



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA DE BEJAIA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

MEMOIRE DE MAGISTER
Option Microbiologie Appliquée

Thème

**Evaluation de la sensibilité aux quinolones et aux
fluoroquinolones de souches d'entérobactéries isolées
au niveau de quelques laboratoires d'analyses
médicales de la région de Béjaïa**

Présenté par

M^{lle}YANAT Betitra

Président :	Mr. KECHA. M.	MCA, UAMB
Rapporteur :	Mr. TOUATI. A.	MCA, UAMB
Examineur :	Mme. BEJOU. F.	MCA, UAMB
Invité :	Mr. NABTI E. H	MCB, UAMB

2009

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA DE BEJAIA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

MEMOIRE DE MAGISTER

Option Microbiologie Appliquée

Thème

**Evaluation de la sensibilité aux quinolones et aux
fluoroquinolones de souches d'entérobactéries isolées
au niveau de quelques laboratoires d'analyses
médicales de la région de Béjaia**

Présenté par

M^{lle}YANAT Betitra

Président :	Mr. KECHA. M.	MCA, UAMB
Rapporteur :	Mr. TOUATI. A.	MCA, UAMB
Examineur :	Mme. BEJOU. F.	MCA, UAMB
Invité :	Mr. NABTI E. H	MCB, UAMB

2009



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA DE BEJAIA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

MEMOIRE DE MAGISTER

Option Microbiologie Appliquée

Thème

**Evaluation de la sensibilité aux quinolones et aux
fluoroquinolones de souches d'entérobactéries isolées
au niveau de quelques laboratoires d'analyses
médicales de la région de Béjaïa**

Présenté par

M^{lle} YANAT Betitra

Président :	Mr. KECHA. M.	MCA, UAMB
Rapporteur :	Mr. TOUATI. A.	MCA, UAMB
Examineur :	Mme. BEJOU. F.	MCA, UAMB
Invité :	Mr. NABTI E. H	MCB, UAMB

2009



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA DE BEJAIA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

MEMOIRE DE MAGISTER

Option Microbiologie Appliquée

Thème

**Evaluation de la sensibilité aux quinolones et aux
fluoroquinolones de souches d'entérobactéries isolées
au niveau de quelques laboratoires d'analyses
médicales de la région de Béjaia**

Présenté par

M^{lle} YANAT Betitra

Président :	Mr. KECHA. M.	MCA, UAMB
Rapporteur :	Mr. TOUATI. A.	MCA, UAMB
Examineur :	Mme. BEJOU. F.	MCA, UAMB
Invité :	Mr. NABTI E. H	MCB, UAMB

2009

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de biochimie microbienne de l'université A. Mira de Béjaia

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse Dr. A. Touati, Maître de conférence de l'université A. Mira de Béjaia, pour ses conseils éclairés dans l'orientation des travaux et son pragmatisme, et aussi pour m'avoir fait confiance et pour avoir largement participé à ma formation scientifique.

J'adresse mes remerciements au Professeur S. Benallaoua qui m'a accueilli dans son équipe.

Mes remerciements s'adressent également à

Docteur. M. Kecha, Maître de conférences de l'université A. Mira de Béjaia, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.

Madame la doctoresse Bedjou. F et Monsieur le Docteur Nabti. H, de l'université A. Mira de Béjaia, qui ont accepté d'être examinateurs de ce travail, pour l'intérêt qu'ils lui ont manifesté et leur disponibilité.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Ait Bachir, le Dr. Djama, le Dr. Kadi et le Dr. Lalaoui, ainsi que le personnel des quatre laboratoires d'analyses médicales à partir desquels les souches ont été collectées, pour leur contribution majeure à ce travail.

DEDICACES

Je dédie ce travail

A

Mes très chers parents,

Pour m'avoir encouragé et soutenu durant mes études

Mon frère et mes sœurs

Tous mes amis

Ainsi qu'à toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) et tout particulièrement à mes collègues et amies : Ibtisseme, Samiha, Fahima et Badria, pour leur soutien et leur esprit d'équipe.

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	01

Partie I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Quinolones et fluoroquinolones : Structure et mode d'action

I. Généralités	03
II. Relation structure-activité	05
III. Classification	
III.1. Classification chimique	05
III.2. Classification biologique.....	06
IV. Mode d'action	
IV.1. Pénétration des quinolones	08
IV.2. Inhibition de la gyrase.....	08
IV.3. Inhibition de la topoisomérase IV.....	10
V. Utilisation des quinolones	11

Chapitre II : Résistance des entérobactéries aux quinolones

I. Mécanismes de résistance	
I.1. Résistance à médiation chromosomique.....	13
I.1.1. Résistance par modification de la cible.....	13
I.1.2. Résistance par diminution de la concentration intracellulaire.....	17
I.2. Résistance à médiation plasmidique.....	20
I.2.1. Protection des cibles : Protéine Qnr.....	20

I.2.2. Inactivation enzymatique : AAC(6')-Ib-cr.....	22
I.2.3. Efflux actif : Pompe QepA.....	23
II. Epidémiologie de la résistance plasmidique aux quinolones.....	23
III. Association Qnr-BLSE	25
IV. Environnement génétique des gènes <i>qnr</i>	25
V. Origine des gènes de résistance de type <i>qnr</i>	28

Partie II : MATERIEL & METHODES

1. Collecte de souches bactériennes.....	30
2. Repiquages des souches et identification.....	30
3. Etude de la résistance des souches d'entérobactéries aux antibiotiques.....	31
3.1. Antibiogramme standard.....	31
4. Détermination des CMI de la ciprofloxacine en milieu solide.....	33
5. PCR du gène <i>qnr</i>.....	34
6. Recherche des β-lactamases à spectre élargi (BLSE).....	34
6.1. DD-test.....	34
6. 2. DD-Test sur gélose à la cloxacilline.....	34
7. PCR du gène <i>bla</i> _{CTX-M}.....	35
8. Transfert par Conjugaison.....	35
9. Etude de la relation consommation-résistance aux antibiotiques.....	38

Partie III : RESULTATS & DISCUSSION

I. Collecte de souches	39
I.1. Répartition des souches par prélèvement et par espèce	39
I.2. Caractéristiques de la population.....	40
II. Résistance des souches aux antibiotiques	
II.1. Résistance à l'acide nalidixique	42

II.1.1. Taux de résistance par prélèvement et par espèce.....	43
II.1.2. Caractéristiques de la population résistante.....	44
II. 2. Résistance aux fluoroquinolones	47
II.3. Résistance aux autres antibiotiques.....	50
III. Analyse des phénotypes de résistance.....	51
III.1. Analyse des phénotypes de résistance aux quinolones.....	51
III.1.1. Déduction des phénotypes de résistance aux quinolones.....	51
III.1.2. Fréquence des phénotypes de résistance aux quinolones.....	51
III.1.3. PCR du gène <i>qnr</i>	54
III.1.4. Détermination des CMI de la ciprofloxacine.....	56
III.2. Analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	59
III.2.1. Recherche des β -lactamases à spectre élargi (BLSE).....	59
a. DD-Test.....	59
b. DD-Test sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacillne.....	60
c. PCR du gène <i>bla</i> _{CTX-M}	61
IV. Conjugaison.....	62
V. Etude de la relation consommation _résistance aux antibiotiques	
V.1. Enquête chez les médecins	62
V.2. Enquête chez les pharmaciens.....	63
Conclusion.....	65
Références bibliographiques.....	68
Annexes	

DEDICACES

Je dédie ce travail

A

Mes très chers parents,

Pour m'avoir encouragé et soutenu durant mes études

Mon frère et mes sœurs

Tous mes amis

Ainsi qu'à toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie Appliquée

(LMA) et tout particulièrement à mes collègues et amies : Ibtisseme,

Samihha, Fahima et Badria, pour leur soutien et leur esprit

d'équipe.

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	01

Partie I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Quinolones et fluoroquinolones : Structure et mode d'action

I. Généralités.....	03
II. Relation structure-activité	05
III. Classification	
III.1. Classification chimique	05
III.2. Classification biologique.....	06
IV. Mode d'action	
IV.1. Pénétration des quinolones	08
IV.2. Inhibition de la gyrase.....	08
IV.3. Inhibition de la topoisomérase IV.....	10
V. Utilisation des quinolones	11

Chapitre II : Résistance des entérobactéries aux quinolones

I. Mécanismes de résistance	
I.1. Résistance à médiation chromosomique.....	13
I.1.1. Résistance par modification de la cible.....	13
I.1.2. Résistance par diminution de la concentration intracellulaire.....	17
I.2. Résistance à médiation plasmidique.....	20
I.2.1. Protection des cibles : Protéine Qnr.....	20
I.2.2. Inactivation enzymatique : AAC(6')-Ib-cr.....	22
I.2.3. Efflux actif : Pompe QepA.....	23

II. Epidémiologie de la résistance plasmidique aux quinolones	23
III. Association Qnr-BLSE	25
IV. Environnement génétique des gènes <i>qnr</i>	25
V. Origine des gènes de résistance de type <i>qnr</i>	28

Partie II : MATERIEL & METHODES

1. Collecte de souches bactériennes	30
2. Repiquages des souches et identification	30
3. Etude de la résistance des souches d'entérobactéries aux antibiotiques	31
3.1. Antibiogramme standard.....	31
4. Détermination des CMI de la ciprofloxacine en milieu solide	33
5. PCR du gène <i>qnr</i>	34
6. Recherche des β-lactamases à spectre élargi (BLSE)	34
6.1. DD-test.....	34
6. 2. DD-Test sur gélose à la cloxacilline.....	34
7. PCR du gène <i>bla</i> <i>CTX-M</i>	35
8. Transfert par Conjugaison	35
9. Etude de la relation consommation-résistance aux antibiotiques	38

Partie III : RESULTATS & DISCUSSION

I. Collecte de souches	39
I.1. Répartition des souches par prélèvement et par espèce	39
I.2. Caractéristiques de la population.....	40
II. Résistance des souches aux antibiotiques	
II.1. Résistance à l'acide nalidixique	42
II.1.1. Taux de résistance par prélèvement et par espèce.....	43
II.1.2. Caractéristiques de la population résistante.....	44
II. 2. Résistance aux fluoroquinolones	47
II.3. Résistance aux autres antibiotiques.....	50

III. Analyse des phénotypes de résistance.....	51
III.1. Analyse des phénotypes de résistance aux quinolones.....	51
III.1.1. Dédution des phénotypes de résistance aux quinolones.....	51
III.1.2. Fréquence des phénotypes de résistance aux quinolones.....	51
III.1.3. PCR du gène <i>qnr</i>	54
III.1.4. Détermination des CMI de la ciprofloxacine.....	56
III.2. Analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	59
III.2.1. Recherche des β -lactamases à spectre élargi (BLSE).....	59
a. DD-Test.....	59
b. DD-Test sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline.....	60
c. PCR du gène <i>bla</i> _{CTX-M}	61
IV. Conjugaison.....	62
V. Etude de la relation consommation _résistance aux antibiotiques	
V.1. Enquête chez les médecins	62
V.2. Enquête chez les pharmaciens.....	63
Conclusion.....	65
Références bibliographiques.....	68
Annexes	

Liste des abréviations

Aforcopio-Bio : Association de formation continue en pathologie infectieuse des biologistes

BLSE : β -lactamase à spectre élargi

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

C1G : céphalosporine de 1^{ère} génération

C2G : céphalosporine de 2^{ème} génération

C3G : céphalosporine de 3^{ème} génération

C4G : céphalosporine de 4^{ème} génération

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CTX-M : céfotaximase

EAU : European Association of Urology

ECBU: Examen Cyto-Bactériologique des urines

Gyr : gyrase

I : intermédiaire

Mar : Multiple antibiotic resistance

MD : Marque Déposée

Omp : Outer membrane protein

PCR : Polymeras Chain Reaction

P.V : Prélèvements vaginaux

Qep : quinolone efflux pump

Qnr : quinolone resistance

QRDR : Quinolone Resistance Determining Region

R : résistant

RND : Resistance Nodulation cell Division

S : sensible

TBE : Tris-Borate-EDTA

TDA : Tryptophane désaminase

VP : Voges-Proskauer

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Structure de base des quinolones	03
2	Structure chimique de quelques quinolones et fluoroquinolones	04
3	Relation structure-activité des fluoroquinolones	05
4	Schéma de la formation du complexe fluoroquinolone-topoisomerase-ADN	09
5	Représentation schématique des séquences entourant le gène <i>qnrA</i> identifiées chez deux souches <i>d'E. cloacae</i> et <i>d'E. aerogenes</i>	26
6	Environnement génétique du gène <i>qnrB2</i>	27
7	Représentation schématique des séquences entourant le gène <i>qnrS</i>	27
8	Comparaison des séquences des déterminants plasmidiques QnrA1, QnrA2, QnrS et QnrB avec les déterminants QnrA3, QnrA4 et QnrA5 de <i>S. algae</i>	28
9	Technique de transfert plasmidique par conjugaison	37
10	Pyramide des âges de la population	41
11	Pyramide des âges de la population résistante à l'acide nalidixique	45
12	Taux de résistance aux fluoroquinolones des souches résistantes à l'acide nalidixique	47
13	Sensibilité des souches résistantes à l'acide nalidixique à d'autres familles d'antibiotiques	50
14	Fréquence des phénotypes de résistance aux quinolones	53
15	Antibiogrammes des quinolones des souches d'entérobactéries et les différents phénotypes de résistance	53
16	Résultat de l'amplification par PCR du gène <i>qnrB</i> (pour les souches A101, A108, A134, A162 et L301)	55
17	Image de synergie pour le Souche A162 productrice de BLSE	59
18	Phénotype d'hyperproduction de céphalosporinase pour la souche A101	60
19	Résultat de l'amplification par PCR du gène <i>bla</i> _{CTX-M} (pour les souches A101, A108, A134, A162 et L301)	61

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I.	Spectre d'activité des quinolones	07
II.	Indications des fluorquinolones	12
III.	Les mutations détectées dans les gènes codant pour la gyrase chez <i>E coli</i> et chez <i>Salmonella</i>	15
IV.	Les mutations détectées dans les gènes codant pour la topoisomérase IV chez <i>E. coli</i> et chez <i>Salmonella</i>	16
V.	Epidémiologie du gène <i>qnr</i>	24
VI.	Liste des antibiotiques testés	32
VII.	Réalisation de la gamme d'antibiotique pour un volume final de 100 ml	33
VIII.	Répartition des souches par prélèvement	39
IX.	Répartition des souches par espèce	40
X.	Répartition des patients par catégories d'âge	41
XI.	Taux de résistance par prélèvement	43
XII.	Taux de résistance par espèce	43
XIII.	Taux de résistance à l'acide nalidixique par catégorie d'âge	44
XIV.	Taux de résistance à l'acide nalidixique selon le sexe des patients	46
XV.	Taux de résistance aux fluoroquinolones par espèce	48
XVI.	Comparaison des % de résistance à la ciprofloxacine chez <i>E. coli</i> avec les données rapportées dans certaines régions du monde	49
XVII.	Mécanismes probables de la résistance aux quinolones	51
XVIII.	Fréquence des phénotypes de résistance aux quinolones pour chaque espèce	52
XIX.	Souches d'entérobactéries testées pour la PCR du gène <i>qnr</i>	54
XX.	CMI de la ciprofloxacine des souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixiques	56-57
XXI.	Diamètres (mm) des zones d'inhibition du DD-test	59
XXII.	Diamètres (mm) des zones d'inhibition sur gélose Mueller Hinton avec et sans cloxacilline	60

Annexes

- I. Taux de résistance à l'acide nalidixique par catégorie d'âge.
- II. Taux de résistance à l'acide nalidixique selon le sexe des patients.
- III. Diamètres (mm) des zones édités par le CA-SFM, 2007.
- IV. Préparation du mélange réactionnel pour la PCR du gène *qnr*
- V. Amorces utilisées pour la PCR *qnr*
- VI. Programmation de la PCR
- VII. Aspect des colonies sur milieu sélectif et chromogène des espèces d'entérobactéries les plus fréquemment isolées.
- VIII. Résultats de l'identification par la galerie biochimique.

Introduction

Introduction

Les quinolones sont des composés antibactériens de synthèse dont le chef de file, l'acide nalidixique, a été décrit en 1962. En raison de son spectre étroit et de ses propriétés pharmacocinétiques, son utilisation est limitée aux infections urinaires de l'adulte à entérobactéries (Soussy, 2006). L'addition d'un atome de fluor en position C-6 et d'un noyau pipérazinyl en position C-7 a conduit à la mise au point des fluoroquinolones qui ont été introduites en thérapeutique au début des années 80. Les propriétés pharmacocinétiques de ces dernières et leur large spectre d'action ont permis d'étendre leurs indications aux traitements d'infections systémiques causées par la plupart des bactéries à Gram négatif aérobies et à certaines bactéries à Gram positif comme les staphylocoques, ainsi qu'aux traitements d'infections respiratoires causées par *Streptococcus pneumoniae* (Nordmann et Mammeri, 2007).

L'introduction des quinolones en thérapeutique a été suivie rapidement par la description de souches résistantes chez les entérobactéries. Pendant plus de 30 ans, les seuls mécanismes de résistance connus étaient chromosomiques. Les mutations responsables sont localisées dans des gènes qui conduisent soit à la perte d'affinité de l'antibiotique pour sa cible (les topoisomérases), soit à une augmentation de son excrétion hors du cytoplasme, ou bien à une diminution de sa pénétration transmembranaire (Hopkins et al., 2005 ; Nordmann et Mammeri, 2007).

Le premier déterminant d'origine plasmidique, QnrA, fut découvert en 1998 aux Etats-Unis chez une souche de *Klebsiella pneumoniae* (Martinez-Martinez et al., 1998), suivi par la découverte en 2005 du déterminant QnrS et en 2006 de QnrB chez plusieurs espèces d'entérobactéries (Hata et al., 2005 ; Jacoby et al., 2006). En Algérie, la présence de QnrS et de QnrB a été déterminée chez des souches d'*E. cloacae* (Iabaden et al., 2008 ; Touati et al., 2008). Dernièrement, deux nouveaux types de Qnr (QnrD et QnrC) ont été décrits en Chine (Cavaco et al., 2009; Wang et al., 2009). Ces protéines s'intercaleraient entre les quinolones, les topoisomérases et l'ADN, limitant ainsi la fixation ultérieure des quinolones sur leur cible (Tran et Jacoby, 2002). La dissémination de ces déterminants est mondialement connue (Robicsek et al., 2006).

En 2005, un second mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones a été décrit, il s'agit de la modification de la molécule par l'acétyl transférase AAC (6')-1b-cr (Robicsek et al.,

2006). Plus récemment, une pompe à médiation plasmidique « QepA » a été découverte (Yaman et al., 2007).

L'émergence de la résistance acquise des entérobactéries aux quinolones et aux fluoroquinolones aussi bien à l'hôpital qu'en ville est devenue une préoccupation majeure et ce un peu partout dans le monde (Lecaillon et al., 2004). Bouzenoune et al, on rapporté des taux de résistance de 11,7 % pour l'acide nalidixique et de 10,1 % pour l'ofloxacin dans une étude réalisée à l'hôpital de Ain M'lila en Constantine (Bouzenoune et al, 2009). Des taux de résistance à la ciprofloxacine de 43%, de 28% et de 22.1% ont été révélés chez des souches communautaires isolées au Brésil, en Italie et en Chine respectivement (Pereira et al., 2007; Ho et al., 2007; Cagnacci et al.,2008). Ces taux de résistance élevés justifient une surveillance régionale périodique de l'efficacité de ces antibiotiques en milieu extra-hospitalier.

Actuellement, très peu de travaux nationaux ont été consacrés à l'étude de la résistance aux quinolones. Il est donc indispensable de disposer de données actualisées sur l'évolution de cette résistance. C'est dans cette optique que nous proposons d'évaluer la sensibilité aux quinolones et aux fluoroquinolones de souches d'entérobactéries isolées au niveau de quelques laboratoires d'analyses médicales de la région de Béjaia et de déterminer certains facteurs de risque dans l'acquisition des souches résistantes. Afin de développer ces aspects, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- Collecte de souches d'entérobactéries à partir de quatre laboratoires d'analyses médicales (laboratoire du D^r Djama, du D^r Lalaoui, du D^r Ait Bachir et du D^r Kadi), ainsi que la collecte des données concernant les patients (âge, sexe, origine de prélèvement).
- Evaluation des taux de résistance à l'acide nalidixique des souches d'entérobactéries.
- Etude de la sensibilité des souches résistantes à l'acide nalidixique vis-à-vis des fluoroquinolones et d'autres familles d'antibiotiques.
- Détermination des phénotypes de résistance aux quinolones et aux β -lactamines.
- Détermination des CMI de la ciprofloxacine.
- Etude de la capacité de transfert des déterminants *qnr* et *bla* par conjugaison.
- Caractérisation génétique par PCR des gènes *qnr* et *bla*.
- Evaluation des pratiques de prescription des quinolones et fluoroquinolones en réalisant une enquête auprès de différents médecins de ville et pharmaciens.

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Quinolones et fluoroquinolones :

Structure et mode d'action

Chapitre I : Les quinolones et les fluoroquinolones : Structure et mode d'action

I. Généralités

Les quinolones sont des molécules obtenues par synthèse chimique à partir du noyau **4-oxo, 3-carbonyl, pyridine** : les 4-quinolones, dont l'azote peut être diversement substitué. L'acide nalidixique est le premier antibiotique de la famille des quinolones décrit en 1962 par Leshner et coll et commercialisé en 1968 faisant partie de la série 1, 8 naphthyridine (Bryskier, 1999). Le remplacement de l'atome d'azote en position 8 par un atome de carbone a donné naissance aux dérivés de type quinoléine, dont la première molécule utilisée en thérapeutique a été l'acide oxalinique. L'acide pipémidique est la seule molécule avec une structure pyrido (2,3-d) pyrimidine (figure 1).

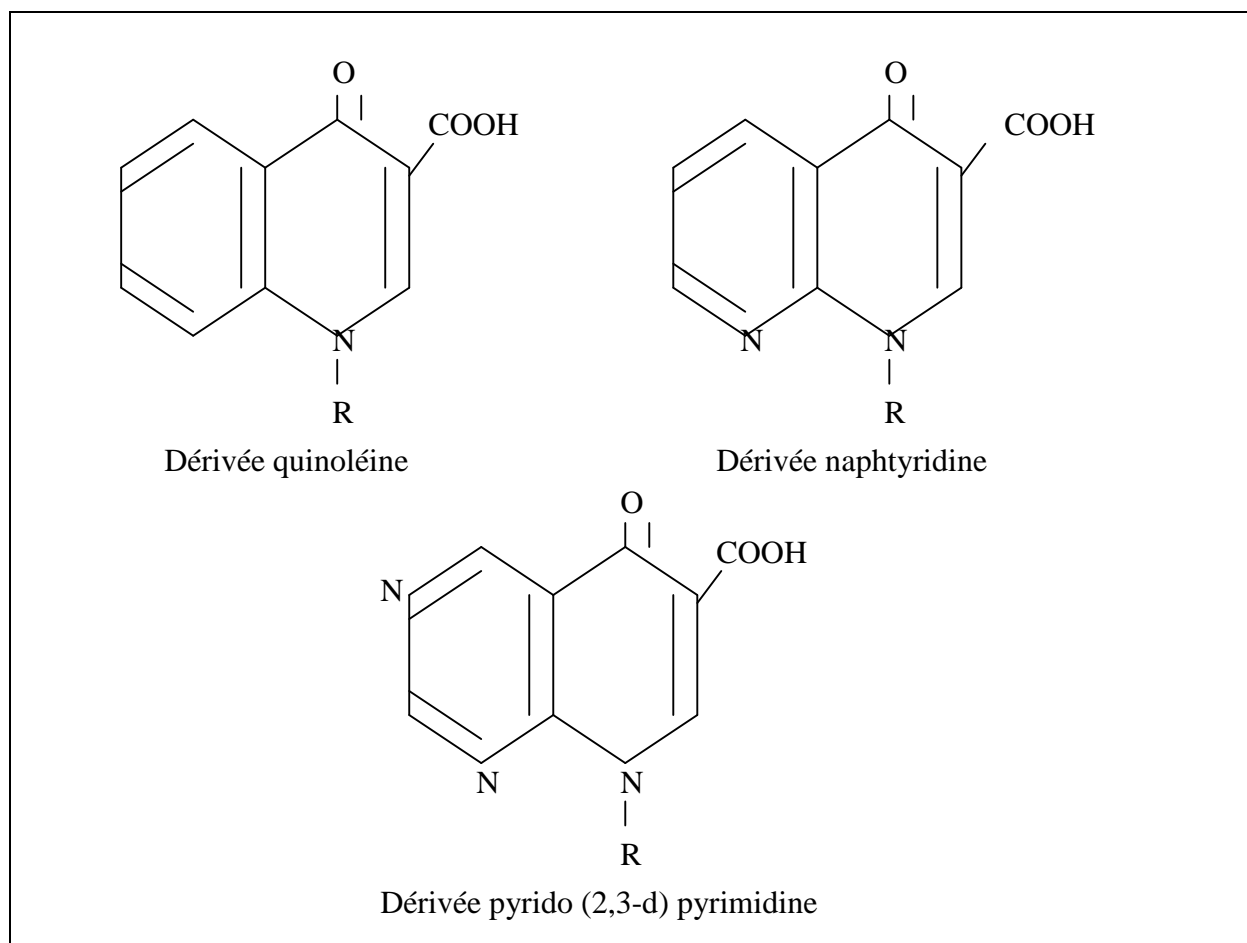


Figure 01 : Structure de base des quinolones (dérivées pyridone β -carboxylique)
(Gaudy et Buxeraux, 2005).

L'utilisation des quinolones classiques (acide nalidixique, acide pipémidique, acide oxalinique et acide piromidique) est limitée aux infections urinaires de l'adulte à entérobactéries et ce en raison de leur spectre étroit, de leur fortes liaisons aux protéines plasmatiques et leur mauvaise tolérance (Bryskier, 1999 ; Trystam et *al.*, 2002).

Au début des années 1980, sont apparues les fluoroquinolones. Se sont des dérivés de la quinoléine avec un atome de fluor en position 6 et un cycle azoté, le plus souvent une pipérazine, en position 7 (figure 2). Les fluoroquinolones ont une activité intrinsèque bien supérieure à celle de l'acide nalidixique, un spectre antibactérien élargi et des propriétés pharmacocinétiques intéressantes (administration orale, bonne résorption *per os*, demi-vie plus élevée et bonne diffusion tissulaire). Ces molécules sont utilisées non seulement dans le traitement des infections urinaires, mais aussi dans le traitement des infections digestives, génitales, respiratoires ou osseuses (Trystam et *al.*, 2002 ; Mahamat et *al.*, 2005).

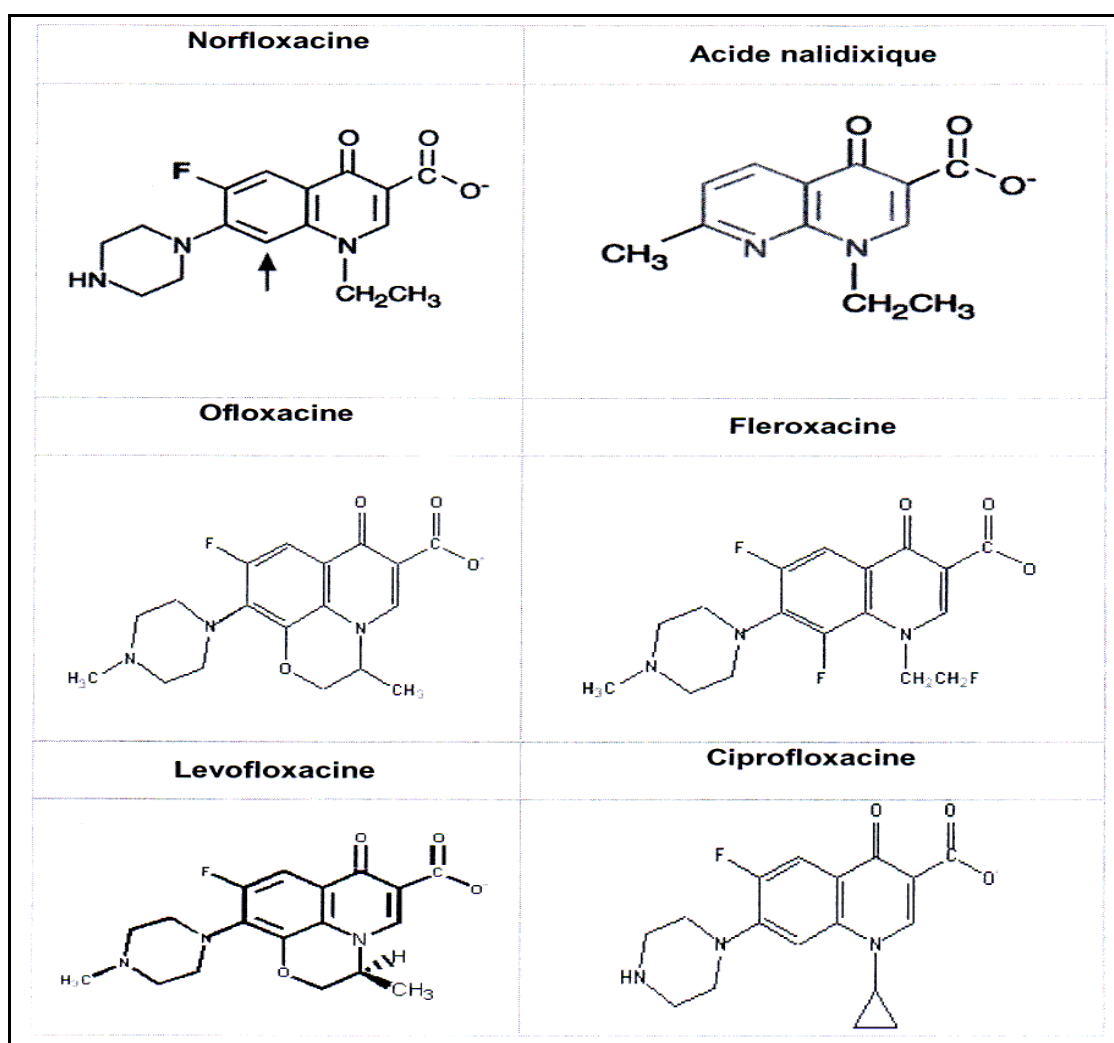


Figure 02 : Structure chimique de quelques quinolones et fluoroquinolones (Soussy, 2006)

II. Relation structure-activité

Les groupements carboxyliques en position 3 et 4 des fluoroquinolones sont responsables de l'activité antibactérienne car ils permettent la fixation de la molécule sur le complexe « ADN-gyrase ». L'atome de fluor en C6 augmente l'inhibition de l'activité de la gyrase et la pénétration transpariétale. Le cycle azoté en position 7 a pour effet d'augmenter l'activité antibactérienne en régulant la pénétration intra-bactérienne (figure 3) (Chu et Fernandes, 1989 ; Bryskier, 1999). Les substitutions du radical X₈ influencent sur l'activité envers les germes anaérobies ainsi que la pharmacocinétique (Schaumann et Rodlof, 2007).

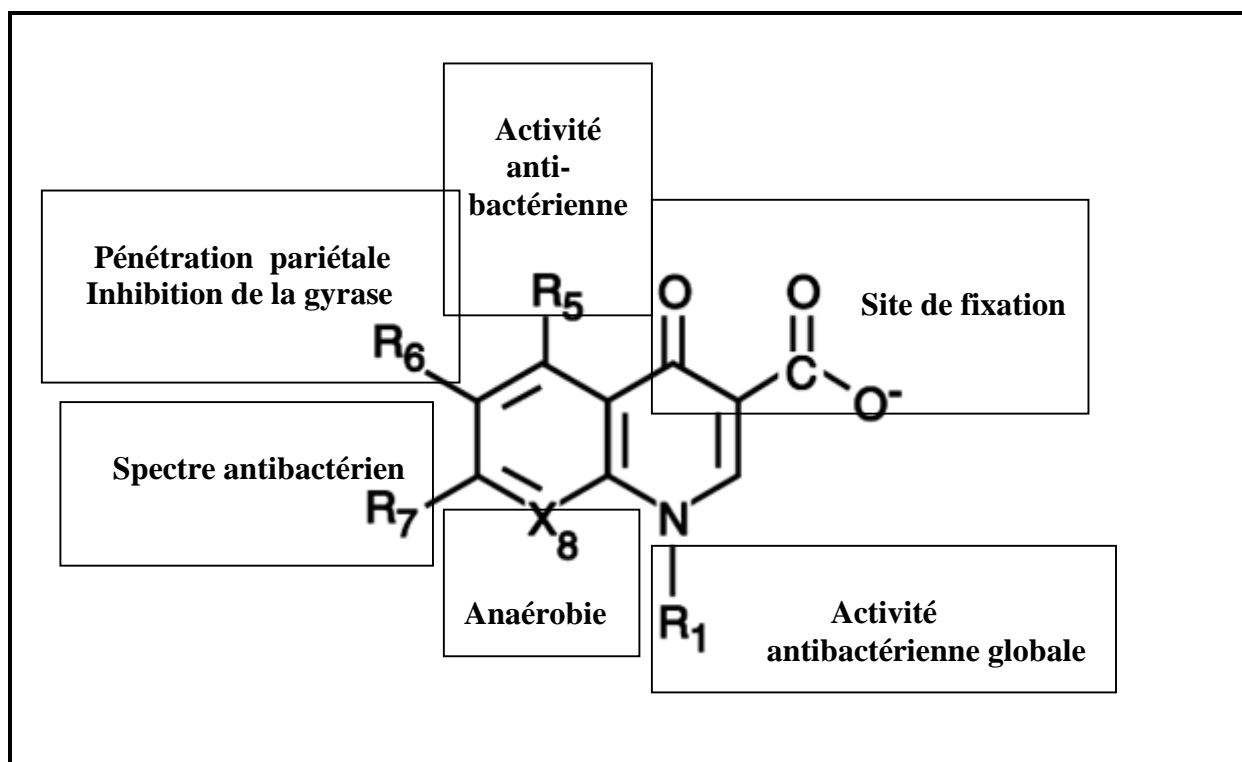


Figure 03 : Relation structure-activité des fluoroquinolones (Bryskier, 1999)

III. Classification

III.1. Classification chimique

En fonction du nombre de cycles associés au noyau **pyridone β-carboxylique**, il est possible de décrire quatre groupes chimiques des quinolones : mono-, bi-, tri- et tétracycliques (Bryskier, 1999).

- **Le groupe I** : comprend des dérivés monocycliques.

- **Le groupe II** : comprend des dérivés bicycliques dont le second cycle peut être penta- hexa- ou hepta-atomique.

A l'intérieur de ce groupe, quatre sous-groupes peuvent être décrits :

- **IIA₁** : 1, 8 naphthyridine (acide nalidixique).
 - **IIA₂** : quinoléine (la majorité des fluoroquinolones).
 - **IIA₃** : pyridone (2, 3-b) pyrimidine (cycle pipémidique).
 - **IIA₃** : cinnoline (cinoxacine).
- **Le groupe III** : renferme des molécules tétracycliques qui se répartissent en molécules non fluorées (acide oxolinique) et fluorées (ofloxacin).
 - **Le groupe IV** : comprend des molécules quadricycliques.

III.2. Classification biologique

Les quinolones peuvent être classées en quatre générations (Tableau N°I). D'une génération à l'autre, le spectre d'activité s'élargit en incluant un nouveau groupe de pathogènes (King et *al.*, 2000 ; Larouche, 2001).

- **Quinolones de première génération** : représentées par l'acide nalidixique et la cinoxacine possédant le spectre d'activité le plus étroit, limité aux bactéries à Gram négatif.
- **Quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones** : représentées principalement par la norfloxacin, la ciprofloxacine et l'ofloxacin. Elles sont efficaces contre les bactéries à Gram négatif et ont un spectre élargi aux bactéries à Gram positif. D'autres exemples de molécules telles que l'enrofloxacin et la marbofloxacine sont utilisées en médecine vétérinaire.
- **Quinolones de troisième génération** : Dénommées les nouvelles fluoroquinolones, elles sont représentées par la lévofloxacin, la gatifloxacin, la moxifloxacin, la grépafloracin, la gémifloxacin et la sparfloracin. Ces molécules possèdent un spectre englobant les bactéries Gram positives, Gram négatives ainsi que les bactéries atypiques (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*). A ce spectre, s'ajoute l'activité partielle sur les anaérobies pour la moxifloxacin et la gatifloxacin.
- **Quinolones de quatrième génération** : Représentées par la trovafloxacin ayant une activité plus accrue sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies.

Tableau N° I : Spectre d'activité des quinolones (King et al., 2000 ; Larouche, 2001)

Classe	Exemples d'agents	Nom commercial	Spectre d'activité			
			Gram +	Gram -	Atypique	Anaérobie
1 ^{ère} génération	Acide nalidixique	NegGram ^{MD}	-	+++	-	-
2 ^{ème} génération	Norfloxacin Ofloxacin Ciprofloxacine	Noroxine ^{MD} Ofloct ^{MD} , Floxin ^{MD} Ciflox ^{MD} , Cipro ^{MD}	+	+++	+	-
3 ^{ème} génération	Lévofloxacine	Tavanic ^{MD} , Levaquin ^{MD}	++	++	+++	-
	Moxifloxacine	Ilizilox ^{MD} , Avelox ^{MD}	+++	++	+++	++
	Gatifloxacine	Tequin ^{MD}	++	++	+++	+
	Sparfloxacine	Zagam ^{MD}	++	++	+++	-
	Grépafloracine	Raxar ^{MD}	++	++	+++	-
	Gémifloxacine	Factive ^{MD}	+++	++	+++	+
4 ^{ème} génération	Trovafloracine	Trovan ^{MD}	+++	+++	+++	+++

MD : marque déposée

(-) : Peu ou aucune activité
(++) : Activité modérée(+) : Activité faible
(+++): Excellente activité

IV. Mode d'action

IV.1. Pénétration membranaire

Selon la taille, la charge et l'hydrophobicité relative de la molécule, les quinolones peuvent emprunter différentes voies afin de pénétrer à l'intérieur des cellules bactériennes. Les quinolones hydrophiles (acide pipémidique, ciprofloxacine, norfloxacine) diffusent souvent à travers les porines OmpF (rarement à travers les porines OmpC). Les composés plus hydrophobes (acide nalidixique, fluméquine, pefloxacine, sparfloxacine) se fixent par chélation aux ions Mg^{++} de la membrane externe, grâce à la fonction cétonique à proximité de l'atome hétérocyclique, puis passent à travers la porine OmpF. Ces composés peuvent également pénétrer à travers la double couche phospholipidique de la membrane externe (cas de l'acide nalidixique) (Soussy, 2006).

Lorsqu'elles ont diffusé dans le cytoplasme, les quinolones inhibent de manière sélective la réplication de l'ADN bactérien en agissant au niveau des surenroulements. Les fluoroquinolones ont pour cible deux enzymes de la classe des topoisomérases : **la gyrase** (cible principale chez les bactéries à Gram négatif) et la **topoisomérase IV** (cible principale chez les bactéries à Gram positif) (Soussy, 2006). Certaines quinolones de nouvelles générations (clinafloxacine, moxifloxacine) possèdent une affinité similaire pour les deux cibles (Ruiz, 2003).

IV.2. Inhibition de la gyrase

La gyrase est une topoisomérase du groupe II qui permet de réguler la fourche de réplication en introduisant un surenroulement négatif et d'éliminer les nœuds apparaissant dans l'ADN et aide à la formation des boucles et des replis de l'ADN (Bryskier, 1999). Cette enzyme est constituée de deux sous-unités GyrA et GyrB, chacune sous la forme d'un dimère.

- **La sous-unité A** est une protéine de 100 KDa, composée de 875 acides aminés et dont la synthèse est codée par le gène *gyrA*. C'est la cible principale des quinolones chez les bactéries à Gram négatif (Soussy, 2006). Son extrémité N-terminal contient le site actif de la gyrase (Tyrosine 122, site de fixation à l'ADN à son extrémité 5'). Son extrémité C-terminal, assure la stabilité du complexe ADN/Gyrase (Bryskier, 1999).
- **La sous-unité B** est une protéine de 90KDa, composée de 884 acides aminés et dont la synthèse est codée par le gène *gyrB*. Elle comprend un domaine N-terminal responsable de l'hydrolyse de l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire aux réactions catalysées par l'enzyme, et d'un domaine C-terminal qui assure l'interaction avec la sous-unité A et avec l'ADN (Bryskier, 1999 ; Soussy, 2006).

Il existe plusieurs modèles de fixation des quinolones au complexe ADN/Gyrase. Shen et *coll* ont proposé en 1989 que la fixation à l'ADN se fasse de manière coopérative dans une zone où les deux brins ont été séparés et coupés par la gyrase ou même en absence de coupure de l'ADN. Par ailleurs, Critchlow et *al.*, ont suggéré en 1996 que l'ADN ne sera coupé qu'après la fixation des quinolones sur le complexe ADN/Gyrase. Un autre modèle proposé par Maxwell et *al* en 1992, rapportant que les quinolones se fixeraient à l'ADN et à la gyrase. Enfin, pour d'autres auteurs la fixation des quinolones à l'ADN se fait via des ions Mg^{++} (Bryskier, 1999 Soussy, 2006).

Le complexe ADN-Gyrase-Quinolones formé va bloquer la progression de l'ADN polymérase bactérienne au cours de la réplication, d'où l'inhibition de la synthèse d'ADN et donc de la croissance bactérienne (figure 4) (Hooper, 2002).

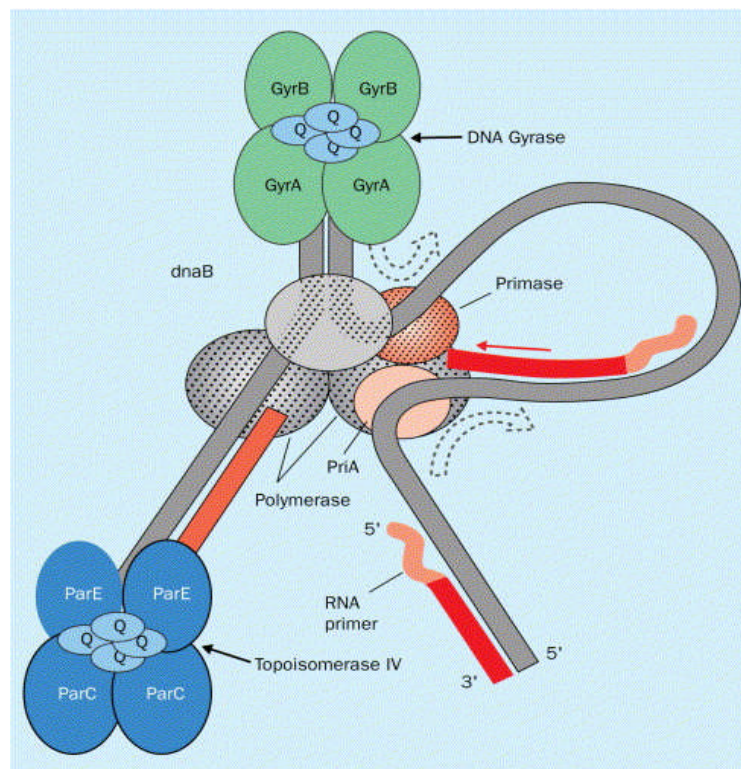


Figure 04 : Schéma de la formation du complexe fluoroquinolones-topoisomérases-ADN (Hooper, 2002)

IV.3. Inhibition de la topoisomérase VI

La topoisomérase VI est la première cible des quinolones chez les bactéries à Gram positif et chez *Haemophilus influenzae* (Bryskier, 1999). Son rôle principal est de désenchevêtrer les brins d'ADN fils après réplication et intervient aussi dans la partition des chromosomes lors de la croissance bactérienne. Cette enzyme présente 40% d'homologie avec la gyrase, elle est aussi présente sous forme tétramérique C2E2. Deux gènes, *parC* et *parE*, codent respectivement pour les sous-unités ParC et ParE.

- **La sous-unité ParC** (75 kDa, homologue à la GyrA) est le siège de l'activité catalytique de la topoisomérase IV (la tyrosine 420 chez *E coli* est l'acide aminé catalytique).
- **La sous-unité ParE** (70kDa, homologue à la Gyr B) contient le site ATPase (Bryskier, 1999 ; Soussy, 2006).

L'interaction entre ADN, quinolone et topoisomérase IV stimule la coupure de l'ADN et inhibe la relégation (Soussy, 2006).

Les quinolones ont des effets différents en fonction de leur concentration. A faible concentration, on assiste à un **effet bactériostatique** par l'inhibition des phénomènes de réplication et de transcription. A concentration élevée, on observe un **effet bactéricide** dû à l'irréversibilité du complexe ADN-topoisomérase-quinolone formé, ce qui conduit à la fragmentation du chromosome bactérien et à l'induction du système de réparation SOS (Hooper, 2002; Robiesek et al., 2006).

V. Utilisation des quinolones

Les quinolones et les fluoroquinolones sont utilisées aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, dans des indications parfois similaires. Cette classe d'antibiotiques permet de traiter efficacement plusieurs infections communautaires et nosocomiales (Fàbrega et *al.*, 2008).

- ❖ **Acide nalidixique et norfloxacin** ou « **quinolones urinaires** » : Sont régulièrement utilisées en prévention de l'infection urinaire récidivante dont le principal pathogène est *E. coli*. En effet, les quinolones s'avèrent être un traitement de première ligne lors d'infections urinaires, bien que leur administration reste contre indiquée chez l'enfant de moins de trois mois chez qu'il peut être responsable de tableaux d'hypertension intracrânienne (Nathanson et Deschênes, 2002).
- ❖ **Ofloxacin** et **ciprofloxacine** ou « **quinolones systémiques** » : Sont utilisées dans les infections compliquées du tractus urinaire (pyélonéphrites) et de la prostate. La forte pénétration de ces molécules fait qu'elles sont aussi utilisées dans le traitement des infections de la peau et des os impliquant les bacille à Gram négatif, les infections gastro-intestinales associées à *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* et *Yersinia enterocolitica*. Mais également, les infections des voies respiratoires inférieures, les infections intra-abdominales (avec un agent anti-anaérobie) et les otites externes malignes (Larouche, 2001 ; Soussy, 2006).
- ❖ **Lévofloxacine** et **sparfloxacine** ou « **quinolones respiratoires** » : Ces molécules sont très actives contre les micro-organismes à Gram positif surtout *Streptococcus pneumoniae*, elles sont donc utilisées pour le traitement des infections des voies respiratoires telles que les pneumonies acquises en communauté et les exacerbations des bronchites chroniques (Larouche, 2001).
- ❖ **Trovafloxacine** : Elle est indiquée pour le traitement des infections gynécologiques, intra-abdominales, urinaires et les pneumonies nosocomiales. En raison de son hépatotoxicité grave, cette molécule a été retirée du marché (Larouche, 2001).

Tableau N°II : Indications des fluoroquinolones (King et al., 2000)

	Norfloxacine	Ciprofloxacine	Ofloxacine	Lévofloxacine	Sparfloxacine	Moxifloxacine	Gatifloxacine	Trovafloraxine
Infections urinaires	X	X	X	X			X	X
Infections urinaires compliquées		X	X				X	X
Prostatite	X	X	X					X
Infections Diarrhéiques		X						
Conjonctivites			X					
Sinusite sévère		X		X		X	X	X
Exacerbations de bronchites chroniques		X	X	X	X	X	X	X
Pneumonie communautaire		X	X	X	X	X	X	X
Infection Intra-abdominale		X						X
Infection de la peau		X	X	X				X
Infection des os		X						
Fièvre typhoïde		X						
Pneumonie Nosocomiale		X						X

Chapitre II :
Résistance des entérobactéries aux
quinolones

Chapitre II : Résistance des entérobactéries aux quinolones

L'émergence et la dissémination de la résistance des entérobactéries aux quinolones, aussi bien en milieu hospitalier qu'en communauté, rend difficile le traitement des infections causées par ces germes. Cette résistance est due à plusieurs mécanismes qui peuvent être chromosomiques ou plasmidiques (Paterson, 2006).

I. Mécanismes de résistance

I. 1. Résistance à médiation chromosomique

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

I.1.1. Résistance par modification de la cible

Diverses mutations dans les gènes codant les sous-unités de ces enzymes (*gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*) ont été identifiées chez des souches résistantes. Cependant, leur impact sur les CMI des quinolones varie selon la nature et le nombre de substitutions en acides aminés qu'elles engendrent, la nature et le nombre des sous-unités qu'elles affectent et les espèces bactériennes concernées (Plésiat, 2006).

a. Résistance par modification de la gyrase

La majorité des mutations décrites dans la gyrase se situent au niveau de l'extrémité N-terminale de GyrA et GyrB dans une région spécifique du site actif de l'enzyme appelée « Quinolone Resistance Determining Region » (**QRDR**). Cette région est hautement conservée chez les espèces bactériennes et elle est localisée au niveau des acides aminés **Ala67/Gln106** dans GyrA et **Asp426/Lys447** dans GyrB (Hopkins et al., 2005; Talukder et al., 2006).

Les substitutions en position 83 (**Ser83Leu**) et 87 (**Asp87Asn ou Gly**) sont les plus fréquemment rencontrées chez *E. coli* et sont localisées tout près du site d'action de la gyrase en amont du résidu tyrosine 122. Il a été suggéré que l'acide aminé en position 83 (Serine) de la GyrA interagit avec le radical en position 1(R1) de la molécule de quinolone et que l'acide aminé en position 87 (Aspartate) de la GyrA interagit avec le radical en position 7 (R7). De même pour les acides aminés en position 82 et 84 pour *parC* chez *E. coli*. Ainsi, ces substitutions peuvent affecter de différentes façons l'affinité pour les molécules de quinolones ayant pour conséquence une diminution de la sensibilité ou même à une résistance aux quinolones (Ruiz, 2003; Hopkins et al., 2005).

Une seule mutation au niveau de *gyrA* est suffisante pour engendrer un haut niveau de résistance à l'acide nalidixique (augmentation de la CMI de 8 à 10 fois), mais pour obtenir une résistance de haut niveau aux fluoroquinolones, une deuxième mutation de *gyrA* et/ou d'autres cibles comme *parC* s'impose (Ruiz, 2003).

Chez *E. coli*, la substitution **Ser83Leu** engendre un plus haut niveau de résistance aux fluoroquinolones que la substitution **Asp87Asn ou Gly**. D'autres mutations dans *gyrA* ont également été détectées mais plus rarement (tableau N°III). La substitution **Asp196Glu** a été détectée en dehors de la séquence QRDR de *gyrA* (Hopkins et al., 2005). Deux nouvelles mutations dans *gyrA* ont été nouvellement décrites par Cesaro et al, il s'agit des substitutions: **Ser83stop** et **Asp82Asn** (Cesaro et al., 2008).

Deux substitutions ont été détectées dans *gyrB* : **Asp426Asn** et **Lys447Glu**. La première engendre une résistance à toutes les quinolones et la seconde engendre une résistance à l'acide nalidixique uniquement et une sensibilité à toutes les fluoroquinolones amphotères telle que la ciprofloxacine (Yoshida et al., 1991; Hopkins et al, 2005). Une nouvelle mutation dans *GyrB* par insertion du glutamate en position 465 a été décrite chez une souche d'*E. coli* (Cesaro et al., 2008).

Tableau N° III: Les mutations détectées dans les gènes codant pour la gyrase chez *E coli* et chez *Salmonella* (Hopkins et al, 2005, Cesaro et al., 2008).

Gène	<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i>	
	Position	Substitution	Position	Substitution
<i>gyrA</i>	Ala51	Val	Ala67	Pro
	Ala67	Ser	Asp72	Gly
	Gly81	Cys Asp	Val73	Ile
	Asp82	Gly Asn	Gly81	Cys Ser His Asp
	Ser83	Leu Trp Ala Val Stop	Asp82	Gly Asn
	Ala84	Pro Val	Ser83	Tyr Phe Ala
	Asp87	Asn Gly Tyr His Val	Asp87	Asn Gly Tyr Lys
	Gln106	His Arg	Leu98	Va
	Ala196	Glu	Ala119	Ser Glu Val
			Ala131	Gly
Glu139			Ala	
Asp144			Asp (mutation silencieuse)	
<i>gyrB</i>	Asp426	Asn	Tyr420	Cys
	Lys447	Glu	Arg437	Leu
			Ser464	Tyr Phe

b. Résistance par modification de la topoisomérase IV

Actuellement, les mutations *parC* et *parE* chez *E. coli* sont toujours associées avec les mutations dans *gyrA*, jouant un rôle important chez les souches ayant un haut niveau de résistance aux quinolones (Hopkins et al, 2005).

La mutation la plus fréquente dans *parC* est située dans le codon 80, la substitution **Ser80Ile** est la plus connue. D'autres mutations dans les codons **Glu84Gly**, **Lys** ou **Val** sont aussi identifiées mais moins souvent (tableau N°IV) (Hopkins et al, 2005). Cattoir et al ont décrit l'association des deux mutations **Gly81Asp** dans *gyrA* et **Ser80Arg** dans *parC* qui confère une résistance de haut niveau à l'ofloxacin mais une sensibilité à l'acide nalidixique chez une souche d'*E. coli*, durant un traitement de dix jours à l'ofloxacin (Cattoir et al., 2006).

Les modifications dans *ParE* sont assez rares et constituent les mutations ultimes pour conférer un haut niveau de résistance (Lascols et al., 2007). Récemment, une nouvelle mutation dans *ParE* a été détectée en position 458 (**Ser→Ala**) (Sorlozano et al., 2007).

Tableau N°IV : Les mutations détectées dans les gènes codant pour la topoisomérase IV chez *E. coli* et chez *Salmonella* (Hopkins et al, 2005 ; Sorlozano et al., 2007).

Gène	<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i>	
	Position	Substitution	Position	Substitution
<i>parC</i>	Ala56	Thr	Tyr57	Ser
	Ser57	Thr	Thr66	Ile
	Gly78	Asp Lys	Gly78	Asp
	Ser80	Ser80 Arg80	Ser80	Arg Ile
	Ser83	Leu	Glu84	Lys Gly
	Glu84	Gly Lys Val		
	Ala108	Val		
<i>parE</i>	Leu416	Phe	Glu453	Gly
	Ile444	Phe	Ser458	Pro
	Leu445	His	His461	Tyr
	Ser458	Thr Ala	Ala498	Thr
	Glu460	Asp	Val512	Gly
	Ile464	Phe		
	Ile529	Leu		

I.1.2. Résistance par diminution de la concentration intracellulaire

a. Imperméabilité membranaire

Chez *E. coli*, OmpF est la porine principale 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, 2006).

Des isolats d'entérobactéries synthétisant des quantités normales de porines mais montrant un profil de résistance similaire à un phénotype d'imperméabilité ont été décrits. La première identification d'un isolat d'*E. aerogenes* de ce type, en 1998, a permis d'établir les bases moléculaires de ce mécanisme de résistance original qui est lié au remplacement du résidu Gly par le résidu Asp dans la boucle L3 de la porine, induisant le rétrécissement du canal et l'altération du champ électrostatique (Pagès, 2004).

Chez plusieurs espèces bactériennes, la disparition des porines fait intervenir l'opéron *mar*, qui, via un petit ARN antisens *micF*, déstabilise l'ARNm de la porine et ce, conjointement à l'expression des pompes d'efflux (Pagès, 2004 ; Gootz, 2006). Ceci a pour conséquence l'augmentation de la résistance aux quinolones hydrophiles, mais n'affecte pas la CMI d'autres molécules telles que : la tosufloxacinine ou la sparfloxacine (Ruiz, 2003 ; Hopkins et al., 2005).

Le système d'osmorégulation à deux composants *ompR-envZ*, qui règle l'expression de OmpC-OmpF chez *E. coli*, pourrait également jouer un rôle dans la résistance des souches. D'autres processus faisant intervenir des cascades de régulation génétique (via *soxS*, *ramA*, IHF) sont aussi associés à la diminution des porines. À côté de ces régulations génétiques possibles, l'influence de facteurs structuraux associés, comme celle du LPS dans l'assemblage, le transport et l'insertion dans la membrane externe, ainsi que celle des protéines chaperons peuvent avoir un effet déterminant sur la quantité de porines exprimées (Pagès, 2004).

Les polyamines sont des molécules synthétisées par la bactérie dans des conditions particulières (stress, phase stationnaire de croissance). Ces petits composés portent des groupes aminés et peuvent contracter des interactions avec les acides aminés (Asp, Glu) localisés dans le canal de la porine. Différents travaux ont montré la capacité de la spermine (polyamine) à restreindre drastiquement la pénétration de la norfloxacine chez *Enterobacter*. L'analyse de mutants en OmpF a permis d'identifier deux positions au niveau de la

constriction du canal, Asp113 et 121, qui peuvent jouer le rôle de points d'ancrage pour la polyamine (Pagès, 2004).

b. Système d'efflux

Les pompes d'efflux représentent 6% à 8% des transporteurs membranaires totaux (Kumar et al., 2005). Elles sont la cause de résistances intrinsèques chez certaines espèces. Ainsi, les souches sauvages d'*Acinetobacter baumannii* ont une CMI de la ciprofloxacine allant de 0.125 à 1 mg/l, alors que les souches sauvages d'*E. coli* n'ont qu'une CMI de la ciprofloxacine allant de 0.007 à 0.25 mg/l. Ceci résulte d'une résistance intrinsèque due à la surexpression de la pompe d'efflux chez *Acinetobacter* (Ruiz, 2003 ; Piddock, 2006).

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

Le taux de résistance intrinsèque des pompes est influencé à la fois par la composition chimique de l'antibiotique (Escribano et al., 2004) 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). Il a été démontré que la surexpression de AcrA augmente le niveau de résistance aux fluoroquinolones de 9 à 10 fois plus (CMI>32mg/L) (Hopkins et al., 2005).

Différentes insertions ou substitutions d'acides aminés, essentiellement au niveau de AcrR, peuvent augmenter l'expression de la pompe d'efflux AcrAB-TolC. La substitution la plus fréquente étant **Cys45Arg** dans AcrR (Corvec et al., 2008). Une autre mutation au niveau du gène répresseur *acrR* a été détectée chez des souches de *Salmonella enterica* sérovar *typhimurum* résistantes à la ciprofloxacine, il s'agit d'une addition de deux acides aminés **Ile75** et **Glu76** (Olliver et al., 2004). Il a été démontré que les gènes SoxRS (superoxyde) induisent également la résistance aux antibiotiques de la même façon que l'opéron *mar* (Pagès, 2004).

Le système d'efflux est souvent associé aux mutations dans *gyrA* chez les souches résistantes à haut niveau aux fluoroquinolones. Cependant, chez une souche de *S. enterica*

sérovar *typhimurium*, il a été démontré que la pompe AcrAB était plus souvent responsable de la résistance aux fluoroquinolones que les mutations *gyrA* (Giraud et *al.*, 2006).

Le système AcrAB s'ouvre et se ferme par une série de changements conformationnels par un mécanisme électrochimique proton dépendant faisant intervenir deux résidus Aspartate-407 et 408 et un résidu lysine-940 qui fournissent une paire de charge dans la région interne de la membrane. Ces acides aminés sont essentiels pour l'exportation du substrat et leur substitution amène à la perte de la résistance de la cellule (Kiralj et Feneira 2006 ; Satoshi, 2008).

Lorsque la pompe AcrAB n'est pas fonctionnelle, d'autres pompes d'efflux de type RND peuvent être recrutées, telle que, AcrEF et SmeDEF, responsables de l'excrétion active des quinolones caractérisée chez *S. maltophilia* (Ruiz, 2003 ; Giraud et *al.*, 2006).

I.2. Résistance à médiation plasmidique

I.2.1. Protection des cibles: Protéines Qnr

C'est en réalisant des expériences de conjugaison pour analyser la résistance aux β -lactamines que Martinez-Martinez *et al.*, ont découvert, en 1998, le premier déterminant de résistance plasmidique aux quinolones. Le plasmide pMG252, provenant de la souche clinique *Klebsiella pneumoniae* UAB1, isolée en Alabama (USA) en 1994, était associé à une résistance aux quinolones (Martinez-Martinez *et al.*, 1998). Le clonage du gène de résistance a mis en évidence un cadre de lecture ouvert de 657 pb codant pour une protéine de 218 acides aminés dénommée Qnr (pour *Quinolone resistance*) et renommée par la suite QnrA1 (Tran et Jacoby, 2002 ; Nordmann et Mammeri, 2007).

La protéine QnrA appartient à la famille des protéines à motif pentapeptide répété, qui est définie par la présence de répétitions en tandem de cinq acides aminés (Ser, Thr, Ala ou Val)-(Asp ou Asn)-(Leu ou Phe)-(Ser, Thr ou Arg)-(Gly) (Tran et Jacoby, 2002). Cette protéine se lie aux topoisomérases et ce indépendamment de la présence de l'ADN, des quinolones et de l'ATP, limitant ainsi la fixation ultérieure des quinolones sur leur cible (Tran *et al.*, 2005).

Parmi les protéines faisant partie de la famille des protéines à motifs pentapeptides répétés, la microcine B17 (bactériocine) inhibe également la gyrase selon un mécanisme d'action semblable à celui des quinolones. Les organismes produisant la microcine B17 produisent aussi la McbG, une protéine à motifs pentapeptides répétés ayant 19.6 % d'homologie en acides aminés avec la protéine QnrA, qui protège la gyrase de l'effet de la microcine B17 (action « antidote ») (Nordmann et Poirel, 2005 ; Honoré *et al.*, 2006).

Depuis la découverte du premier déterminant de résistance plasmidique aux quinolones QnrA, d'autres déterminants ont été identifiés :

- **qnrS** fut découvert chez une souche de *Shigella flexneri* 2b responsable d'une toxoinfection alimentaire dans la préfecture de Aichi (Japon) (Hata *et al.*, 2005). Ce gène code pour une protéine de 218 acides aminés présentant 59 % d'identité avec QnrA1. Un nouveau variant, dénommé QnrS2, a été découvert dans une souche de *Salmonella enterica* stéréotype *anatum* isolée de carcasses de volailles aux USA. Il présente 91 % d'identité avec QnrS, renommé QnrS1 (Gay *et al.*, 2006).
- **qnrB** fut découvert en 2006 chez des souches de *K. pneumoniae* isolées à Coimbatore (Inde), puis chez d'autres espèces d'entérobactéries (*Citrobacter koseri*, *E. coli* et

Enterobacter cloacae) isolées aux USA. Ce gène code pour une protéine de 226 acides aminés présentant 40 % et 37 % d'identité avec QnrA1 et QnrS1, respectivement (Jacoby et al., 2006).

De nouveaux variants de *qnr A, S et B* résultants de substitutions ponctuelles d'acides aminés ont été par la suite identifiés. *qnrA* possède 6 sous-types (A1, ...A6), *qnrS* 4 sous-types (S1, S2, S3 et S4) et *qnrB* 20 variantes (B1, ...B20) (Jacoby et al., 2008 ; Teo et al., 2008 ; Torpdahl et al., 2009). Deux autres types de gène *qnr* ont été découverts dernièrement, *qnrD* et *qnrC* :

- ***qnrD*** a été décrit à partir de souches de *Salmonella enterica* sérovar *kentucky* et *bovismorbificans* d'origine humaine isolées en Chine. Le déterminant QnrD augmente la CMI de la ciprofloxacine par un facteur de 32 (d'une CMI de 0.002 à 0.06 µg/ml) et possède 214 acides aminés avec 48% d'homologie avec QnrA1, 61% avec QnrB1 et 41% avec QnrS1 (Cavaco et al., 2009).
- ***qnrC*** a été caractérisé à partir du plasmide pHS10 d'une souche de *P. mirabilis* isolée en Chine. Ce gène est situé en aval d'une nouvelle séquence d'insertion ISPmi1 de la famille IS3. Le déterminant QnrC de 221 acides aminés possède un taux d'homologie en acides aminés de 64%, de 42%, de 59% et de 43% avec QnrA1, QnrS1, QnrB1 et QnrD respectivement (Wang et al., 2009).

La résistance plasmidique aux quinolones est de bas niveau. Le gène *qnr* confère une résistance à l'acide nalidixique mais pas aux fluoroquinolones, même s'il conduirait à une élévation importante des CMI pour les fluoroquinolones (de 16 à 125 fois pour la lévofloxacine, la ciprofloxacine, la sparfloxacine et la moxifloxacine) (Nordmann et Mammeri, 2007). Cependant, Cette augmentation des CMI favoriserait (d'un facteur 100) la sélection de mutants chromosomiques des topoisomérases de type II. Cet effet a pour conséquence d'augmenter la probabilité qu'une souche porteuse de *qnr* de devenir résistante à plus haut niveau par sélection lors d'un traitement par les fluoroquinolones (Lascols et al., 2006 ; Hu et al., 2007).

I.2.2. Inactivation enzymatique : AAC(6')-Ib-cr

En 2005, un second mécanisme de résistance plasmidique a été décrit chez des souches de *E. coli* isolées en Chine, contribuant de façon indépendante à la résistance aux quinolones en modifiant la molécule par l'enzyme AAC(6')-Ib-cr qui est une aminoside 6'N-acétyltransferase mutée. L'AAC(6')-Ib « sauvage » est à l'origine de la résistance aux aminosides par inactivation de l'antibiotique. Deux mutations faux sens, **Trp102Arg** et **Asp179Tyr**, retrouvées dans le variant Ib-cr lui permettent de N-acétyler le cycle pipérazynil au niveau du groupement amine secondaire de la ciprofloxacine et de la norfloxacine. La présence de cette enzyme diminue la sensibilité à la ciprofloxacine de 4 fois (Robicsek et al., 2006 ; Nordmann et Mammeri, 2007).

Le gène *aac(6')-Ib-cr* est bien répandu en Chine et en Amérique du Nord. En effet, sa prévalence était de 51% à Shangai (Chine) chez des souches de *E. coli* isolées entre 2000 et 2002 (Robicsek et al., 2006), contre un taux de 14% chez des entérobactéries isolées aux USA entre 1999 et 2004 (Park et al., 2006).

Dans plusieurs cas, le plasmide codant l'enzyme AAC(6')-Ib-cr code aussi pour une β -lactamase à spectre élargi (BLSE). Ainsi, la prévalence du gène *aac(6')-Ib-cr* était de 4% parmi des souches d'entérobactéries productrices de BLSE isolées en France (Fihman et al., 2008). Généralement les BLSE associés à AAC(6')-Ib-cr sont de type CTX-M (Avguštin et al., 2007). Au Canada, 13% des souches résistantes aux quinolones produisent l'enzyme AAC(6')-Ib-cr dont 54% co-produisent la CTX-M-15 (Pitout et al., 2008). Kim et al ont décrit l'association du gène *aac(6')-Ib-cr* avec un gène codant pour un autre type de BLSE *bla_{OXA-1}* (Kim et al., 2009).

Comme pour la protéine Qnr, le déterminant AAC(6')-Ib-cr confère un bas niveau de résistance aux quinolones (CMI de la ciprofloxacine de 0.04 à 0.08 μ g/ml chez les transconjugants) (Park et al., 2006) et sa préexistence facilite la sélection de mutants chromosomiques des topoisomérases de type II (Robicsek et al., 2006). Par ailleurs, la présence des deux déterminants Qnr et AAC(6')-Ib-cr dans la même bactérie confère un plus haut niveau de résistance (1 μ g/ml) (Fàbrega et al., 2008).

I.2.3. Efflux actif : Pompe « QepA »

En 2007, a été décrit chez une souche d' *E. coli* isolée en Belgique et une autre isolée au Japon, un mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones par efflux actif. Ces souches hébergeaient des plasmides conjugatifs (pIP1206 et pHPA respectivement) portant le gène *qepA* qui code pour un homologue d'un transporteur à 14-segments transmembranaires dépendant de protons appartenant à la famille MFS (Major Facilitator Superfamily). Cette pompe est impliquée dans l'excrétion des fluoroquinolones hydrophiles (norfloxacine, ciprofloxacine et enrofloxacine) avec une CMI augmentant de 32 à 64 fois (Perichon et al., 2007 ; Yaman et al., 2007).

Le gène *qepA* a un GC% de 72% proche de celui des Actinomycètes. Sa présence à proximité du gène *rmtB* (gène codant pour la résistance aux aminosides) flanqué par des éléments transposables (IS26) laisse supposer que des fragments chromosomiques d'Actinomycètes portant ces gènes ont été mobilisés chez *E. coli* (Yaman et al., 2007).

Plus récemment, une nouvelle pompe QepA a été décrite en France chez une souche d'entérobactérie clinique. Cette pompe est dénommée QepA2 dont le gène, porté sur un plasmide conjugatif de 90 kb, est associé au gène *bla_{CTX-M-15}* (Cattoir et al., 2008).

La pompe QepA a également été décrite au Canada chez des souches d'*E. coli* productrices de BLSE de type CTX-M (Baudry et al., 2009).

II. Epidémiologie de la résistance plasmidique aux quinolones

Les déterminants de résistance de type Qnr sont de dissémination mondiale. Les analyses génotypiques ont révélé que les souches *qnr* positives ne sont pas épidémiologiquement reliées, à l'exception d'une épidémie nosocomiale causée en Hollande par un clone d'*E. cloacae* multirésistant portant le gène *qnrA* (Paaw et al., 2006). Ces résultats montrent que la dissémination des gènes *qnr* proviendrait de l'émergence simultanée et indépendante de plusieurs structures génétiques mobiles qui se seraient propagées par transposition ou conjugaison (Nordmann et Mammeri, 2007).

Tableau N° V: Epidémiologie du gène *qnr*

Références	Type de <i>qnr</i>	Année d'isolement	Pays	Espèces identifiées
Martinez-Martinez et al., 1998.	<i>qnrA</i>	1994	Alabama (USA)	<i>K. pneumoniae</i> .
Jacoby et al., 2003.	<i>qnrA</i>	1994	19 pays dont 24 états des Etats-Unis.	<i>E.coli</i> <i>K. pneumoniae</i>
Wiegand et al., 2004.	<i>qnrA</i>	2001	Egypte	<i>Providencia stuartii</i>
Jonas et al., 2005.	<i>qnrA</i>	2000-2003	Allemagne	<i>Enterobacter. Spp,</i> <i>Citrobacter freundii</i>
Joeng et al., 2005.	<i>qnrA</i>	2001-2003	Corée	<i>E. coli</i>
Hata et al., 2005.	<i>qnrS</i>		Japon	<i>Shigella flexenerri</i>
Nazic et al., 2005.	<i>qnrB</i> <i>qnrS</i>	2000-2006	Turquie	<i>E. cloacae</i>
Gay et al., 2006.	<i>qnrB</i> <i>qnrS</i>	1996-2003	USA	<i>Salmonella non typhi</i>
Jacoby et al., 2006.	<i>qnrB</i>	1996-2003	USA Inde	Entérobactéries
Poirel et al., 2006.	<i>qnrA</i> <i>qnrS</i>	2001-2002	Vietnam	<i>E. cloacae</i>
Lavigne et al., 2006.	<i>qnrA</i>	2005-2006	France	Entérobactéries BLSE+
Strahilevitz et al., 2007.	<i>qnrA</i> <i>qnrB</i> <i>qnrS</i>	1990-2005	Israël	<i>E. cloacae</i> et <i>K pneumoniae</i>
Hopkins et al., 2007.	<i>qnrS</i>	1993-2005	Grande Bretagne	<i>Salmonella enterica</i>
Veldman et al., 2007.	<i>qnrB</i> <i>qnrS</i>	1999-2006	Hollande	<i>Salmonella enterica</i>
Castanheira et al., 2007.	<i>qnrA</i>	2002-2003	Brésil	<i>E. coli</i>
Lavilla et al., 2008.	<i>qnrA</i> <i>qnrS</i>	2003-2004	Barcelone (Espagne)	Entérobactéries BLSE+
Iabaden et al., 2008.	<i>qnrS</i> <i>qnrB</i>	2003-2007	Algérie	<i>E. cloacae</i>
Pitout et al., 2008.	<i>qnrS</i> <i>qnrB</i>	2004-2007	Canada	Entérobactéries
Hu et al., 2008	<i>qnrS</i> <i>qnrB</i>	-	Chine	<i>K .pneumoniae</i> et <i>E. coli</i>
Kim et al., 2009	<i>qnrA</i> <i>qnrS</i> <i>qnrB</i> <i>qnrC</i>	1998-2001 2005-2006	Corée	Entérobactéries

III. Association Qnr-BLSE

La majorité des souches *qnr* positives décrites jusqu'à présent sont multirésistantes aux antibiotiques et en particulier aux β -lactamines par production de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) ou d'une céphalosporinase plasmidique (AmpC), ce qui souligne la possibilité d'une co-sélection de ces deux mécanismes de résistance plasmidiques (Honoré et *al.*, 2004 ; Nordmann et Mammeri, 2007).

QnrA fut détecté dans des souches produisant les BLSE de type CTX-M-1 (Poirel et *al.*, 2006 ; Lavigne et *al.*, 2006), CTX-M-9 (Lavilla et *al.*, 2008; Saito et *al.*, 2007), CTX-M-15 (Lavigne et *al.*, 2006), SHV-7 (Wang et *al.*, 2004), SHV-12 (Lavilla et *al.*, 2008 ; Poirel et *al.*, 2006 ; Cambau et *al.*, 2006 ; Guessennd et *al.*, 2005), SHV-29 (Lavilla et *al.*, 2008), VEB- 1 (Nazic et *al.*, 2005 ; Poirel et *al.*, 2006 ; Rodriguez-Martinez et *al.*, 2007 ; Poirel et Nordmann, 2007) et PER-1 (Cambau et *al.*, 2006), les céphalosporinases plasmidiques FOX-5 (Wang et *al.*, 2004) et les carbapénèmases plasmidiques OXA-48 (Nazic et *al.*, 2005) et IMP-4 (Wu et *al.*, 2007).

Les déterminants de type QnrB ont été identifiés chez des souches produisant les BLSE de type CTX-M-3 et CTX-M-9 (Liassine et *al.*, 2008), CTX-M-15 (Jacoby et *al.*, 2006 ; Cattoir et *al.*, 2006; Touati et *al.*, 2008 ; Iabaden et *al.*, 2008), SHV12 (Pai et *al.*, 2007; Cattoir et *al.*, 2006) et SHV-30 (Gay et *al.*, 2006) ainsi que la céphalosporinase plasmidique DHA-1 (Park et *al.*, 2007 ; Pai et *al.*, 2007) et la carbapénèmase plasmidique KPC-2 (Chmelnitsky et *al.*, 2008).

Les déterminants de type QnrS ont été associés aux BLSE de type TEM-1 (Kehrenberg et *al.*, 2006), TEM-52, CTX-M-1 (Poirel et *al.*, 2006), CTX-M-15 (Iabaden et *al.*, 2008), SHV- 12 (Lavilla et *al.*, 2008 ; Poirel et *al.*, 2006 ; Iabaden et *al.*, 2008 ; Wu et *al.*, 2007) et la β -lactamase LAP-1 (Poirel et *al.*, 2007).

IV. Environnement génétique des gènes *qnr*

La majorité des gènes *qnr* sont portés par différents plasmides conjugatifs de grande taille (54 et >180 kb) associés à d'autres déterminants de résistance notamment aux β -lactamines et aux aminosides (Li, 2005).

IV.1. Environnement génétique de *qnrA*

L'environnement génétique du gène *qnrA* est caractérisé par la présence d'intégrons complexes de type *sull*. Ces intégrons sont impliqués dans la mobilisation des gènes *qnrA* et sont maintenant reconnus comme constituant d'un transposon (ISCR1) de la famille des

IS9110 . Ces transposons possèdent une structure caractérisée par la duplication des gènes *qacEΔ1* (gène codant pour la résistance à l'ammonium quaternaire) et *sul1* (gène non exprimé codant pour la résistance aux sulfamides) habituellement présents à l'extrémité 3' des intégrons de classe 1 et par la présence d'une région commune (CR1) qui contient le gène *orf513* codant pour une recombinase ainsi que le promoteur d'expression des gènes *qnrA* (figure 5) (Tran et Jacoby, 2002; Poirel et al, 2006).

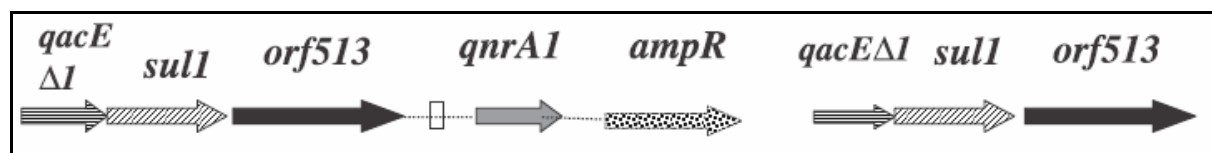


Figure 05: Représentation schématique des séquences entourant le gène *qnrA* identifiées chez deux souches d'*E. cloacae* et d'*E. aerogenes* (Poirel et al, 2006).

L'environnement génétique du gène *qnrA* décrit chez une souche de *K. pneumoniae* rapportée par Shen et al., (*aac(6')Ib-cr*, *qacFD*, *sul1*, ISCR1, *qnrA1*, *ampR*, Orf5 et Orf6) montre que *qnrA* peut être associé à un autre gène codant pour la résistance aux quinolones (Shen et al., 2008). D'autres travaux ont rapporté son association avec des gènes codant pour la résistance à d'autres familles d'antibiotiques, β-lactamines (ampicilline et carbapénicilline), aminosides et chloramphénicol par la présence des gènes *bla*, *aadA2* et *cmlA1* respectivement (Rodriguez-Martinez et al., 2007).

En France, l'environnement génétique de *qnrA* était le même que celui décrit à Shangai (Chine), mais différent de celui déterminé aux USA et en Europe (Cambau et al., 2006). En fonction des plasmides, les distances séparant les gènes *orf513* et *qnrA* varient ainsi que la nature des gènes situés en aval de *qnrA*. Cette variabilité suggère que ces transposons se seraient constitués indépendamment les uns des autres au cours d'événements génétiques différents (Nordmann et Mammeri, 2007).

IV.2. Environnement génétique de *qnrB*

Initialement le gène *qnrB1* fut décrit dans le plasmide pMG298 à proximité du gène *orf1005* qui présente une structure similaire à celle d'un transposon avec des séquences inversées répétées de 83-pb et un cadre de lecture ouvert codant pour une probable transposase (Jacoby et al., 2006). Dans une étude faite à Singapour, le gène *qnrB1* a été décrit comme faisant partie d'intégrons complexes de type *sul1*, associé à *orf1005* en aval de IS26 et en amont de In5403 (Teo et al., 2009).

L'analyse de l'environnement du gène *qnrB2* décrit par Jacoby *et al.* chez une souche de *Citrobacter koseri* isolée aux États-Unis n'a pas mis en évidence de structure génétique impliquée dans la mobilisation de gène de résistance. Le gène *qnrB2* identifié dans une souche de *Salmonella enterica* sérotype *keurmassar* isolée au Sénégal est localisé dans un transposon de type ISCR1 (figure 6) (Garnier *et al.*, 2006) de même pour le gène *qnrB19* identifié chez une souche de *E. coli* isolée en Colombie (Cattoir *et al.*, 2008).

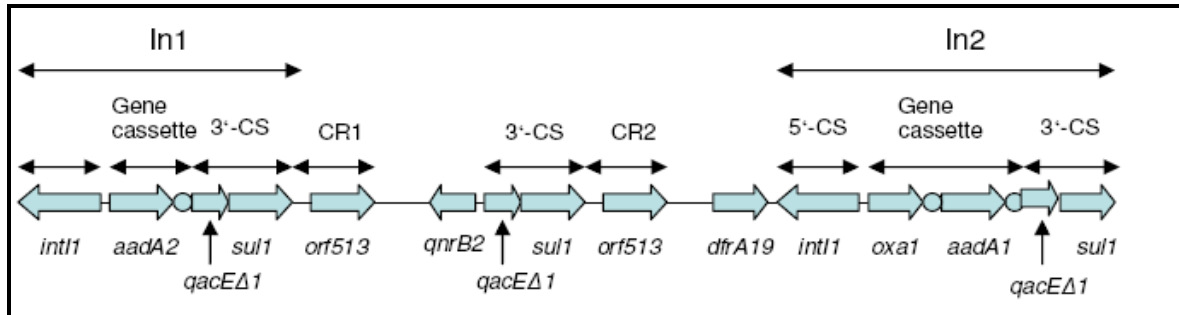
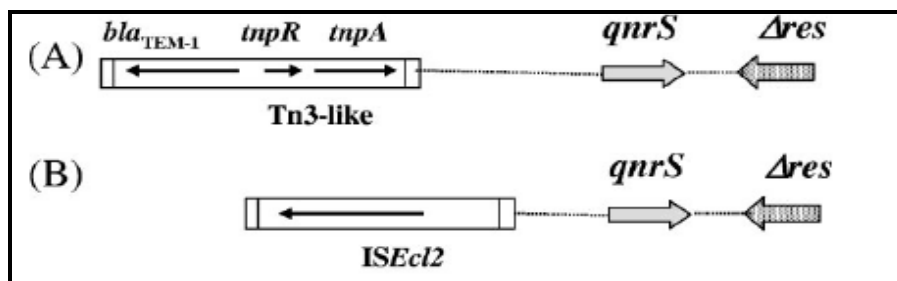


Figure 06: Environnement génétique du gène *qnrB2* (Garnier *et al.*, 2006).

IV.3. Environnement génétique de *qnrS*

Le gène *qnrS*, initialement décrit par Hata *et al.* chez une souche de *Shigella flexneri* isolée au Japon, est encadré par deux séquences inversées répétées de 1,2 kb. En amont de ce gène, se trouve le transposon Tn3 associé au gène *bla_{TEM-1}*, et en aval, un gène codant pour une probable résolvasse (Hata *et al.*, 2005).

L'environnement du gène *qnrS1* de souches d'*E. cloacae* isolées au Vietnam et en France, est caractérisé par la présence d'une séquence d'insertion dénommée *ISEc12* dans un plasmide portant le gène *bla_{Lap-1}* (figure7) (Poirel *et al.*, 2006).



A : Structure identifiée chez *S. flexneri* 2b (Japan).
B : structure identifiée chez *E. cloacae* (France et Vietnam)

Figure 07: Représentation schématique des séquences entourant le gène *qnrS* (Poirel *et al.*, 2006).

La variabilité des structures entourant les gènes de type *qnr* révèle la diversité des systèmes de capture et de mobilisation de gènes qui sont impliqués dans la dissémination des déterminants de type Qnr. L'émergence mondiale de ce nouveau mécanisme de résistance ne provient pas de la dissémination d'une structure génétique unique, mais de l'apparition de plusieurs structures génétiques issues d'événements de mobilisation différents (Nordmann et Mammeri, 2007).

V. Origine des gènes de résistance de type *qnr*

L'origine des gènes plasmidiques de résistance aux antibiotiques reste dans la très grande majorité des cas totalement inconnue. Des études tendent à identifier le géniteur du gène *qnr* s'orientent soit vers des bactéries de l'environnement, soit vers des bactéries sélectionnées chez l'animal (*Salmonella*) qui dans les deux cas transférerait horizontalement la résistance aux bactéries retrouvées chez l'Homme (Nordmann et al., 2005 ; Robicsek et al., 2006). L'analyse de l'environnement génétique du gène *qnrA3* a confirmé son origine chromosomique chez l'espèce *Shewanella algae* (figure 8). Cette dernière est une bactérie Gram négative de la famille des *Shewanellaceae* se trouvant dans l'environnement notamment dans les eaux marines (Nordmann et Poirel, 2005).

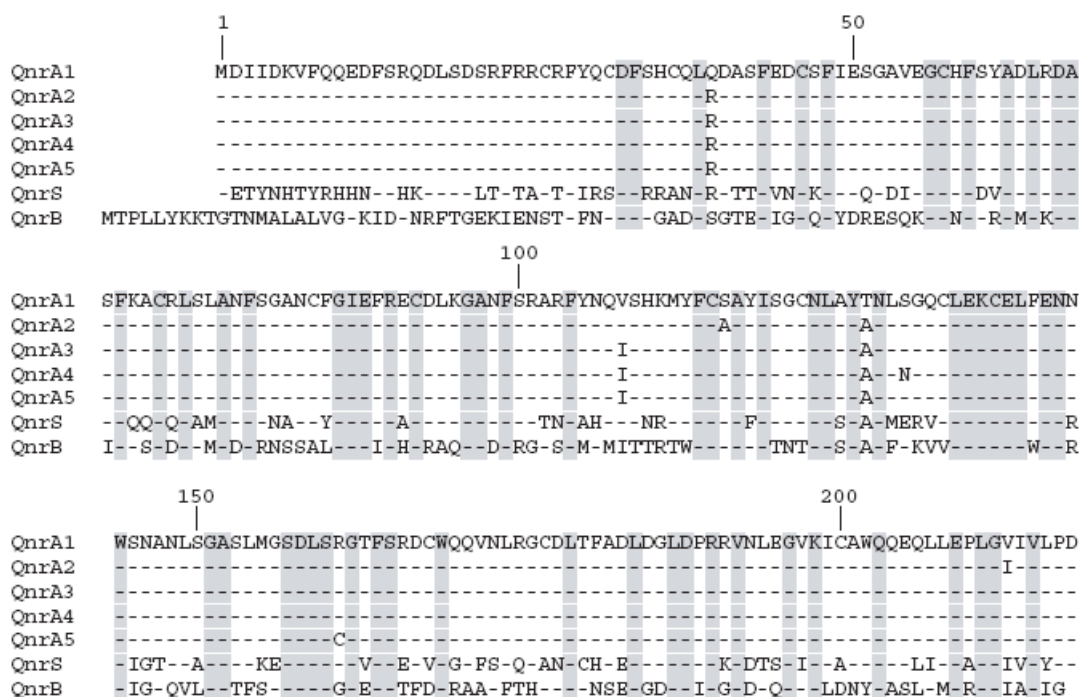


Figure 08: Comparaison des séquences des déterminants plasmidiques QnrA1, QnrA2, QnrS et QnrB avec les déterminants QnrA3, QnrA4 et QnrA5 de *S. algae* (Nordmann et Poirel, 2005)

La recherche des progéniteurs des gènes *qnrB* et *qnrS* a permis d'identifier trois gènes chromosomiques structurellement proches chez les espèces marines *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* et *Photobacterium profundum* (Nordmann et Mammeri, 2007). Récemment, l'origine très probable des gènes de type QnrS a été identifiée. *Vibrio splendidus* possédant dans son chromosome un gène codant pour une protéine à motifs pentapeptidiques répétés qui présente 88 % d'identité avec le déterminant plasmidique QnrS1. Il s'agit à nouveau d'une espèce bactérienne d'origine hydrique comme l'est *S. algae* (Cattoir et al., 2007).

L'environnement est donc aussi un réservoir autre que l'animal (alimentation), dans l'émergence des gènes de résistance aux antibiotiques. L'utilisation extensive des quinolones pour les animaux et en aquaculture fait qu'il est possible que les concentrations sub-inhibitrices des quinolones peuvent sélectionner dans la mer, les souches de *Shewanella algae*, et de ce fait, augmenter le transfert des résistances aux quinolones chez les entérobactéries (Poirel et al., 2005).

Partie II

Matériel & Méthodes

Partie II : MATERIEL & METHODES

1. Collecte de souches bactériennes

Durant la période Décembre 2007 à Juin 2008, des souches d'entérobactéries issues de divers prélèvements (urine, pus, sperme, prélèvements vaginaux et selles) ont été collectées au niveau de quatre laboratoires d'analyses médicales de la région de Béjaia. Il s'agit du laboratoire du Dr Djama (Béjaia), du Dr Lalaoui (Béjaia), du Dr Kadi (Sidi-Aich) et du Dr Ait Bachir (Akbou).

Pour chaque patient, les données suivantes ont été recueillies (Annexe I):

- Sexe du patient.
- Age du patient.
- Type de prélèvement.
- Souche identifiée.
- Antibiotiques testés au niveau du laboratoire.

Une analyse statistique des données a été réalisée par le test de χ^2 , afin de déterminer certains facteurs de risque dans l'acquisition de la résistance aux quinolones (Annexe II).

2. Repiquages des souches et confirmation de l'identification

Les souches collectées sont repiquées sur un milieu sélectif (Hecktoen, BCP ou Mac Conkay). La composition de ces milieux est donnée en annexe III.

Une identification préliminaire des souches est réalisée par les laboratoires d'analyses médicales, pour chaque laboratoire sa propre méthode d'identification (galerie API20, galerie biochimique ou **URISelect4** (BIO-RAD)). Afin de confirmer l'espèce ou le genre au quel appartiennent ces souches d'entérobactéries, une deuxième identification a été effectuée en se basant sur les tests suivants :

➤ Isolements sur milieu chromogène « **URISelect4** »

L'**URISelect4** (BIO-RAD) est un milieu sélectif contenant deux substrats chromogènes qui permettent une identification directe, par mise en évidence d'activité enzymatique des

germes les plus fréquemment responsables d'infections urinaires (*E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*). Chaque espèce apparaît sous forme de colonies de couleur différente.

➤ Galerie biochimique

L'identification des souches d'entérobactéries est réalisée par l'étude de plusieurs tests biochimiques (Le Minor et Richard, 1993) :

- Recherche de la nitrate-réductase sur bouillon nitraté.
- Utilisation du glucose, du lactose et production de gaz et d'H₂S sur gélose TSI.
- Fermentation du mannitol et mobilité
- Recherche d'uréase, production d'indole, et d'une TDA sur milieu urée-indole.
- Etude du type fermentaire (réaction de Voges-Proskauer et RM) sur milieu Clark et Lubs.
- Utilisation du citrate

3. Etude de la résistance des souches d'entérobactéries aux antibiotiques

Toutes les souches d'entérobactéries collectées ont été testées vis-à-vis des quinolones représentées par l'acide nalidixique. La sensibilité des souches 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, 2007).

3.1. Antibiogramme standard (CA-SFM 2007)

• Standardisation

Pour chacune des souches à tester, des suspensions sont réalisées en dissociant 4 à 5 colonies dans 3 ml d'eau physiologique. Les inoculums sont ajustés jusqu'à obtenir une DO de 0.10 à environ 600±50 nm (soit 10⁸ UFC/ml équivalente au standard Mc Farland 0.5). On réalise par la suite une dilution de 10⁻².

• Ensemencement

Les boîtes de Pétri préalablement coulées par le milieu Mueller Hinton à une épaisseur d'environ 4mm, sont ensemencées par écouvillonnage en respectant les mesures de sécurité nécessaires. Par la suite, les disques d'acide nalidixique (30 µg) (Biomérieux) sont déposés. Les boîtes sont par la suite incubées à 37°C pendant 24h.

- **Lecture**

Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus sont mesurés autour des disques d'acide nalidixique. L'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le CFA-SFM (communiqué du CA-SFM, 2007) (Annexe IV).

- ❖ Pour les souches retrouvées résistantes à l'acide nalidixique, nous avons également testé, par la même méthode de l'antibiogramme standard, la sensibilité de ces souches à d'autres molécules d'antibiotiques (Biomérieux) parmi lesquelles trois fluoroquinolones (tableau N°VI)

Tableau N°VI : Liste des antibiotiques testés

Antibiotique	Abréviation	Charge (µg)	Famille
Ciprofloxacine	CIP	5	Fluoroquinolones
Ofloxacine	OFX	5	
Norfloxacine	NOR	5	
Amoxicilline-acide clavulanique	AMC	20+10	β-lactamines (Aminopénicillines)
Céfoxitine	FOX	30	β-lactamines (C2G)
Pipéracilline	PIP	75	β-lactamines (Ureidopénicillines)
Céfotaxime	CTX	30	β-lactamines (C3G)
Céftazidime	CAZ	30	
Céfépime	FEP	30	β-lactamines (C4G)
Cefpirome	CPO	30	
Imipénème	IMP	10	β-lactamines (Carbapénèmes)
Rifampicine	RA	30	Rifamycines
Tétracycline	TE	30 UI	Tétracyclines
Triméthoprim + sulfaméthoxazol	SXT	1.25 +23.75	Sulfamides
Colistine	CT	50	Polypéptidés

4. Détermination des CMI de la ciprofloxacine en milieu solide (CA-SFM, 2007)

1. Préparation des boîtes

- Une solution mère de ciprofloxacine à 2 mg/ml a été préparée.
- A partir de cette solution mère, une gélose Mueller Hinton en surfusion est additionnée d'une concentration croissante de ciprofloxacine (à raison de 2) (Tableau N°VII).
- Après homogénéisation, le milieu (Mueller Hinton + ciprofloxacine) est coulé sur boîte puis séché 30 minutes à l'étuve à 37° C.

Tableau N°VII : Réalisation de la gamme d'antibiotique pour un volume final de 100ml

Concentration finale en CIP ($\mu\text{g/ml}$)	8	16	32	64	128
Volume de la solution de CIP en (ml)	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4
Volume de Mueller Hinton en (ml)	99.6	99.2	98.4	96.8	93.6

2. Ensemencement

Une suspension de 10^8 UFC/ml est diluée à 10^{-2} . 10 μl de la dernière dilution est déposé sur le milieu soit un inoculum de 10^4 UFC/spot. On incube à 37°C pendant 24h.

3. Lecture

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'ya pas de croissance visible. La présence d'une ou de deux colonies ou d'un fin film n'est pas prise en considération.

5. PCR du gène *qnr*

Afin de déterminer l'origine plasmidique de la résistance de quelques souches aux quinolones, une PCR multiplexe a été effectuée en utilisant des amorces spécifiques au gène *qnr* (*qnrA*, *qnrS* et *qnrB*). La PCR a été réalisée par Dr Touati au sein du laboratoire de bactériologie du CHU de Reims (France) (Annexe V).

6. Recherche de la β -lactamase à spectre élargi (BLSE)

Afin de mettre en évidence la production de BLSE parmi les souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique. Un DD-Test est réalisé pour les souches présentant une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération : céfotaxime (CTX) et/ou céftazidime (CAZ).

6. 1. DD-test (ou test de synergie)

La production d'une β -lactamases à spectre élargi a été détectée par le test de la synergie qui consiste à placer des disques de céphalosporines de 3^{ème} génération : ceftazidime et céfotaxime, et de 4^{ème} génération : céfépime et céfpirome (30 μ g chacun) à une distance de 20 mm (centre à centre) d'un disque d'Augmentin® (amoxicilline-clavulanate) (20 μ g et 10 μ g, respectivement). L'augmentation de la zone d'inhibition entre le disque d'Augmentin® et les disques de ceftazidime, céfotaxime, céfépime ou céfpirome indique la production d'une BLSE (Jarlier et *al.*, 1988).

6. 2. DD-Test sur gélose à la cloxacilline

Chez les souches naturellement productrices de céphalosporinases telle que *Enterobacter sp*, la présence d'une BLSE peut être masquée du fait de l'induction de la céphalosporinase par le clavulanate. Dans ce cas, nous avons refait le DD-test en utilisant la gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline (250 μ g/ml) dans le but d'inhiber l'activité céphalosporinase. La comparaison des diamètres d'inhibition entre les boîtes avec et sans cloxacilline permet de mettre en évidence la présence d'une BLSE (Giraud-Morin et Fosse, 2008).

7. PCR du gène *bla*_{CTX-M}

Une PCR universelle a été réalisée dans le but de rechercher les gènes de synthèse de β -lactamases de type CTX-M chez les souches résistantes au CTX, en utilisant des amorces spécifiques au gène *bla*_{CTX-M} (Annexe VI).

8. Essai de transfert par Conjugaison du gène *bla*_{CTX-M}

C'est le transfert d'un plasmide conjugatif codant pour la résistance à un ou plusieurs antibiotiques d'une souche donatrice à une souche réceptrice. La sélection des transconjugants s'effectue en présence de 2 antibiotiques : l'un correspond à l'une des résistances transférées, l'autre à la résistance non transférable de la souche réceptrice.

• Matériel

Souche réceptrice : *Proteus mirabilis* résistantes à la rifampicine et sensible à tout les autres antibiotiques.

Souches donatrices : *E. coli* (A162) et *Enterobacter cloacae* (A134) résistantes au céfotaxime et intermédiaire à la rifampicine.

Solution de rifampicine (2mg/ml).

Solution de céfotaxime (2mg/ml).

- **Protocole :**

Nous avons adopté le protocole préconisé par Touati (2006) qui est le suivant :

1. On cultive les deux souches donatrices et la souche réceptrice dans 10 ml de bouillon trypticase soja. On incube une nuit à 37°C au bain-marie avec agitation.
2. On effectue une dilution au 1/50^{ème} (200µl dans 10 ml de TSB) de la souche donatrice et réceptrice puis on incube à 37°C pendant 3 heures.
3. Dans un tube stérile, on mélange 1 ml de la culture de la souche donatrice avec 1 ml de la culture de la souche réceptrice et 1ml du bouillon TSB (rapport V/V/V).
4. On incube le mélange et les témoins à 37°C pendant 2 heures.
5. Le milieu de sélection des transconjugants est représenté par la gélose Mueller Hinton contenant deux antibiotiques : l'un est le céfotaxime (concentration finale de 4 µg/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.
6. On étale 200 µl du mélange sur la surface des boites de sélection. Afin de vérifier la sélectivité des milieux de sélection, onensemence la souche donatrice et la souche réceptrice séparément (boites témoin).
7. On incube les boites de sélection à 37°C pendant 18 heures .

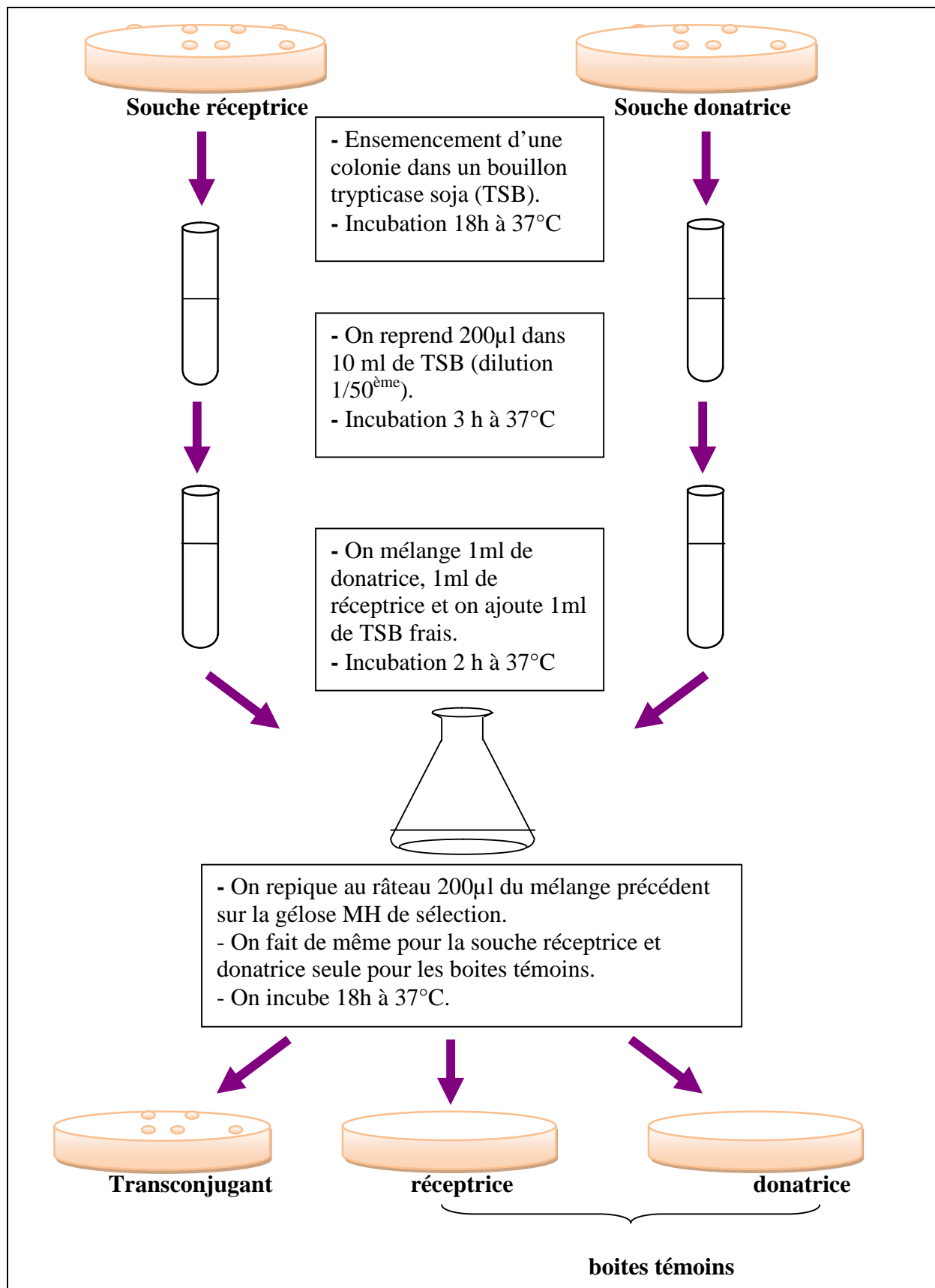


Figure 09: Technique de transfert plasmidique par conjugaison

9. Etude de la relation consommation-résistance aux antibiotiques

Il est actuellement bien démontré que l'augmentation de la consommation en antibiotiques permet d'augmenter la résistance des bactéries à ces mêmes antibiotiques. Dans le but d'évaluer les pratiques de prescription des antibiotiques en milieu communautaire, une enquête a été réalisée, durant l'année 2008, au près de médecins de différentes spécialités pratiquant en ville (nombre : 26) (Annexe VII) et de pharmaciens (nombre: 68) (Annexe VIII).

Partie III

Résultats & Discussion

Parti III : RESULTATS & DISCUSSION

I. Collecte des souches

La collecte des souches à partir des quatre laboratoires d'analyse médicale a été réalisée durant la période décembre 2007 à mai 2008. Au total, 441 souches d'entérobactéries ont été isolées dont 195 au laboratoire Djama (Béjaia), 132 au laboratoire Lalaoui (Béjaia), 80 au laboratoire Ait Bachir (Akbou) et 34 au laboratoire Kadi (Sidi-Aich).

Les résultats de l'identification des souches d'entérobactéries selon l'aspect des colonies sur milieux sélectifs et sur milieu chromogène et selon les caractéristiques biochimique sont donnés en Annexe VI et Annexe VII respectivement.

I. 1. Répartition des souches par prélèvement et par espèce

On note d'après le Tableau N°XII que la majorité des souches (96.6%) sont d'origine urinaire. En effet, l'infection urinaire est l'une des infections bactériennes communautaires les plus fréquentes (Sekhsokh et *al.*, 2008).

Tableau N°XII : Répartition des souches par prélèvement

	Type de prélèvement				
	Urine	Sperme	P.V	Pus	Selles
Nombre de souches	428	6	4	2	1
%	97.05	1.36	0.9	0.45	0.22

P.V : Prélèvements vaginaux

L'espèce la plus fréquemment isolée est *E. coli* avec un taux de 71.42%, suivie des espèces du genre *Klebsiella* (*K. pneumoniae* et *K. oxytoca*), *Proteus mirabilis* et *Enterobacter cloacae* avec des taux de 12.92%, 8.16% et 5.89% respectivement (Tableau N°XIII)

Tableau N°XIII : Répartition des souches par espèce

	Espèces				
	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Autres
Nombre de souches	315	57	36	26	7
%	71.42	12.92	8.16	5.89	1.58

Autres : *Citrobacter sp*, *Providencia sp*, *Serratia sp*

L'espèce *E. coli* est de loin le germe le plus fréquemment isolé dans les infections urinaires, ces résultats sont à rapprocher d'une étude réalisée par Lemort et *al.*, (Lemort et *al.*, 2006). Cela est en rapport avec la physiopathologie de l'infection urinaire qui est en général ascendante, et il existe une forte colonisation du périnée par les entérobactéries d'origine digestive, et en particulier *E. coli*. A cela s'ajoutent des facteurs spécifiques d'uropathogénicité. Ainsi, *E. coli* possède des adhésines, capables de lier la bactérie à l'épithélium urinaire et d'empêcher son élimination par les vidanges vésicales. *Klebsiella* et *Proteus* sécrètent une uréase qui alcalinise l'urine, dont le pH naturellement acide empêche la prolifération des germes (Le Minor et Veron, 1989).

I.3. Caractéristiques de la population

❖ Age

Durant la collecte des souches, les données concernant l'âge des patients ont été obtenues seulement pour 307 individus. L'âge des patients a été réparti en catégories. La catégorie d'âge adulte est la catégorie à partir de laquelle les souches ont été le plus souvent isolées, 32.24% pour la tranche d'âge allant de 18ans à 35ans et 27.36% pour la tranche d'âge allant de 35ans à 65ans (Tableau N°XV).

Chez la femme, la fréquence des infections urinaires augmente avec l'âge, avec 2 pics, l'un au début de l'activité sexuelle et l'autre en période post ménopausique. Chez l'homme, la

fréquence augmente après 50 ans, en relation notamment avec la pathologie prostatique (Caron et al., 2008).

Tableau N°XV : Répartition des patients par catégorie d'âge

Catégorie d'âge	Nombre d'individus	%
1j – 2 ans	38	12.37
> 2 ans – 18 ans	47	15.3
> 18 ans – 35 ans	99	32.24
> 35 ans – 65 ans	84	27.36
> 65 ans	39	12.7
Total	307	

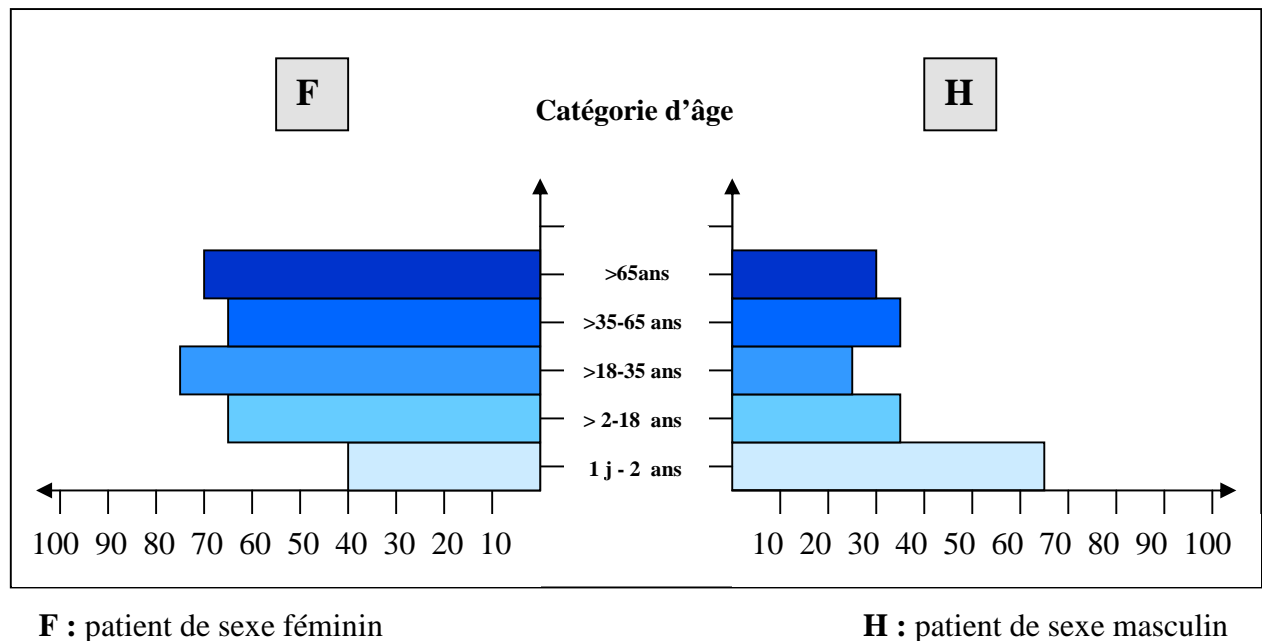


Figure 10: Pyramide des âges de la population

❖ Sexe

Le sex-ratio femme/ homme = $300/141 = 2.13$. Il y'a donc deux fois plus de patients de sexe féminin que de patients de sexe masculin. Des résultats comparables ont été rapportés par Larabi *et al* et Sekhsokh *et al* dans des études réalisées sur les infections urinaires (Larabi *et al.*, 2003 et Sekhsokh *et al.*, 2008). Le fait est que ces infections surviennent plus fréquemment chez la femme que chez l'homme est dû à des facteurs favorisants spécifiques (urètre court, grossesse...), mais également à la consultation de la maternité qui adresse un grand nombre d'ECBU. Selon des données épidémiologiques, 40 à 50 % des femmes ont au moins une infection urinaire au cours de leur existence (Caron *et al.*, 2008). Néanmoins d'après nos résultats, nous remarquons que pour la catégorie d'âge nourrisson (1j-2ans), les infections urinaires sont plus courantes chez les garçons que chez les filles (figure 10), cela est probablement dû au fait que les garçons appartenant à cette tranche d'âge soient en général non-circoncis et donc plus touchés par les infections.

II. Résistance des souches aux antibiotiques

II.1. Résistance à l'acide nalidixique

Au total 65/441 souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixique ont été isolées soit un taux de 14.73%, parmi lesquelles 25 au laboratoire Lalaoui, 19 ont été isolées au laboratoire Djama, 16 au laboratoire Ait Bachir et 5 au laboratoire Kadi.

Les résultats obtenus confirment le caractère inquiétant de l'évolution de la résistance à l'acide nalidixique chez les entérobactéries. En effet, elle met en évidence une évolution des souches communautaires vers la résistance aux quinolones. Pratiquement 15 % des souches isolées sont résistantes à l'acide nalidixique. Ces résultats sont proches de ceux obtenus à l'hôpital de Ain M'lila (Constantine) avec un taux de 11.7% (Bouzenoune *et al.*, 2009), ainsi qu'en France et dans certains autres pays européens (14%) selon les données de 2007 de l'aforcopi-Bio (Caron *et al.*, 2008).

II.1.1. Taux de résistance par prélèvements

Le tableau ci-dessous donne les taux de résistance à l'acide nalidixique pour chaque type de prélèvements, on remarque que 3/5 des souches issues de prélèvements vaginaux sont résistantes à l'acide nalidixique, et vu le nombre limité, on ne peut pas considérer que ce type de prélèvement est un impact direct sur la résistance.

Tableau N° XVI: Taux de résistance par prélèvement

	Type de prélèvements					Total
	PV	Pus	Sperme	Urine	Selles	
Nombre de souches	5	2	2	431	1	441
Nombre de souches résistantes	3	1	6	55	0	65

PV : Prélèvements vaginaux

II.1.2. Taux de résistance par espèces

Le taux de résistance à l'acide nalidixique est globalement le même pour chaque espèce, avec cependant un taux plus élevé chez les espèces *Enterobacter cloacae* (19.23%).

Tableau N° XVII: Taux de résistance par espèce

	Espèces				
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Autres</i>
Nombre de souches total	26	36	315	57	7
Nombre de souches résistantes	5	6	46	8	0
%	19.23	16.66	14.6	14.03	0

Autres : *Citrobacter sp*, *Providencia sp*, *Serratia sp*

II.1.3. Caractéristiques de la population

❖ Age

Les taux de résistance à l'acide nalidixique obtenus pour chaque catégorie d'âge sont représentés dans le tableau ci-dessous (Tableau N°XVIII). En raison d'un manque de données, l'analyse statistique a été réalisée uniquement pour 307 patients.

Tableau N°XVIII : Taux de résistance à l'acide nalidixique par catégorie d'âge

Catégorie d'âge	Nombre de souches isolées	Nombre de souches résistantes	% R
1j – 2 ans	38	8	21.05
> 2ans – 18 ans	47	7	14.89
> 18ans – 35ans	99	9	9.09
> 35 ans – 65 ans	84	8	9.52
> 65 ans	39	10	25.64
Total	307	42	

L'analyse statistique de la sensibilité en fonction de l'âge révèle des différences significatives avec une résistance acquise aux quinolones plus élevée chez les personnes âgées de plus de 65 ans (25.64 %), constatation déjà faite par Colodner et *al* et Zhanel et *al* dans des études sur les facteurs de risques d'acquisition de la résistance aux quinolones en communauté (Zhanel et *al.*, 2006 ; Colodner et *al.*, 2008), cela est en relation avec le système immunitaire qui s'affaiblit avec l'âge.

Il est à noter qu'un taux de résistance de 21% a été constatés chez les nourrissons (1j-2ans) et ce même si les quinolones soient contre-indiquées pour l'enfant de moins de trois mois car ces molécules peuvent être responsables de tableaux d'hypertension intracrânienne (Nathanson et Deschênes, 2002).

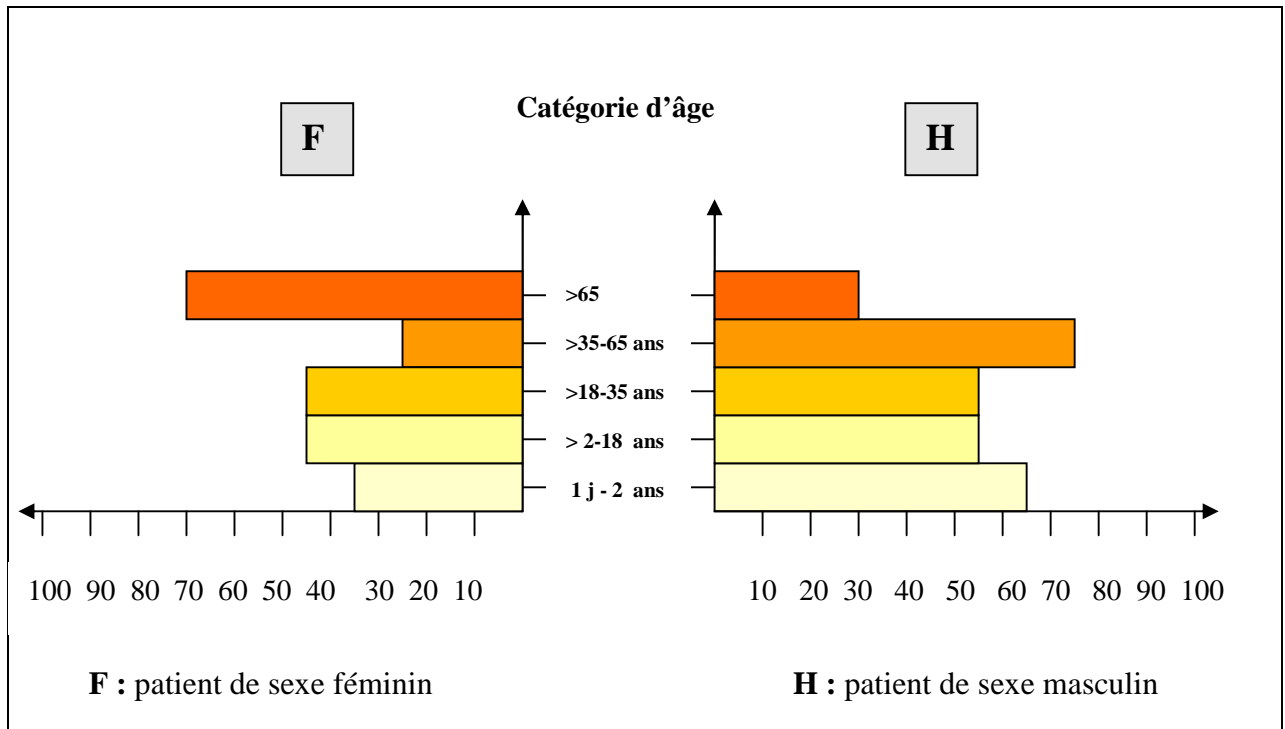


Figure 11: Pyramide des âges de la population résistante à l'acide nalidixique

❖ **Sexe**

32/300 soit 10.66% des patients résistants à l'acide nalidixique sont de sexe féminin et 33 / 141 soit 23.4% sont de sexe masculin (Tableau N° XIX).

Tableau N°XIX : Taux de résistance à l'acide nalidixique selon le sexe des patients

	Femme	Homme
Nombre total	300	141
Nombre de résistants	32	33
%	10.66	23.4

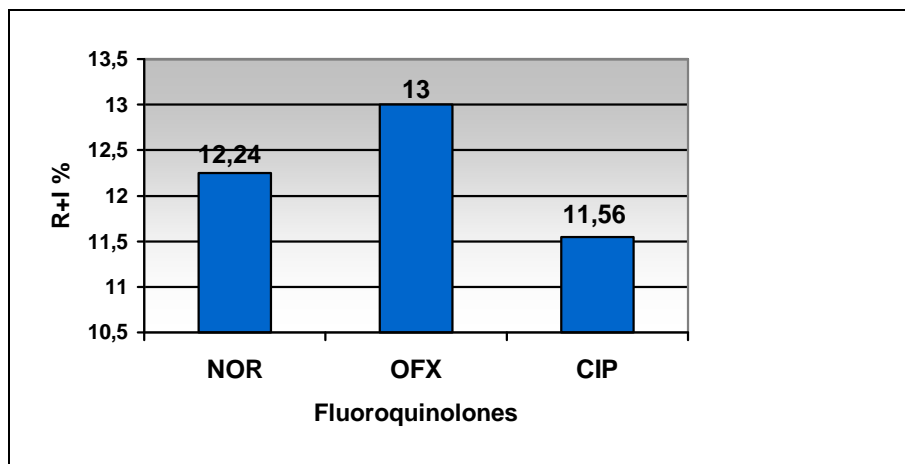
Les résultats du test statistique concernant le sexe des patients montrent des différences significatives avec un taux de résistance plus élevé chez la gent masculine (23.4%). Le sexe est donc un facteur de risque dans l'acquisition de la résistance aux quinolones. Ces résultats ont été approuvés par d'autres études réalisées en Espagne (Caron *et al.*, 2008). D'autres travaux montrent aussi l'association entre la résistance aux quinolones et la gent masculine, mais cette fois-ci en milieu hospitalier, avec un taux de résistance de 8% chez les hommes et de 5.5% chez les femmes (Denton, 2007).

Toutefois, on remarque que pour la catégorie d'âge de plus 65 ans, le taux de résistance est plus élevé chez la femme (figure 11), cela est sans doute en relation avec l'arrivée de la ménopause, car cette dernière est considérée comme un facteur de risque dans l'acquisition de la résistance aux antibiotiques (Ho *et al.*, 2007).

De manière générale, les hommes et les personnes âgées de plus de 65 ans sont considérés comme des sujets à risque dans l'acquisition de la résistance aux quinolones. Il existe d'autres facteurs de risque non évoqués dans cette étude comme l'utilisation antérieure des quinolones, les infections urinaires chroniques, les malades porteurs de sondes ou d'anomalies morphologiques des voies urinaires, par exemple (Lemort *et al.*, 2006 ; Ho *et al.*, 2007).

II.2. Résistance aux fluoroquinolones

Les souches résistantes ou intermédiaires à l'acide nalidixique ont été testées vis-à-vis des fluoroquinolones : norfloxacine, ofloxacine et ciprofloxacine. D'après nos résultats (figure 12), 12,24% (54/441), 13% (57/441) et 11,56% (51/441) des souches d'entérobactéries isolées sont résistantes ou intermédiaires à la norfloxacine, l'ofloxacine et la ciprofloxacine respectivement, Ce qui est nettement plus élevé aux taux rapportés par Lecaillon et *al.*, : 3,3% pour la norfloxacine, 4% pour l'ofloxacine et 2% pour la ciprofloxacine (Lecaillon et *al.*, 2004).



NOR : norfloxacine, OFX : ofloxacine, CIP : ciprofloxacine

Figure 12: Taux de résistance aux fluoroquinolones des souches résistantes à l'acide nalidixique

Les souches résistantes aux fluoroquinolones testées, sont toutes résistantes à l'acide nalidixique. Les travaux de Trystram et *al.*, 2002, ont montré qu'il y'a une augmentation nette du niveau de résistance aux fluoroquinolones parmi les souches résistantes à l'acide nalidixique (Trystram et *al.*, 2002). L'augmentation du niveau de résistance à l'acide nalidixique apparaît donc comme une étape dans l'évolution vers la résistance aux fluoroquinolones.

Les résultats obtenus montrent également que la résistance est croisée entre fluoroquinolones, mais le niveau d'expression peut varier pour chaque molécule. Ainsi, les souches intermédiaires à la norfloxacine et à l'ofloxacine restent sensibles à la ciprofloxacine. Cependant, 100% des souches résistantes à la ciprofloxacine sont également résistantes aux autres fluoroquinolones testés dans cette étude (norfloxacine et l'ofloxacine). La résistance à la ciprofloxacine a donc une valeur prédictive sur la résistance aux autres fluoroquinolones ainsi qu'à l'acide nalidixique. Les mêmes observations ont été constatées par Lecaillon et *al.* (Lecaillon et *al.*, 2004).

II.2.1. Taux de résistance aux fluoroquinolones par espèce

Le taux de résistance aux fluoroquinolones varie très peu en fonction des espèces, il est cependant légèrement plus élevé chez *E. cloacae* pour l'ofloxacin et la norfloxacin (15.38%) et chez *Klebsiella sp* pour la ciprofloxacine (12.28%) (Tableau N°XX)

Tableau N°XX : Taux de résistance aux fluoroquinolones par espèce

Espèces	Nombre souches isolées	Nombre de souches résistantes			%		
		OFX	NOR	CIP	OFX	NOR	CIP
<i>E. coli</i>	315	41	38	38	13	12	12
<i>Enterobacter cloacae</i>	26	4	4	3	15.38	15.38	11.5
<i>Proteus mirabilis</i>	36	4	4	3	11.11	11.11	8.33
<i>Klebsiella sp</i>	57	8	8	7	14	14	12.28
Total	441	57	54	51	13	12.24	11.56

Brisse et *al.*, ont révélé un taux de résistance à la ciprofloxacine de 7.2% (32/ 445) parmi des souches de *Klebsiella pneumoniae* et 3.4% (8/238) parmi des souches de *Klebsiella oxytoca* isolées en Europe (Brisse et *al.*, 2000). Les résultats du réseau de surveillance EARSS ont montré un taux de résistance de 35% pour la ciprofloxacine chez *K. pneumoniae* au début des années 90, cette situation a correspondu à l'émergence et à la dissémination des souches productrices de β -lactamases à spectre étendu. Depuis, avec la diminution régulière de la fréquence d'isolement de ces souches qui étaient également résistantes aux quinolones, une diminution régulière de la fréquence de la résistance a été observée avec toutefois une légère augmentation dans les années 2000 (environ 18%) (Soussy, 2006).

Des données nationales et internationales récentes suggèrent que la fréquence de la résistance aux fluoroquinolones est en constante augmentation et que le caractère communautaire ou nosocomial de la souche peut influencer le niveau de résistance (Tableau N°XXI).

Tableau N°XXI : Comparaison des % de résistance à la ciprofloxacine chez *E.coli* avec les données rapportées dans certaines régions du monde

Pays	% de résistants à la ciprofloxacine	Origine des souches	Références
Nos résultats	12	Communautaire	-
Algérie	10.1	Hospitalière	Bouzenoune et <i>al.</i> , 2009
Maroc	22	Hospitalière + Communautaire	Sekhsokh et <i>al.</i> , 2008
France	11	Hospitalière	Lemort et <i>al.</i> , 2006
	3.7	Communautaire	
	21	Hospitalière	Lobel et <i>al.</i> , 2008
	8.9	Communautaire	
Italie	28	Communautaire	Cagnacci et <i>al.</i> , 2008
Espagne	24		
Vietnam	3.7	Communautaire	Poirel et <i>al.</i> , 2006
Chine	22.1	Communautaire	Ho et <i>al.</i> , 2007
	43	Hospitalière	Wu et <i>al.</i> , 2007
Japon	8	Hospitalière + Communautaire	Muratani et Matsumoto, 2006
Brésil	43	Communautaire	Pereira et <i>al.</i> , 2007
U.S.A	6.8	Communautaire	Zhanet et <i>al.</i> , 2006
Canada	1.1	Communautaire	

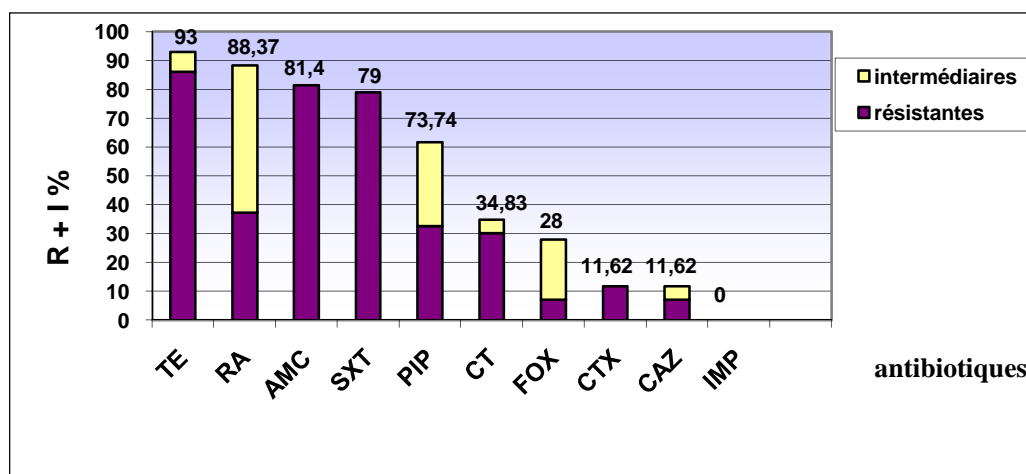
II.3. Résistance aux autres antibiotiques

Certaines souches d'entérobactéries résistantes aux quinolones montrent une résistance croisée à d'autres familles d'antibiotiques. Parmi les souches testées 93%, 88,37%, 81,4, et 79% sont résistantes à la tétracycline, la rifampicine, l'amoxicilline-acide clavulanique et le triméthoprim-sulfaméthoxazole respectivement (figure 12).

Cagnacci et *al.*, ont démontré cette association de résistance (ciprofloxacine / triméthoprim-sulfaméthoxazole / tétracycline) dans la majorité des souches isolées (82,4%) (Cagnacci et *al.*, 2008). De même pour Ho et *al.*, avec la co-résistance ciprofloxacine / co-trimoxazole (Ho et *al.*, 2007).

Ces résultats nous montrent bien qu'il y'a un risque épidémique lié à la transmission de la résistance des bactéries aux β -lactamines, aux quinolones, aux sulfamides, à la rifamycine et aux tétracyclines.

On note que 5 souches parmi les 43 testées (11,62%) sont résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (céfotaxime et céftazidime) et que toutes les souches restent sensibles à l'imipénème. Ces antibiotiques représentent donc une alternative très intéressante aux souches résistantes aux fluoroquinolones dans le traitement des infections à *E. coli*. Il est toutefois important de souligner l'émergence en ville de souches BLSE de type CTX-M conférant une résistance aux C3G.



TE : Tétracycline, **RA** : Rifampicine, **AMC** : amoxicilline + acide clavulanique, **SXT** : Triméthoprim-sulfaméthoxazole, **PIP** : Pipéracilline, **CT** : Céfalotine, **FOX** : Céfoxitine, **CTX** : Céfotaxime, **CAZ** : Céftazidime.

Figure 13: Sensibilité des souches résistantes à l'acide nalidixique à d'autres familles d'antibiotiques

III. Analyse des phénotypes de résistance

III.1. Analyse des phénotypes de résistance aux quinolones

III.1.1. Déduction des phénotypes de résistance aux quinolones

Les phénotypes de résistance aux quinolones des souches d'entérobactéries isolées sont déduits selon leur sensibilité vis à vis de trois antibiotiques : l'acide nalidixique (NA), la ciprofloxacine (CIP) et la norfloxacine (NOR) (tableau N°XXII).

Tableau N° XXII: Mécanismes probables de la résistance aux quinolones (Soussy, 2006)

NA	NOR	CIP	Mécanisme probable de résistance
S	S	S	Sauvage
I	S	S	Réduction d'accumulation ou <i>qnr</i>
R	S	S	1 mutation <i>gyrA</i>
R	I	S	1 mutation <i>gyrA</i>
R	R	S	1 mutation <i>gyrA</i> + 1 mutation <i>parC</i>
R	R	I	2 mutations <i>gyrA</i> + 1 mutation <i>parC</i>
R	R	R	2 mutations <i>gyrA</i> + 1 mutation <i>parC</i> + perméabilité

S : Sensible, **I** : Intermédiaire, **R** : Résistant

gyrA : gène codant pour la sous-unité A de la gyrase

qnr : gène codant pour la protéine Qnr

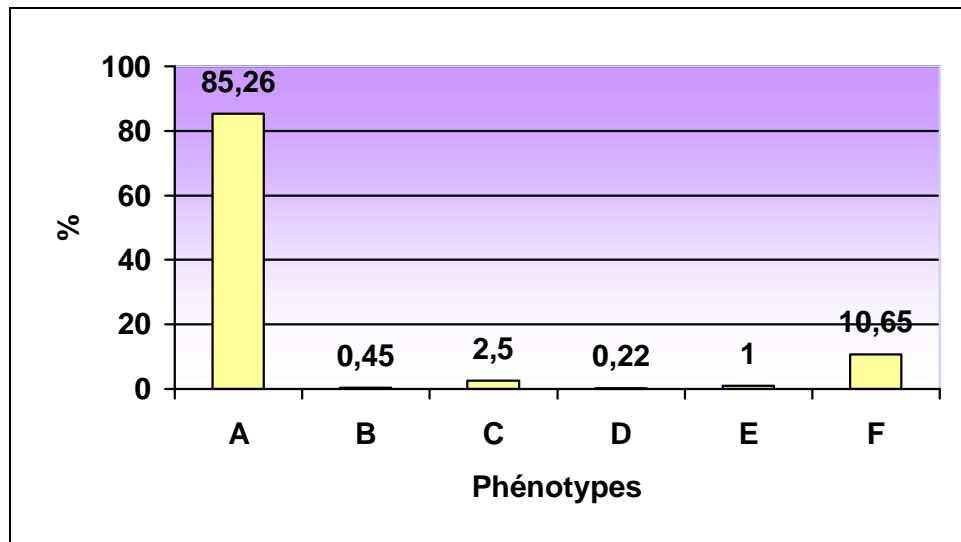
parC : gène codant pour la sous-unité C de la la topoisomérase IV.

III.1.2. Fréquence des phénotypes de résistance aux quinolones

Les souches résistantes à la fois à l'acide nalidixique, à la norfloxacine et à la ciprofloxacine correspondant au mécanisme 2 mutations *gyrA* + 1 mutation *parC* +/- perméabilité, sont les plus répandues avec un taux de 10.65 % (tableau N°XXIII). Des fréquences voisines ont été décrites en France (8 à 9%) pour le même phénotype (Soussy, 2006). L'imperméabilité qui peut être associée à ce mécanisme (par système d'efflux ou altération des porines) est probablement responsable de la co-résistance de la plupart des souches aux β -lactamines et aux tétracyclines.

Tableau N° XXIII: Fréquence des phénotypes de résistance aux quinolones pour chaque espèce

Phénotypes	Espèces					
	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter sp</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Proteus sp</i>	Total	%
Sauvage	269	21	49	30	376	85.26
Réduction d'accumulation ou <i>qnr</i>	0	1	0	1	2	0.45
1 mutation <i>gyrA</i>	8	0	1	2	11	2.5
1 mutation <i>gyrA</i> + 1 mutation <i>parC</i>	0	1	0	0	1	0.22
2 mutations <i>gyrA</i> + 1 mutation <i>parC</i>	2	0	0	2	4	1
2 mut <i>gyrA</i> + 1 mut <i>parC</i> + perméabilité	36	3	7	1	47	10.65



A : Sauvage

B : Réduction d'accumulation ou *qnr*

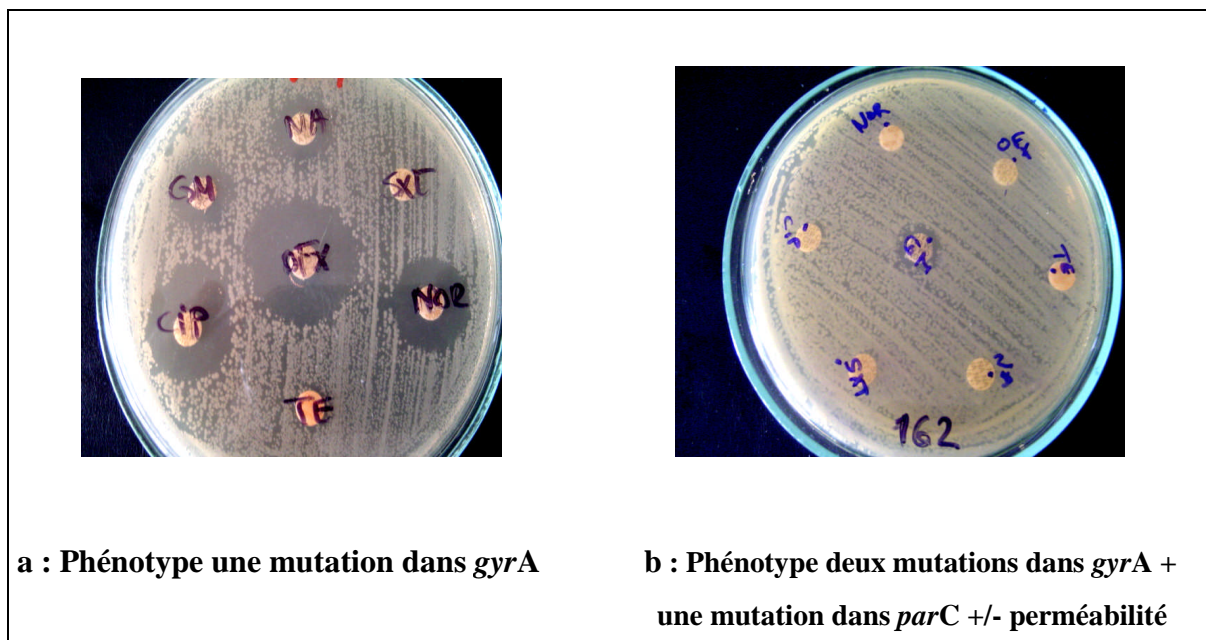
C : 1 mutation *gyrA*

D : 1 mutation *gyrA* + 1 mutation *parC*

E : 2 mutations *gyrA* + 1 mutation *parC*

F : 2 mut *gyrA* + 1 mut *parC*+perméabilité

Figure 14: Fréquence des phénotypes de résistance aux quinolones



NA : acide nalidixique, OFX : ofloxacine, NOR : norfloxacine, CIP : ciprofloxacine,

Figure 15: Antibiogrammes des quinolones de deux souches d'entérobactéries ayant différents phénotypes de résistance

III.1.3. PCR du gène *qnr*

25 souches d'entérobactéries ont été analysées par PCR multiplexe en utilisant des amorces spécifiques aux gènes *qnr* (*qnrA*, *qnrB* et *qnrS*) (tableau N°VIII).

Tableau N°VIII : Souches d'entérobactéries testées pour la PCR du gène *qnr*

Code	Espèces	NOR	CIP	OFX	NA
A139	<i>K. oxytoca</i>	I	S	R	R
L251	<i>P. mirabilis</i>	R	I	R	R
L248	<i>P. mirabilis</i>	S	S	S	R
D132	<i>E. cloacae</i>	R	S	I	I
K219	<i>E. cloacae</i>	S	S	S	I
A110	<i>E coli</i>	S	S	S	R
A165	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R
L280	<i>E coli</i>	S	S	S	R
A150	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R
D223	<i>E coli</i>	R	R	R	R
L265	<i>E coli</i>	S	S	I	R
A116	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R
A225	<i>P. mirabilis</i>	R	I	R	R
L292	<i>E coli</i>	R	R	R	R
D125	<i>E coli</i>	R	I	R	R
A121	<i>P. mirabilis</i>	I	S	R	R
D257	<i>K. oxytoca</i>	R	R	R	R
A109	<i>E coli</i>	R	R	R	R
L279	<i>E coli</i>	R	R	R	R
L276	<i>E coli</i>	R	R	R	R
A101	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R
L301	<i>E. coli</i>	R	R	R	R
A134	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R
A162	<i>E. coli</i>	R	R	R	R
A108	<i>E. cloacae.</i>	R	R	R	R

Les résultats montrent que toutes les souches testées sont *qnrA* et *qnrS* négatives. Seules deux souches d'*E. cloacae* (A101, A108) et une souche d'*E. coli* (L301) sont *qnrB* positives (figure 16).

Plusieurs publications récentes font état depuis 2003 de l'isolement de souches porteuses de ces gènes plasmidiques chez différentes espèces d'entérobactéries notamment d'*E. cloacae* et *E. coli*. Touati et al., et Iabaden et al., ont rapporté la présence du gène *qnrB* chez des souches d'*E. cloacae* isolées en Algérie (Touati et al., 2008 ; Iabaden et al., 2008). En Corée, 28.5% des souches d'*E. cloacae* étaient *qnr* positive avec une prédominance pour *qnrB* (Park et al., 2005). La prévalence du gène *qnrB* était de 4% parmi des souches d'*E. coli* isolées en Italie, responsables d'infections urinaires (Cagnacci et al., 2008).



Légendes :

1 : *E. cloacae* A101

4 : *E. coli* A162

2 : *E. cloacae* A108

5 : *E. coli* L301

3 : *E. cloacae* A134

Figure 16: Résultat de l'amplification par PCR du gène *qnrB* (pour les souches A101, A108, A134, A162 et L301).

III.1.4. Détermination des CMI de la ciprofloxacine

Les résultats de l'évaluation de la résistance à la ciprofloxacine par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur milieu solide sont donnés dans le tableau N°XXIV.

Tableau N°XXIV : CMI de la ciprofloxacine des souches d'entérobactéries résistantes à l'acide nalidixiques (NA^R)

N°	Espèces	NA	NOR	CIP	OFX	CMI de la CIP (µg/ml)	Mécanismes probables
A109	<i>E coli</i>	R	R	R	R	32	F
A110	<i>E coli</i>	R	S	S	S	8	C
D125	<i>E coli</i>	R	R	I	R	128	E
D142	<i>E coli</i>	R	R	R	R	32	F
D143	<i>E coli</i>	R	R	R	R	32	F
D144	<i>E coli</i>	R	R	R	R	8	F
D157	<i>E coli</i>	R	R	R	R	16	F
D211	<i>E coli</i>	R	R	R	R	8	F
D223	<i>E coli</i>	R	R	R	R	32	F
D224	<i>E coli</i>	R	R	R	R	16	F
D231	<i>E coli</i>	R	R	R	R	64	F
D241	<i>E coli</i>	R	R	R	R	> 128	F
D255	<i>E coli</i>	R	R	R	R	> 128	F
D259	<i>E coli</i>	R	R	R	R	64	F
D273	<i>E coli</i>	R	R	R	R	8	F
D285	<i>E coli</i>	R	R	R	R	64	F
D310	<i>E coli</i>	R	R	R	R	> 128	F
K221	<i>E coli</i>	R	R	R	R	16	F
A107	<i>E coli</i>	R	R	R	R	32	F
K237	<i>E coli</i>	R	R	R	R	8	F
L218	<i>E coli</i>	R	R	R	R	> 128	F
L252	<i>E coli</i>	R	R	R	R	128	F
L264	<i>E coli</i>	R	R	R	R	> 128	F
L265	<i>E coli</i>	R	S	S	I	8	C
L269	<i>E coli</i>	R	R	R	R	32	F
L276	<i>E coli</i>	R	R	R	R	128	F
L279	<i>E coli</i>	R	R	R	R	32	F
L280	<i>E coli</i>	R	S	S	S	8	F
L286	<i>E coli</i>	R	R	R	R	> 128	F

N°	Espèces	NA	NOR	CIP	OFX	CMI de la CIP (µg/ml)	Mécanismes probables
L287	<i>E coli</i>	R	R	R	R	> 128	F
L288	<i>E coli</i>	R	R	R	R	64	F
L292	<i>E coli</i>	R	R	R	R	128	F
L294	<i>E coli</i>	R	R	R	R	16	F
L299	<i>E coli</i>	R	S	S	I	16	C
L301	<i>E coli</i>	R	R	R	R	> 128	F
L302	<i>E coli</i>	R	R	I	R	64	E
L314	<i>E coli</i>	R	S	S	S	8	C
L315	<i>E coli</i>	R	S	S	R	64	C
A148	<i>E coli</i>	R	R	R	R	8	F
A226	<i>E coli</i>	R	R	R	R	> 128	F
A153	<i>E coli</i>	R	R	R	R	128	F
A162	<i>E coli</i>	R	R	R	R	128	F
K206	<i>E. coli</i>	R	R	R	S	8	F
L311	<i>E. coli</i>	R	S	S	R	64	F
D132	<i>E. cloacae</i>	I	R	S	I	16	D
D253	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	32	F
K219	<i>E. cloacae</i>	I	S	S	S	8	B
A101	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	> 128	F
A108	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	> 128	F
D257	<i>K. oxytoca</i>	R	R	R	R	16	F
A139	<i>K.oxytoca</i>	R	I	S	R	8	C
L220	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	8	F
L230	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	> 128	F
A134	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	128	F
K245	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	32	F
A116	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	> 128	F
A165	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	16	F
L251	<i>P. mirabilis</i>	R	R	I	R	4	E
L248	<i>P. mirabilis</i>	R	S	S	S	8	C
L249	<i>P. mirabilis</i>	I	S	S	S	8	B
A121	<i>P. mirabilis</i>	R	I	S	R	8	C
A150	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	8	F
A225	<i>P. mirabilis</i>	R	R	I	R	8	E

Selon Ruiz, une seule mutation au niveau de *gyrA* est suffisante pour engendrer un haut niveau de résistance à l'acide nalidixique (augmentation de la CMI de 8 à 10 fois), mais pour obtenir une résistance de haut niveau aux fluoroquinolones, une deuxième mutation de *gyrA* et/ou d'autres cibles comme *parC* s'impose (Ruiz, 2003).

Cependant, pour le mécanisme : 2 mutations *gyrA* + 1 mutation *parC* +/- perméabilité, qui est le plus fréquent, différentes CMI de la ciprofloxacine sont observées (variant entre 8 et > 128 µg/ml). Des résultats similaires ont été rapportés par Grutek et al., et Talukder et al., (Grutek et al., 2002 et Talukder et al., 2006). Les différentes CMI obtenues peuvent être expliquées par la présence ou l'absence d'une pompe d'efflux, mais aussi par la nature des substitutions en acide aminé. En effet, Hu et al., ont constaté que les souches ayant la mutation Ser83Leu dans *gyrA* avaient des CMI supérieures à celles ayant la mutation Ser83Ile dans *gyrA* (Hu et al., 2007).

Le mécanisme de résistance aux quinolones transmis par le gène *qnr* est généralement faible (CMI de la ciprofloxacine : 0.09 µg/ml) (Honoré et al., 2006). Or, les souches identifiées *qnr* positives (A101, A108 et L301) montrent des résistances de haut niveau pour la ciprofloxacine avec des CMI > 128 µg/ml. Il a été démontré que les mécanismes de résistance plasmidiques et chromosomiques sont additionnels car les mutations dans les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*, l'efflux et l'imperméabilité peuvent s'associer aux gènes *qnr* pour augmenter la résistance aux quinolones (Li, 2005). De plus, les protéines Qnr peuvent faciliter la sélection des mutations conférant la résistance aux quinolones en augmentant la fréquence de résistance (Martinez-Martinez et al., 1998).

Ainsi, la comparaison de la sensibilité aux quinolones de souches *qnr* positives et *qnr* négatives ayant le même type de mutations a révélé des CMI des fluoroquinolones 10 fois supérieures pour les souches *qnr* positives (Lascols et al., 2007).

III.2. Analyse des phénotypes de résistance aux β -lactamines

III.2.1. Recherche des β -lactamases à spectre élargi (BLSE)

Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) sont recherchées pour les souches résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (céfotaxime et/ou céftazidime).

III.2.1.1. DD-Test

Le DD-Test montre des images de synergie pour 4 des 5 souches d'entérobactéries résistantes au céfotaxime, il s'agit des souches A134, L301, A108 et A162. L'image de synergie est traduite par l'augmentation de diamètres des zones d'inhibition autour des disques de céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération située à proximité d'un disque contenant le clavulanate (AMC) qui inhibe la BLSE produite par les souches résistantes (figure 17).

Tableau N° XXV: Diamètres (mm) des zones d'inhibition du DD-test

Code	espèce	Diamètre (mm)				Synergie
		CTX	CAZ	FEP	CPO	
A101	<i>E. cloacae</i>	6	6	22	19	Absence
L301	<i>E. coli</i>	12	14	18	16	Présence
A134	<i>E. cloacae</i>	14	18	18	22	Présence
A162	<i>E. coli</i>	14	18	20	18	Présence
A108	<i>E. cloacae</i>	12	14	18	12	Présence

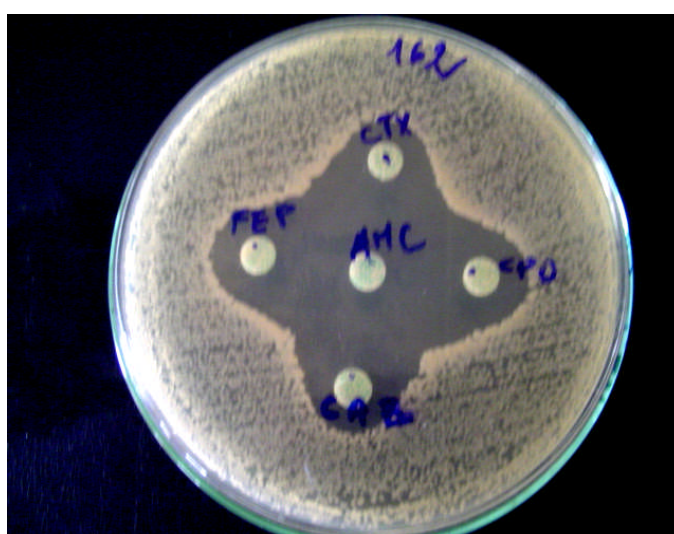


Figure 17: Image de synergie pour le Souche A162 productrice de BLSE

III.2.1.2. DD-Test sur gélose Mueller Hinton additionnée de cloxacilline

La souche A101 n'ayant pas donné d'image de synergie pour le DD-Test est testée une deuxième fois par addition de cloxacilline dans la gélose Mueller Hinton à une concentration finale de 200 µg/ml.

Tableau N°XXVI : Diamètres (mm) des zones d'inhibition sur gélose Mueller Hinton avec et sans cloxacilline

Code	espèce	Diamètre (mm)												Synergie
		CTX			CAZ			FEP			CPO			
		MH ^a	MH ^b	D ^c	MH ^a	MH ^b	D ^c	MH ^a	MH ^b	D ^c	MH ^a	MH ^b	D ^c	
A101	<i>E. cloacae</i>	6	22	16	6	22	16	37	40	3	22	30	8	Absence

MH^a : Muller Hinton sans cloxacilline

MH^b : Muller Hinton avec cloxacilline à 200µg/ml

D^c : Différence entre les diamètres des zones d'inhibition

L'absence d'image de synergie et l'augmentation des diamètres des zones d'inhibition autour des disques de CTX, CAZ, CPO et FEP suggèrent que cette souche d'*E. cloacae* résiste probablement par hyperproduction de sa céphalosporinase chromosomique.



**A101 sur gélose Muller Hinton
sans cloxacilline**



**A101 sur gélose Muller Hinton
avec cloxacilline à 200µg/ml**

Figure18 : Phénotype d'hyperproduction de céphalosporinase pour la souche A101

III.2.2. PCR du gène *bla*_{CTX-M}

La PCR du gène *bla*_{CTX-M} a permis de confirmer les phénotypes de résistance déduits précédemment. Les souches d'*E. coli* A162 et L301 ainsi que les souches d'*E. cloacae* A108 et A134 ont été révélées CTX-M positives. Seule la souche A101 d'*E. cloacae* était CTX-M négative (figure 19).



- | | |
|---------------------------|------------------------|
| 1: <i>E. cloacae</i> A101 | 4: <i>E. coli</i> A162 |
| 2: <i>E. cloacae</i> A108 | 5: <i>E. coli</i> L301 |
| 3: <i>E. cloacae</i> A134 | |

Figure 19: Résultat de l'amplification par PCR du gène *bla*_{CTX-M} (pour les souches A101, A108, A134, A162 et L301).

6.15% (4/65) des souches résistantes aux quinolones sont productrices de CTX-Mases. Ces enzymes ont été identifiées comme étant les BLSE les plus prédominantes en milieu communautaire et sont souvent la cause d'infections urinaires (Pitout et *al.*, 2005). Elles possèdent une capacité de diffusion et d'évolution importante (Bonnet, 2006). Des publications nationales ont montré que les CTX-M-3 et les CTX-M-15 sont les plus prévalentes en Algérie (Ramdani-Bougoussa et *al.*, 2006 ; Touati et *al.*, 2006. ; Iabadene et *al.*, 2008).

2/4 des souches productrices de BLSE de type CTX-M sont *qnrB* positives. La prévalence des souches portant le gène *qnr* parmi des souches productrices de BLSE était de 27.2% en Cote

d'Ivoire (Guessennnd et *al.*, 2008) , de 0.7% en France (Honoré et *al.*, 2006), de 4.9% en Espagne (Lavilla et *al.*, 2008) et de 8% en Chine (Jeong et *al.*, 2008).

Cela est dû au fait que ces enzymes sont souvent codées par des gènes localisés dans des plasmides portant également des gènes codant pour la résistance à d'autres antibiotiques notamment les quinolones (Pitout et *al.*, 2005). Plusieurs études ont décrit l'association des déterminants QnrB et CTX-M-15 (Touati et *al.*, 2008, Iabaden et *al.*, 2008).

IV. Conjugaison

Le transfert par conjugaison a été réalisé pour les deux souches productrices de BLSE et intermédiaires à la rifampicine : A134 et A162. Sur la gélose de sélection, aucune croissance n'a été observée. Il n'ya donc pas eu de transfert par conjugaison du gène *bla*_{CTX-M}. Des résultats similaires ont été rapportés par Touati et *al.*, pour deux souches d'entérobactéries (Touati et *al.*, 2006)

L'absence de transconjugants peut être expliquée par le fait que les plasmides portant le gène *bla*_{CTX-M} ne soient pas conjugatifs. En effet, même si, dans la majorité des cas, le gène *bla*_{CTX-M} est porté par un plasmide conjugatif, certains plasmides portant ce même gène ne sont pas transférables (Walther-Rasmussen et Høiby, 2004). Le gène *bla*_{CTX-M} peut cependant être transféré par d'autres éléments mobilisables à savoir, les intégrons et les transposons (Corkill et *al.*, 2005).

V. Etude de la relation consommation _résistance aux antibiotiques

V.1. Enquête chez les médecins

Les résultats de l'enquête réalisée sur 26 médecins de différentes spécialités (dermatologue, pneumologue, gynécologue, urologue, pédiatre, généraliste,) exerçant en milieu communautaire, montrent que les β -lactamines sont de loin la famille d'antibiotiques la plus prescrite et ce pour tout type d'infections. En général, il s'agit des β -lactamines du groupe des pénicillines (amoxicilline) et plus rarement des céphalosporines.

Les autres antibiotiques les plus prescrits après les β -lactamines sont les macrolides et les sulfamides, suivis des aminosides et des quinolones et enfin des cyclines.

Les quinolones sont donc peu prescrites en médecine ambulatoire et seulement en cas d'infections urinaires compliquées.

Cette enquête nous a également permis de constater que, de manière générale, les antibiogrammes sont très peu demandés par les médecins, sauf en cas d'infections récidivantes ou résistantes aux traitements usuels.

V.2. Enquête chez les pharmaciens

L'enquête chez 68 pharmaciens a révélé que les antibiotiques les plus vendus sont (par ordre d'importance) :

- ❖ Les pénicillines : amoxicilline (clamoxy[®] et autre), ampicilline (Totapen[®], amoxicilline-acide clavulanique (Augmentin[®]).
- ❖ Les aminosides : gentamycine (Gentalline[®])
- ❖ Les sulfamides : cotrimoxazole (Bactrim[®])
- ❖ Les céphalosporines de 1ère génération : céfazoline (Céfacidal[®]), céfalexine (céporexine[®]).
- ❖ Les quinolones et fluoroquinolones : acide pipémidique (Pipram[®]), ciprofloxacine (Ciflox[®])
- ❖ Les céphalosporines de 2ème génération : céfuroxime (Méfoxin[®]).

En résumé, la consommation des quinolones en milieu communautaire est assez faible, il en découle néanmoins que le taux de résistance est relativement élevé (15%), cela peut être expliqué par la co-résistance des souches tout particulièrement aux β -lactamines. La forte consommation des β -lactamines exerce une pression de sélection sur les souches résistantes. Le mécanisme de résistance aux β -lactamines et aux quinolones peut être commun (pompe d'efflux et/ou altération des porines) comme il peut être associé (*qnr-bla*) et permet donc au déterminant Qnr d'émerger à travers les souches productrices de BLSE.

De plus, l'utilisation des quinolones en médecine vétérinaire peut contribuer à l'acquisition de la résistance par l'alimentation et ceux par le biais des bactéries telles que les Salmonelles (Fabrega et al., 2008). Bouchif et al ont rapporté le premier cas au Maroc de *Salmonella kentucky* isolée chez la dinde résistante à la ciprofloxacine avec une CMI de 16 μ g/ml en 2006 (Bouchif et al., 2008).

La relation entre augmentation de la résistance et consommation a été notée comme importante à travers de nombreuses études. La résistance aux fluoroquinolones est restée longtemps stable en Espagne puis la consommation journalière de fluoroquinolones a progressivement augmenté, le taux de consommation était de 2,2 pour 1000 habitants en 1993, et atteint le seuil de 2,4 pour 1000 habitants en 2000, ce qui a eu pour conséquence l'augmentation de la résistance aux fluoroquinolones chez les souches d'*E. coli* isolées des infections urinaires avec un taux de 15 à 20 % (Lemort et *al.*, 2006).

D'autres études ont montré que le traitement préalable aux quinolones (durant une période de quatre semaines avant l'infection urinaire) est un facteur de risque majeur des infections urinaires communautaires dûes aux souches d'*E. coli* résistantes à la ciprofloxacine et aux infections urinaires communautaires récidivantes (Colodner et *al.*, 2008).

Conclusion

Conclusion

La présente étude nous permet de collecter 441 souches d'entérobactéries à partir de quatre laboratoires d'analyses médicales de la région de Béjaia, parmi lesquelles 195 souches ont été isolées au niveau du laboratoire du D^r Djama (Béjaia), 132 au niveau du laboratoire du D^r Lalaoui (Béjaia), 80 au niveau laboratoire du D^r Ait Bachir (Akbou) et 34 au niveau du laboratoire du D^r Kadi (Sidi-Aich). La majorité des souches sont d'origine urinaire (96.6%) et l'espèce la plus fréquemment isolée est *E. coli* avec un taux de 71.26%.

65/441 des souches d'entérobactéries sont résistantes à l'acide nalidixique soit un taux de 14.73%, parmi lesquelles 25 ont été isolées au laboratoire du D^r Lalaoui. 19 au laboratoire du D^r Djama, 16 au laboratoire du D^r Ait Bachir et 5 au laboratoire du D^r Kadi.

Le taux résistance aux quinolones est de 19.23% pour *Enterobacter cloacae*, de 16.66% pour *Proteus mirabilis*, de 14.6% pour *Klebsiella sp* et de 14% pour *E. coli*.

L'analyse statistique des données concernant les patients (âge et sexe) a permis de constater que les hommes et les personnes âgées de plus de 65 ans étaient plus vulnérables à l'acquisition de la résistance aux quinolones.

L'étude de la sensibilité des souches d'entérobactéries vis-à-vis des fluoroquinolones a permis d'enregistrer des taux de résistance de 13% (57/441) pour l'ofloxacine, de 12.24% (54/441) pour la norfloxacine et de 11.56% (51/441) pour la ciprofloxacine.

Certaines souches résistantes à l'acide nalidixique montrent une multirésistance à la tétracycline, à la rifampicine, à l'amoxicilline-acide clavulanique et au triméthoprime-sulfaméthoxazole avec des taux de 93%, 88.37%, 81.4%, 79% et respectivement. 5 souches sont résistantes au céfotaxime et au céftazidime et toutes les souches restent sensibles à l'imipénème.

Les souches résistantes à la fois à l'acide nalidixique, à la norfloxacine et à la ciprofloxacine correspondant au mécanisme : 2 mutations *gyrA*+ 1 mutation *parC* +/- perméabilité, sont les plus répandues avec une fréquence de 10.65 %. Différentes CMI de la ciprofloxacine ont été observées (variant entre 8 et > 128 µg/ml) parmi les souches ayant ce même phénotype.

Deux souches d'*E. cloacae* (A101, A108) et une souche d'*E. coli* (L301) ont été révélées *qnrB* positives, ce qui indique la dissémination du déterminant QnrB dans notre région. Ces trois souches ont des CMI pour la ciprofloxacine > 128 µg/ml. Ce haut niveau de

résistance peut être le résultat de l'addition d'autres mécanismes de résistance aux quinolones en plus de la résistance plasmidique.

Les résultats de la PCR montrent que 4 souches d'entérobactéries (A108, A134, A162 et L301) résistent aux C3G par production de BLSE de type CTX-M et une souche (A101) par l'hyperproduction de sa céphalosporinase chromosomique. L'émergence du déterminant Qnr B parmi les souches productrices de BLSE de type CTX-M a été identifiée pour deux souches d'*E. cloacae* (A108 et L301).

Le transfert des gènes *bla_{CTX-M}* par conjugaison n'a pu être obtenu pour les souches d'*E. cloacae* (A134) et d'*E. coli* (A162) testées.

Durant l'enquête réalisée chez les médecins de ville et les pharmaciens, nous avons constaté que les quinolones étaient très peu utilisées dans le traitement des infections urinaires.

L'émergence de la résistance plasmidique aux quinolones, aussi bien en milieu hospitalier qu'en pratique de ville, est devenue une préoccupation majeure, d'autant plus qu'elle est souvent associée à la résistance vis-à-vis d'autres classes d'antibiotiques habituellement utilisés en thérapeutique telles que les β -lactamines par la co-expression des gènes *bla* et *qnr*, et peut ainsi conduire à des impasses thérapeutiques.

Au vu de nos résultats, le risque épidémique lié à la transmission de la résistance des entérobactéries aux quinolones en milieu extra-hospitalier existe bien en Algérie. Le taux enregistré est d'environ 15% ce qui est relativement élevé et comparable aux taux rapportés dans la littérature, alors que les recommandations actuelles des sociétés d'urologie comme la *European Association of Urology* (EAU) définissent la possibilité d'utiliser de façon probabiliste un antibiotique dans le traitement des infections urinaires si la résistance des principaux agents infectieux dans ce contexte est $\leq 10\%$ (Lobel et al., 2008).

Les mesures tendant à prévenir et à maîtriser les conséquences de cette résistance, en milieu communautaire, doivent agir sur les facteurs qui conditionnent son émergence et son évolution :

- Il s'agit, en premier lieu, de diminuer la pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie en sensibilisant la population au fait que les antibiotiques ne sont pas automatiques (pas quand c'est viral) par le biais de publicités par exemple.

- D'améliorer les conditions d'usage des antibiotiques en respectant la durée du traitement et en évitant l'automédication surtout pour les populations à risque.
- De faire en sorte qu'il y'est une coopération permanente entre médecins, techniciens et chercheurs en organisant chaque année des colloques nationaux et internationaux dans un but thérapeutique et prophylactique.
- De mettre en place un système de surveillance des résistances et de consommation d'antibiotiques à travers de large base de données et à l'aide de modèle dynamique en vue d'un meilleur control de la diffusion des souches résistantes.
- Enfin, une recherche active de nouvelles molécules, fondée sur une connaissance approfondie des mécanismes génétiques et biochimiques de la résistance mais aussi des éléments mobiles qui permettent leurs diffusions, et la mise en évidence de nouveaux sites d'action intrabactériens, doit être développée.

Cette étude ne reste évidemment que préliminaire, elle pourrait être complétée en :

- ❖ Etudiant un plus grand nombre de souches, incluant des bactéries Gram positives et Gram négatives, et de rendre ainsi l'étude statistique plus fiable.
- ❖ Traitant d'autres facteurs de risque dans l'acquisition de la résistance (antibiothérapie, l'hospitalisation préalable, diabète, sondage urinaire,...).
- ❖ Appliquant des techniques de biologie moléculaire pour :
 - Déterminer les différents mécanismes de résistance aux quinolones des souches.
 - Identifier le support génétique pour toutes les souches résistantes aux quinolones afin d'en évaluer l'émergence.
 - Caractériser l'environnement génétique du gène *qnr* et ainsi de mettre en évidence la structure génétique impliquée dans sa mobilisation et d'établir la relation clonale des souches.
- ❖ Testant les souches vis-à-vis des nouvelles générations de fluoroquinolones.
- ❖ Enfin, une meilleure connaissance nationale des consommations d'antibiotiques, l'impact des politiques d'utilisation des antibiotiques, y compris l'alternance des antibiotiques sur la résistance bactérienne, et la détection précoce des nouvelles résistances devraient faire l'objet de travaux prioritaires.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Avguštin, J. A., R. Keber, K. Žerjavič, T. Oražem and M. Grabner. 2007. Emergence of the quinolone resistance-mediating gene *aac(6')-Ib-cr* in extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(11): 4171-4173.

B

Baudry, P. J., K. Nichol, M. DeCorby, P. Lagacé-Wiens, E. Olivier, D. Boyd, M. R. Mulvey, D. J. Hoban and G. G. Zhanel. 2009. Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from Canadian intensive care units: the 1st report of QepA in North America. *Diagnos Microbiol and Infect Dis.* **63** (3): 319-3.

Bonnet. R. 2006. β -lactamines et entérobactéries. In : Courvalin. P, Lecclerc. R et Bingen. E, eds . ANTIBIOGRAMME, 2^{ème} ed. ESKA, Paris ; 141-162.

Bouchakour, M., M. Timinouni, K. Zerouali, J.D. Perrier-Gros-Claude, M. C. Ploy, N. El Mdaghri and P. Courvalin. 2008. Association of plasmid-mediated quinolone resistance genes, DHA-1 β -lactamase, and extended-spectrum β -lactamase SHV-12 in *Enterobacter cloacae* isolated in Morocco. *18th European Congress of Clin Microbiol and Infect Diss.* Abstract number: **O84**.

Bouchrif. B, B. Karraouan, M. M. Ennaji, M. Timinouni. 2008. Émergence de la résistance aux quinolones chez *Salmonella spp.* à Casablanca – Maroc. *Méd et mal infect.* **38** : 615-616.

Bouzenoune F, Boudersa F, Bensaad A, Harkat F, Siad N. 2009. Les infections urinaires à Ain M'lila (Algérie). Résistance aux antibiotiques des 239 souches isolées entre 2006 et 2007. *Méd et mal infect.* **39**(2) :142-143.

Brisse, S., D. Milatovic, A. C. Fluit, J. Verhoef and F-J. Schmitz. 2000. Epidemiology of quinolone resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Europe. *J Clin Microbiol Infect Dis.* **19**: 64-68.

Bryskier.A. Antibiotiques et agents antibactériens. In : Bryskier. A. (eds), Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses, Paris; 1999. P71-72, 688, 733.

C

Cagnacci, S., L. Gualco, E. Debbia, G. C. Schito, and A. Marchese. 2008. European Emergence of Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli* Clonal Groups O25:H4-ST 131 and

O15:K52:H1 Causing Community-Acquired Uncomplicated Cystitis. *J Clin Microbiol.* **46** (8) : 2605–2612.

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

Caron, F., T. Galperine, N. Dumarcet, R. Azria, E. Bingen, H. Botto, J.-D. Cavallo, E. Chartier-Kastler, J.-N. Dacher, T. Diatta et al. 2008. Recommandation de bonne pratique. Diagnostic et antibiothérapie des infections bactériennes communautaires chez l'adulte. *Med Mal Infect.* **28S** : S203-S252

Castanheira, M., A. S. Pereira, A. G. Nicoletti, A. C. C. Pignatari, A. L. Barth, and A. C. Gales. 2007. First report of plasmid-mediated *qnrA1* in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(4): 1527-1529.

Cattoir V, P. Lesprit , C. Lascols , E. Denamur , P. Legrand , C.J. Soussy , E. Cambau . 2006. In vivo selection during ofloxacin therapy of *Escherichia coli* with combined topoisomerase mutations that confer high resistance to ofloxacin but susceptibility to nalidixic acid. *J Antimicrob Chemother.***58**(5):1054-7.

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

Cattoir, V., L. Poirel, and P. Nordmann. 2007. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrB4 identified in France in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate coexpressing a QnrS1 determinant. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(7): 2652–2653.

Cattoir, V., L. Poirel and P. Nordmann. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* **52** (10): 3801-3804.

Cattoir, V., P. Nordmann, J. Silva-Sanchez, P. Espinal, and L. Poirel. 2008. ISEcp1-Mediated Transposition of *qnrB*-Like Gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**(8): 2929–2932.

Cavaco, L. M., H. Hasman, S. Xia, F. M. Aurestrup. 2009. Qnr D, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar *Kentucky* and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(2):603-8.

Cesaro , A., R. R. Dit Bettoni, C. Lascols, A. Mérens, C J Soussy and E. Cambau. 2008. Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne *qnr* genes. *Int J Antimicrob Chemother.* Abstract.

Chenia, H. Y., B. Pillay, and D. Pillay. 2006. Analyse of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. *Int J Antimicrob Chemother.* **58**: 1274-1278.

Chmelnitsky, I., S. Navon-Venezia, J. Strahilevitz and Y. Carmeli. 2008. Plasmid-mediated *qnrB2* and carbapenemase gene *bla*_{KPC-2} carried in the same plasmid in

carbapenem- resistant ciprofloxacin –suceptible *Enterobacter cloacae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**(8): 2962-2965.

Chu, D. T. W et P. B. Fernandes. 1989. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob Agent Chemother.* **33**(2): 131-135.

Colodner. R., I. Kometiani, B. Chazan, and R. Raz. 2008. Risk factor for community-acquired urinary tract infection due to quinolone-resistant *E coli*. *J Infect.* **36** (1): 41-45.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CFA-SFM). Communiqué 2007.

Corrkill, J. E., J. J. Anson and C. A. Hart. 2005. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. *Int J Antimicrob Chemother.* **56**: 1115-1117.

Corvec, S., D. Lepelletier, A. Reynaud, S. Dauvergne, C. Giraudeau and N. Caroff. 2008. In vivo selection of an *Escherichia coli* isolate highly resistant to ciprofloxacin and ceftazidime: role of a 4-bp duplication in *acrR* and *ampC* overexpression. *Int J Antimicrob Agents.* **32** (2) : 196-198.

Critchlow et al . 1996. Cités par **Bryskier.A.** Antibiotiques et agents antibactériens. In : Bryskier. A. (eds), Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses, Paris; 1999. P731.

D

Denton. M. 2007. Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents.* **29** (3):S9-S22.

E

Ellington, M. J. and N. Woodford. 2006. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction *Escherichia coli* strain in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(4):1527–1529.

Escribano, I., J. C. Rodriguez, L. Cebrian and G. Royo. 2004. The importance of active efflux systems in the quinolone resistance of clinical isolates of *Salmonella spp.* *Int Antimicrob Agents.* **24**: 428-432.

F

Fàbrega A, Sánchez-Céspedes J, Soto S, Vila J. 2008. Quinolone resistance in the food chain. *Int J Antimicrob Agents.* **31**(4):307-15.

Fihman V, Lartigue MF, Jacquier H, Meunier F, Schnepf N, Raskine L, Riahi J, Sanson-le Pors MJ, Berçot B. 2008. Appearance of *aac(6')-Ib-cr* gene among extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a French hospital. *J Infect.* **56**(6):454-9.

G

Garnier. F., N. Raked, A. Gassama, F. Denis, and M-C. Ploy. 2006. Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sul1*-type integron in the newly described *Salmonella enterica* serovar Keurmassen. *Antimicrob Agents and Chemother.* **50**(9): 3200-3202.

Gay. K., A. Robicsek, J. Strahilevitz. 2006. Plasmid mediated quinolone resistance in non *Typhi Salmonella*. *Clin Infect Dis.* **43**: 297-304.

Giraud. E., S. Boucheron, A. Cloeckaert. 2006. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella* : emerging of mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes and Infect.* **8**: 1937-1944.

Giraud-Morin. et T. Fosse. 2008. Evolution récente et caractérisation des entérobactéries productrices de BLSE au CHU de Nice (2005-2007). *Pathol Biol.* 2676-2683.

Gootz. T. D. 2006. The forgotten Gram-negative bacilli: What genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. *Biochemical Pharmacol.* **71**(7) :1073-1084.

Gruteke, P., W. Goessens, J. V. Gils, P. Peerbooms, N. L. Toom, M. V. Santen-Verheuvél, A. V. Belkum and H. Verbrugh. 2002. Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum β -lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. *Clin Microbiol. Rev.* **41**: 1161-1166.

Guessennd, N., S. Bremont, V. Gbonon, A. Kacou-NDouba, E. Ekaza, T. Lambert, M. Dosso, P. Courvalin. 2008. Résistance aux quinolones de type *qnr* chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire. *Pathol Biol.* **56** : 439-446.

H

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

Ho. PL., WW. Poon , SL. Loke , MS. Leung , KH. Chow , RC. Wong , KS. Yip , EL. Lai , KW. Tsang . 2007. Community emergence of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* from women. *J Antimicrob Chemother.* **60**(1):140-4.

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

Honoré, S., C. Lascols, D. Malin R. Targaouchi, V. Cattoir, P. Legrand, C.-J. Soussy and E. Cambau. 2006. Emergence et diffusion chez les entérobactéries du nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones *Qnr* (hospital Henri_Mondor 2002-205). *Pathol Biol.* **54**: 270-279.

Hooper, D. C. 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Infect Dis.* **2**: 530-536.

Hopkins, K. L., R. H. Davies and E. J. Threlfall. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* **25**: 358-373.

Hopkins K. L., L. Wootton, M. R. Day and E. J. Threlfall. 2007. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. *Int J Antimicrob Chemother.* **59**: 1071–1075.

Hu, Li-Fen., Jia-Bin. Li, Ying. Ye, and Xu. Li. 2007. Mutations in the GyrA subunit of dna gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in clinical strains of fluoroquinolone-resistant *Shigella* in Anhui, China. *J of Microb.* **45** (2): 168-170.

J

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

J

Jacoby, G., N. Chow,¹ and K. B. Waites. 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **47** (2): 559-562.

Jacoby, G. A., K. E. Walsh, D. M. Mills, V. J. Walker, H. Oh, A. Robicsek et D. C. Hooper. 2006. *qnr* B, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **50** (4): 1178-1182.

Jacoby, G. A., V. Cattoir, D. Hooper, L. Martínez- Martínez, P. Nordmann, A. Pascual, L. Poirel and M. Wang. 2008. *qnr* gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**(7): 2297-2299.

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

Jeong, J-Y, H. J. Yoon, E. S. Kim, Y. Lee, S-H. Choi, N. J. Kim, J. H. Woo, and Y. S. Kim. 2005. Detection of *qnr* in Clinical Isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**(6):2522–2524.

Jeong, J-Y., E. S. Kima, S-H. Choia, H-H. Kwona, S-R Lee, S-O Lee, M-N Kim, J. H. Woo, and Y. S. Kim. 2008. Effects of a plasmid-encoded *qnrA1* determinant in *Escherichia coli* strains carrying chromosomal mutations in the *acrAB* efflux pump genes. *Diagnos Microbiola Infect Dis.* **60**: 105–107.

Jonas, D., K. Biehler, D. Hartung, B. Spitzmüller, and F. D. Daschner. 2005. Plasmid-mediated quinolone resistance in isolates obtained in German intensive care units. *Antimicrob Chemother.* **49**(2) : 773–775.

\mathcal{K}

Kehrenberg , C., S. Friederichs, A. Jong, G. Brenner Michael, and S. Shwarz. 2006. Identification of the plasmid born-quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar *Infantis*. *Int J Antimicrob Chemother.* **58** : 18-22.

Kim , S. Y., Y-J. Park, J. K. Yu. Y. S. Kim, and K. H. 2009. Prevalence and characteristics of *aac(6')-Ib-cr* in AmpC- producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicenter study from Korea. *Diagnos Microbiol Infect Dis.* **63**: 114-118.

Kim. H. B., C. H. Park, C. J. Kim, E-C. Kim, G. A. Jacoby. 2009. Prevalence of plasmid mediated quinolone resistance determinant over 9 year-period. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(2) : 639-645.

King, D. E., R. Malone, et S. H. Lilley. 2000. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am Fam Physician.* **61** : 2741-8.

Kiralj. Rudolf., and M. M.C. Ferreira. 2005. Molecular graphics approach to bacterial AcrB protein- β -lactam antibiotic molecular recognition in drug efflux mechanism. *J Mol Graph Mod.* **25** (1) :126-145.

Kumar, A., and H. P. Schweizer. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev.* **57**:1486-513.

\mathcal{L}

Larabi. K., A. Masmoudi, and C. Fendi. 2003. Etude bactériologique et phenotypes de résistance des germs responsables d'infection urinaires dans un CHU de Tunis: à propos de 1930. *Med Mal infect.* **33** : 348-352.

Larouche. G. 2001. Les quinolones des années soixante à aujourd'hui. *Pharmactuel.* **34**(2) : 40-46.

Lascols, C., J. Robert, V. Cattoir, C. Bébéar, J-D Cavallo, I. Podglajen , M-C. Ploy, R. Bonnet , C-J. Soussy and E. Cambau. 2007. Type II topoisomerase mutations in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and other enterobacterial species harbouring the *qnrA* gene. *Int J Antimicrob Chemother.* **29**: 402–409.

Lavigne, J-P., H. Marchandin, J. Delmas, N. Bouziges, E. Lecaillon, L. Cavalie, H. Jean-Pierre, R. Bonnet and A. Sotto. 2006. *qnrA* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from France. *Antimicrob Agents Chemother.* **50** (12) : 4224–4228.

Lavilla, S., J. J. González-Lopez, M. Sabaté, A. Garcia-Fernández, M. N. Larrosa, R. M. Bartolomé, A. Carattoli and G. Prats. 2008. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *Int J Antimicrob Chemother.* **61**: 291–295.

Lecaillon. E, R. Blosser-Middleton , D. Sahn , M. Jones . 2004. Activity of nalidixic acid and fluoroquinolones on *Escherichia coli* strains isolated from non-complicated urinary infections (reseau TSN - France, 1999 - 2001). *Med Mal Infect.***34**(10):450-4.

Le Minor. L et Veron. M. 1989. Bactériologie médicale. Paris. Flammarion.

Le Minor, C., and C. Richard. 1993. Méthode de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur, France.

Lemort ML, Neuville S, Medus M, Gueudet P, Saada M, Aumaître H, Lecaillon E. 2006. Évolution comparée de la sensibilité de souches de *Escherichia coli* isolées d'infections urinaires de patients consultant aux urgences et de patients hospitalisés en 2002 et 2004 à l'hôpital de Perpignan. *Pathol Biol.* **54** (8-9): 427-430.

Li, X-Z. 2005. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *Antimicrobial Agents.* **25** : 453–463.

Liassine N., P. Zulueta-Rodriguez, C. Corbel, C. Lascols, C.J. Soussy and E. Cambau. 2008. First detection of the plasmid-mediated quinolone resistance in extended-spectrum β -lactamases producing *Enterobacteriaceae* isolated from in-and out-patients in Switzerland. *Int J Antimicrob Chemother.* **62**(5):1151-1152.

Lobel. B., A. Valot, V. Cattoir, O. Lemenand et O. Gaillot. 2008. Comparaison de la sensibilité aux antibiotiques de 1217 isolats consécutifs de *Escherichia coli* responsables d'infections urinaires féminines en ville et à l'hôpital. *Press Med.* **37** : 746-750.

M

Mahamat. A., J. P. Daurès, and A. Sotto. 2005. Evaluation de la relation consommation de fluoroquinolones et émergence de résistance chez *Escherichia coli*: rôles respectif et comparatif des études observationnelles et quasi expérimentales. *Médecine Mal Infect.* **35** : 543-548.

Mallèa, M., J. Chevalier, A. Eyraud, and J. M. Pages. 2002. Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. *Biochem Biophys Res Commun.* **293**:1370-3.

Mammeri, H., M. Van De Lee, L. Poirel, L. Martinez-Martinez, and P. Nordmann. 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* **49** (1): 71-76.

Martinez-Martinez. L., A. Pascal, and G. A. Jacoby. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* **351** : 797-99.

Maxwell et al . 1992. Cités par **Soussy, C.J.** 2006. Quinolones et bactérie à Gram négatif In : Courvalin. P, Leclerc. R et Bingen. E (eds), ANTIBIOGRAMME, 2ème ed ESKA, Paris; p264.

Muratani, T., and T. Matsumoto. 2006. Urinary tract infection by fluoroquinolone and cephem resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents*. **28S**: S10-S13.

N

Nathanson. S., et G. Deschênes . 2002. Antibioprophylaxie urinaire. *Arch Pediatr*. **9(5)**:511-8.

Nazic, H., L. Poireland P. Nordmann. 2005. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. **49(5)** : 2146-2147.

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

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

Nordmann, P., et H. Mammeri. 2007. Résistance plasmidique aux quinolones. *ANTIBIOTIQUE*. **9** : 246-53.

O

Olliver. A., M. Vallé, E. Chaslus-Dancla and A. Cloeckaer. 2004. Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of *in vitro*-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett.*; **238(1)**:267-72.

P

Paaw. A., A. C. Fluit, J. Verhoef . 2006. *Enterobacter cloacae* outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital. *Emerg Infect Dis*. **12**: 807-12.

Pagès, J. M. 2004. Porines bactérienne et sensibilité aux antibiotiques. *M.S*. **20** (3) : 346-351.

Pai, H., M-R. Seo, and T. Y. Choi. 2007. Association of QnrB determinants and production of extended-spectrum β -lactamases or plasmid-mediated AmpC β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. **51(1)** :

Park, C. H., A. Robicsek, G. A. Jacoby, D. Sahm, and D. C. Hooper. 2006. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. **50(11)** : 3953–3955.

Park, Y-J., J. K. Yu, S. Lee, E-J. Oh and G-J. Woo. 2007. Prevalence and diversity of qnr alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter*

freundii and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* **60**: 868–871.

Pascual, A. L. Poirel and M. Wang. 2008. *qnr* gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* **52** (7): 2297-2299.

Paterson D. L. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control.* ;**34**(1):S20-8.

Pereira, A. S., S. S. Andrade, J. Monteiro, H. S. Sader, A. C.C. Pignatari, A. C. Gales. 2007. Evaluation of the Susceptibility profiles, genetic similarity and presence of *qnr* gene in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals. *Brazilian J Infect Dis.* **11**(1):1413-8670.

Perichon. B., P. Courvalin, M. Galimard. 2007. Transferable resistance to aminoglycoside by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(7): 2564-69.

Piddock. L.J.V. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pump in bacteria. *Clin Microb Review.* **19**(2): 382-402.

Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. 2005. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother.* **56**(1):52-9.

Pitout, J.D. D., Y. Wei1, D. L. Church and D. B. Gregson. 2008. Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* within the Calgary health region, Canada: the emergence of aac(60)-Ib-cr. *Antimicrob Chemother.* **61**: 999–1002.

Plésiat. P. 2006. Biochimie de la résistance. In : Courvalin. P, Leclerc. R et Bingen. E (eds), ANTIBIOGRAMME, 2ème ed ESKA, Paris; p 17.

Poirel, L., M. Van De Loo, H. Mammeri, and P. Nordmann. 2005. Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum β -Lactamase VEB-1. *Antimicrob Agents Chemother* **49** (7) : 3091–3094.

Poirel, L., J-M. Rodriguez-Martinez, H. Mammeri, A. Liard, and P. Nordmann. 2005. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother.* **49** (8): 3523–3525.

Poirel, L., C. Leviandier, and P. Nordmann. 2006. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and Qnr S in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**(12): 3992-3997.

Poirel, L., J. D. D. Pitout, L. Calvo, J-M. Rodriguez-Martinez, D. Church and P. Nordmann. 2006. In vivo selection of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **50** (4): 1525-1527.

Poirel, L., T. Vu Nguyen, A. Weintraub, C. Leviandier and P. Nordmann. 2006. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS* in *Enterobacter cloacae*. *Clin Microbiol.* **12**: 1021–1023.

Poirel, L., V. Cattoir, A. Soares, C-J. Soussy and P. Nordmann. 2007. Novel Ambler class A β -Lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrS1. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(2): 631–637.

R

Ramdani-Bouguesa, N., N. Mendoca, J. Leitao, E. Ferreira, M. Tazir, and M. Caniça. 2006. CTX-M-3 and CTX-M-15 extended spectrum β -lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *J Clin Microbiol.* **44** (12): 4584-4586.

Robiscsek, A., G. A. Jacoby and D. C. Hooper. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Infect. Diseases.* **6**: 629-640.

Robiscsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby. 2006. Fluoroquinolone modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* **12**: 83-8.

Robicsek, A., J. Strahilevitz, D. F. Sahm, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper. 2006. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob Agent Chemother.* **50**(8): 2872-2874.

Rodríguez-Martínez, J. M., A. Pascual, I. García¹ and L. Martínez-Martínez. 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type β -lactamase. *Antimicrob Chemother* **52**: 703–706.

Rodríguez-Martínez, J.M., C. Velasco , I. Garcia , M.E. Cano, L. Martinez-Martinez , A. Pascual. 2007. Characterisation of integrons containing the plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrA1* in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents* **29**: 705–709.

Ruiz, J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Antimicrob Chemother.* **51**: 1109-1117.

S

Saito, R., W. Kumita, K. Sato, T. Chida, N. Okamura, K. Moriya and K. Koike. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance associated with *qnrA* in an *Escherichia coli* clinical isolate producing CTX-M-9 β -lactamase in Japan. 2007. *Antimicrob Agents.* **29**: 597-611.

Satoshi. M. 2008. Multidrug efflux transporter, AcrB –the pumping mechanism. *Current Opin in structur Biol.* **18**: 459-465.

Schaumann. R et A. C. Rodlof. 2007. Activities of quinolones against obligately anaerobic bacteria. *Anti-infect Agents in Med Chimis* **6**: 49-56.

Sekhsoh. Y., M. Chadli, S.A. El Hamzaoui. 2008. Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. *Méd mal infect.* **38** :324–327.

Shen et coll . 1989. Cités par **Soussy, C.J.** 2006. Quinolones et bactérie à Gram négatif In : Courvalin. P, Leclerc. R et Bingen. E (eds), ANTIBIOGRAMME, 2ème ed ESKA, Paris; p264.

Shen, P., Y. Jiang , Z. Zhou , J. Zhang , Y. Yu , L. Li . 2008. Complete nucleotide sequence of pkP96 a 67 850pb multiresistance plasmid encoding *qnrA1*, *aac(6')-Ib-cr* and *bla_{CTX-M-24}* from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* **62**(6): 1252-6.

Sorlozano, A., J. Gutierrez, A. Jimenez, J. D. Luna and J. L. Martinez. 2007. Contribution of a new mutation in *parE* to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *J of Microb.* **45** (8): 2740-2742.

Soussy, C.J. 2006. Quinolones et bactérie à Gram négatif In : Courvalin. P, Leclerc. R et Bingen. E (eds), ANTIBIOGRAMME, 2ème ed ESKA, Paris; p263-275.

Soussy, C.J. 2007. Résistance bactérienne aux antibiotiques. In : B. Lobel et C-J Soussy. Les infections urinaires. Ed Springer Paris. p21.

Strahilevitz, J., D. Engelstein, A. Adler, V. Temper, A. E. Moses, C. Block, and A. Robicsek. 2007. Changes in *qnr* prevalence and fluoroquinolone resistance in clinical systems: self-imposed selection pressure. *Antimicrob Chemother.* **57**, 1026–1029.

T

Talukder, K. A., B. K. Khajanchi, M. A. Islam, D. K. Dutta, M. Rahman, H. Watanabe, G. B. Nair and D. A. Sack. 2006. Fluoroquinolone resistance linked to both *gyrA* and *parC* mutations in the quinolone resistance-determining region of *Shigella dysenteriae* type1. *Current Microbiol.* **52**: 108-111.

Teo, J. W. P., K. Y. Ng and R. T. P. Lina. 2009. Detection and genetic characterisation of *qnrB* in hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. *Antimicrobial Agents.* **33**: 177–180. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**(8): 2872–2874.

Torpdahl, M., A. M. Hammerum, C. Zachariasen and E. M. Nielsen. 2009. Detection of *qnr* genes in *Salmonella* isolated from humans in Denmark. *J Antimicrob Chemother.* **63**(2):406-408.

Touati. A. 2006. Caractérisation des phénotypes de résistance des entérobactéries aux β -lactamines isolées en milieu hospitalier ; cas de deux hôpitaux de la wilaya de Béjaïa. (Thèse de doctorat). Université A. Mira.

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

Tran, J. H., and G. A. Jacoby. 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Pnas.* **99**(8): 5638–5642.

Tran, J. H., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper. 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**(1) : 118–125.

Trystam, D., K. Grenet, E. Cambau, Y. Péan, M. H. Fiévet, V. Jarlier et J. Robert. 2002. Evolution de la sensibilité aux quinolones et aux fluoroquinolones des bacilles à Gram négatif aérobies isolés dans un hopital universitaire (1992-200). *Pathol Biol.* **50** : 30-37.

V

Veldman, K., W. v. Pelt and D. Mevius. 2007. First report of *qnr* genes in *Salmonella* in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* **61**(2):452-3.

W

Walther-Rasmussen, J., and N. Høiby. 2004. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases. *Can J Microbiol.* **50**:137-65.

Wang, M., D. F. Sahn, G. A. Jacoby, Y. Zhang, and D. C. Hooper. 2004. Activities of newer quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr*. *Antimicrob Agents Chemother.* **48** (4) : 1400–1401. **34** (5) : S20-S28.

Wang, M., Q. Guo, X. Xu, X. Wang, X. Ye, S. Wu, D. C. Hooper, and M. Wang. 2009. New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, *qnrC*, Found in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* Abstract.

Wiegand, I., N. Khalaf, N. H. M. Al-Agamy, B. Wiedermann. 2004. First detection of the transferable quinolone resistance in clinical *Providencia stuartii* strains in Egypt. *Clin Microbiol Infect.* **10** (3): 64.

Wu, Jiunn-Jong., W-C. Ko, S-H. Tsai, and J-J. Yan. 2007. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a taiwanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(4) : 1223–1227.

Y

Yamane, K., J. Wachino, S. Suzuki, K. Kimura, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, T. Konda and Y. Arakawa. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* **51** (9): 3354-3360.

Yoshida, H., Bogaki. M, Nakamura. M, Yamanaka. L. M and Nakamura. S. 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **35** (8): 1647-1650.

Z

Zhanel, G. G., T. L. Hisanaga, N. M. Laing, M. R. DeCorby, K. A. Nichol, B. Wesnoweski, J. Johnson, A. Noreddin, D. E. Low, J. A. Karlowsky, for the NAUTICA Group, D. J. Hoban. 2006. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: final result from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *Antimicrob Agents*. **27**: 468-475.

Annexes

ANNEXE I

Questionnaire

Code :		Code labo :						
Date:		Age :			Sexe : M/F			
Hospitalisation dans les 3 mois précédent : Oui / Non								
Antibiothérapie : Oui / Non								
Antibiotique administré :				Date de début :				
Prélèvement :								
Souche identifiée :								
Antibiogramme réalisé au laboratoire d'analyse								
Antibiogramme complémentaire								
Présence ou absence d'image de synergie								
.....								
.....								
.....								
.....								

ANNEXE II

Analyses statistiques des données

- Age:

Tableau N°I : Taux de résistance à l'acide nalidixique par catégorie d'âge

Catégorie d'âge	Nombre de souches isolées	Fréquence de résistants observée	Fréquence de résistants théoriques	% R
1j – 2 ans	38	8	5.2	21
> 2ans – 18 ans	47	7	6.43	15
> 18ans – 35ans	99	9	13.54	9
> 35 ans – 65 ans	84	8	11.5	9.5
> 65 ans	39	10	5.33	25.64
Total	307	42		

- ❖ Sous H_0 la distribution par âge de population résistante à l'acide nalidixique est identique à celle de la population globale.

➤ **Calcul du χ^2 :**

$$\chi^2_{\text{obs}} = \sum \frac{(R_{\text{obs}} - R_{\text{th}})^2}{R_{\text{th}}}$$

$$\chi^2_{\text{obs}} = \frac{(8-5.2)^2}{5.2} + \frac{(7-6.43)^2}{6.43} + \frac{(9-13.54)^2}{13.54} + \frac{(8-11.5)^2}{11.5} + \frac{(10-5.33)^2}{5.33}$$

$$\chi^2_{\text{obs}} = 12.52$$

Pour ddl = 5-1 = 4, la valeur lue dans la table de $\chi^2_{5\%}$ est de 9.49.

$\chi^2_{\text{obs}} > \chi^2_{\text{th}}$. Donc, H_0 est rejetée.

- ❖ L'analyse statistique des données concernant l'âge des patients révèle des différences significatives avec un taux de résistance aux quinolones plus élevée chez les personnes âgées de plus de 65 ans (25.64 %). L'âge est donc un facteur de risque dans l'acquisition de la résistance aux quinolones.

- **Sexe**

Tableau N°II : Taux de résistance à l'acide nalidixique selon le sexe des patients

Sexe	Résistants	Sensibles	Total	% résistant
Femme	32	268	300	10.66
Homme	33	108	141	23.4
Total	65	376	441	

❖ Sous H_0 la distribution par sexe de population résistante à l'acide nalidixique est identique à celle de la population globale.

➤ **Calcul du χ^2 :**

$$\chi^2 = \frac{441(32 \times 108 - 268 \times 33)^2}{65 \times 376 \times 300 \times 141}$$

$$\chi^2 = 12.38$$

Pour ddl= 1, la valeur lue dans la table de $\chi^2_{5\%}$ est de 3.84.

$\chi^2_{\text{obs}} > \chi^2_{\text{th}}$. Donc, H_0 est rejetée.

❖ Les résultats du test statistique concernant le sexe des patients montrent des différences significatives avec un taux de résistance plus élevé chez la gent masculine (23.4%). Le sexe est donc un facteur de risque dans l'acquisition de la résistance aux quinolones.

ANNEXE III

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

Gélose Hektoen

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	

Gélose BCP

Peptone	5	g
Extrait de viande	3	g
Lactose	10	g
Pourpre de bromocrésol	0,025	g
Agar	15	g
	pH 7	

Gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf	300	g
Hydrolysate de caséine	17,5	g
Amidon	1,5	g
Agar	17	g
pH 7.4		

Gélose mannitol-mobilité

Peptone tryptique de viande	20	g
Mannitol	2	g
KNO ₃	1	g
Rouge de phénol à 1 %	0.04	g
Agar	4	g
pH 7.6		

Gélose Mac Conkay

Peptone de caséine	17	g
Peptone de viande	3	g
Lactose	10	g
Mélange de sels biliaires	1.5	g
Rouge neutre	0.03	g
Chlorure de sodium	05	g
Cristal violet	0.001	g
Agar	10	g
pH 7,4		

Milieu de Hajna-Kligler (KIA)

Extrait de viande de bœuf	3	g
Extrait de levure	3	g
Peptone (riche en lysine)	20	g

NaCl	5	g
Citrate ferrique	0.3	g
Thiosulfate de sodium	0.3	g
Lactose	10	g
Glucose	1	g
Rouge de phénol (solution à 1%)	5	ml
Agar	12	g

pH 7.4

Milieu Uriselect4

- Base nutritive contenant 4 peptones
- 2 substrats chromogènes : β -galactosidase et β -glucosidase
- Tryptophane

Bouillon Trypticase soja

Peptone trypsique 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

ANNEXE IV

Tableau N°III : Diamètres (mm) des zones édités par le CA-SFM, 2007

Antibiotiques	Abréviation	S	R
Céfotaxime	CTX	≥ 21	< 15
Ceftazidime	CAZ	≥ 21	< 15
Céfépime	FEP	≥ 21	< 15
Cefpirome	CFP	≥ 21	< 15
Céfoxitine	FOX	≥ 22	< 15
Imipénème	IMP	≥ 22	< 17
Pipéracilline	PIP	≥ 20	< 12
Amoxicilline-clavulanate	AMC	≥ 21	< 14
Tétracycline	TE	≥ 19	< 17
Colistine	CT	≥ 15	< 15
Acide nalidixique	NA	≥ 20	< 15
Ciprofloxacine	CIP	≥ 25	< 22
Norfloxacine	NOR	≥ 25	< 22
Ofloxacine	OFX	≥ 25	< 22
Triméthoprim-sulfaméthoxazole	SXT	≥ 16	< 10
Rifampicine	RA	≥ 19	< 14

ANNEXE V

PCR du gène *qnr*

(Mullis *et al.*, 1985 modifié par Touati *et al.*, 2008)

1. Extraction de l'ADN total

La technique employée a été le choc thermique. Quelques colonies fraîchement cultivées sur milieu solide ont été suspendues dans 300 µl d'eau distillée. On chauffe à 100°C/10 min au bain-marie sec. Après centrifugation à 13000 g pendant 5 minutes, on récupère le surnageant qu'on conserve à -20°C.

2. PCR

a. Préparation du mélange réactionnel

Le tableau N°IX donne le mélange réactionnel pour la PCR *qnrA* et *qnrS* qui est réalisée en multiplexe et celui pour la PCR *qnrB*.

Tableau N°IV : Préparation du mélange réactionnel pour la PCR du gène *qnr*

	Concentration initiale		Volume pour 1 tube		Concentration finale	
	<i>qnrA</i> et <i>qnrS</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrA</i> et <i>qnrS</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrA</i> et <i>qnrS</i>	<i>qnrB</i>
Tampon	10X	10X	5	5	1X	5X
dNTPs	25 mM	25 mM	0.5	0.5	0.25 mM	0.5 mM
MgCl ₂	25 mM	25 mM	2	0.5	2.5 mM	0.5 mM
<i>qnr</i> -F	2 µM	25 µM	1	2	0.5 µM	2 µM
<i>qnr</i> -R	25 µM	25 µM	1	2	0.5 µM	2 µM
<i>Taq</i> polymerase	2 U/µl	5 U/µl	0.5	0.5	2.5 U	0.5 U
H ₂ O	-	-	35	34.5	-	34.5
ADN	-	-	5	5	-	5
Volume final			50	50	-	50

b. Amorces utilisées

Des amorces spécifiques pour les trois gènes *qnr* ont été utilisées pour détecter ces gènes (tableau N°X).

Tableau N° V : Amorces utilisées pour la PCR *qnr*

<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> -F	5'-GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG-3'
	<i>qnrA</i> -R	5'-ATCCAGATCGGCAAAGGTTA-3'
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i> -F	5'- GGAAACCTACAATCATACATA -3
	<i>qnrS</i> -R	5'- GTCAGGATAAACAACAATACC-3'
<i>qnrB</i>	<i>qnrB</i> -F	5'-GACAGAAACAGGTTCCACCGGT-3
	<i>qnrB</i> -R	5'- CAAGACGTTCCAGGAGCAACG-3

c. Amplification

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur avec cette programmation.

Tableau N° VI : Programmation de la PCR

		T°	Temps
Dénaturation initiale		95°C	30mn
30 cycles	dénaturation	94°C	0.30 mn
	hybridation	55°C	0.30 mn
	élongation	72°C	0.30 mn
Dénaturation finale		72°C	5mn

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %.

3. Electrophorèse en gel d'agarose

- **Matériel**

- Une cuve pour gel immergé + Support de gel + Peigne (VWR international).
- Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 10X (EurobioFrance).
- Solution de bromure d'éthidium (Sigma Aldrich).
- Solution de dépôt : bleu de bromophénol (EurobioFrance).
- Agarose (Invitrogen).
- Four à micro-onde.
- Marqueur de poids moléculaire (fragment de 100 pb et 1Kb) (EurobioFrance).
- Chambre de visualisation Bio-Profil (Vilbert Lourmat).

- **Protocole**

La technique présentée ici est celle des gels immergés : le gel, horizontal, est immergé dans le tampon d'électrophorèse. Ceci permet d'avoir un contact gel-tampon toujours correct.

Le tampon utilisé est le Tris-Borate-EDTA (TBE). L'avantage de ce tampon par rapport au tampon acétate par exemple, est qu'il n'est pas électrolysé et donc réutilisable à plusieurs reprises. De plus il permet d'obtenir d'assez grandes différences de potentiel pour un ampérage qui reste faible (25 mA à 150 V) ce qui évite un échauffement nuisible à la qualité de l'électrophorèse.

- **Préparation des gels**

- On pèse respectivement 2.4 g d'agarose dans 1 bécher de 250 ml. On ajoute 12 ml de tampon TBE 10X (10 fois concentré) et on complète avec 108 ml d'eau distillée.
- On fait fondre le mélange au four à micro-ondes en arrêtant le four de temps en temps pour agiter. Le mélange doit être parfaitement transparent. On laisse refroidir.
- On ajoute 6 µl de solution de bromure d'éthidium et on homogénéise
- On coule le gel dans le support du gel sans faire de bulles et on place les peignes. On laisse refroidir.

- **Electrophorèse des produits d'amplification**

- Lorsque le gel est polymérisé (environ 20 min), on retire délicatement les peignes et les adhésifs.
- On met le gel dans la cuve d'électrophorèse avec le support.

- On remplit la cuve avec le tampon TBE 1X de façon à ce que le gel soit immergé sous environ 1 mm de tampon.
- 10 μ l de produits d'amplification sont mélangés avec 3 μ l de « solution de dépôt » qui contient du bromophénol.
- On dépose à l'aide d'une micropipette 10 μ l de ce mélange.
- Un puit recevra le produit de l'amplification du témoin positif, un autre celui du témoin négatif et un autre le marqueur de poids moléculaire.
- On branche le générateur et on applique une ddp de 150 V. La durée de migration est d'environ 30 min.

- **Visualisation**

Lorsque la migration est suffisante (environ 30 min), on arrête le générateur, on ôte le support contenant le gel de la cuve et on le place dans une chambre de visualisation. Les bandes d'ADN sont fluorescentes grâce au bromure d'éthidium et une photo du gel est prise.

ANNEXE VI

PCR du gène *bla* CTX-M

(Mullis et al., 1985 modifié par Touati et al., 2008)

1. Préparation du mélange réactionnel pour PCR CTX-M

Le mélange réactionnel contient :

- 762.5 µl d'eau distillée
- 75 µl de tampon
- 7.5 µl de dNTP
- 30 µl de l'amorce CTX-M-A (5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3')
- 30 µl de l'amorce CTX-M-B (5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3')
- Agiter au vortex
- Ajouter 0.5 µl de *taq* polymérase
- Répartir 22.5 µl du mixe dans des tubes pour PCR
- Ajouter 2.5 µl d'extrait d'ADN.
- Un témoin positif (2.5 µl d'extrait d'ADN de CTX-M-15) et un témoin négatif (2.5 µl d'eau ayant servie pour la manipulation) ont été également réalisés.

2. PCR

- L'amplification a été réalisée avec cette programmation :
- Dénaturation 94°C pour 3 min
- 30 cycles :
 - Dénaturation 94°C pour 30s,
 - Appariement 51°C pour 30s
 - Elongation 72°C pour 30s,
- Elongation finale de 72°C pour 5 min.

Les produits d'amplification sont récupérés et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %. (le marqueur de poids moléculaire pour la PCR CTX-M étant de 100 pb).

ANNEXE VII

Fiche antibiothérapie (médecin)

Médecin (spécialité) :

Maladies les plus traitées (énumérez selon l'ordre d'importance) :

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Antibiotiques les plus prescrits (énumérez selon l'ordre d'importance) :

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Antibiogramme : Oui / Non

Autres commentaires :

.....
.....
.....

ANNEXE VIII

Fiche destinée aux pharmaciens

DCI	Dénomination commerciale (fr)	Famille	Vente*	Quantité vendue 2006*
Amikacine	Amiklin	Aminosides		
Gentamycine	Gentalline	Aminosides		
Kanamycine	Kamycine	Aminosides		
Nétilmicine	Nétromicine	Aminosides		
Tobramycine	Nebcine, tobrex	Aminosides		
Amoxicilline	Clamoxyl et autre	Pénicillines		
Amoxicilline + clavulanate	Augmentin	Pénicillines		
Ampicilline	Totapen	Pénicillines		
Aztréonam	Azactam	Pénicillines		
Mezlocilline	Baypen	Pénicillines		
Pipéracilline	pipérilline	Pénicillines		
Pipéracilline + tazobactam	Tazocilline	Pénicillines		
Ticarcilline	Ticarpen	Pénicillines		
Ticarcilline + clavulanate	Claventin	Pénicillines		
Céfalocone	Céfalocone, keflin	C1G		
Céfazoline	Céfacidal	C1G		
Céfalexine	Céporexine	C1G oral		
Céfradine	Dexef, zefra	C1G oral		
Céfoxitine	Méfoxin	C2G		

DCI	Dénomination commerciale (fr)	Famille	Vente*	Quantité vendue 2006*
Céfuroxime	Curoxime, zinnat	C2G		
Cépirome	Cefrom	C2G		
Céfépime	Axépin	C3G		
Céfotaxime	Claforan	C3G		
Céftazidime	Fortum	C3G		
Ceftriaxone	Céfiïox	C3G		
Latamoxef	Rocéphine	C3G		
Céfixime	Moxalactam	C3G oral		
Céfotiam	Oroken	C3Goral		
Ertapénème	Takétiam	Carbapénème		
Imipinème	Invanz	Carbapénème		
Acide nalidixique	Négram	Quinolones		
Acide pipémidique	Pipram	Quinolones		
Ciprofloxacine	Ciflox, uniflox	Quinolones		
Lévofloxacine	Tavanic	Quinolones		
Norfloxacine	Noroxine	Quinolones		
Ofloxacine	Oflocet	Quinolones		
Péfloxacine	Péflacine	Quinolone		
Cotrimoxazol	Bactrim	Sulfamides		

Vente*

4 : très vendu 2 : moyennement vendu 1 : rarement vendu 0 : jamais vendu

ANNEXE IX

Tableau N°VII: Aspect des colonies sur milieu sélectif et chromogène des espèces d'entérobactéries les plus fréquemment isolées.

Espèces	Aspect des colonies		
	BCP	Hecktoen	UriSelect
<i>E. coli</i>	Jaune, bombées	Rose/saumon	rose
<i>K. pneumoniae</i>	Jaune, muqueuses	Saumon, muqueuses	Bleu foncé
<i>E. cloacae</i>	Jaune	Saumon	Violette ou Bleu à reflet rose
<i>P. mirabilis</i>	Incolores, envahissantes	Vertes à centre foncé, envahissantes	Brun orangé

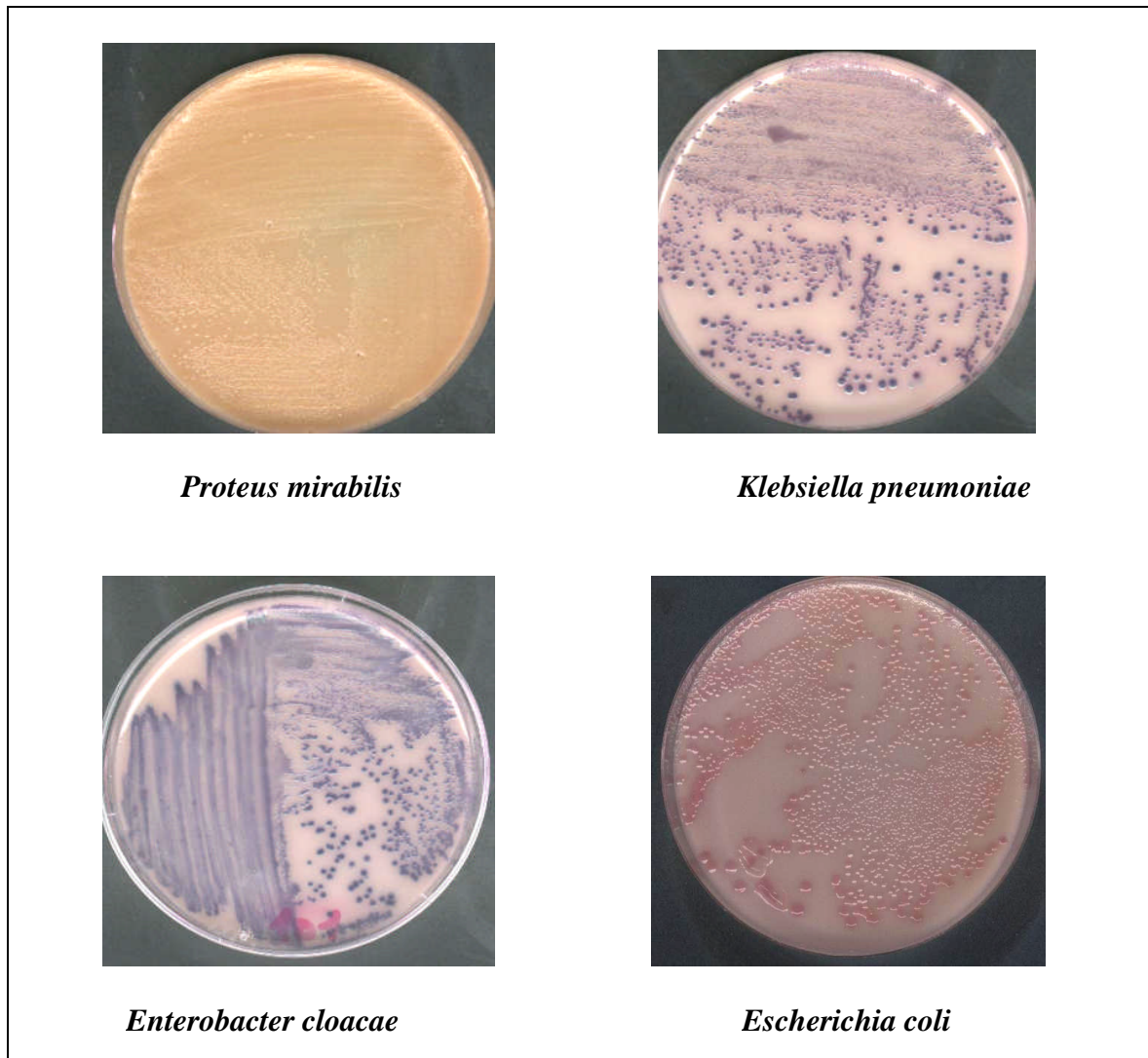


Figure 01 : Aspect des colonies de certaines espèces d'entérobactéries sur milieu Uriselect

ANNEXE X

Tableau N°VIII : Résultats de l'identification par la galerie biochimique

Souches	Nitrate réductase	Indole	Uréase	TDA	Lactose	Glucose	H ₂ S	Gaz	Citrate	RM	VP	Mannitol	Mobilité
<i>E. coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>E. nterobacter</i> <i>sp</i>	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>Klebsiella sp</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>Proteus sp</i>	+	+/-	+	+	-	+	+/-	-	+/-	-	-	-	+

Résumé

Au cours de cette étude, 441 souches d'entérobactéries ont été collectées à partir de quatre laboratoires d'analyse médicale de la région de Béjaia durant la période décembre 2007 à mai 2008. La majorité des souches soit 96.4% sont d'origine urinaire.

L'évaluation de la sensibilité des ces souches vis-à-vis de l'acide nalidixique a permis de sélectionner 65 souches résistantes à cet antibiotique (% de résistance de 14.73%). *E. cloacae* est l'espèce la plus résistante (taux de résistance de 19.23%). L'analyse statistique des données a montré que le sexe et l'âge du patient sont probablement des facteurs de risque dans la colonisation/infection par une souche résistante.

Les souches résistantes à l'acide nalidixique ont montré une résistance croisée aux fluoroquinolones avec des taux de résistance de 91% pour l'ofloxacine et de 87% pour la ciprofloxacine et la norfloxacine, ainsi qu'à d'autres familles d'antibiotiques ; tétracycline, rifampicine, amoxicilline-acide clavulanique et triméthoprime-sulfaméthoxazole avec des taux de 93%, 88.37%, 81.4% et 79% respectivement.

La présence du gène *qnrB1* a été révélé par PCR pour deux souches *E. cloacae* et une souche d'*E. coli*, parmi lesquelles deux souches sont productrices de BLSE de type CTX-M.

Mots clés : Quinolones, résistance, entérobactéries, communautaire, QnrB, CTX-M.

Abstract

In this aim, 441 strains of *Enterobacteriaceae* are collected for four laboratories of medical analysis in the region of Bejaia from December 2007 to May 2008. 96.4% of these strains are isolated from urine.

The evaluation of sensitivity of these strains to the nalidixic acid allowed the selection of 65 strains resistant to this antibiotic (14.73%). The statistical analysis of obtained data showed that the age and the sex of the patient are probably risk factors for colonization an infection by the resistant strains.

The nalidixic acid strains resistant presented a cross-resistance toward the fluoroquinolons with a level of 91% to ofloxacin and 87% to norfloxacin and to ciprofloxacin, also toward other antibiotic families: tetracycline, rifampicin, amoxicillin-clavulanic acid and trimethoprim-sulphamethoxazole at 93.88%, 81.4% and 79%, respectively.

The gene *qnrB1* was revealed, using a PCR method in two strains of *E. cloacae* and one strain of *E. coli*. Among these strains, two are CTX-M ESBL producing.

Key words: Quinolone, resistance, *Enterobacteriaceae*, community, QnrB, CTX-M.