées sur la PCR avec des couples d'amorces spécifiques aux différents groupes de gènes de carbapénèmases permet une identification précise des carbapénèmases (Nordmann *et Carre*, 2010).

**PARTIE II:**  
**ÉTUDE**  
**EXPERIMENTALE**



**I-MATERIEL**  
**ET**  
**METHODES**

## 1. Présentation de l'étude

Cette étude comporte trois parties :

La première partie du travail a consisté en la collecte de souches d'entérobactéries durant une période de 4 mois (de Décembre 2012 à Avril 2013) au niveau de 2 hôpitaux (Al-Thawra et Saudi-German) et de quatre laboratoires d'analyses médicales situés à Sana'a, Yémen.

Pour chaque patient, les données suivantes ont été recueillies :

- Sexe et âge du patient
- Nature des prélèvements

La deuxième partie du travail s'est déroulée au niveau du laboratoire de Génétique bactérienne de l'université A. Mira de Béjaia où l'identification des souches, les tests de sensibilité aux antibiotiques ainsi que la détermination des phénotypes de résistance ont été effectués.

La troisième partie du travail a été réalisée au niveau du laboratoire de bactériologie du CHU de Reims (France) qui a consisté en la caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques et au typage moléculaire des souches d'entérobactéries.

## 2. Isolement et identification des souches

Les souches ont été sélectionnées sur la base de leur résistance au céfotaxime (CTX) et /ou céftazidime (CAZ) et proviennent de différents prélèvements pathologiques : urines, selles, spermes, pus, prélèvements vaginaux et expectoration. L'isolement des souches bactériennes a été réalisé sur plusieurs milieux de cultures sélectifs (gélose Hektoen, Mc Conkey, EMB) (Annexe I). L'identification des souches isolées a été réalisée sur la base de l'aspect des colonies sur milieux sélectifs et sur les résultats de la galerie API 20E (Biomérieux) (Annexe IV).

## 3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Toutes les souches d'entérobactéries résistantes au CTX et/ou CAZ ont été testées vis-à-vis d'un ensemble d'antibiotiques (**Tableau N°IV**). La sensibilité des souches aux antibiotiques est évaluée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2012).

➤ **Milieu de culture**

L'antibiogramme est réalisé sur la gélose Mueller Hinton reconstituée (FLUKA).

➤ **Inoculum**

A partir d'une culture pure de 18-24h, des colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées, puis déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile et bien homogénéisée. L'opacité de l'inoculum doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une densité optique de 0,08 à 0,10 à 625 nm (ce qui correspond à environ  $10^8$  UFC/ml). Par la suite, une dilution de 1\10 est réalisée.

➤ **Ensemencement**

Un écouvillon stérile est imbibé dans la suspension bactérienne diluée à 1/10, puis essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de décharger au maximum. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et en le passant sur la périphérie de la gélose.

➤ **Application des disques d'antibiotiques**

Chaque disque d'antibiotiques (Oxoid®, BioRad®) est déposé sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince. La liste des d'antibiotiques testés pour les souches résistantes aux carbapénèmes est donnée dans le tableau N°V.

➤ **Lecture**

Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse et l'interprétation en Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CA-SFM (communiqué CA-SFM, 2012) (Annexe II)

**Tableau N°IV** : Liste des antibiotiques testés pour toutes les souches (résistantes au CTX et/ou CAZ)

<b>Antibiotiques</b>	<b>Abréviations</b>	<b>Charges (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Familles</b>
Amoxicilline-Acide clavulanique	AMC	20 + 10	<b><math>\beta</math>-lactamines</b>
Céfotaxime	CTX	30	<b><math>\beta</math>-lactamines</b>
Céfoxitine	FOX	30	<b><math>\beta</math>-lactamines</b>
Imipénème	IMP	10	<b><math>\beta</math>-lactamines</b>
Céftazidime	CAZ	30	<b><math>\beta</math>-lactamines</b>
Aztréonam	ATM	30	<b><math>\beta</math>-lactamines</b>
Céfèpime	FEP	30	<b><math>\beta</math>-lactamines</b>
Gentamycine	GM	10	<b>Aminosides</b>
Amikacine	AK	30	<b>Aminosides</b>
Ciprofloxacine	CIP	5	<b>Quinolones</b>
Péfloxacine	PF	5	<b>Fluoroquinolones</b>
Tétracycline	TET	30 (UI)	<b>Tétracycline</b>

UI : Unité Internationale

**Tableau N°V:** Liste des antibiotiques complémentaires testés pour les souches résistantes aux carbapénèmes

<b>Antibiotiques</b>	<b>Abréviations</b>	<b>Charges (µg)</b>	<b>Familles</b>
Céfotaxime-Acide Clavulanique	CCTX	30/10	<b>β-lactamines</b>
Céftazidime-Acide Clavulanique	CCAZ	30/10	<b>β-lactamines</b>
Céfépime-Acide Clavulanique	CFEP	30/10	<b>β-lactamines</b>
Méropénème	MEM	10	<b>β-lactamines</b>
Cefpirome	CPO	30	<b>β-lactamines</b>
Ertapénème	ERT	10	<b>β-lactamines</b>
Doripénème	DOR	10	<b>β-lactamines</b>
Pipéracilline	PIP	75	<b>β-lactamines</b>
Pipéracilline/tazobactam	TZP	75/10	<b>β-lactamines</b>
Ticarcilline	TIC	75	<b>β-lactamines</b>
Ticarcilline/ac. clavulanique	TCC	75/10	<b>β-lactamines</b>
Tobramycine	TM	10	<b>Aminosides</b>
Acide nalidixique	NAL	30	<b>Quinolones</b>
Norfloxacine	NOR	5	<b>Flouroquinolones</b>
Ofloxacine	OFX	5	<b>Flouroquinolones</b>
Triméthoprime	TMP	5	<b>Sulfamides</b>
Sulfamides	SUL	200	<b>Sulfamides</b>
Triméthoprime/sulfaméthoxazole	SXT	1,25/23,75	<b>Sulfamides</b>
Tigécycline	TGC	15	<b>Cyclines</b>
Chloramphénicol	CHL	30	<b>Phenicol</b>
Fosfomycine	FSF	50	<b>Fosfomycine</b>

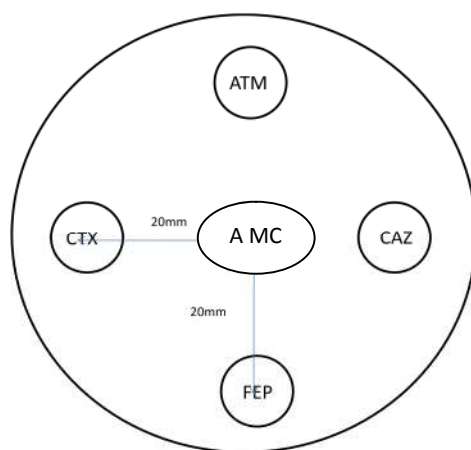
## 4. Étude des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

### 4.1. Test de synergie (DD-Test)

Un test de synergie (DD-Test) est réalisé afin de mettre en évidence la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE).

Ce test consiste à déposer autour d'un disque d'AMC (amoxicilline 20  $\mu$ g /acide clavulanique 10 $\mu$ g) des disques de céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (céfotaxime : CTX, céftazidime : CAZ), et de 4<sup>ème</sup> génération (céfépime : FEP) (30  $\mu$ g) et l'aztréonam (30  $\mu$ g) sur la gélose Mueller-Hinton. La distance entre les disques est de 20mm (centre à centre) (figure 5).

La présence d'une BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie entre le disque d'AMC et les autres disques (CAZ, CTX, FEP) (Jarlier *et al.*, 1988).



**Figure 5** : La disposition des disques d'antibiotiques dans le DD-Test

### 4.2. Recherche de la production d'une carbapénèmase

- **Test de Hodge** (Hodge *et al.*, 1978)

Ce test est réalisé afin de mettre en évidence la production d'une carbapénèmase pour les souches qui présentent une résistance ou une sensibilité diminuée aux carbapénèmes, le test est réalisé comme suit (Lee *et al.*, 2010) :

- Une souche d'*E. coli* de référence ATCC25922 (sensible) estensemencée par écouvillonnage sur gélose Mac Conkey à partir d'une suspension à 0,5 McFarland.
- Un disque d'imipénème est déposé au centre de la boîte, puis chaque souche à tester estensemencée par stries à partir du disque d'imipénème jusqu'à la périphérie de la boîte.

- Après une nuit d’incubation à 37 °C, la déformation du diamètre de la zone d’inhibition à l’intersection entre la strie et la culture d’*E. coli* indique la production d’une carbapénèmase (par la souche testée) qui hydrolyse l’imipénème (Figure 6).

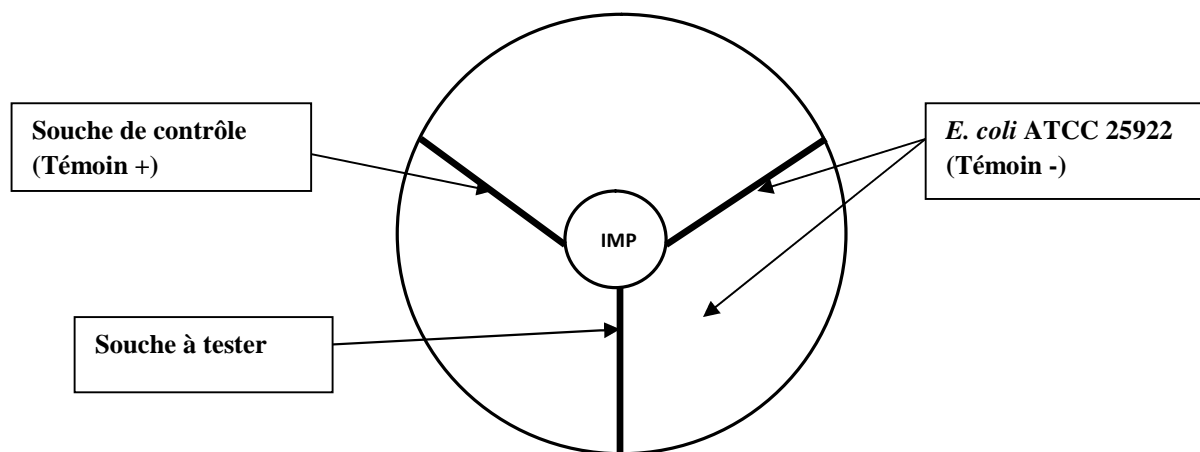


Figure 6 : Technique de Hodge test

#### 4.3. Recherche de la production de métallob-lactamases (M $\beta$ L)

- **Test à l’EDTA**

La production d’une M $\beta$ L est recherchée en utilisant une solution stérilisée par autoclavage d’EDTA à 0,5 M pH 8 (Annexe III). Dans ce but, deux méthodes ont été utilisées :

- **Méthode des disques combinés**

- Deux disques d’imipénème sont déposés séparément sur la gélose MH dans la même boîte.
- 4 $\mu$ l de la solution d’EDTA sont déposés sur l’un des disques.
- Après 18h d’incubation à 37°C, les diamètres des zones d’inhibition autour des deux disques sont comparés.

Un résultat positif se traduit par une augmentation de la zone d’inhibition autour du disque imipénème + EDTA par rapport au disque d’imipénème seul. Les souches dont le diamètre d’inhibition autour du disque IMP–EDTA est supérieur à celui obtenu avec le disque d’IMP seul, d’au moins 6mm, sont considérées comme souches productrices de M $\beta$ L (Yong *et al.*, 2002).

➤ **Recherche de synergie**

Un DD-test est réalisé avec un disque d'imipénème (10 $\mu$ g) et un disque imbibé avec 10 $\mu$ l de solution d'EDTA à 0,5M distant de 15mm (Jeong *et al.*, 2006). La présence d'une M $\beta$ L est détectée par visualisation d'une image de synergie entre le disque d'imipénème et celui d'EDTA.

## 5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) est réalisée par la technique d'E-Test pour les souches résistantes aux carbapénèmes (CASFM, 2012).

Les antibiotiques testés sont les suivants : imipénème, értapénème, méropénème, doripénème, céfotaxime, céftazidime, aztréonam.

➤ **E-Test**

- La préparation des cultures suit les mêmes étapes que celles décrites pour l'antibiogramme standard.
- La bandelette contenant différentes concentrations de l'antibiotique à tester (Biomérieux®) est prélevée délicatement à l'aide d'une pince puis appliquée sur la surface gélosée (figure 7).
- Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18-24H
- La CMI de l'antibiotique testé est lue à l'œil nu, boîte ouverte et bien éclairée. Elle correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse (dessinée par l'inhibition de la culture bactérienne) et la bandelette E-test



**Figure 7** : Technique d'E-Test pour détermination de la CMI



## 6. Étude du transfert par conjugaison (Aibinu *et al.*, 2003)

### ➤ Matériel

- Souche donatrice : *Klebsiella pneumoniae* (3141, 4161, 4866) sensibles à la rifampicine et résistantes à tous les autres antibiotiques.
- Souche réceptrice : *E. coli* C600 résistante à la rifampicine et sensible aux autres antibiotiques.
- Bouillon nutritif.
- Gélose Mueller Hinton.
- Solution de rifampicine (RA) (2mg/ml).
- Solution de céftazidime (CAZ) (4µg/ml).

### ➤ Technique

- Les trois souches donatrices et la souche réceptrice sont cultivées dans 10 ml de bouillon nutritif, puis incubées à 37°C pendant une nuit au bain-marie agitateur.
- Des dilutions à 1/50<sup>ème</sup> de la souche réceptrice et des souches donatrices sont réalisées dans du bouillon nutritif (200µl dans 10ml de BN), puis incubées à 37°C pendant 3h.
- Dans un Erlen, 1 ml de la culture de la souche donatrice et 1 ml de la culture de la souche réceptrice sont mélangés à 1ml du bouillon nutritif neuf (rapport 1/1/1) ; puis incubés à 37°C pendant 2h, avec les témoins (la souche donatrice ensemencée sur MH + CAZ 4µg/ml et la réceptrice sur MH + RA 250µg/ml) à 37°C pendant 24h.
- Le milieu de sélection des transconjugants est représenté par la gélose Mueller Hinton contenant deux antibiotiques : l'un est la céftazidime (concentration finale de 4µg/ml) qui correspond au caractère suspecté plasmidique de la souche donatrice et l'autre la rifampicine (concentration finale de 250 µg/ml) qui est un caractère chromosomique de la souche réceptrice.
- On étale 200µl du mélange avec un râteau étaleur sur la surface des boîtes de sélection et on ensemence la souche réceptrice et donatrice séparément sur les boîtes témoins.
- On incube les boîtes témoins et de sélection à 37°C pendant 18h.
- L'étude de la résistance des transconjugants aux antibiotiques est réalisée par la méthode de l'antibiogramme standard en prélevant avec un cure dent stérile, une colonie (du transconjugant) qu'on dissocie dans 1ml d'eau physiologique stérile. A partir de cette dernière, on réalise l'antibiogramme.

## 7. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques

### 7.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN total a été extrait en utilisant le kit QIAmp DNA Mini (QIAGEN) selon les instructions du fabricant.

### 7.2. PCR multiplexe pour la détection des carbapénèmes

Les gènes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>OXA-23-like</sub>*, *bla<sub>OXA-58-like</sub>* et *bla<sub>OXA-48-like</sub>* ont été recherchés en utilisant des amorces spécifiques (Tableau N°IX).

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un thermocycleur (GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems)) dans un volume réactionnel de 50 µl contenant 5µl de l'ADN des souches; 5 µl de 10 X tampon PCR; 0,25 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM de déoxynucléosides triphosphates (dTTP, dCTP, dGTP, dATP) ; 0,25 mM de chaque amorce ; 2,5 U de Taq DNA polymérase. Les conditions de PCR sont résumées dans le tableau N° VI.

**Tableau N° VI :** Conditions de la PCR multiplexe pour la détection des carbapénèmes

Dénaturation initiale		95°C	3min
35 Cycles	Dénaturation	95°C	40sec
	Hybridation	55°C	30sec
	Élongation	72°C	20sec
Élongation finale		72°C	10min

### 7.3. PCR simplexe pour la détection des gènes BLSE

La présence d'autres gènes codant pour la résistance aux β-lactamines a été recherchée. Les gènes *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>GES</sub>* et *bla<sub>CTX-M</sub>* ont été amplifiés en utilisant des amorces spécifiques (**Tableau N°IX**). Les conditions de PCR pour chaque gène sont résumées dans le tableau N° VII (Brasme *et al.*, 2007).

**Tableau N°VII:** Conditions de la PCR multiplexe pour la détection des gènes BLSE

Paramètre	Condition/durée		
	<i>bla<sub>CTX-1</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>bla<sub>GES</sub></i>
Dénaturation initiale	95°C/3 mn	95°C/3 mn	95°C/3 min
Dénaturation	94°C/3 mn	94°C/3 mn	94°C/3 min
Hybridation	51°C/30 sec	42°C/30 sec	55°C/30 sec
Élongation	72°C/30 sec	72°C/30 sec	72°C/30 sec
Élongation finale	72°C/5 mn	72°C/5 mn	72°C/5 min
Nombre de cycle	30	30	30

#### 7.4. PCR multiplexe pour la détection des gènes AmpC

De la même manière, les gènes *bla<sub>ACC</sub>*, *bla<sub>FOX</sub>*, *bla<sub>MOX</sub>*, *bla<sub>DHA</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>* and *bla<sub>MIR</sub>* ont été recherchés en utilisant la PCR multiplexe suivant les conditions résumées dans le tableau N°VIII (Kermas *et al.*, 2012).

**Tableau N°VIII :** Conditions de la PCR multiplexe pour la détection des gènes AmpC.

Dénaturation initiale		95°C	3min
35 Cycles	Dénaturation	95°C	40sec
	Hybridation	55°C	30sec
	Élongation	72°C	20sec
Élongation finale		72°C	10min

#### 7.5. Electrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification

Les produits d'amplification ont été visualisés après migration sur gel d'agarose à 2% additionné de 6µl de bromure d'ethidium (10 mg/mL). La migration à été effectuée sous une tension de 150V pendant environ 40 min. La taille des produits d'amplification attendue à été comparée au marqueur de poids moléculaire 100 bp (Invitrogen) (Touati, 2006).

#### 7.6. Recherche des gènes *qnr*

- Recherche des gènes *qnr* par PCR multiplexe en temps réel

Les gènes *qnr* sont des gènes de résistance plasmidique aux fluoroquinolones qui agissent en protégeant la cible de ces antibiotiques.

Les gènes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* et *qnrS* ont été recherchés en utilisant la PCR multiplexe en temps réel. Le mix réactionnel de PCR a été préparé à partir d'un kit Faststart DNA Master SYBER Green I Mix (Roche molecular diagnostics, Allemagne) avec des concentrations finales pour chacune des amorces de 1µM. Le programme d'amplification utilisé était le suivant : dénaturation à 95°C pendant 3 minutes afin d'activer la polymérase et de dénaturer l'ADN ; amplification pendant 30 cycles composés de 30S à 94°C, 30S à 55°C puis 30S à 72°C (Guillard *et al.*, 2011).

### 8. Étude de la clonalité des souches par RAPD

RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) est une technique utilisée pour la détection rapide des polymorphismes génétiques utilisant une petite séquence amorce comme séquence arbitraire dans une réaction de PCR. Cette dernière est effectuée dans de faibles conditions de stringence pour générer un ensemble de produits d'amplification spécifiques à la souche qui seront analysés par électrophorèse.

Le Kit Ready-To-Go RAPD (Amersham Bioscience) est utilisé pour réaliser la PCR RAPD en suivant les recommandations du fabricant. On utilise deux amorces.

Primer 4 : 5'-AAGAGCCCGT-3' / Primer 5 : 5'-AACGCGCAAC-3' pour *K. pneumoniae*.

Primer 3 : 5-GTAGACCCGT-3' / Primer 6 : 5-CCCGTCAGCA-3' pour *E. cloacae*.

Les conditions de PCR :

- 1 cycle à 95°C pour 5 min,
- 45 cycles :
  - 95°C pour 1 min,
  - 36°C pour 1 min.
  - 72°C pour 2 min.
- 72°C pour 3 min.

Les produits de l'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5%. La migration est réalisée d'abord pendant 1h à 100 V et ensuite pendant 1h30 à 80 V. Ensuite, on visualise le gel et on compare les différentes bandes d'ADN (Touati *et al.*, 2006).

Tableau N°IX: Liste des amorces utilisées

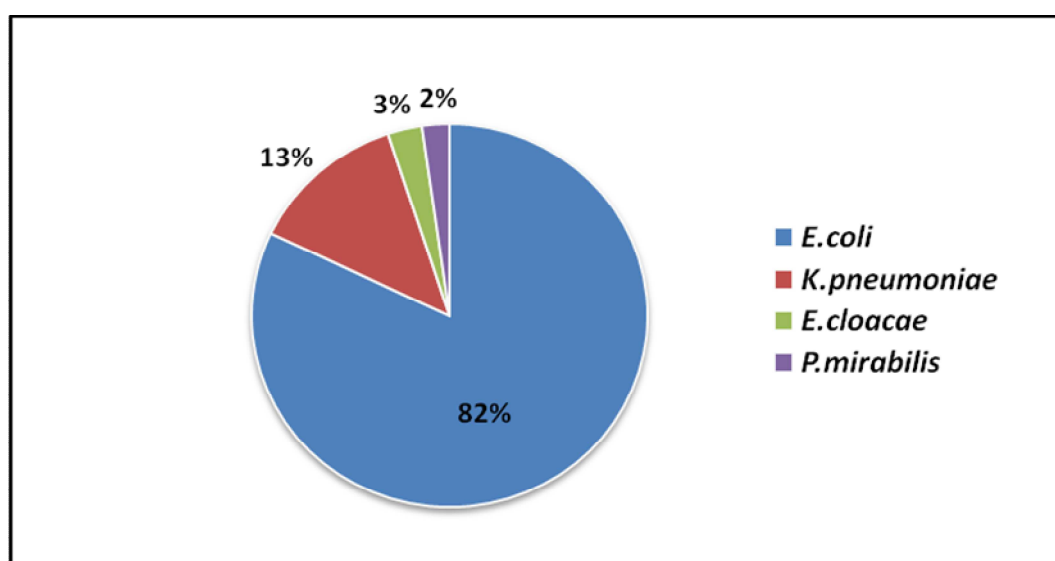
Cible	Amorces	Primer sequence (5' -> 3')	Température d'hybridation (°C)	Références
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM-A	TAAAATTCTTGAAGACG	42	Chanal <i>et al.</i> , 2000
	TEM-B	TTACCAATGCTTAATCA		
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	GES-1A	ATGCGCTTCATTCACGCAC	55	Poirel <i>et al.</i> , 2000
	GES-1B	CTATTGTCCGTGCTCAGG		
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	CTX-M1-A2	CTTCCAGAATAAGGAATC	51	Dutour <i>et al.</i> , 2002
	CTX-M1-B2	CCGTTTCCGTATTACAA		
<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	CMY-2-F	GATAAAGCCGCATTACTGCA	55	Cette étude
	CMY-2-R	CTGGAACGAAGGCTACGTA		
<i>bla</i> <sub>MOX</sub>	MOX-F	ACTGCAATCCCCGAGGA	55	Cette étude
	MOX-R	GAATTGCCCGCCAGCAA		
<i>bla</i> <sub>DHA</sub>	DHA-F	GCCTGTTTGGTGCTCTGA	55	Cette étude
	DHA-R	GCACGGTTATACGGCTGA		
<i>bla</i> <sub>FOX</sub>	FOX-F	AGCAGACCCTGTTTCGAGA	55	Cette étude
	FOX-R	CTATTTGCGGCCAGGTGA		
<i>bla</i> <sub>ACC</sub>	ACC-F	AAAAGTCTGGGTGTGAGCTA	55	Cette étude
	ACC-R	GCCCCATATTGGCTTGCA		
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	VIM-F	CTCGCGGAGATTGARAAGCAAATTG	55	Cette étude
	VIM-R	GAATGCGCAGCACCRGGATAGA		
<i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>	OXA-24-F	TGATGAAGCTCAAACACAGGGTG	55	Cette étude
	OXA-24-R	AGCATCTTAAATGTTGATGCAGGGA		
<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	OXA-23-F	ATGTTGAATGCCCTGATCGGATTG	55	Cette étude
	OXA-23-R	TAGACTGGGACTGCAGAAAGCTT		
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	OXA-48-F	ATGCGTGTRTTAGCCTTATCGGCT	55	Cette étude
	OXA-48-R	AGGTMGATGCGGGTAAAAATGCTTG		
<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	OXA-58-F	AATTGGCACGTCGTATTGGTCCA	55	Cette étude
	OXA-58-R	TGCCCTGGGCTAAATCATAAC		
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	KPC-F	GTCACCCATCTCGGAAAAATATCTG	55	Cette étude
	KPC-R	CGGCGTTACTACTGTATTGCACG		
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	NDM-F	GATTGCGACTTATGCCAATGCGT	55	Cette étude
	NDM-R	GATCCCAACGGTGATATTGTCAC		
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	IMP-F	GGYGTATTATGTTACATACWTCGTT	55	Cette étude
	IMP-R	GAGAAATTAAGCCACTCTATTCC		
<i>qnrA</i>	qnrA-Fu	TTCTCACGCCAGGATTTG	55	Guillard <i>et al.</i> , 2011
	qnrA-Ru	CCATCCAGATCGGCAAA		
<i>qnrB</i>	qnrB-Fu	GGMATHGAAATTCGCCACTG	55	Guillard <i>et al.</i> , 2011
	qnrB-Ru	TTYGCBGYCYGCCAGTCG		
<i>qnrC</i>	qnrC-Fu	ATTACGGGTTGTAATTTGTCTTATG	55	Guillard <i>et al.</i> , 2011
	qnrC-Ru	ATCAGAAAATGATCCCCTACT		
<i>qnrD</i>	qnrD-Fu	GGAGCTGATTTTCGAGGG	55	Guillard <i>et al.</i> , 2011
	qnrD-Ru	AGAAAAATTAGCGTAACTAAGATTTGTC		
<i>qnrS</i>	qnrS-Fu	GTGAGTAATCGTATGTACTTTTGC	55	Guillard <i>et al.</i> , 2011
	qnrS-Ru	AAACACCTCGACTTAAGTCT		

# **II- RESULTATS**

## 1. Souches bactériennes

Au cours de cette étude, 178 souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (céfotaxime et/ou céftazidime) ont été isolées au niveau de deux hôpitaux et quatre laboratoires d'analyses médicales situés à Sana'a, Yémen, durant une période de 4 mois (de Décembre 2012 à Avril 2013).

Selon les résultats de l'identification par la galerie API 20E (Annexe IV) *E. coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec un taux de 82%, suivi par *K. pneumoniae*, *E. cloacae* et *P. mirabilis* avec des taux de 13%, 3% et 2% respectivement (Figure 8).



**Figure 8:** Fréquence des souches d'entérobactéries isolées.

Parmi les souches isolées, 41% (73/178) sont nosocomiales contre 59% (105/178) communautaires (isolées des laboratoires).

### 1.1. Répartition des souches selon l'âge et le sexe des patients

Le tableau N° X montre que les taux d'isolement les plus élevés sont observés dans les catégories d'âge adulte >18-35 ans et >35-65 ans avec des taux de 55.6% (99/178) et 23% (41/178) respectivement. Les souches isolées sont quasiment équivalentes entre patients de sexe féminin et patients de sexe masculin avec des taux de 54% (96/178) et 46% (82 /178) respectivement.

**Tableau N°X** : Répartition des souches par sexe et par catégories d'âge des patients.

Catégories d'âge	Age (ans)	Féminin		Masculin		Total	
		N	%	N	%	N	%
Nourrisson	[0- 2]	1	0.56	1	0.56	2	1.12
Enfant	] 2 – 18]	13	7.30	7	3.93	20	11.23
Adultes	] 18-35]	51	28.65	48	26.96	99	<b>55.61</b>
	] 35-65]	27	15.16	14	7.86	41	23.02
Personnes âgées	] 65- 90]	4	2.24	12	6.74	16	8.98
Total		96	<b>54</b>	82	<b>46</b>	178	100

### 1.2. Répartition des souches selon la nature du prélèvement

Les résultats montrent que plus de la moitié des souches (59.6%) sont d'origine urinaire, et que 19% des souches ont été isolées à partir de pus. La répartition des souches selon l'origine de prélèvement est résumée dans le tableau N°XI.

**Tableau N°XI** : Répartition des souches selon la nature du prélèvement

Sources	Effectifs	Pourcentage (%)
Urine	106	59.6
Pus	34	19
Crachat	6	3.4
Prélèvement vaginal (P.V)	9	5
Sperme	6	3.4
Autres	17	9.5
Total	178	100

## 2. Étude de la sensibilité aux $\beta$ -lactamines

Les 178 souches d'entérobactéries sélectionnées selon leur résistance à la CAZ et /ou CTX ont montré des taux de résistance élevés pour la plupart des  $\beta$ -lactamines. Il est à noter que 5,6% (10/178) des souches testées sont résistantes aux carbapénèmes comprenant 8 souches de *Klebsiella pneumoniae* et 2 souches d'*Enterobacter cloacae* (Tableau N°XII).



Tableau N°XII: Taux de résistance aux  $\beta$ -lactamines par espèces.

		Taux de résistance (%)					
Antibiotique Souche	CAZ	CTX	AMC	FEP	FOX	IMP	ATM
<i>K. pneumoniae</i>	12.92	12.35	11.23	12.92	8.42	4.49	12.92
<i>E. cloacae</i>	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	1.1	2.8
<i>P. mirabilis</i>	2.24	2.48	1.1	2.24	0.56	0	2.24
<i>E. coli</i>	69.66	70.22	67.41	69.1	54.44	0	38.76
Total	87.6	87.9	80.2	87	57.8	5.6	56.7

Ces souches d'entérobactéries présentent également une résistance à d'autres familles d'antibiotiques mis à part les  $\beta$ -lactamines. En effet, des taux de résistance élevés de 78,5%, de 65% et 46,5% ont été enregistrés pour la tétracycline, la ciprofloxacine et la gentamycine (**tableau N° XIII**).

Tableau N°XIII: Taux de résistance aux autres familles d'antibiotiques par espèces

		Taux de résistance (%)				
Antibiotique Souche	TE	AK	GM	CIP	PF	
<i>K. pneumoniae</i>	10.67	5.05	10.11	9.55	8.98	
<i>E. cloacae</i>	1.68	1.68	2.24	2.8	2.24	
<i>P. mirabilis</i>	2.24	2.24	2.24	2.24	2.24	
<i>E. coli</i>	63.9	24.06	31.91	50.52	52.57	
Total	78.5	33	46.5	65	66	

Pour le reste de notre étude, nous nous sommes intéressés uniquement aux souches résistantes ou de sensibilité diminuée aux carbapénèmes (10 souches).

### 3. Analyse des souches résistantes aux carbapénèmes

#### 3.1. Caractéristiques des souches résistantes aux carbapénèmes

Les caractéristiques cliniques des dix souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes sont représentées dans le tableau N°XIV.

**Tableau N°XIV : Caractéristiques cliniques des souches résistantes aux carbapénèmes**

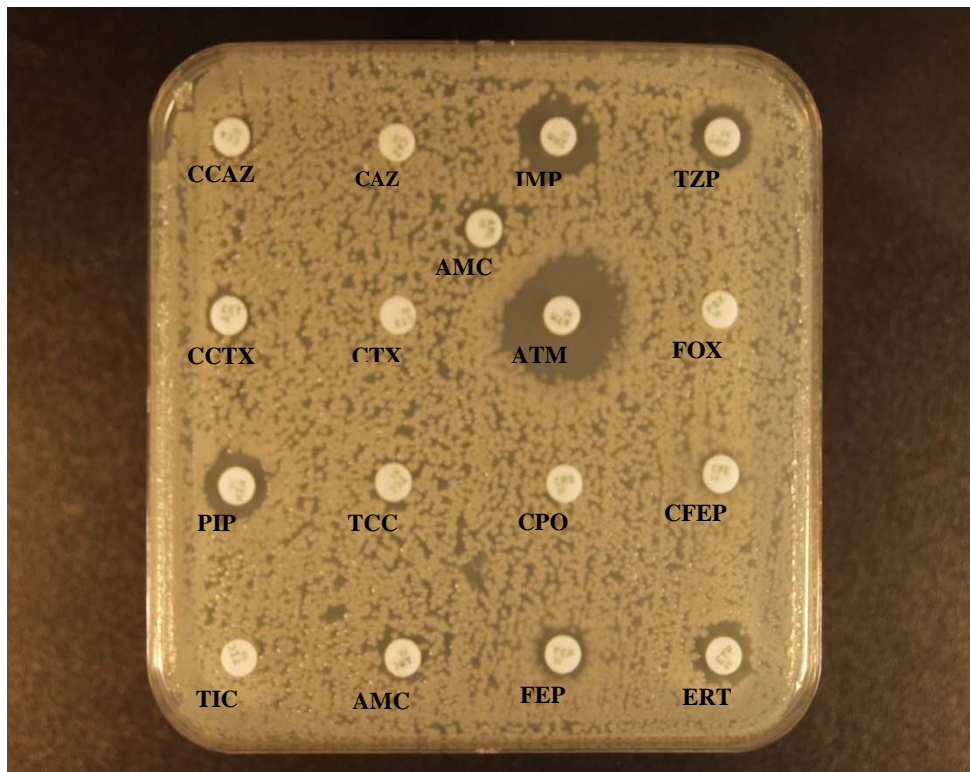
Code	Souche	Date d'isolement	Age	Sexe	Origine	Hôpital/Laboratoire privé
1176	<i>K. pneumoniae</i>	09/02/2013	A	F	L. Ascite	Aulaqi
4161	<i>K. pneumoniae</i>	16/02/2013	E	F	Pus	Aulaqi
4866	<i>K. pneumoniae</i>	18/02/2013	A	F	Urine	Aulaqi
10877	<i>K. pneumoniae</i>	04/02/2013	A	F	Urine	Aulaqi
4644	<i>K. pneumoniae</i>	17/02/2013	A	M	Urine	Aulaqi
3141	<i>K. pneumoniae</i>	13/02/2013	A	F	Sang	Al thawra
27	<i>K. pneumoniae</i>	14/02/2013	A	M	Crachat	Al thawra
18(B)	<i>E. cloacae</i>	26/02/2013	A	M	Pus	Al thawra
18	<i>E. cloacae</i>	05/02/2013	A	M	Pus	saudi german hospital
4166	<i>K. pneumonie</i>	27/02/2013	A	F	Vaginal	Dobhani

Toutes les souches présentant une diminution de la sensibilité aux carbapénèmes ont été isolées durant la même période (février 2013) au niveau de différents sites à savoir, les hôpitaux 'Al thawra' (03 souches) et Saudi-german hospital' (01 souche) et les laboratoires d'analyses médicales privés : Aulaqi (05 souches) et Dobhani (01 souche).

Ces souches sont issues de diverses origines, 3 /10 sont isolées à partir des urines, et 3 /10 de pus. 06 souches ont été isolées des patients du sexe féminin contre 04 chez le sexe masculin.

#### 3.2. Résistance des souches aux $\beta$ -lactamines

Les résultats de l'antibiogramme effectué sur les 10 souches d'entérobactéries montrent que la totalité des souches sont résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines testées (18 molécules testées) avec, néanmoins, une diminution de la sensibilité à l'imipénème, au méropénème et au doripénème pour certaines souches (figure 9) (tableau N°XV).



**Figure 9 :** Résultat de l'antibiogramme ( $\beta$ -lactamines) de la souche d'*E. cloacae* 18B

Tableau N°XV : Sensibilité des souches d'entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines testées

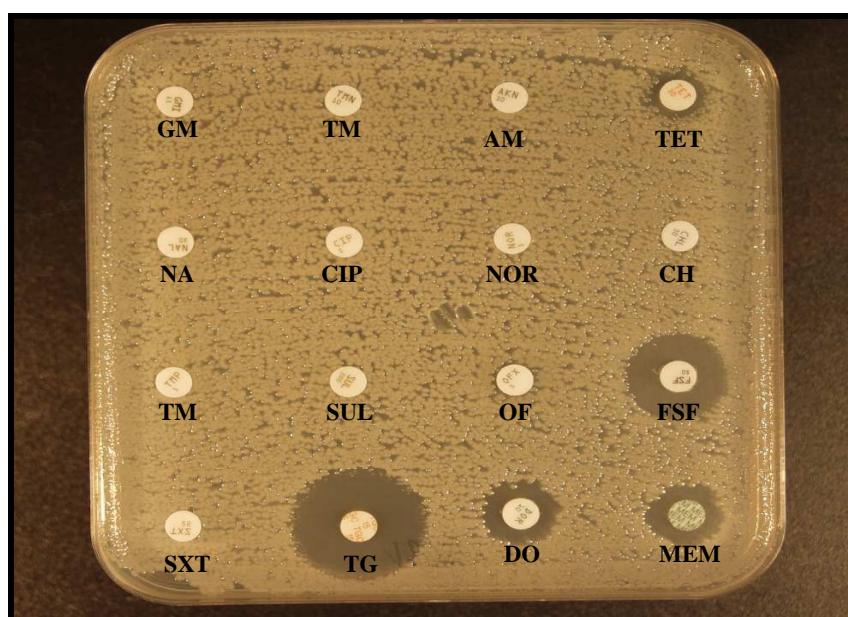
Code	Souche	AMC	PIP	TZP	TIC	TCC	ATM	FOX	CTX	CCTX	CAZ	CCAZ	FEP	CFEP	CPO	ERT	IMP	DOR	MEM
3141	<i>K. pneumoniae</i>	10(R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	9 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	12 (R)	6 (R)	8 (R)	12(R)	17(R)	6 (R)	13(R)	20(I)	17(R)	17(I)
18(B)	<i>E. cloacae</i>	6 (R)	12(R)	10(R)	6 (R)	6 (R)	20 (I)	6 (R)	6 (R)	7 (R)	6 (R)	6 (R)	8 (R)	6 (R)	6 (R)	10(R)	14(R)	13(R)	14(R)
4644	<i>K. pneumoniae</i>	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	8(R)	8 (R)	10(R)
18	<i>E. cloacae</i>	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	22 (I)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	11(R)	12(R)	6 (R)	11(R)	18(I)	15(R)	15(I)
1176	<i>K. pneumoniae</i>	13(R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	10(R)	12(R)	6 (R)	6 (R)	10(R)	6 (R)	9 (R)	12(R)	15(R)	6 (R)	13(R)	21(I)	17(R)	19(I)
4866	<i>K. pneumoniae</i>	12(R)	6 (R)	8(R)	6 (R)	13(R)	10(R)	6 (R)	6 (R)	13(R)	6 (R)	10 (R)	15(R)	18(R)	6 (R)	14(R)	22(I)	19(I)	18(I)
27	<i>K. pneumoniae</i>	6 (R)	6 (R)	10(R)	6 (R)	8 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	13(R)	6 (R)	6 (R)	14(R)	18(R)	6 (R)	14(R)	18(I)	16(R)	17(I)
10877	<i>K. pneumoniae</i>	12(R)	6 (R)	9 (R)	6 (R)	9 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	14(R)	6 (R)	9 (R)	14(R)	19(R)	6 (R)	15(R)	22(I)	19(I)	20(I)
4161	<i>K. pneumoniae</i>	11(R)	6 (R)	9 (R)	6 (R)	10(R)	17(R)	6 (R)	6 (R)	12(R)	6 (R)	11 (R)	16(R)	19(R)	6 (R)	17(R)	22(I)	21(I)	19(I)
4166	<i>K. pneumoniae</i>	12(R)	6 (R)	10(R)	6(R)	10(R)	17(R)	6 (R)	6 (R)	12(R)	6 (R)	9 (R)	18(R)	19(R)	6 (R)	16(R)	23(I)	19(I)	19(I)

**Légende :** **AMC** : Amoxicilline-Acide clavulanique, **PIP** : Pipéracilline, **TZP** : Pipéracilline-Tazobactam, **TIC** : Ticarcilline, **TCC** : Ticarcilline-Acide clavulanique, **ATM** : Aztréonam, **FOX** : Céfoxitine, **CTX** : Céfotaxime, **CCTX** : Céfotaxime-Acide Clavulanique, **CAZ** : Céftazidime, **CCAZ** : Céftazidime-Acide Clavulanique, **FEP** : Céfépime, **CFEP** : Céfépime-Acide Clavulanique, **CPO** : Cefpirome, **ERT** : Ertapénème, **IMP** : Imipénème, **DOR** : Doripénème, **MEM** , **R** : Résistant, **S** : Sensible, **I** : Intermédiaire.

### 3. 3. Étude de la sensibilité aux autres familles d'antibiotiques

La majorité des souches sont résistantes aux autres familles d'antibiotiques (quinolones, aminosides, sulfamides). Toutefois, le chloramphénicol mais surtout la fosfomycine et la tigécyclines restent des molécules actives contre les souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes.

L'indice de multi-résistance (rapport entre nombre d'antibiotiques auxquels la souche est résistante sur le nombre total d'antibiotiques testés) qui renseigne sur le niveau de résistance des souches aux molécules testées est très élevé pour toutes les souches. Ainsi, seule la souche *K. pneumoniae* 4161 est résistante à 09 des 14 antibiotiques testés, alors que les souches de *K. pneumoniae* 1176, 27 et 10877 et *E. cloacae* 18 sont résistantes à 11 des 14 antibiotiques testés. Enfin, les souches de *K. pneumoniae* 3141, 4644 et 4866 et *E. cloacae* 18(B) sont résistantes aux 12 des 14 antibiotiques testés (Figure10) (tableau N°XVI).



**Figure 10** : Résultat de l'antibiogramme (autres que  $\beta$ -lactamines) de la souche d'*E. cloacae* 18B

**Tableau N°XVI:** Sensibilité des souches d'entérobactéries aux antibiotiques autres que les  $\beta$ -lactamines

Code	Souche	AMINOSIDES			QUINOLONES				SULFAMIDES			CYCLINES		PHENICOLS	FOSFOMYCINE	Indice de multi-résistance
		GM	TM	AMK	NAL	CIP	NOR	OFX	TMP	SUL	SXT	TET	TGC	CHL	FSF	
3141	<i>K. pneumoniae</i>	6 (R)	6(R)	6(R)	6(R)	15(R)	8(R)	14(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	22(S)	6(R)	22(S)	0,857
18(B)	<i>E. cloacae</i>	6 (R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	10(R)	23(S)	6(R)	18(S)	0,857
4644	<i>K. pneumoniae</i>	6 (R)	6(R)	15(I)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	22(S)	6(R)	15(S)	0,857
18	<i>E. cloacae</i>	6 (R)	6(R)	6(R)	21(S)	19(R)	15(R)	20(R)	6(R)	6(R)	6(R)	8(R)	23(S)	6(R)	20(S)	0,785
1176	<i>K. pneumoniae</i>	6 (R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	8(R)	6(R)	6(R)	6(R)	22(S)	22(S)	17(R)	21(S)	0,785
4866	<i>K. pneumoniae</i>	8(R)	11(R)	21(S)	16(I)	12(R)	6(R)	13(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	18(I)	27(S)	6(R)	0,857
27	<i>K. pneumoniae</i>	21(S)	8(R)	16(I)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	8(R)	21(S)	25(S)	19(S)	0,785
10877	<i>K. pneumoniae</i>	21(S)	8(R)	14(I)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	6(R)	8(R)	22(S)	24(S)	20(S)	0,785
4161	<i>K. pneumoniae</i>	20(S)	8(R)	15(I)	18(I)	21(R)	18(R)	16(R)	6(R)	6(R)	6(R)	25(S)	23(S)	27(S)	21(S)	0,642
4166	<i>K. pneumoniae</i>	20(S)	10(R)	14(I)	17(I)	20(R)	14(R)	15(R)	6(R)	6(R)	6(R)	24(S)	22(S)	27(S)	20(S)	0,642

**Légende :** **GM:** Gentamicine, **TM:** Tobramycine, **AMK:** Amikacine, **NAL :** Acide nalidixique, **CIP :** Ciprofloxacine, **NOR :** Norfloxacine, **OFX :** Ofloxacine, **TMP :** Triméthoprime, **SUL :** Sulfamides, **SXT :** Triméthoprime/sulfaméthoxazole, **TET :** Tétracycline, **TGC :** Tigécycline, **CHL :** Chloramphénicol, **FSF :** Fosfomycine. **R :** Résistant, **S :** Sensible, **I :** Intermédiaire.

### 3.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les CMI ont été déterminées par la technique d'E-test (figure 11) et sont données dans le tableau N°XVII. Les CMI de la ceftazidime et du céfotaxime sont très élevées (>256 µg/ml). Concernant les carbapénèmes, les CMI de l'értapénème sont légèrement plus élevés comparés au méropénème, doripénème et imipénème : de 6 à >32 µg/ml pour l'értapénème, de 2 à >32 µg/ml pour les trois autres carbapénèmes. Enfin les CMI de l'aztréonam varient de 16 à >256 µg/ml.

Il est à noter que la souche de *K. pneumoniae* 4644 est la plus résistante avec des CMI pour les carbapénèmes >32 µg/ml et des CMI à l'aztréonam, céfotaxime et ceftazidime >256 µg/ml.

**Tableau N°XVII : CMI (µg/ml) des souches résistantes aux β-lactamines**

Code	Souche	MEM	DOR	IMP	ETP	ATM	CTX	CAZ
3141	<i>K. pneumoniae</i>	4	6	3	24	>256	>256	>256
18(B)	<i>E. cloacae</i>	3	4	6	24	16	>256	>256
4644	<i>K. pneumoniae</i>	>32	>32	>32	>32	>256	>256	>256
18	<i>E. cloacae</i>	6	6	4	>32	16	>256	>256
1176	<i>K. pneumoniae</i>	6	6	3	24	>256	>256	>256
4866	<i>K. pneumoniae</i>	2	2	2	16	>128	>256	>256
27	<i>K. pneumoniae</i>	6	6	3	12	>256	>256	>256
10877	<i>K. pneumoniae</i>	3	2	2	8	>256	>256	>256
4161	<i>K. pneumoniae</i>	2	2	2	6	24	>256	>256
4166	<i>K. pneumoniae</i>	2	2	2	6	32	>256	>256



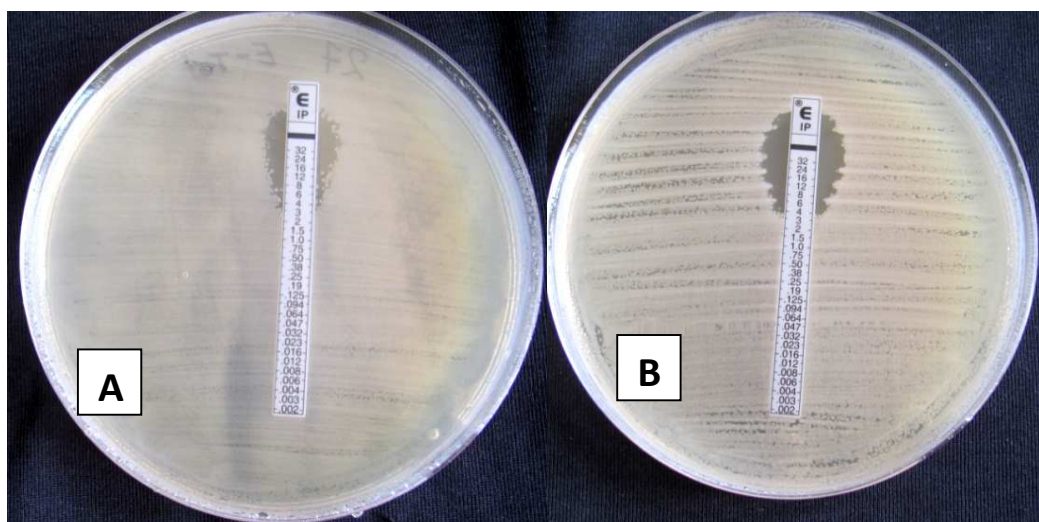


Figure 11 : Résultats de la détermination des CMI de l'imipénème par l'E-test.

A : *K. pneumoniae* 27 (I)

B : *E. cloacae* 18 (I)

#### 4. Caractérisation des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### ➤ Recherche de la production de carbapénèmases (Résultats du Hodge-test)

Le test de Hodge est positif pour toutes les souches (image de trèfle) indiquant la production de carbapénèmases (Figure12).

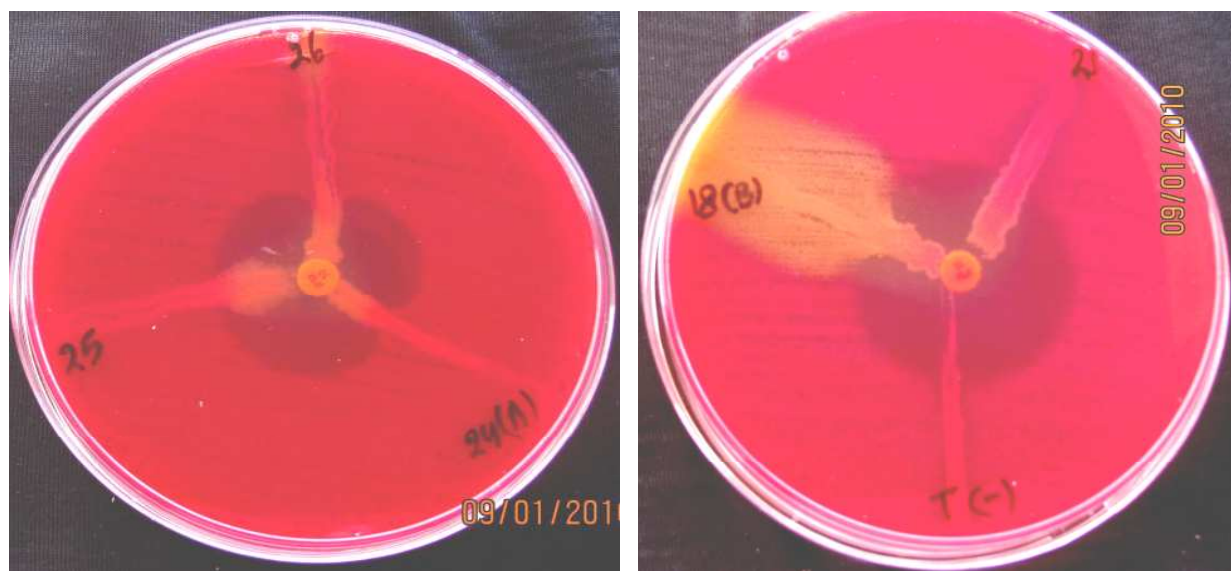
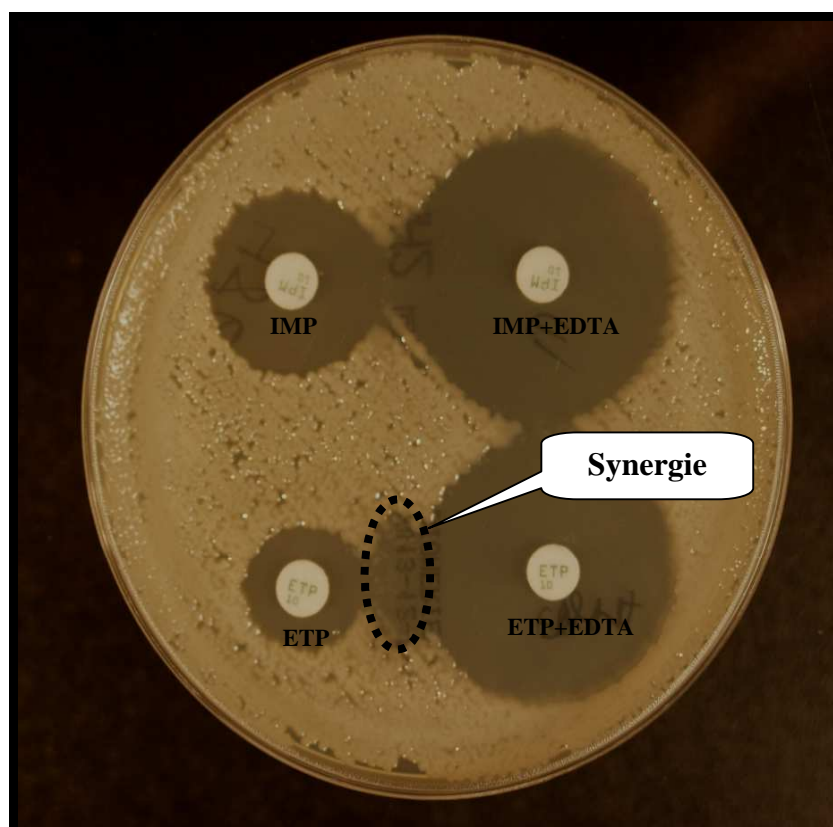


Figure12: Résultats du test de Hodge



➤ **Production des métallob- $\beta$ -lactamases**

Le test à l'EDTA est positif pour toutes les souches, que ça soit, en combinaison avec les disques d'imipénème ou d'értapénème ou par le test de synergie, indiquant, ainsi, la production de carbapénémases de type métallobeta-lactamases, comme l'illustre la figure13.



**Figure 13** : Résultats du test d'inhibition à l'EDTA (Souche de *K. pneumoniae* 4866)

➤ **Recherche des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)**

Une image de synergie a été observée pour 65% (soit 116/178) des souches d'entérobactéries indiquant une production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Parmi les souches BLSE positives, on compte 08 souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes productrices de métallob- $\beta$ -lactamases (**Figure14**).

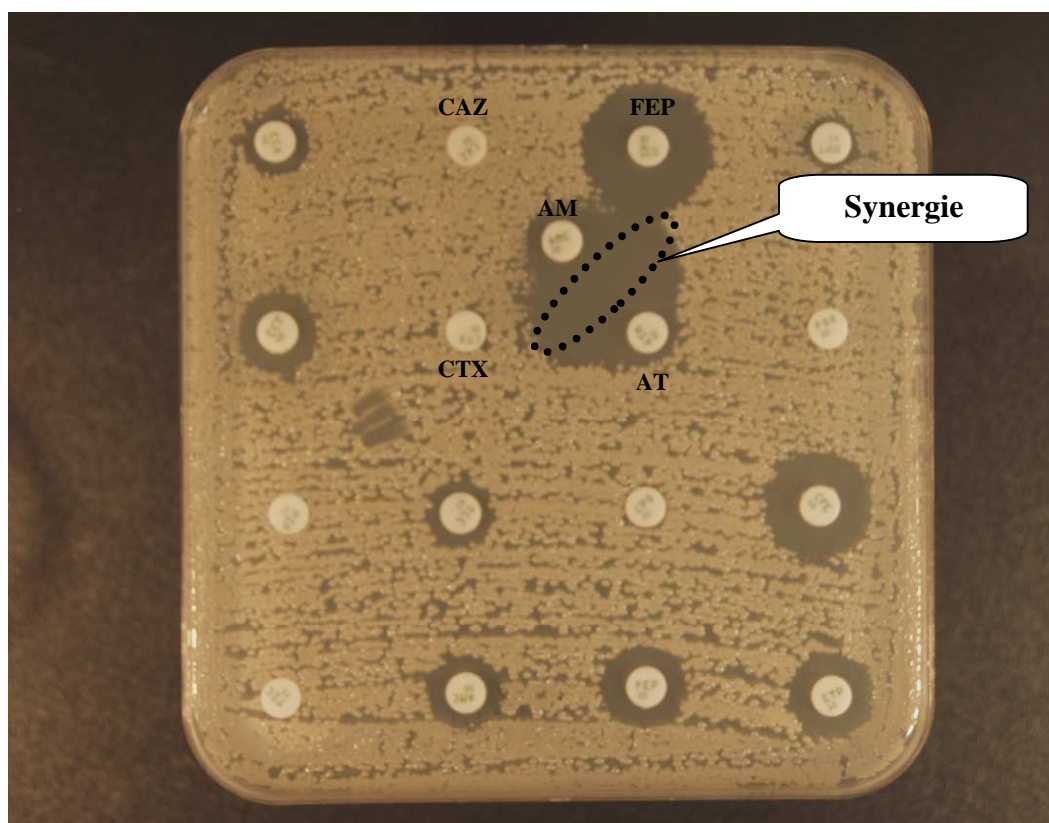


Figure 14 : Image de synergie (Souche de *K. pneumoniae* 4866)

## 5. Caractérisation moléculaire des déterminants de la résistance aux $\beta$ -lactamines

La recherche des différents déterminants génétiques de la résistance aux carbapénèmes (carbapénémases) a été réalisée par une PCR multiplexe. Cette dernière a permis d'obtenir une amplification génique pour le gène *bla<sub>NDM</sub>* chez les 10 souches testées. *bla<sub>TEM-1</sub>* est retrouvée chez 07 souches de *K. pneumoniae* et une souche de *E. cloacae*.

Concernant les souches de *Klebsiella pneumoniae*, qui, en plus de la production d'une carbapénémase de type NDM-1, co-produisent également une BLSE de type CTX-M -15.

Tous les isolats, à l'exception de *K. pneumoniae* 1176, ont été *qnr*-positive : dont cinq (5) *QnrB1* (18, 18B, 4866, 4161 and 4166), deux (2) *QnrA* (3141 and 4644) et deux *QnrS1* (27 et 10877). Les autres PCR sont retrouvées négatives (Tableau N°XVIII)

**Tableau N°XVIII :** Résultats de la PCR des gènes codant pour les NDM-1, les BLSE et les Qnr

Code	Souche	MBL	BLSE	Autres $\beta$ -lactamases	Qnr
3141	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	CTXM-15	Negative	QnrA
18[B]	<i>E. cloacae</i>	NDM-1	Negative	TEM-1	QnrB1
4644	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	CTXM-15	TEM-1	QnrA
18	<i>E. cloacae</i>	NDM-1	Negative	Negative	QnrB1
1176	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	CTXM-15	Negative	-
4866	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	CTXM-15	TEM-1	QnrB1
27	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	CTXM-15	TEM-1	QnrS1
10877	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	CTXM-15	TEM-1	QnrS1
4161	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	CTXM-15	TEM-1	QnrB1
4166	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	CTXM-15	TEM-1	QnrB1

## 6. Transfert des gènes de résistance par conjugaison

Le transfert par conjugaison des gènes de résistance aux antibiotiques a été réalisé pour trois souches de *K. pneumoniae* (3141, 4161, 4866) et a permis d'obtenir trois transconjugants présentant des profils identiques à ceux des souches donatrices.

Les résultats de l'antibiogramme réalisé pour les transconjugants obtenus sont résumés dans le tableau N°XIX.

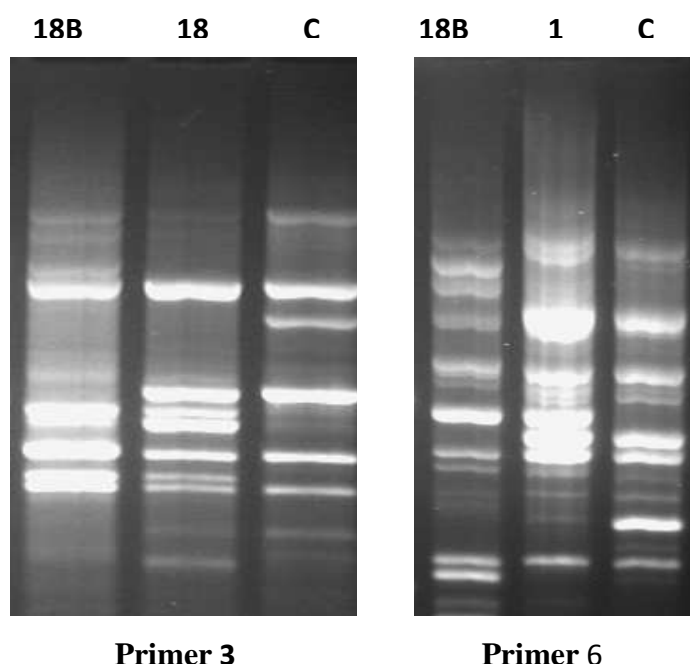
**Tableau N°XIX :** Diamètres des zones d'inhibition obtenus pour les transconjugants

(en mm)

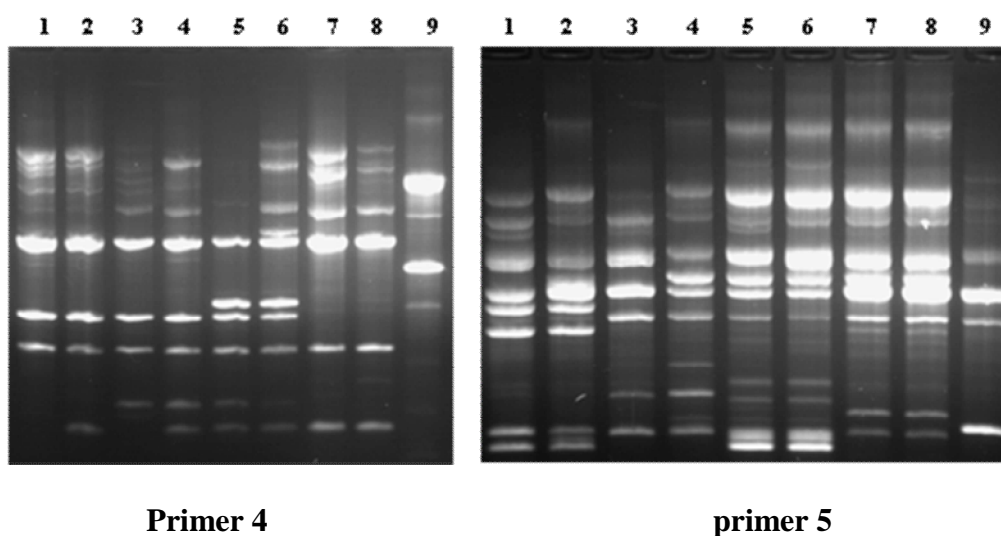
Code	souche	CAZ	CTX	AMC	ATM	IMP	FOX
3141	<i>K. pneumoniae</i>	6	6	8	6	9	6
4161	<i>K. pneumoniae</i>	6	6	10	13	15	6
4866	<i>K. pneumoniae</i>	6	6	10	10	17	6
TC 3141	<i>E. coli</i>	6	9	6	6	18	6,5
TC 4161	<i>E. coli</i>	6	8	6	6	18	6
TC 4866	<i>E. coli</i>	6	6	6	6	16	6

### 7. Étude de la clonalité des souches par la technique RAPD

Les 10 souches d'entérobactéries productrices de NDM-1 ont été typées par RAPD afin de déterminer une relation clonale entre ces souches. Après amplification par PCR et visualisation des produits de l'amplification. Le profil RAPD des 10 souches est représenté dans les figures 15 et 16.



**Figure15:** Profil de RAPD des souches d'*E. cloacae*



**Figure16:** Profil de RAPD des souches de *K. pneumoniae*

**Légende:** C: souche de contrôle *E. cloacae*, 1: Kp 3141, 2: Kp 4644, 3: Kp 1176, 4: Kp 4866, 5: Kp 27, 6: Kp 10877, 7: Kp 4161, 8: Kp 4166 et 9: souche de contrôle *K. pneumoniae*.

Les résultats montrent différents profils pour les souches d'*E. cloacae* 18b et 18 et ce pour les deux amorces utilisées, indiquant l'absence d'une relation clonale entre ces deux souches.

Concernant les souches de *K. pneumoniae*, à partir des résultats obtenus par les deux amorces, on pourrait supposer qu'il y a 5 groupes clonaux qui ont été distingués par la RAPD, le premier renfermant les souches 3141 et 4644, le deuxième inclus les souches 27 et 10877 et le troisième renferme les souches 4161 et 4166. Enfin, les souches 1176 et 4866 qui forment chacune un groupe à part entière.

# **III- DISCUSSION**

## Discussion générale

La famille des entérobactéries joue un rôle essentiel dans les infections transmises en milieu hospitalier et extra-hospitalier. Elles sont capables de développer de nombreux mécanismes de résistance tels que la production de  $\beta$ -lactamases de type BLSE, KPC, ou AMPC. Les carbapénèmes constituent souvent les seules armes contre bon nombre de bactéries à Gram négatifs multi-résistantes, en particulier les productrices de  $\beta$ -lactamase à Spectre Étendu (BLSE). Cependant, la production de carbapénémases par les bactéries, contre-indique un traitement aux carbapénèmes. L'émergence et la diversité des souches productrices de carbapénémases sont donc particulièrement préoccupantes (Guzek *et al.*, 2013).

Ainsi, le but de ce travail était de déterminer la prévalence de la résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération isolées au niveau d'hôpitaux et de laboratoires d'analyses médicales situés au Yémen, mais aussi de caractériser les déterminants moléculaires de la résistance aux  $\beta$ -lactamines et de rechercher la clonalité entre les souches. Il est à noter qu'à ce jour, cette région n'a fait l'objet d'aucunes publications concernant les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries.

Dans notre étude, sur les 178 souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, 65% (116/178) sont productrices de BLSE et 5,6% soit 10/178 sont résistantes aux carbapénèmes dont 3 souches isolées à l'hôpital universitaire Al Thawra. Alors que, dans une étude antérieure réalisée dans ce même hôpital au niveau du service de néonatalogie sur des souches de bacilles à Gram négatif isolées entre Avril 2008 et Mars 2009 aucune souche résistante à l'imipénème n'a été enregistrée (Al-Shamahy *et al.*, 2012). Les carbapénèmes incluent le seul groupe d'antibiotiques à faible toxicité utilisé lors des traitements d'infections dues aux entérobactéries productrices de BLSE (EBLSE). Toutefois, l'utilisation des carbapénèmes en thérapeutique a été suivie rapidement par la description de souches résistantes chez les entérobactéries. Ainsi, une augmentation de moins de 0,1% à 4,5% a été rapportée entre 2002 et 2010 chez des souches de *K. pneumoniae* isolées aux Etats Unis (Braykov *et al.*, 2013). De plus, les travaux de Armand-Lefèvre *et al* (2013) ont permis de constater que le taux de résistance à l'imipénème a augmenté de 5,9% à 7,8% chez des patients porteurs de BLSE ayant été exposés à cet antibiotique durant 1 à 3 jours, et ont pu conclure par la suite que la consommation d'imipénème, même dans une période assez courte, est belle et bien un facteur de risque dans l'acquisition de la résistance.

Les souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes ont été retrouvées aussi bien chez les patients hospitalisés (5,4% soit 4/73) que chez les patients extra-hospitaliers (5,7% soit 6/105). Plusieurs travaux ont décrit la dissémination de la résistance aux carbapénèmes un peu partout dans le monde. Une étude a rapporté que 49/62 soit 79 % des souches d'entérobactéries isolées à l'hôpital de Wenzhou (Chine) entre 2007 et 2010, étaient résistantes aux carbapénèmes (Zhou *et al.*, 2013). Rastegar Lari *et al.* ont rapporté une prévalence de 54% (19/35) de souches de *Klebsiella spp* résistantes à l'imipénème isolées chez 28 patients brûlés hospitalisés en Iran durant 6 mois (Rastegar Lari *et al.*, 2013). Dans cette même région, un taux de résistance à l'imipénème de 19.3% a été enregistré chez des souches d'entérobactéries d'origine clinique et communautaire isolées en 2010 (Hashmi *et al.*, 2013). Contrairement aux travaux réalisés par (Nüesch-Inderbinen *et al.*, 2013) en Suisse qui n'ont identifié aucune souche d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes en communauté.

3/10 des souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes ont été isolées à partir des prélèvements urinaires ou de pus et 1/10 à partir de sang, de crachat, de prélèvements vaginal (PV) ou de fluide ascite. La répartition de ces souches est presque équivalente entre les patients de sexe féminin (06 souches) et les patients de sexe masculin (04 souches) et plus fréquemment chez la catégorie d'âge adulte (8/10 souches). Tandis que, 1/10 souches est issue de la catégorie de personnes âgées ou enfants. Au contraire, Braykov *et al.* (2013) ont rapporté que la majorité des souches de *K pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes ont été isolées chez des patients âgés de plus de 65 ans.

Parmi les souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, 08 sont des *K. pneumoniae* et 02 sont des *E. cloacae*. Tandis que, toutes les souches de *E. coli* (142 souches) restent sensibles aux carbapénèmes. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés dans une étude menée sur des souches uropathogènes d'origine communautaire isolées en Inde et qui montre un taux de résistance à l'imipénème de 0% (0/66) pour les souches de *E. coli* et un taux de 75,86% (23/29) pour les souches de *K. pneumoniae* (Prakash *et al.*, 2013). Une autre étude réalisée à l'hôpital de King Fahd en Arabie Saoudite a rapporté un taux de résistance à l'imipénème de 8,29% parmi des *E. coli* productrices de BLSE (Al-Zahran *et al.*, 2005).

Les 10 souches d'entérobactéries sont résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines testées (18 molécules testées), mais présentent néanmoins une variabilité quand au niveau de résistance aux carbapénèmes. Ainsi, 100% des souches sont résistantes à l'ertapénème avec des CMI



allant de 6 µg/ml à 32 µg/ml. Tandis que, pour le doripénème, l'imipénème et le méropénème les souches y sont résistantes ou de sensibilité diminuée (CMI de 2µg/ml à >32 µg/ml).

Le test de sensibilité aux autres familles d'antibiotiques montre que les 10 souches de *K. pneumoniae* et *E. cloacae* sont pratiquement résistantes à tous les antibiotiques, mis à part, la fosfomycine et le chloramphénicol pour certaines souches. La tigécycline reste, néanmoins, le seul antibiotique réellement efficace contre les souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes. De même, Dizbay *et al* (2014) ont rapporté un taux de résistance élevé à plusieurs familles d'antibiotiques parmi des souches de *Klebsiella sp* résistantes aux carbapénèmes excepté pour la colistine et la tigécycline. Ces deux molécules pourraient donc être considérées comme le seul traitement vis-à-vis des souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes. Toutefois, leur efficacité dans le cas d'infections sévères n'est pas prouvée sans oublier que pour la colistine, certaines espèces (*Proteus sp*, *Serratia sp*) sont intrinsèquement résistantes.

L'augmentation de l'utilisation de la colistine pour le traitement des infections à bacilles à Gram négatif multirésistants, telles que les souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases a conduit à une augmentation des fréquences de résistance à cet antibiotique (Bogdanovich *et al.*, 2011). Au cours des dernières années, la colistine est devenue le dernier recours pour le traitement des infections causées par les bactéries à Gram négatif multirésistantes. Le taux croissant de résistance à la colistine montre que cet antibiotique ne doit plus être considéré comme un remède universel (Arpin *et al.*, 2012).

L'analyse phénotypique de résistance aux carbapénèmes a montré que les 10 souches (8 *K. pneumoniae* et 2 *E. cloacae*) étaient productrices de carbapénémases de type métallo-β-lactamase (présence de synergie avec l'EDTA). La caractérisation moléculaire a permis de détecter la présence de l'enzyme NDM-1 chez toutes les souches le plus souvent associée aux BLSE de type CTX-M-15 et/ou TEM-1. Cette étude décrit pour la première fois la dissémination de BLSE et de NDM-1 parmi des souches d'entérobactéries isolées au Yémen. La prévalence des souches productrices de carbapénémases de type NDM-1 est de 5,6%. Des études antérieures réalisées en Asie ont rapporté des taux variables. Ainsi, des études réalisées en Inde indiquent la prévalence locale : un hôpital à Varanasi (Nord) a identifié une prévalence de 6,9% chez 780 souches d'entérobactéries isolées chez des patients ambulatoires et des patients hospitalisés entre Février 2010 et Juillet 2010 (Seema *et al.*, 2011), avec des données très semblables (5-8% de prévalence selon le type de spécimen) chez les

entérobactéries isolées dans un grand hôpital de Mumbai (Desphande *et al.*, 2010a ; Desphande *et al.*, 2010b), alors que une prévalence de 18,5% a été enregistrée en ambulatoire à Rawalpindi, au Pakistan (Perry *et al.*, 2011). Au Singapour, la prévalence semble plus élevée, de 32,5% (Teo *et al.*, 2013). Cette prévalence est plus faible au Bangladesh qui est de 2,73% (Islam *et al.*, 2012). Au Moyen Orient, la prévalence est de 20% en Arabie Saoudite (Shibl *et al.*, 2013). En Roumanie (Europe), la prévalence est très faible avoisinant les 4% (Székely *et al.*, 2013).

Les enzymes CTX-M-15 sont connues comme étant les BLSE les plus prédominantes. Elles possèdent une capacité de diffusion et d'évolution importante parmi les souches d'entérobactéries (Bonnet, 2006). Ainsi, les résultats montrent que les 08 souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes sont toutes productrices de BLSE de type CTX-15.

Le type de BLSE prédominant dans la plupart des pays du Golf appartiennent à la famille CTX-M (Figure 17), en Arabie Saoudite, le sous-groupe CTX-M-like 1 (Al-Agamy *et al.*, 2009) et les CTX-M-15 au Koweït (Rotimi *et al.*, 2008), aux Émirats Arabes Unis (Alfaresi *et al.*, 2011), et à Oman (Poirel *et al.*, 2011a) (**tableau N°XX**).

Cette prévalence élevée peut avoir comme origine les immigrants en provenance de pays avec un taux élevé de Entérobactéries CTX-M-15, comme caractérisé au Koweït, où la majorité des producteurs des CTX-M-15 étaient des patients du sud d'Asie et non-Arabs koweïtiens (Ensor *et al.*, 2009). Environ la moitié de la population du Koweït est originaire du sous-continent indien et d'autres pays du Moyen-Orient (Kapiszewski, 2006). Le clone pandémique *E. coli* ST131 a été bien décrit au Koweït (Coque *et al.*, 2008 ; Dashti *et al.*, 2011). Le clone ST131 souvent produit des CTX-M-15 (Rogers *et al.*, 2011). La structure socio-économique des États du Conseil de Coopération du Golf (CCG) dépend fortement de la main-d'œuvre en provenance de l'Asie du Sud : environ 37 % la population total des États du CCG sont des expatriés internationaux, principalement du sous-continent indien (Kapiszewski, 2006). Il est bien connu que les BLSE de type CTX-M-15 sont omniprésentes dans le sous-continent indien (Baby Padmini *et al.*, 2008).

Actuellement, les carbapénèmes chez les entérobactéries se trouvent principalement chez *K. pneumoniae*, et dans une moindre mesure, chez *E. coli* et d'autres entérobactéries, avec une prévalence plus élevée en Europe du Sud et en Asie que dans d'autres régions du monde. Il a été récemment suggéré que la propagation mondiale des entérobactéries productrices de carbapénèmes sera dominée en milieu hospitalier par *K. pneumoniae*

exprimant tous les types de carbapénemases, principalement KPC, VIM, NDM, et OXA-48, et dans la communauté par *E. coli* exprimant enzymes de types NDM ou OXA (OXA-48 et OXA-181) (Nordmann *et al.*, 2011). Parmi nos souches, il y avait 8 *K. pneumoniae* et 2 *E. cloacae* hébergeant le gene *bla*<sub>NDM-1</sub>. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures qui ont révélé la nature MDR des souches *K. pneumoniae bla*<sub>NDM-1</sub> positifs (Peirano *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2011b; Shoma *et al.*, 2014).

La plupart des souches *bla*<sub>NDM-1</sub> positives co-hébergeaient un gène de BLSE, le plus souvent le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Les gènes *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> et *bla*<sub>OXA-10</sub> ont également été fréquemment détectés. Parmi les plasmides qui codent pour la résistance aux quinolones, les gènes de type *qnr* ont été identifiés dans quelques cas, ainsi que le gène codant pour l'*aac(6)-Ib-cr*. Dans notre étude, la NDM-1 a été co-exprimé avec CTX-M-15 et TEM-1. Parmi les 10 entérobactéries productrices de NDM-1, les 9 gènes *qnr* ont été détectés. Ainsi, 5 d'entre elles sont productrices de *qnrB1*, 2 de *qnrA* et 2 de *qnrS*. L'association de gènes *qnrB* avec *bla*<sub>NDM-1</sub> observée dans cette étude était similaire à ce qui a été rapportée en Egypte (Abdelaziz *et al.*, 2013), au Maroc (Poirel *et al.*, 2011c), en Australie (Shoma *et al.*, 2014), au Singapour (Teo *et al.*, 2013), en Inde (Khan et Nordmann, 2012), en Belgique (Bogaerts *et al.*, 2011) et en France (Arpin *et al.*, 2012). Comme décrite précédemment, l'association entre les gènes *qnrS* et *bla*<sub>NDM-1</sub> (Peirano *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2012) a également été observée dans cette étude. Les Souches co-productrices de NDM-1 et *qnrA* ont déjà été signalées au Bangladesh (Islam *et al.*, 2012). Cette association n'a pas été signalée dans le Moyen-Orient.

Depuis le premier cas d'infection causée par une bactérie produisant une NDM-1 en 2008 (Kumarasamy *et al.*, 2010), cette enzyme connaît déjà une diffusion internationale importante incluant plus de 40 pays à travers le monde englobant tous les continents mis à part l'Antarctique (tableau N°XX) (Johnson et Woodford, 2013). En Péninsule arabique, les NDM-1 connaissent une forte diffusion parmi les souches d'entérobactéries (**figure 17**). Les premières souches productrices des NDM-1 ont été détectées en Oman. L'une des deux souches était clonale à la souche identifiée précédemment en Inde, ce qui suggère fortement son importation de l'Inde. Cela souligne en outre que le sous-continent indien peut être un important réservoir de NDM-1. Cela est particulièrement préoccupant dans le Sultanat d'Oman, où jusqu'à 450 000 citoyens indiens ou pakistanais vivent (Poirel *et al.*, 2011a). Plus tard, les souches productrices des NDM-1 ont été signalées au Koweït (Jamel *et al.*, 2012), Émirats arabes unis (Sonnevend *et al.*, 2012) et en Arabie Saoudite (Al-Agamy *et al.*, 2013; Shibl *et al.*, 2013). Cette diffusion peut être attribuée à des interactions entre les différentes

populations et communautés dans ces pays (El-Herte *et al.*, 2012). Le rôle de voyages internationaux dans la propagation des NDM-1 est bien documenté (Canton *et al.*, 2012) comme les touristes, les travailleurs étrangers, les immigrants ou réfugiés. Le Moyen-Orient est une zone d'intérêt particulier à cet égard. Dans certains pays, comme l'Arabie Saoudite ou les Émirats arabes unis, environ un habitant sur trois sont des travailleurs étrangers, principalement de l'Égypte, l'Inde, le Yémen, le Pakistan et les Philippines (Abdelaziz *et al.*, 2013). Par exemple, plus de 1,5 million de pèlerins étrangers de différentes nations voyage en Arabie saoudite au cours de la même période chaque année pour effectuer le Hajj (Memish , 2010). Habituellement les groupes de pèlerins de différents pays se rendent à La Mecque et à Médine avec leurs propres professionnels de santé. Cependant, les cas critiques sont traités dans des centres médicaux satellites (Al-Ghamdi *et al.*, 2003) et dans les hôpitaux locaux basés dans les villes saintes (Bukhari *et al.*, 2008). Dans une autre étude, il a été constaté que les épisodes de septicémie dans les hôpitaux de la Mecque sont augmentés de 16,5% pendant la période du Hadj en raison de l'afflux de patients étrangers (Asghar , 2006). En outre, il est également intéressant de noter que le "tourisme médical " est une industrie en croissance dans les pays arabes. Le tourisme médical implique non seulement les chirurgies esthétiques, mais aussi la chirurgie correctrice (Al- Hinai *et al.*, 2011). Les exemples actuels et spécifiques de la propagation internationale des bactéries résistantes aux antibiotiques en raison de l'hospitalisation sont les isolats *K. pneumoniae* NDM-1 positif de patients omanais qui avaient voyagé en Inde et au Pakistan (Poirel *et al.*, 2011a). Dans une autre étude, Poirel *et al.* ont rapporté un transfert de NDM-1 d'Irak en France par un touriste médical irakien (Poirel *et al.*, 2011b) . A Yémen, à l'hôpital Al Thawra, certain personnel soignant sont originaires d'Inde. Ainsi, les voyages dans les pays où les BLSE et les MBL sont endémiques est un facteur de risque évident. Toutefois, à ce jour, aucune NDM-1 n'a été signalée au Qatar et Bahrain (Zowawi *et al.*, 2013).

De plus, de nombreux autres facteurs jouent un rôle déterminant dans l'émergence de la résistance dans les pays de la péninsule arabique telle que la consommation abusive et anarchique des antibiotiques et l'utilisation des mêmes molécules pour les humains et les animaux. En outre, le manque d'études identifiant les mécanismes de résistance ne permet pas une bonne surveillance de la diffusion de la résistance afin de mieux la contrôler (Zowawi *et al.*, 2013).

L'essai de transfert par conjugaison a été réalisé sur 3 souches de *K. pneumoniae*. (3141, 4161,4866) donnant 3 transconjugants présentant une résistance au céfotaxime, au

céftazidime, à l'aztréoname, à la céfoxitine et une sensibilité diminuée à l'imipinème. Ce qui pourrait suggérer le transfert des plasmides porteurs des gènes codant pour NDM-1 (résistance à l'imipinème) et pour les BLSE (résistance à l'aztréonam).

Les gènes *bla*<sub>NDM-1</sub> peuvent être portés par différents types de plasmides (IncA/C, IncF, IncL/M, or untypable) et plus rarement intégrés dans le chromosome et que la majorité sont transférables par conjugaison *in vitro* même entre différentes espèces (Nordmann *et al.*, 2011).

Tableau N°XX: Dissémination mondiale des NDM-1 chez les patients ayant une relation épidémiologique avec le subcontinent indien

Pays	Année d'isolement	Espece	Source	Historique du patient	Références
Canada	2011	<i>K. pneumoniae</i>	Urine	Hospitalisé en Inde 2 mois auparavant	Peirano et al. (2011b)
Australie	2010	<i>K. pneumoniae</i>	Urine	Antibiothérapie en Inde 3 mois auparavant	Sidjabat et al. (2011)
États unies	2011	<i>K. pneumoniae</i>	Crachat	Hospitalisé en Inde un mois auparavant	Savard et al. (2011)
		<i>Salmonella sp.</i>	Écouvillon rectal		
<b>Europe</b>					
Autriche	2010	<i>Escherichia coli</i>	Blessure	Voyage en Inde	Zarfel et al. (2011b)
Belgium	2010	<i>Escherichia coli</i>	Pus	Patient transféré d'un hôpital du Pakistan	Bogaerts et al. (2010)
Finland	2011	<i>E. coli</i>	Urine	Voyage en Inde	osterblad et al. (2012)
France	2011	<i>E. coli</i>	fèces	Retour d'Inde	Birgy et al. (2011)
Allemagne	2009	<i>E. coli</i>	sécrétions trachéales	Hospitalisé en Inde 3 mois auparavant	Pfeifer et al. (2011b)
Italie	2011	<i>K. pneumoniae</i>	Urine	Hospitalisation antérieur en Inde	Gaibani et al. (2011)
Espagne	2010	<i>K. pneumoniae</i>	Abcès péritonéal	Hospitalisation antérieur en Inde	Oteo et al. (2012)
Irlande	2011	<i>K. pneumoniae</i>	Urine	Enfant de 6 mois né en Inde	McDermott et al. (2012)
<b>Asie</b>					
Chine	2010	<i>K. oxytoca</i>	Abcès pelvien	Patient transferred from a hospital in Nanchang Province of Jangxi in China	Lai et al. (2011)
Japan	2009	<i>E. coli</i>	Sang	Hospitalisé en Inde 1 mois auparavant	Chihara et al. (2011)
Kuwait	2010	<i>K. pneumoniae</i>	écouvillon sur une blessure dans la région sacrée	Retour d'Inde	Jamal et al. (2012)
Oman	2011	<i>K. pneumoniae</i>	Abdomen	voyage en Inde	Dortet et al. (2012b)
Irak	2011	<i>K. pneumoniae</i>	Sang	Patient transfert d'un hôpital en Irak vers la Turquie	Poirel et al.,(2012c)

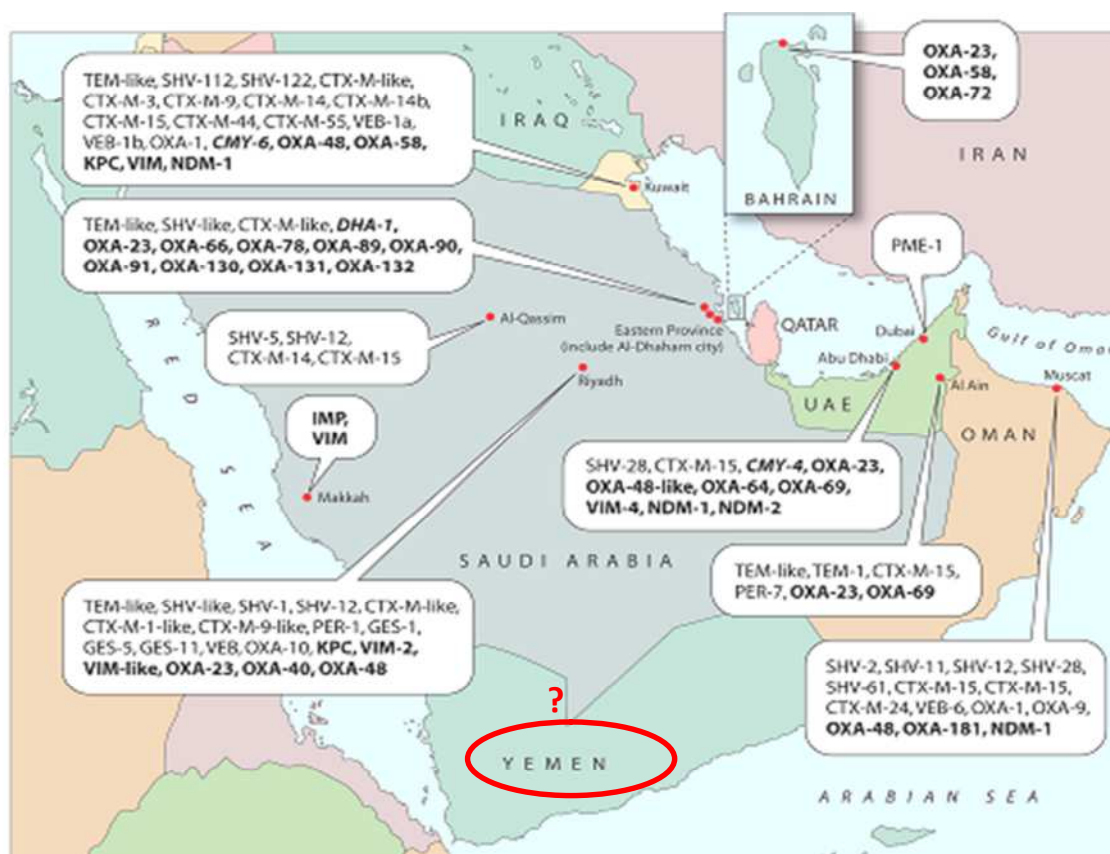


FIG 1 Geographical distribution of  $\beta$ -lactamases produced by GNB in the GCC states. The country and city correspond to those where the isolate has been recovered or originated. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases are shown in normal font, while the enzymes in bold font are carbapenemases. AmpC enzymes are shown in bold italic font.

**Figure 17 :** Diffusion géographique des  $\beta$ -lactamases produites chez les bacilles à Gram négatif au niveau des Golf (Zowawi *et al.*, 2013).

Les souches productrices de NDM-1 non répétitives ont toutes été isolées durant la même période, à savoir, en février 2013, dans différents sites, mais à des distances assez proches (environ 10 Km) : 3 souches (2 *K. pneumoniae* et 1 *E. coli*) isolées à l'hôpital Al Thawra, 5 souches (*K. pneumoniae*) isolées au laboratoire d'analyses médicales Aulaqi, 1 souche (*E. coli*) isolée à l'hôpital Saudi German et 1 souche (*K. pneumoniae*) isolée au laboratoire d'analyses médicales Dobhani. Ces souches ont, globalement, le même profil de résistance, particulièrement, pour les 5 souches de *K. pneumoniae* (4866, 27, 10877, 4161 et 4166) qui présentent toutes la co-expression des gènes *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>CTXM-15</sub> et *bla*<sub>TEM-1</sub>. Ce qui pourrait suspecter la dissémination de souches épidémiques. La technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) permet justement de discriminer les différents groupes clonaux. Ainsi, les résultats montrent que les deux souches de *E. coli* (18b et 18) sont totalement différentes (différents profils). Concernant les 8 souches de *K. pneumoniae*, 5 groupes clonaux ont été

distingués, le premier renfermant les souches 3141 et 4644, le deuxième inclus les souches 27 et 10877 et le troisième renferme les souches 4161 et 4166. Enfin, les souches 1176 et 4866 qui forment chacune un groupe apparentière.

La diversité génétique des souches productrices de NDM-1 peut être due au transfert horizontal des gènes codant pour ces enzymes. Bien que, ce type de transfert n'est pas le mécanisme le plus fréquent lors de dissémination de souches productrices de NDM-1. Cette diversité entre les souches suggère de multiple sources et d'origines ainsi que la forte pression de sélection de la population bactérienne. De même, une étude antérieure sur l'épidémiologie des souches de *K pneumoniae* productrices de NDM-1 par la technique de RAPD a rapporté que parmi 16 souches isolées durant la même période en Inde, 12 groupes clonaux ont été identifiés dont un groupe contenant 4 souches, ces souches étaient isolées chez des nouveaux nés admis au service de soins intensifs. L'épidémiologie des souches productrices de NDM-1 dans cet hôpital est représentative de la divergence d'acquisition de plusieurs clones avec une dissémination limitée entre patients soulignant ainsi la nécessité de gérer au mieux l'utilisation des d'antibiotiques au sein du services de soins intensifs (Shanthi *et al.*, 2013).



# CONCLUSION

## Conclusion

Dans la présente étude, des souches d'entérobactéries ont été collectées au niveau de deux hôpitaux ainsi qu'au niveau de quatre laboratoires d'analyses médicales situés au Yémen durant une période de 4 mois (de Décembre 2012 à Avril 2013).

Parmi les souches d'entérobactéries isolées, 82% sont des *E. coli*, suivi par *K. pneumoniae* et *E. cloacae* et *P. mirabilis* avec des taux de 13%, de 3% et de 2% respectivement. Ces souches ont présenté des hauts niveaux de résistance aux  $\beta$ -lactamines (>80%), avec un taux de 5,6% (10/178) de souches sont résistantes aux carbapénèmes (CMI de 2 à >32  $\mu$ g/ml).

Ces travaux ont permis de constater la dissémination des souches multirésistantes au Yémen aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu extrahospitalier. En effet, 65% (116/178) des souches isolées sont probablement productrices de BLSE. Toutes les souches présentant une diminution de la sensibilité aux carbapénèmes ont été isolées durant la même période (février 2013), on peut constater une dissémination des souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, aussi bien, dans le milieu hospitalier que dans le milieu communautaire.

Parmi les souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, 08 sont des *K. pneumoniae* et 02 sont des *E. cloacae*. Tandis que, toutes les souches de *E. coli* (142 souches) restent sensibles aux carbapénèmes. Les 10 souches de *K. pneumoniae* et *E. cloacae* sont pratiquement résistantes à tous les antibiotiques, mis à part, la fosfomycine et le chloramphénicol pour certaines souches. La tigécycline reste, néanmoins, le seul antibiotique réellement efficace contre les souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes.

L'analyse phénotypique de résistance aux carbapénèmes a montré que les 10 souches (8 *K. pneumoniae* et 2 *E. cloacae*) étaient productrices de carbapénémases de type métallo- $\beta$ -lactamase (présence de synergie avec l'EDTA).

La caractérisation moléculaire a permis de détecter la présence de l'enzyme NDM-1 chez toutes les souches le plus souvent associée aux BLSE de type CTX-M-15 et/ou TEM-1. Cette étude décrit pour la première fois la dissémination de BLSE et de NDM-1 parmi des souches d'entérobactéries isolées au Yémen.

Ce qui est plus inquiétant, c'est bien le fort taux de résistance aux carbapénèmes (imipénème) qui sont considérés comme étant la dernière classe d'antibiotiques utilisables dans les infections à germes producteurs de BLSE. Les carbapénèmes sont donc des molécules précieuses qu'il convient de préserver par, notamment, la sensibilisation de la population et du corps médical sur l'utilisation abusive de ces molécules car, à notre connaissance, aucune autre molécule n'est à l'heure actuelle à un stade de développement assez avancé pour répondre à ce vide dans notre arsenal thérapeutique dans les années à venir.

De plus, le fait est qu'il n'y est pas, à ce jour, de travaux publiés sur la résistance aux antibiotiques au Yémen et que, d'un autre côté, on y enregistre des taux de résistance très élevés, fait penser qu'il est impératif de mettre en place un système de surveillance des résistances et de consommation d'antibiotiques à travers de larges bases de données et à l'aide de modèles dynamiques en vue d'un meilleur control de la diffusion des souches résistantes dans ce pays.

En perspectives, les résultats obtenus au cours de notre étude restent préliminaires et méritent d'être exploités et complétés par :

- Étude d'un plus grand nombre de souches.
- Étude de certains facteurs de risque (tel que l'âge et le sexe du patient) dans l'acquisition de souches résistantes.
- Typage moléculaire des plasmides.
- PFGE afin de typer les souches épidémiques.
- Étude de la virulence des souches (Caractérisation du type ST) par la MLST.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

### A

**Abdelaziz M. O., Bonura C., Aleo A., Fasciana T. et Mammina C. (2013).** NDM-1- and OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Cairo, Egypt. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **1**, 213-215.

**Adjidé C.-C., Biendo M., Rousseau F., Hamdad-Daoudi F., Thomas D., Laurans G., Canarelli B., Obin O., Hénicque M. et Schmit J.-L., (2006).** *Escherichia coli* producteurs de bêtalactamases à spectre étendu : de nouvelles menaces nosocomiales? *Pathologie Biologie*. **54**, 510–517.

**Aibinu I. E., Ohaegbulam V. C., Adenipekun E. A., Ogunsola F. T., Odugbemi T. O. et Mee B. J. (2003).** Extended-spectrum beta-lactamase enzymes in clinical isolates of *Enterobacter* species from Lagos, Nigeria. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**, 2197-200.

**Al-Agamy M. H., Shibl A. M., et Tawfik A. F. (2009).** Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *Annals of Saudi Medicine*. **29**, 253-257.

**Al-Agamy M. H., Shibl A. M., Elkhizzi N. A., Meunier D., Turton J. F. et Livermore D. M. (2013).** Persistence of *Klebsiella pneumoniae* clones with OXA-48 or NDM carbapenemases causing bacteraemias in a Riyadh hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **76**, 214-216.

**Alfaresi M. S., Elkoush A. A., Alshehhi H. M. et Abdulsalam A. I. (2011).** Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United Arab Emirates. *Medical Principles and Practice*. **20**, 177-180.

**Al-Ghamdi S. M., Akbar H. O., Qari Y. A., Fathaldin O. A. et Al-Rashed R. S. (2003).** Pattern of admission to hospitals during Muslim pilgrimage (Hajj). *Saudi Medical Journal*. **24**, 1073-1076.

**Al-Hinai S. S., Al-Busaidi A. S. et Al-Busaidi I. H. (2011).** Medical tourism abroad: a new challenge to Oman's health system-Al Dakhilya region experience. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. **11**, 477-484.

## Références bibliographiques

**Almeida A., De sa cavalcanti F.L., Vilela M.A., Gales A.C., De Morais Jr M.A. et Camargo De Morais M.M. (2012).** *Escherichia coli* ST502 and *Klebsiella pneumoniae* ST11 sharing an IncW plasmid harbouring the *bla*(KPC-2) gene in an intensive care unit patient. *International Journal Antimicrobial Agents*. **40**(4), 374-376.

**Al-Qadheeb N. S., Althawadi S., Alkhalaf A., Hosaini S. et Alrajhi A. A. (2010).** Evolution of tigecycline resistance in *Klebsiella pneumoniae* in a single patient. *Annals of Saudi Medicine*. **30**, 404–407.

**Al-Shamahy H. A., Sabrah A. A., Al-Robasi A. B. et Naser S. M. (2012).** Types of bacteria associated with neonatal sepsis in Al-Thawra University Hospital, Sana'a, Yemen, and their antimicrobial profile. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. **12**, 48-54.

**Armand-Lefèvre L., Angebault C., Barbier F., Hamelet E., Defrance G., Ruppé E., Bronchard R., Lepeule R., Lucet J.-C., El Mniai A., Wolff M., Montravers P., Plésiat P. et Andremont A. (2013).** Emergence of Imipenem-Resistant Gram-Negative Bacilli in Intestinal Flora of Intensive Care Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **57**(3), 1488–1495.

**Arpin C., Noury P., Boraud D., Coulange L., Manetti A., André C., M'Zali F. et Quentin C. (2012).** NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Resistant to Colistin in a French Community Patient without History of Foreign Travel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **56**, 3432-3434.

**Asghar A. H. (2006).** Frequency and antimicrobial susceptibility patterns of bacterial pathogens isolated from septicemic patients in Makkah hospitals. *Saudi Medical Journal*. **27**, 361-367.

**Auckenthaler R. (1995).** Activité antibactérienne, spectre, mode d'action, cibles bactériennes. In : Antibiothérapie en pratique clinique. *Ed. Masson*, Paris. 21p.

## B

**Baby P. S., Appala R.B. et Mani K. R. (2008).** Detection of Enterobacteriaceae producing CTX-M extended spectrum beta-lactamases from a tertiary care hospital in south India. *Indian Journal of Medical Microbiology*. **26**, 163–166.

## Références bibliographiques

**Barrial K. et Scotet J. (2006).** Classification raisonnée des  $\beta$ -lactamases chez les bacilles Gram négatif. Perspectives d'évolution. DES Bactériologie. 17p.

**Bogaerts P., Bouchahrouf W., De Castro R. R., Deplano A., Berhin C., Pierard D., Denis O. et Glupczynski, Y. (2011).** Emergence of NDM-1-Producing *Enterobacteriaceae* in Belgium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **55**, 3036-3038.

**Bogdanovich T., Adams-Haduch J. M., Tian G. B., Nguyen M. H., Kwak E. J., Muto C. A. et Doi Y. (2011).** Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. *Clinical Infectious Diseases*. **53**, 373-376.

**Bonnet R. (2006).** B-lactamines et entérobactéries. In: Courvalin P., Lecclerc R. et Bingen E., eds . ANTIBIOGRAMME, 2<sup>ème</sup> ed. ESKA, Paris ; 141-162.

**Brasme L., Nordmann P., Fidel F., Lartigue M.F., Bajolet O., Poirel L., Forte D., Vernet-Garnier V., Madoux J., Reveil J.C., Alba-Sauviat C., Baudinat I., Bineau P., Bouquigny-Saison C., Eloy C., Lafaurie C., Simeon D., Verquin J-P., Noel F., Strady C. et De Champs C. (2007).** Incidence of class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Champagne-Ardenne (France): a 1 year prospective study. *Antimicrobial Chemotherapy*. **60**, 956–964.

**Braykov N. P., Eber M. R. , Klein E. Y., Morgan D. J. et Laxminarayan R. (2013).** Trends in resistance to carbapenems and third-generation cephalosporins among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in the United States, 1999-2010. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. **34** (3), 259-68.

**Bryskier A. (1999).** Antibiotiques et agents antibactérien : classification et relation structure activité. In : Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. *Edition : Ellipses*. Paris. Pp : 54-57.

**Bukhari S. Z., Hussain W. M., Fatani M. I. et Ashshi A. M. (2008).** Multi-drug resistant *Ewingella americana*. *Saudi Medical Journal*. **29**, 1051-1053.

**Bush K., Jacoby G. et Medeiros A. (1995).** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **39**, 1211-1233.

## Références bibliographiques

**Bush K. et Jacoby G. A. (2010).** Updated Functional Classification of  $\beta$  Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **54** (3), 969-976.

### C

**Cantón R., Akova M., Carmeli Y., Giske C. G., Glupczynski Y., Gniadkowski M., Livermore D. M., Miriagou V. et Naas T. (2012).** Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. **18**, 413-431.

**Carbon C., Régnier B., Saimot G., Vildé J. L. et Yeni P. (1995).** Médicaments Anti-infectieux. *Edition: Flammarion*. Paris. 506p.

**Carrër A., Fortineau N. et Nordmann P. (2010).** Use of the ChromID extended-spectrum beta-lactamase medium for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**, 1913-1914.

**Cavallo J-D., Fabre R., Jehl F., Rapp C. et Carrabé E. (2004).**  $\beta$ -lactam antibiotics. *EMC-Maladies infectieuses*. **1**, 129-202.

**Chanal C., Bonnet R., De Champs C., Sirot D., Labia R. et Sirot J. (2000).** Prevalence of  $\beta$ -Lactamases among 1,072 Clinical Strains of *Proteus mirabilis*: a 2-Year Survey in a French Hospital. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **44**, 1930-1935.

**Charlier P., Coyette J., Dehareng D., Dive G., Duez C., Dusart J., Fonzé E., Fraipont C., Frère J.M., Galleni M., Goffin C., Joris B., Lamotte-Brasseur J. et Nguyen-Distèche M. (1998).** Résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines. *Medecine /science*. **14**, 544-55.

**Cohen Stuart J., Dierikx C., Al Naiemi N., Karczmarek A., Van Hoek A. H. A. M., Vos P., Fluit A. C., Scharringa J., Duim B., Mevius D. et Leverstein-Van Hall M. A. (2010).** Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum b-lactamases in *Enterobacteriaceae* using ligation-mediated amplification with microarray analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **65**, 1377–1381.

**Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. (CFA-SFM).** Communiqué 2012.



## Références bibliographiques

**Coque T. M., Novais A., Carattoli A., Poirel L., Pitout J., Peixe L., Baquero F., Canton R. et Nordmann P. (2008).** Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases*. **14**, 195-200.

**Cornaglia G., Rossolini G.M. (2010).** The emerging threat of acquired carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Infection*. **16**, 99-101.

### D

**Dashti A. A., Vali L., Jadaon M. M., El-Shazly S. et Amyes S. G. (2011).** The emergence of carbapenem resistance in ESBL-producing *Escherichia coli* O25B-ST131 strain from community acquired infection in Kuwait. *BMC Proceedings*. **5**. 1p.

**Desphande P., Rodrigues C., Shetty A., Kapadia F., Hedge A. et Soman R. (2010 a).** New Delhi metallo  $\beta$ -lactamase (NDM-1) in Enterobacteriaceae; treatment options with carbapenems compromised. *Journal of Association of Physicians of India*. **58**, 1-6.

**Desphande P., Shetty A., Kapadia F., Hedge A., Soman R. et Rodrigues C. (2010 b).** New Delhi metallo 1: have carbapenems met their doom? *Clinical Infectious Diseases*. **51**, 1222-1223.

**Dizbay M., Tunccan O.G., Karasahin O., Aktas F. (2014).** Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* spp. infections in a Turkish university hospital: epidemiology and risk factors. *Journal of Infection in Developing Countries*. **8**(1), 044-049.

**Donald H. M., Scaife W., Amyes S. G., et Young H. K. (2000).** Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **44**, 196-199.

**Dutour C., Bonnet R., Marchandin H., Boyer M., Chanal C., Sirot D. et Sirot J. (2002).** CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14  $\beta$ -Lactamases from *Enterobacteriaceae* Isolated in France. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **46**, 534-537.

## Références bibliographiques

### E

**El-Herte R. I., Kanj S. S., Matar G. M. et Araj G. F. (2012).** The threat of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in Lebanon: An update on the regional and local epidemiology. *The Journal of Infection and Public Health.* **5**, 233-243.

**Ensor V. M., Jamal W., Rotimi V. O., Evans J. T. et Hawkey P. M. (2009).** Predominance of CTX-M-15 extended spectrum beta-lactamases in diverse *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from hospital and community patients in Kuwait. *International Journal of Antimicrobial Agents.* **33**, 487-489.

### G

**García-Fernandez A., Miriagou V., Papagiannitsis C.C., Giordano A., Venditti M., Mancini C. et Carattoli A. (2010).** An ErtapenemResistant Extended-Spectrum-  $\beta$  – Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Clone Carries a Novel OmpK36 Porin Variant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **54** (10), 4178- 4184.

**Giamarellou H. et Poulakou G. (2009).** Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options? *Drugs.* **69**, 1879- 901.

**Grall N., Andremont A. et Armand-Lefèvre L. (2011).** Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *Journal des Anti-infectieux.* Article in press, 16p.

**Gootz T.D., Lescoe M.K., Dib Hajj F., Dougherty B.A., He W., Della-Latta P. et Huard R.C. (2009).** Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*KPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **53**(5), 1998-2004.

**Guillard T., Moret H., Brasme L., Carlier A., Vernet-Garnier V., Cambau E. et de Champs C. (2011).** Rapid detection of *qnr* and *qepA* plasmid-mediated quinolone resistance genes using real-time PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* **70**, 253-259.

**Guzek A., Tomaszewski D., Rybicki Z., Truszczyński A., Barański M. et Korzeniewski K. (2013).** Comparison of in vitro efficacy of ertapenem, imipenem and

## Références bibliographiques

meropenem by the Enterobacteriaceae strains family. *Anaesthesiology Intensive Therapy*. **45**(2), 67–72.

### H

**Hashemi S. H., Esna-Ashari F., Tavakoli S. et Mamani M. (2013).** The Prevalence of Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae Strains Isolated in Community- and Hospital-Acquired Infections in Teaching Hospitals of Hamadan, West of Iran. *Journal of Research in Health Sciences*. **13**(1), 75-80.

**Hocquet D., Patry I., Dupont P., Bize M., Jeannot K., Chavanet P. et Plésiat P. (2005).** Résistance de bas niveau aux fluoroquinolones par surexpression de l'efflux chez *pseudomonas aeruginosa* : conséquences thérapeutiques et détection au laboratoire. *Pathologie Biologie*. **53**, 495-499.

**Hodge W., Ciak J., Tramont E.C. (1978).** Simple method for detection of penicillinase-producing *N. gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*. **7**, 102-103.

**Hopkins K.L., Davies R.H., et Threlfall E.J. (2005).** Mechanism of quinolone resistance in *E. coli* and salmonella: recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **25**, 358-373.

### I

**Islam M. A., Talukdar P. K., Hoque A., Huq M., Nabi A., Ahmed D., Talukder K. A., Pietroni M. A. C. et Hays J. P. (2012).** Emergence of multidrug-resistant NDM-1-producing Gram-negative bacteria in Bangladesh. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **31**, 2593-2600.

### J

**Jamal W., Rotimi V. O., John Albert M., Khodakhast F., Udo E. E. et Poirel L. (2012).** Emergence of nosocomial New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients admitted to a tertiary care hospital in Kuwait. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **39**, 177-185.

## Références bibliographiques

**Jarlier V., Nicolas M. H., Fournier G., et Philippon A. (1998).** Extended-broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review of Infection Diseases*. **10**, 867-878.

**Jeong S.H., Bae I.K., Park K.O., An Y.J., Sohn S.G., Jang S.J., Sung K.H., Yang K.S., Lee K., Young D. et Lee S.H. (2006).** Outbreaks of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing Carbapenemases in Korea. *The Journal of Microbiology*. **44**(4), 423-431.

**Johnson A.P. et Woodford N. (2013).** Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of Medical Microbiology*. **62**, 499–513.

## K

**Kapiszewski A. (2006).** Arab versus Asian migrant workers in the GCC countries. United Nations Expert Group Meeting on International Migration and Development in the Arab Region, Beirut, Lebanon. *United Nations Secretariat*. 21 p.

**Kermas R., Touati A., Brasme, L. Le Magrex-Debar E., Mehrane S., Weill F.X. et De Champs C. (2012).** Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Serotype Brunei and Heidelberg at the Hussein Dey Hospital in Algiers (Algeria). *Foodborne Pathogens and Disease*. **9**, 803-808.

**Khan A. U. et Nordmann P. (2012).** NDM-1-producing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* from diabetic foot ulcers. *Indian Journal of Medical Microbiology*. **61**, 454-456.

**Kiralj R. et Ferreira M. M. (2006).** Molecular graphics approach to bacterial AcrB protein- $\beta$ -lactam antibiotic molecular recognition in drug efflux mechanism. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. **25**(1), 126-145.

**Kliebe C., Nies B.A., Meyer J.F., Tolxdroff-Neutzling R.M., et Wiedemanne B. (1985).** Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **28**, 302-307.

## Références bibliographiques

**Knothe H., Shah P. et Krcmery V. (1983).** Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. **11** (6), 315-317.

**Ktari S., Arlet G., Mnif B., Gautier V., Mahjoubi F., Ben Jmeaa M., Bouaziz M. et Hammami A. (2006).** Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo-beta-lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase, and CMY-4 AmpC beta-lactamase in a Tunisian university hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50**, 4198–4201.

**Kumarasamy K. K., Toleman M. A., Walsh T. R., Bagaria J., Butt F., Balakrishnan R., Chaudhary U., Doumith M. et Giske C. G. (2010).** Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infectious Diseases*. **10**, 597-602.

### L

**Lee K., Kim C.K., Yong D., Jeong S.H., Yum J.H., Seo Y.H., Docquier J.D. et Chong Y. (2010).** Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemases producing Gram-negative bacilli. *Journal of Microbiological Methods* **83**,149–152.

**Liassine N. (2000).** Problèmes des pathogènes Gram négatifs résistants aux antibiotiques en milieu hospitalier. *Schweizerische medizinische Wochenschrift*. **130**, 1930-1936.

**Livermore D.M., Canton R. et Gniadkowski M. (2007).** CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Antimicrobial Chemotherapy*. **59**, 165-74.

### M

**Mallèa M., Chevalier J., Eyraud A. et Pages J. M. (2002).** Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **293**, 1370-1373.

## Références bibliographiques

**Memish Z. A. (2010).** The Hajj: communicable and non-communicable health hazards and current guidance for pilgrims. *Euro surveillance*. **15**, 1-4.

**Miriagou V., Cornaglia G., Edelstein M., Galani I., Giske C. G., Gniadkowski M., Malamou-Lada E., Martinez-Martinez L., Navarro F., Nordmann P., Peixe L., Pournaras S., Rossolini G. M., Tsakris A., Vatopoulos A. et Canto'n R. (2010).** Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **16**, 112–122.

### N

**Naas T., Poirel L. et Nordmann P. (2008)** Minor extended-spectrum- $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*. **14** (1), 42-52.

**Nauciel C. (2000).** Principales familles d'antibiotique et leur mode d'action. *In. Bactériologie médicale. Ed. Masson, Paris.* Pp: 55-63.

**Nordmann P., Cuzon G. et Naas T. (2009).** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infectious Diseases*. **9**, 228-236.

**Nordmann P. (2010).** Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *Medecines/Sciences*. **26**(11), 950-959.

**Nordmann P. et Carrer A. (2010).** Les carbapénèmases des entérobactéries. *Archives de Pédiatrie*. **17**, 154-162.

**Nüesch-Inderbinen M., Zurfluh K., Hächler H. et Stephan R. (2013).** No evidence so far for the dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the community in Switzerland. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. **2**(23), 1-3.

### P

**Pasteran F., Mendez T., Rapoport M., Guerriero L. et Corso A. (2010).** Controlling False-Positive Results Obtained with the Hodge and Masuda Assays for Detection of Class A Carbapenemase in Species of *Enterobacteriaceae* by Incorporating Boronic Acid. *Journal of clinical microbiology*. **48**(4), 1323–1332.

## Références bibliographiques

- Patel, G. et Bonomo R. A. (2013).** Stormy waters ahead: global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology*. **4**, 1-17.
- Paterson D. L. et Bonomo R. A. (2005).** Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*. **18** (4), 657-686.
- Paton R., Miles R. S., Hood J. et Amyes S. G. (1993).** ARI1:beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **2**(2), 81- 87.
- Peirano G., Pillai D. R., Pitondo-Silva A., Richardson D. et Pitout J. D. D. (2011)** The characteristics of NDM-producing *Klebsiella pneumonia* from Canada. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **71**, 106-109.
- Perry J. D., Naqvi S. H., Mirza I. A., Alizai S. A. Hussain A., Ghirardi S., Orega S., Wilkinson K., Woodford N., Zhang J., Livermore D. M., Abbasi S. A. et Raza M. W. (2011).** Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **66**(10), 2288–2294.
- Philippon A. et Arlet G. (2006).**  $\beta$ -lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel. *Annales de Biologie Clinique*. **64** (1), 37-51.
- Philippon A. (2013).** Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE). *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. **28**, 287-296.
- Ploy M.C., Gassama A., Chainier D. et Denis F. (2005).** Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*. **20**, 343–352.
- Poirel L., Le Thomas I., Naas T., Karim A. et Nordmann P. (2000).** Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **44**, 622-632.
- Poirel, L., C. Heritier, V. Tolun, et P. Nordmann. (2004).** Emergence of oxacillinase mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **48**, 15-22.

## Références bibliographiques

**Poirel L., Cattoir V., Soares A., Soussy C-J. et Nordmann P. (2007).** Novel Ambler class A B-lactamases LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrS. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **51**(2), 631-637.

**Poirel L., Revathi G., Bernabeu S., et Nordmann P. (2011 a).** Detection of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **55** (2), 934–936.

**Poirel L., Fortineau N. et Nordmann P. (2011 b).** International transfer of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from Iraq to France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **55**, 1821-1822.

**Poirel P., Benouda A., Hays C. et Nordmann P. (2011 c).** Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **66**, 2781-2783.

**Potron A., Nordmann P., Lafeuille E., Al Maskari Z., Al Rashdi F. et Poirel L. (2011).** Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D b-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **55**, 4896–4899.

**Potron A., Poirel L., Rondinaud E. et Nordmann P. (2013).** Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* over a 11 year period, 2001 to 2011. *Euro surveillance*. **18** (31), 14 p.

**Prakash D. et Saxena R. S. (2013).** Distribution and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Bacterial Pathogens Causing Urinary Tract Infection in Urban Community of Meerut City, India. *ISRN Microbiology*.13 p.

## Q

**Queenan A.M. et Bush K. (2007).** Carbapenemases : the versatile beta lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. **20**, 440-458.

## R



## Références bibliographiques

**Rastegar Lari A., Azimi L., Rahbar M., Fallah F. et Alaghebandan R. (2013).** Phenotypic detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase among burns patients: First report from Iran. *Burns*. **39**, 174 – 176.

**Robin F., Gibolda L. et Bonnet R. (2012).** Résistances naturelles et acquises aux B-lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne. *Revue Francophonie des laboratoires*. **445**, 47-58.

**Rodriguez-Martinez J-M., Nordmann P., Fortineau N. et Poirel L. (2010).** VIM-19, a metallo- $\beta$ -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **54**, 471–476.

**Rogers B. A., Sidjabat H. E. et Paterson D. L. (2011).** *Escherichia coli* O25b- ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **66**, 1-14.

**Rotimi, V. O., Jamal W., Pal T., Sovenned A. et Albert M. J. (2008).** Emergence of CTX-M-15 type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* spp. in Kuwait and the United Arab Emirates. *Journal of Medical Microbiology*. **57**, 881-886.

## S

**Scaife, W., Young H. K., Paton R. H., et Amyes S. G. (1995).** Transferable imipenem resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **36**, 585-586.

**Seema K., Sen M. R., Upadhyay S. et Bhattacharjee A. (2011).** Dissemination of the New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase- 1 (NDM-1) among Enterobacteriaceae in a tertiary referral hospital in north India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2p.

**Shanthi M., Sekar U., Sowmiya M., Malathi J., Kamalanathan A., Sekar B. et Madhavan H.N. (2013).** Clonal diversity of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 producing *Enterobacteriaceae* in a tertiary care centre. *Indian Journal of Medical Microbiology*. **31**(3), 237-241.

## Références bibliographiques

**Shibl A. M., Al-Agamy M. H., Memish Z., Senok A., Abdul Khader S. et Assiri, A. (2013).** The emergence of OXA-48- and NDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *International Journal of Infectious Diseases*. **17**, 1130-1133.

**Shoma S., Kamruzzaman M., Ginn A. N., Iredell J. R. et Partridge S. R. (2014).** Characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Australia carrying *bla*<sub>NDM-1</sub>. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **78**, 93-97.

**Sonnevend A., Al Baloushi A., Pal T., Hashmey R., Tariq W. Z., Girgis S., Sheikh F., Pitout M. et Hamadeh M. B. (2012).** Emergence of NDM-1-carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Abu Dhabi Emirate, United Arab Emirates. *Clinical Microbiology and Infection*. 494-496.

**Székely E., Ivelina Damjanovac I., Laura Jánváric L., Vasa K. E., Molnár S., Bilcab D.V., Lorinczi L.K. et Tóthc A. (2013).** First description of *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-181</sub> producing *Enterobacteriaceae* strains in Romania. *International Journal of Medical Microbiology*. **303**, 697– 700.

## T

**Teo J. W. P., Tan P., La M. V., Krishnan P., Tee N., Hsien K. T., Deepak N. R., Yen T. T., Jureen R. et Lin R. T. P. (2013).** Surveillance trends of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from Singapore, 2010–2013. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. Article In press.

**Touati A. (2006).** Caractérisation des phénotypes de résistance des entérobactéries aux  $\beta$ -lactamines isolées en milieu hospitalier : cas de deux hôpitaux de la wilaya de Béjaia. Thèse de doctorat, université A/MIRA, Algérie.

**Touati A., Benallaoua S., Forte D., Madoux J., Brasme L. et De Champs C. (2006).** First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of *enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Antimicrobial Agents Journal*. **27**, 397-402.

## Références bibliographiques

### V

**Vodovar D., Marcadé G., Raskine L., Malissin I. et Megarban. (2012).** Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi : épidémiologie, facteurs de risque et mesures de prévention. *La Revue de médecine interne*. Article in press, 7 p.

### W

**Walsh T.R., (2008).** Clinically significant carbapenemases: an update. *Current Opinion in Infectious Diseases*. **21**(4), 367–371.

**Watanabe M., Iyobe S. et Inoue M. (1991).** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet Infectious Diseases*. **35**, 147-151.

**Wei Z.Q., Du X., Yu Y., Shen P., Chen Y. et Li J. (2007).** Plasmid-Mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**(2), 763–765.

**Wolff M., Joly-Guillou M.-L. et Pajot O. (2008).** Le point sur les carabapénèmes. *Réanimation*. **17**, 242-250.

### Y

**Yigit H., Queenan A.M. et Anderson G.J. (2001).** Novel carbapenem- hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **45**, 1151-1161.

**Yong D., Lee K., Yum J.H., Shin H.B., Rossolini G.M., et Chong Y. (2002).** Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo  $\beta$ -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *Journal of Clinical Microbiology*. **40**(10), 3798–3801.

**Yong D., Toleman M.A. et Giske C.G. (2009).** Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique

## Références bibliographiques

genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type14 from India. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* . **53**, 5046-5054.

### Z

**Zhou T., Zhang X., Guo M., Ye J., Lu Y., Bao Q. et Chi W. (2013).** Phenotypic and Molecular Characteristics of Carbapenem-Non-Susceptible Enterobacteriaceae from a Teaching Hospital in Wenzhou, Southern China. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. **66**, 96-102.

**Zowawi H. M., Balkhy H. H., Walsh T. R. et Paterson D. L. (2013).** b-Lactamase Production in Key Gram-Negative Pathogen Isolates from the Arabian Peninsula. *Clinical Microbiology Reviews* . **26**(3), 361-380.

# **ANNEXES**

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

<b>Gélose Hektoen</b>		
Protéose peptone	12	g
Extrait de levure	3	g
Chlorure de sodium	5	g
Thiosulfate de sodium	5	g
Sels biliaires	9	g
Citrate de fer ammoniacal	1.5	g
Salicine	2	g
Lactose	12	g
Saccharose	12	g
Fuchsine acide	0.04	g
Bleu de bromothymol	0.065	g
Agar	14	g
pH	7.5	

<b>Gélose Mueller Hinton</b>		
Infusion de viande de boeuf	300	g
Hydrolysate de caséine	17,5	g
Amidon	1,5	g
Agar	17	g
pH	7.4	

<b>Gélose Mac Conkey</b>		
Peptone de caséine	17	g
Crisal violet	0.001	g
Rouge neutre	0.03	g
Chlorure de sodium	5	g
Mélange de sels biliaires	1.5	g
Lactose	10	g
Peptone de viande	3	g
pH	7.4	

<b>Bouillon Trypticase soja</b>		
Peptone tryptique de caséine	17	g
Peptone papaïnique de soja	3	g
Chlorure de Sodium	5	g
Phosphate bipotassique	2	g
Glucose	2	g
pH	7.3	

<b>Gélose BCP</b>		
Peptone	5	g
Extrait de viande	5	g
Lactose	3	g
Pourpre de bromocrésol	10	g
Agar	0.025	g
PH	7	

<b>Gélose EMB</b>		
Peptone	10	g
Lactose	10	g
Phosphate bipotassique	2	g
Eosine	0.4	g
Bleu de méthylène	0.065	g
Gélose	15	g
PH	7	

Tableau XI : Diamètres des zones édités par le CFA-SFM, 2012

Antibiotiques	Abréviations	Charges ( $\mu\text{g}$ )	Ø critique (mm)		Concentration critique ( $\mu\text{g/ml}$ )	
			S	R	S	R
Amoxicilline/Acide clavulanique	AMC	20 + 10	$\geq 21$	$< 16$	$\leq 4/2$	$> 8/2$
Céfotaxime	CTX	30	$\geq 26$	$< 23$	$\leq 1$	$> 2$
Céfoxitine	FOX	30	$\geq 22$	$< 15$	$\leq 8$	$> 32$
Imipenème	IMP	10	$\geq 24$	$< 17$	$\leq 2$	$> 8$
Céftazidime	CAZ	30	$\geq 26$	$< 19$	$\leq 1$	$> 8$
Aztréonam	ATM	30	$\geq 27$	$< 21$	$\leq 1$	$> 8$
Céfèpime	FEP	30	$\geq 24$	$< 17$	$\leq 1$	$> 8$
Gentamycine	GM	10	$\geq 18$	$< 16$	$\leq 2$	$> 4$
Amikacine	AK	30	$\geq 17$	$< 15$	$\leq 8$	$> 16$
Ciprofloxacine	CIP	5	$\geq 25$	$< 22$	$\leq 0,5$	$> 1$
Péfloxacine	PF	5	$\geq 22$	$< 16$	$\leq 1$	$> 4$
Tétracycline	TET	30 (UI)	$\geq 19$	$< 17$	$\leq 4$	$> 8$
Méropénème	MEM	10	$\geq 22$	$< 15$	$\leq 2$	$> 8$
Cefpirome	CPO	30	$\geq 24$	$< 17$	$\leq 1$	$> 8$
Ertapénème	ERT	10	$\geq 28$	$< 26$	$\leq 0,5$	$> 1$
Doripénème	DOR	10	$\geq 24$	$< 19$	$\leq 1$	$> 4$
Pipéracilline	PIP	75	$\geq 20$	$< 16$	$\leq 8$	$> 16$
Pipéracilline/tazobactam	TZP	75/10	$\geq 21$	$< 17$	$\leq 8/4$	$> 16/4$
Ticarcilline	TIC	75	$\geq 24$	$< 22$	$\leq 8$	16
Ticarcilline/ac. clavulanique	TCC	75/10	$\geq 24$	$< 22$	$\leq 8/2$	$> 16/2$
Tobramycine	TM	10	$\geq 18$	$< 16$	$\leq 2$	$> 4$
Acide nalidixique	NAL	30	$\geq 20$	$< 15$	$\leq 8$	$> 16$
Ciprofloxacine	CIP	5	$\geq 25$	$< 22$	$\leq 0,5$	$> 1$
Norfloxacine	NOR	5	$\geq 25$	$< 22$	$\leq 0,5$	$> 1$
Ofloxacine	OFX	5	$\geq 25$	$< 22$	$\leq 0,5$	$> 1$
Triméthoprime	TMP	5	$\geq 20$	$< 16$	$\leq 2$	$> 4$
Sulfamides	SUL	200	$\geq 17$	$< 12$	$\leq 64$	$> 256$
Triméthoprime/sulfaméthoxazole	SXT	1,25/23,75	$\geq 16$	$< 13$	$\leq 2/38$	$> 4/76$
Tigécycline	TGC	15	$\geq 21$	$< 19$	$\leq 1$	$> 2$
Chloramphénicol	CHL	30	$\geq 23$	$< 23$	$\leq 8$	$> 8$
Fosfomycine	FSF	50	$\geq 14$	$< 14$	$\leq 32$	$> 32$



**Préparation de la solution d'EDTA :**

La solution d'EDTA ( MM = 372,24 g/mol) à 0.5 M (mol/l) est préparée par dissolution de 186.1 g de poudre d'EDTA- 2H<sub>2</sub>O di sodique dans 1 000 ml d'eau distillée, puis ajustée au pH 8.2 en utilisant une solution de NaOH et stérilisée par autoclavage pendant 20 mn à 120°C.



**Figure 1.** Résultats de la galerie API20E de *K. pneumoniae* (10877).



**Figure 2.** Résultats de la galerie API20E d'*E. cloacae* [18(B)]



**Figure 3.** Résultats de la galerie API20E de *P. mirabilis* [8479]



**Figure 4.** Résultats de la galerie API20E d'*E. coli* [15]

الحمد لله رب العالمين

## Résumé

L'objectif de notre travail est la détermination des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, en particulier aux carbapénèmes chez des souches d'entérobactéries.

Des souches d'entérobactéries résistantes au céfotaxime et /ou au céftazidime ont été collectées au niveau de deux hôpitaux et de quatre laboratoires d'analyses médicales de la région de Sana'a (Yémen) durant une période de 4 mois (de Décembre 2012 à Avril 2013). La sensibilité de ces souches d'entérobactéries aux carbapénèmes a été réalisée par la méthode de l'antibiogramme et par la détermination des CMI (E-Test). Les phénotypes de résistance aux bêta-lactamines ont été déterminés par le DD-Test, le test de Hodge et le test à l'EDTA. La caractérisation moléculaire de la résistance aux carbapénèmes et de la résistance associée a été effectuée par PCR et séquençage des gènes *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>CTXM-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> et *qnr*. La détermination de la clonalité des souches a été réalisée par RAPD et enfin, un essai de transfert par conjugaison des gènes de résistance aux antibiotiques a été effectué pour trois souches. Au total, 178 souches d'entérobactéries ont été collectées. Parmi lesquelles, 82% (146/178) sont des *E. coli* et 13% (23/178) sont des *K. pneumoniae*. De plus, 41% (73/178) sont d'origine hospitalière et 59% (105/178) sont d'origine communautaire. Dix souches d'entérobactéries (soit 5,6%) ont été résistantes aux carbapénèmes dont 8 souches de *K. pneumoniae* et 2 souches de *E. cloacae*. Ces souches multirésistantes sont productrices de carbapénémases de type NDM-1 associées à la production de BLSE de type CTX-M-15 et/ou TEM-1 et 9 souches étaient Qnr positives (5 QnrB1, 2 QnrA et 2 QnrS1). La RAPD a permis de constater une diversité génétique parmi les souches productrices de NDM-1. Cette étude décrit pour la première fois la dissémination de BLSE et de NDM-1 parmi des souches de d'entérobactéries isolées au Yémen.

**Mots clés :** Carbapénémase, NDM-1, BLSE, Résistance,  $\beta$ -lactamines, Entérobactéries.

## Abstract

The aim of this study was to determine the phenotypes of resistance to  $\beta$ -lactams antibiotics, especially to carbapenem. Cefotaxim and /or ceftazidim resistant enterobacterial strains were collected from two hospitals and four laboratories of medical analysis from the region of Sana'a (Yemen) during a period of four months (from December 2012 to April 2013). The susceptibility testing of carbapenems of the enterobacterial strains was realized by antibiogram method and by determination of MIC<sub>s</sub> (E-Test). The phenotypes of resistance to  $\beta$ -lactams were determined by the DD-Test, the Hodge test and EDTA test. The molecular characterization of carbapenems resistance and the associated resistance were realized by PCR and sequencing of *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>CTXM-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> and *qnr* genes. The clonal relationship of the strains was determined by RAPD and finally, a transfer assay of antibiotic resistance genes by conjugation was done for three strains. In total, 178 enterobacterial strains were collected. Among them, 82% (146/178) were *E. coli* and 13% (23/178) were *K. pneumoniae*. In addition, 41% (73/178) were from hospital and 59% (105/178) were from community. Ten enterobacterial strains (5,6%) were resistant to carbapenems, among them, 8 were *K. pneumoniae* and 2 were *E. cloacae*. These multidrug resistant strains were NDM-1 producing associated with CTX-M-15 and/or TEM-1 producing and were Qnr positive for 9 strains (5 QnrB1, 2 QnrA and 2 QnrS1). The RAPD showed that there is a genetic diversity in the NDM-1 producing strains. This study described for the first time the dissemination of ESBL and NDM-1 in enterobacterial strains isolated from Yemen.

**Key words:** Carbapenemase, NDM-1, ESBL, Resistance,  $\beta$ -lactams, Enterobacterial.

## المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد الأنماط الظاهرية لمقاومة البييتالاكتامين، وخاصة المقاومة للكاربابينام، عند البكتيريا المعوية. تم جمع سلالات من البكتيريا المعوية المقاومة للسيفوتاكسيم و/أو السيفتازيديم، على مستوى مستشفيات وأربعة مختبرات طبية بمدينة صنعاء باليمن، و هذا خلال أربعة أشهر (من ديسمبر 2012 إلى أبريل 2013). قدرت حساسية هذه السلالات للمضادات الحيوية باستعمال تقنية حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية وتحديد التراكيز الأدنى المثبطة. حددت الأنماط الظاهرية المقاومة بواسطة تقنية (د-د-تاست)، تجربة هودج و تجربة الإثيلين ثنائي الأمين ثلاثي الأستيان. تم تحديد الخصائص الجزيئية لمقاومة الكاربابينام و المقاومة المرتبطة

بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي وإظهار تسلسل جينات *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>CTXM-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> و *qnr*. عُنِيَتْ إنتماء كل سلالة بواسطة تقنية RAPD و في النهاية قمنا بتجربة إنتقال جينات مقاومة الكاربابينام لثلاث سلالات بكتيرية. خلال دراستنا تم جمع 178 سلالة بكتيرية. من بينها 82% *E. coli* و 13% *K. pneumoniae* حيث تمثل سلالات الوسط الإستشفائي 41% (178/73) فيما سلالات خارج المستشفيات تمثل 59% (105/178). عشر (10) سلالات من البكتيريا المعوية

(أي 5,6%) كانت مقاومة للكاربابينام حيث ثمانية منها من نوع *K. pneumoniae* و سلالتان من نوع *E. cloacae*. هذه السلالات متعددة المقاومة تنتج إنزيمات محللة للكاربابينام من نوع NDM-1 مرفقة بإنزيمات محللة للبييتالاكتام واسعة الطيف من نوع CTX-M-15 و/أو TEM-1 و بروتينات Qnr (5 QnrB1, 2 QnrA و 2 QnrS1). مكنتنا تقنية RAPD من إحصاء تنوع وراثي بين السلالات المنتجة لـ NDM-1، تصف هذه الدراسة لأول مرة إنتشار الإنزيمات المحللة للبييتالاكتام واسعة الطيف و إنزيمات NDM-1 بين سلالات البكتيريا المعوية المعزولة في اليمن.

الكلمات الرئيسية: الإنزيمات المحللة للكاربابينام، الإنزيمات المحللة للبييتالاكتام واسعة الطيف، NDM-1، المقاومة، بيتا لاكتام، البكتيريا المعوية

