

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université : Hassiba Benbou Ali de Chlef

Faculté : Science de la nature et la vie

Département : Biologie



THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT LMD

Filière : Biologie

Spécialité : Génomique microbienne

Présentée par

BOUDJEMAA HADJER

Thème :

Prévalence et caractérisation moléculaire de la résistance aux antibiotiques chez *Proteus mirabilis*

Soutenu(e)/...../....., devant le jury composé de :

Allem Rachida	Professeur	Université de Chlef	Directeur de thèse
Mezaini Abdelkader	Professeur	Université de Chlef	Président
Aoues Abdelkader	Professeur	Université d'Oran	Examinateur
Sahraoui Tewfik	Professeur	Université d'Oran	Examinateur
Abbouni Bouziane	Professeur	Université de Sidi bel Abbas	Examinateur
Setti Benali	Professeur	Université Chlef	Examinateur

2019-2020

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **Allah**, le tout Puissant, qui m'a aidé à dépasser toutes les difficultés et qui m'a donné la force, la volonté de finir ce modeste travail.

J'adresse de chaleureux remerciements les plus sincères à ma directrice de thèse **Professeur Allem Rachida**, pour le très grand honneur de diriger cette thèse tout en me laissant une grande liberté. Je la remercie pour ses encouragements, son aide et ses précieux conseils, sa gentillesse, sa qualité professionnelle, elle est pour moi un exemple à suivre.

Merci également au président du jury, **Monsieur MEZAINI Abdelkader** Professeur à l'Université de Chlef, pour l'honneur qu'il nous fait de juger ce travail et de présider ce jury et pour son implication dans le projet, j'ai apprécié son enthousiasme et sa sympathie.

Je désire grandement remercier **Monsieur SETTI Benali** Professeur à l'Université de Chlef, pour avoir accepté d'examiner mon travail ,

Je souhaite notamment remercier **Monsieur AOUES Abdelkader** Professeur à l'Université d'Oran, qui a consacré du temps à juger ce modeste travail.

Je désire en outre remercier **Monsieur SAHRAOUI Tewfik**, pour m'avoir fait l'honneur et le temps précieux d'accepter avec gentillesse de participer au Jury de soutenance.

Je remercie chaleureusement **Monsieur ABBOUNI Bouziane** Professeur à l'université de Sidi Bel Abbas, d'avoir accepté d'être l'examineur de cette thèse.

Mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance à **Monsieur ROLAIN Jean Marc**, Professeur et chef de service du laboratoire de l'Institut hospitalo-universitaire (IHU) Méditerranée infection, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à son bon déroulement. Je le remercie d'avoir dirigé ce travail en me faisant bénéficier de son aide.

Un grand merci à **Monsieur Maxime Descartes Mbogning Fonkou** PhD à l'Institut hospitalo-universitaire (IHU) Méditerranée infection pour sa disponibilité, ses conseils, sa patience, son soutien et sa gentillesse avec beaucoup d'enthousiasme en me faisant bénéficier de ses précieux conseils, de son sens critique.

Je désire en outre remercier tous mes chères collègues ainsi que l'ensemble des ingénieurs de laboratoire du Département de Biologie et de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Hassiba Benbouali de Chlef.

Je remercie aussi l'ensemble des **Techniciens et membres du Laboratoire**, d'EPH de Chettia et laboratoire d'hygiène et sécurité à Ténès, qui ont participé de près ou de loin à l'avancement de ce travail.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner: **Souad Zouagui, Nour Chems el Houda Khennouchi, Mohamed Kerkoud** pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir guidé, encouragé, et conseillé.

Dédicace

*Je dédie cette thèse à mes **très chers parents**, pour les prières, soutiens, encouragements et précieux conseils en hommage à tous leurs grands sacrifices que vous m'avez donnés, durant mes longues années d'études. Toute ma reconnaissance, mon affection, mon respect et surtout pour m'avoir soutenue depuis le premier jour, dans les instants difficiles comme dans les moments de joie.*

*Mon merveilleux **époux** pour son soutien moral, ses encouragements, sa collaboration dans ce travail et son assistance morale qui m'a permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions, Je te souhaite une belle vie. Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.

*A mes chers frères **Abd El Ali, Fethi, Yacine, Ahmed**, et à la famille **Boudjemaa**. Veuillez trouver dans ce travail un modeste témoignage de toute ma gratitude, et de mon attachement le plus profond.*

À tous mes professeurs: Leur générosité et leur soutien m'obligent de leur témoigner mon profond respect et ma loyale considération.

À tous mes chères amis et collègues avec qui j'ai partagé de très bons moments.

Résumé

L'infection à *Proteus mirabilis* est fréquente en milieu hospitalier et communautaire. La propagation de la résistance aux antibiotiques chez cette bactérie et l'émergence des souches multirésistantes est un sujet de préoccupation pour de nombreux pays dans le monde. Le but de cette étude consiste à mettre en évidence l'état actuel de la résistance aux antibiotiques et les conducteurs moléculaires de la résistance des souches de *P.mirabilis* afin de prendre des mesures prophylactiques et thérapeutiques.

Cette étude évalue une collection de 237 échantillons de *Proteus Sp.* sur une période allant du mois de décembre 2015 au mois de janvier 2017 au niveau du laboratoire du Centre Hospitalo-Universitaire d'Oran et des laboratoires privés de Chlef, Aïn Defla, et Khemis Miliana de Nord-Ouest d'Algérie. En premier lieu, L'identification de tous les isolats a été réalisée par le système Api20E et confirmée par la spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS). Ensuite, les gènes codant pour les β -lactamases (BLSEs) et les carbapénémases chez *P.mirabilis* ont été caractérisés par la PCR standard et le séquençage. L'étude de la relation clonale entre ces souches a été déterminée par les techniques de typage moléculaire et de protéomique (ERIC-PCR et spectrométrie de masse MALDI-TOF).

L'étude de la résistance aux 17 antibiotiques, dont 12 β -lactamines, 2 aminosides, 1 quinolone, le triméthoprime/sulfaméthoxazole et la colistine, a montré des taux de résistance élevés pour la plupart des antibiotiques testés.

Différents supports de résistance aux β -lactamases à spectre élargi (BLSE) ont été observés avec dominance du gène codant *bla*_{CTX-M-2} et *bla*_{TEM-2} et l'émergence de nouveaux gènes *bla*_{CMY-2}. D'autres gènes de résistance aux aminosides (*aacI3*, *aac(6')-Ib*), aux quinolones (*aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB* et *qnrS*) ont été également détectés. La dispersion des gènes de résistance au niveau du milieu communautaire et hospitalier, est associée à la présence du plasmide de différents groupes d'incompatibilité (IncFIA, IncA/C et IncN). La technique d'ERIC-PCR a montré un clone prédominant avec 8 souches isolées de CHU d'Oran, appartenant à la séquence de type A, se regroupant dans le dendrogramme spectrométrie de masse MALDI-TOF.

La multi-résistance élevée des souches de *P.mirabilis* impose une rectification du traitement empirique des infections.

Mots-clés : *Proteus mirabilis*, spectrométrie de masse, MALDI-TOF, ERIC-PCR, résistance, antibiotiques.

Abstract

Proteus mirabilis is a common infection in hospital and community settings. The spread of antibiotic resistance pattern is a real threat to public health at the international level. The purpose of this study is to investigate the current state of resistance to antibiotics and molecular drivers of the resistance of *P. mirabilis* strains in order to put preventive measures to limit their spread.

This study evaluated a collection of 237 samples of *Proteus Sp.* over a period from December 2015 to January 2017 at the laboratory of the University Hospital Center of Oran and the private laboratories of Chlef, Ain Defla, and Khemis Miliana from North West Algeria. The study of resistance to 17 antibiotics, including 12 β -lactams, 2 aminoglycosides, 1 quinolone, and trimethoprim/sulfamethoxazole showed high levels of resistance for most antibiotics tested. In addition, the genes encoding ESBLs and carbapenemases in *P. mirabilis* were characterized by standard PCR and sequencing. Finally, the study of the clonal relationship between multidrug resistant strains was determined by the ERIC-PCR technique and mass spectrometry MALDI-TOF proteomic.

The different broad-spectrum β -lactamase (ESBL) supports have been found with dominance of the gene encoding *bla*_{CTX-M-2} (ESBL), *bla*_{TEM-2} and *bla*_{CMY-2}. Another genes encoding aminoglycoside resistance (*aacI3*, *aac(6')-Ib*), quinolones (*aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB* et *qnrS*) were also observed. The dispersion of resistance genes in the community and hospital is associated with the presence of plasmids incompatibility (IncFIA, IncA/C and IncN). The technique of ERIC-PCR showed a predominant clone, with 8 strains isolated from Oran CHU, belonging to the sequence of type A, grouping in the same unity on mass spectrometry MALDI-TOF dendrogram.

The detection of high resistance in *P. mirabilis* strains calls for a correction of the empirical treatment of infections.

Keywords: *Proteus mirabilis*, mass spectrometry MALDI-TOF, ERIC-PCR, antibiotic, resistance.

تعتبر انتشار الالتهابات الناتجة عن بكتيريا *Proteus mirabilis* مقاومة لمضادات الحيوية شائعة في المستشفيات ومركز صحة خارجية يشكل تهديداً حقيقياً للصحة العامة على الصعيد الوطني والدولي في جميع أنحاء العالم. تهدف هذه الدراسة إلى تسليط الضوء على الوضع الحالي لمقاومة المضادات الحيوية والدوافع من أجل وضع تدابير وقائية وعلاجية لسلاسل الجزيئية لمقاومة لمضادات الحيوية.

تمتقيم هذه الدراسة علم مجموعة من 237 عينة من *Proteus Sp* في الفترة الممتدة من ديسمبر 2015 إلى يناير 2017 في مختبر مستشفى وهران الجامعي والمختبرات الخاصة في الشلف، عين الدقلة، وخميس مليانة في الشمال غرب الجزائر. أولاً، تم تعرف على جميع سلالات بواسطة نظام *Api 20EMALDI-TOF et* وتم تعرف على الجينات *lactamase* *carbapenemases* بواسطة جهاز PCR.

أظهرت دراسة السلالات مقاومة لـ 17 مضاد الحيوية، معدلات مقاومة عالية لمعظم المضادات الحيوية التي تم اختبارها : *lactams, aminoglycoside, quinolonetrimethoprim / sulfamethoxazole, colistin,*

قد لوحظت جينات مختلفة مقاومة لمضادات الحيوية (ESBL) β -lactamase مع هيمنة الجينات لـ *bla_{CTX-M-2}* وتم اكتشاف جينات أخرى لمقاومة *aacI3*، *Ib - (6')* ، *Ib - cr* ، *aac (6')* ، *qnrA* ، *qnrB* ، *qnrS* وظهور جينات *bla_{CMY-2}*. يرتبط وجود جينات المقاومة بوجود البلازميد من مجموعات عدم التوافق المختلفة *IncA / C* ، *IncFIA* و *IncN*. وأظهرت نتائج *MALDI-TOF dendrogramme* و *ERIC-PCR*: مجموعات تضم 8 سلالات، تتجمع في مستوى واحد في A التي تنتمي إلى تسلسل نوع سلالات معزولة من وهران CHU.

تتطلب المقاومة العالية المتعددة لسلالات *P. mirabilis* تصحيحاً للمعالجة التجريبية للعدوى.

الكلمات المفتاحية: مقاومة *ERIC-PCR* ، *MALDI-TOF / MS* ، *Proteus mirabilis*.

Table des matières

Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
I. <i>Proteus mirabilis</i>	4
I.1. Généralités sur <i>Proteus mirabilis</i>	4
I.2. Taxonomie.....	5
I.3. Génome.....	6
I.3.1. Polymorphisme et la diversité génétique.....	7
I.3.2. Mécanisme de l'évolution génétique.....	8
II. La pathogénicité et les facteurs de virulence	9
II.1. Manifestations cliniques.....	9
II.2. Physiopathologie des infections urinaires.....	10
II.2.1. Mode de transmission	10
II.3. Physiopathologie de la gastro-entérite.....	11
II.3.1. Infections nosocomiales et la gastro- entérite.....	11
II.3.2. Interactions microbiennes et la maladie de Crohn.....	12
II.3.3. Association avec la maladie pancréatique et hépatobiliaire.....	12
II.3.4. Maladie du pancréas et <i>P. mirabilis</i>	13
II.3.5. Polyarthrite rhumatoïde et <i>P. mirabilis</i>	13
II.4. Les autres types d'infections	13
II.5. Épidémiologie	14

Table des matières

II.6.Facteurs de virulence	16
II.6.1.Facteurs de pathogénicité.....	16
II.6.2.Facteurs de colonisation et adhésion.....	18
II.6.3.Facteurs de persistance.....	20
II.6.4. Traitement d'une infection à <i>P.mirabilis</i>	22
II.6.4.1. Gestion de l'infection.....	22
II.6.4.2. Antibiothérapie empirique.....	22
III.Les antibiotiques	23
III.1. Généralités sur les antibiotiques.....	23
III.2. Classification des antibiotiques.....	24
III.2.1.Bêta-lactamines.....	25
III.2.2. Quinolones	26
III.2.3. Aminosides.....	28
III.2.4.Facteurs d'échec de gestion d'infection.....	30
III.3. <i>Proteus mirabilis</i> et la résistance aux antibiotiques.....	31
III.3.1. Résistance naturelle chez <i>P. mirabilis</i>	31
III.3.2. Evolution de la résistance chez <i>P.mirabilis</i> (Acquisition vertical).....	32
III.4. Mécanisme de résistance aux antibiotiques	34
III.4.1.Mécanisme de résistance enzymatique (production de bêta-lactamases).....	34
III.4.2. Mécanisme de résistance non enzymatique.....	43
IV. Matériel et méthodes	48
IV.1.Origine des souches collectées et les centres d'étude	48
IV.1.1.La durée et lieu d'étude	

Table des matières

.....	48
IV.1.2.L'objectif de cette étude.....	48
IV.1.3.Approbation éthique et étude statistique.....	49
IV.2.Etude phénotypique de <i>P.mirabilis</i>	49
IV.2.1. Prélèvements des souches <i>P.mirabilis</i>	49
IV.2.2. Transport des prélèvements.....	50
IV.2.3. Isolement des souches de <i>P.mirabilis</i>	50
IV.2.4. Identification des souches de <i>P.mirabilis</i>	50
IV.2.5. Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	53
IV.3.Etude génotypique de la résistance aux antibiotiques chez <i>P.mirabilis</i>	58
IV.3.1. Extraction d'ADN génomique de <i>P.mirabilis</i>	58
IV.3.2. Amplification de l'ADN par la PCR standard.....	59
IV.3.3.Séquençage des produits positifs de la PCR par la méthode de Sanger.....	62
IV.3.4.Étude de typage bactérien.....	65
IV.3.4.1.Typage moléculaire des groupes de l'incompatibilité plasmidique.....	65
IV.3.4.2.Typage protéomique par la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF....	66
IV.3.4.3.Typage moléculaire par la technique d'ERIC-PCR.....	67
V. Résultats et Discussion	68
V.1. Isolement des souches de <i>Proteus Spp</i>	68
V.2. Prévalence des souches de <i>P. mirabilis</i>	69
V.2.1. Identification macroscopique et biochimique.....	69

Table des matières

V.2.2. Identification par la spectrométrie de masse MALDI-TOF	71
V.2.3. Répartition des souches de <i>P.mirabilis</i> selon le laboratoire.....	72
V.2.4. Répartition des souches de <i>P.mirabilis</i> selon le sexe	75
V.2.5. Répartition des souches de <i>P.mirabilis</i> selon les prélèvements.....	77
V.3. Étude phénotypique de la résistance aux antibiotiques.....	79
V.3.1. Étude de la résistance des souches cliniques aux antibiotiques.....	79
V.3.2. Co-résistance associée chez les souches de <i>P.mirabilis</i>	83
V.3.3. Résistance aux antibiotiques et provenance des souches.....	86
V.3.4. Identification phénotypique des mécanismes de résistance.....	88
V. 4. Recherche moléculaire des gènes de résistance.....	92
V.4.1. Gènes de résistance aux β -lactamines.....	92
V.4.2. Gènes de résistance aux carbapénèmes.....	95
V.4.3. Gènes de résistance aux aminosides.....	97
V.4.4. Gènes de résistance aux quinolones.....	100
V.5. Caractérisation des groupes d'incompatibilité plasmidique.....	105
V.6. Typage et relation clonal entre les souches.....	109
V.6.1. Typage moléculaire par la technique d'ERIC-PCR	109
V.6.2. Typage protéomique par la technique de MALDI-TOF.....	112
V.6.3. Traitement et instabilité de <i>P.mirabilis</i>	116
Conclusion et perspectives.....	117

Références bibliographiques

Annexes

Table des matières

Liste des publications et des communications

Ce projet de recherche fait partie de plusieurs communications et publications :

Publications internationales:

- **Boudjemaa H.**, Allem R., Fonkou M D M, Zouagui S., el Houda Khennouchi N C., Kerkoud M. (2019). Molecular drivers of emerging multidrug resistance in *Proteus mirabilis* clinical isolates from Algeria. Journal of global antimicrobial resistance, 18, 249-256.
- **Hadjer Boudjemaa**, Rachida Allem, Adda Ababou, Setti Benali .Prevalence of antibiotic resistance profile,clonality analysis bythe spectrometry-based proteotyping analysis of *Proteus mirabilis* isolated from humans and poultry in Algeria.En cours(soumis).
- **Hadjer Boudjemaa***, Rachida Allem, Maxime Descartes Mbogning Fonkou, Zibouche Mohamed. Spreading of Multi-drug carbapenem-resistant *Proteus mirabilis* infection carrying the OXA-48 gene isolated in Algeria: A First Report in North Africa.En cours(soumis).

Communications nationalesetinternationales:

- **Hadjer Boudjemaa**, Allem Rachida.The importance of molecular biology for detection Multi-drug resistant *Proteus mirabilis* strains in Algerian medical clinics.la 2 ème journée aurasienne de biologie moléculaire,5 et 6 octobre 2019.Batna.
- **Hadjer Boudjemaa**, Allem Rachida.Evaluation of relationship between commensal multi-drug resistant *Proteus mirabilis* strains of chicken and human infection using proteotyping.Le Premier Séminaire National sur la Microbiologie et les Sciences Alimentaires "06 et 07 Novembre 2019.Jijel.
- **Hadjer Boudjemaa**, Allem Rachida.Molecular caracterisation of multidrug resistance in *Proteus mirabilis* isolates in clinical Algeria. Journée Internationale de Bioinformatique 05 Novembre 2019.Boumerdes.
- **Hadjer Boudjemaa**, Allem Rachida. The proteotyping evaluation of multidrug resistantes *Proteus mirabilis* isolates from Algerian patient.Les3^{èmes} Rencontres Aurassiennes de Microbiologie Clinique, 11 et 12 Mars 2020,Batna.
- **Hadjer Boudjemaa**, Allem Rachida. The La XXIIème Journées Nationales de Microbiologie Molecular drivers of emerging multidrug resistance in *Proteus mirabilis* clinical isolates from Algeria,14 et 15 avril, Chlef.

Liste des figures

Figure 1. Processus de l'essaimage chez <i>P. mirabilis</i>	19
Figure2. Fimbriae et flagella de <i>P. mirabilis</i>	20
Figure3. Développement des agents antimicrobiens	24
Figure 4. Structure chimique du noyau de céphamycine de la famille de β -lactamines.....	26
Figure5. Structure de l'anneau de 4-quinolone.....	27
Figure 6. Test de double synergie pour la recherche des souches productrices des bêta-lactamases à spectre élargi	56
Figure7. Phénomène de l'essaimage chez <i>P.mirabilis</i>	70
Figure8. Score d'identification de <i>P.mirabilis</i> (>2) par la technique de Maldi-TOF/MS.....	71
Figure9. Répartition des souches communautaires par rapport à le nombre des échantillons..	72
Figure10. Répartition des souches hospitalières et communautaires selon la région	73
Figure11. Distribution des souches nosocomiales de <i>P.mirabilis</i> selon les services.....	74
Figure 12. Répartition des souches de <i>P.mirabilis</i> d'origine communautaire selon le sexe ..	75
Figure13. Répartition des souches de <i>P.mirabilis</i> d'origine hospitalière selon le sexe	76
Figure 14. Répartition des souches hospitalières selon les prélèvements.....	77
Figure 15. Répartition des souches communautaires selon les prélèvements.....	78
Figure 16. Antibiorésistance des souches de <i>P.mirabilis</i> d'origine hospitalière	81
Figure 17. Antibiorésistance des souches de <i>P.mirabilis</i> communautaires	81
Figure 18. Prévalence des phénotypes de résistance aux antibiotiques	90
Figure 19. Résultat négatif (T-) ou positif (T+) du CarbaNP test chez <i>P.mirabilis</i>	91
Figure20. Profil électrophorétique des produits de la PCR des gènes <i>bla</i> _{CTX-2} -et <i>bla</i> _{SHV-1}	92

Figure 21. Profil électrophorétique des produits de la PCR des gènes <i>bla</i> _{CMY-2} - <i>et bla</i> _{TEM-1} -..	93
Figure 22. Profil électrophorétique des produits de la PCR des gènes <i>bla</i> _{AmpC1} <i>et bla</i> _{AmpC1}	93
Figure 23. Profil électrophorétique des produits de la PCR du gène <i>bla</i> _{OXA-48}	95
Figure 24. Profil électrophorétique des produits de la PCR des gènes <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> <i>et aac</i> (3)- <i>IV</i>	98
Figure 25. Profil électrophorétique des produits de la PCR des gènes <i>aac</i> (3)- <i>I</i> <i>et ant</i> (2')- <i>I</i>	98
Figure 26. Profil électrophorétique des produits de la PCR des gènes <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i>	100
Figure 27. Profil électrophorétique des produits de la PCR des gènes <i>gyrB</i> <i>et ParC</i>	101
Figure 28. Amplification des produits de la PCR des gènes <i>gyrB</i> <i>et parC</i>	102
Figure 29. Spectre du gène <i>gyrB</i> sur logiciel CHROMAS Pro.....	103
Figure 30. Alignement multiple du gène <i>gyrB</i> sur le logiciel BLAST(NCBI).....	103
Figure 31. Produits de la PCR des plasmides Inc A/C <i>et</i> Inc FIIS sur gel d'agarose 1%.....	106
Figure 32. Produits de la PCR de plasmide Inc P sur gel d'agarose 1%.....	106
Figure 33. Typage de <i>P.mirabilis</i> par la technique d'ERIC-PCR.....	109
Figure 34. Typage de <i>P.mirabilis</i> par la technique d'ERIC2-PCR.....	110
Figure 35. Typage protéomique de <i>P.mirabilis</i> par la technique de MALDI-TOF.....	113
Figure 36. Protéotypage des souches de <i>P.mirabilis</i> par la technique de MALDI-TOF.....	115

Liste des Tableaux

Tableau1. Liste des antibiotiques testés et leurs diamètres critiques.....	55
Tableau2. Composants utilisés pour la PCR standard.....	60
Tableau3. Composition des réactifs pour les PCR BigDye.....	63
Tableau4. Distribution des prélèvements de <i>Proteus</i> spp. selon l'origine et les régions.....	68
Tableau5. Profil phénotypique de résistance chez les souches de <i>P.mirabilis</i> multirésistantes	84
Tableau6. Pourcentage de résistance des souches de <i>P.mirabilis</i> communautaires et hospitalière.....	87

Liste d'abréviations

Aac : Aminoglycoside acétyltransférase.

Aad : Aminoglycoside adényltransférase.

AARN: l'organisation du Réseau National de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques.

ADH : Arginine dihydrolase.

Ala : Alanine (Acide aminé).

AME : Enzyme de modification des aminosides.

AmpC : Bêta-lactamase chromosomique.

ANT : Aminoglycoside nucléotidyltransférase.

APH : Aminoglycoside phosphotransférase.

API 20 E : Indice de profil analytique 20E (E = Entérobactéries).

Arg: Arginine (Acide aminé).

ARG-ANNOT:Gène-annotation de la résistance aux antibiotiques.

Arm: Méthylase de résistance aux aminosides.

Asn : Asparagine (Acide aminé).

Asp : Acide aspartique (Acide aminé).

BLAST:Outil d'alignement local de base.

BLSE : Bêta -lactamase à spectre étendu.

CA-SFM : Comité d'antibiogramme- société française de microbiologie.

CarbaNP : Test pour la detection Bactéries productrices de carbapénémase

CDC: Centres de contrôle des maladies.

CDS :La région codante de la séquence.

CHU :Centre Hospitalo Universitaire

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CTX-M : Résistance au céfotaxime,

Liste d'abréviations

Cys : Cysteine (Acide aminé).

ddNTP : Didésoxyribonucléotide.

dnaA : Activateur de réplication d'ADN.

dNTP : Désoxyribonucléotide.

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique.

ERIC-PCR : Entérobactérien répétitif consensus intergénique - réaction en chaîne par polymérase.

F: Forward.

G : Guanosine monophosphate.

GC % : Pourcentage en guanine + cytosine du génome (coefficient de Chagraff).

GEL : Gélatinase.

GES : Guyana Extended Spectrum beta-lactamase.

GIM : Imipénémase allemande.

Glu : Acide Glutamique (Acide aminé).

Gly : Glycine (Acide aminé).

GyrA : La sous unité A de l'ADN gyrase.

GyrB : La sous unité B de l'ADN gyrase.

HCCA : Alpha-cyano-4- hydroxy-cinnamic acid.

His : Histidine (Acide aminé).

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

IBC : Integron Borne Cephalosporinase.

Ile : Isoleucine (Acide aminé).

IMI : Bêta-lactamase hydrolysant l'imipénème.

IMP : Résistance acquise à l'imipénème.

Inc L/M : Groupe d'incompatibilité des plasmides.

Liste d'abréviations

IND: Production d'indole.

MLSA : Analyse de séquence multi-focus.

MLST :Le typage de séquences multifocales.

MME HA : Hemagglutinant mannose-sensible.

MSP : Spectre principal.

MS: la spectrométrie de masse

NaCl : Chlorure de sodium.

NCBI :Base de données sur le génome du National Center for Biotechnology Information.

NDM : New Delhi metallo beta-lactamase.

NMC-A : Non Métallo Carbapénèmase de la classe A.

npm : ARNr 16S méthyltransférase.

ODC : Ornithine décarboxylase.

ONPG :Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside.

Omp : Protéine de la membrane externe.

OXA : Oxacillinases.

ParC : Topoisomérase IV.

Pb : Paire de bases.

PER : Bêta-lactamase de classe A produit par *Pseudomonas aeruginosa*.

PFGE : L'électrophorèse en champ électrique pulsé.

Phe : Phenylalanine (Acide aminé).

PLP : Protéines liant la pénicilline.

PMQR : Résistance à la quinolone médiée par les plasmides.

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique.

Omp et Pmp :Les gènes de outer membrane protein

PBP : les protéines de liaison à la pénicilline

Liste d'abréviations

qnr: Gène de résistance aux quinolones.

QRDR : Région de détermination de la résistance aux quinolones.

R : Reverse.

RAPD : ADN polymorphe amplifié au hasard.

REP-PCR : Réaction en chaîne de la polymérase palindromique à éléments répétitifs.

Rmt : ARNr 16S méthyltransférase.

rpoB : RNA polymerase beta subunit.

Ser : Serine (Acide aminé).

SHV : Un type de β -lactamases à spectre étendu (BLSE)/Sulfi-Hydroxile variable de réactif Sulphydryl.

Spp : Espèces.

ISEcp1 : séquence d'insertion

ST : Séquence type.

SDS-PAGE:Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

T : Thymidine monophosphate.

Taq: *Thermus aquaticus*.

TAE :Tris-acetate-EDTA

TDA : Tryptophane désaminase.

TEM : Nom du malade (Temoniera).

Tm : Température de demi-dénaturation.

TRIS : Trishydroxyméthylaminométhane.

Trp : Tryptophane (Acide aminé).

TSA: Gélose trypticase soja.

Tyr: Tyrosine (Acide aminé).

Liste d'abréviations

URE : Uréase.

V : Volt.

VEB: Spectre étendu du Vietnam.

VIM: integron-encoded metallo-beta-lactamase du Verona

Introduction

Introduction

Les infections nosocomiales et communautaires constituent un véritable problème de santé publique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 1,4 million de personnes dans le monde souffrent d'infections contractées à l'hôpital (OMS, 2008). En plus, l'infection acquise en communauté est une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde (Naghaviet *al.*, 2017).

En effet, L'apparition puis la propagation de différents mécanismes de résistance au sein des entérobactéries, particulièrement *P. mirabilis*, représente l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale. De ce fait, les infections causées par ces bactéries multirésistantes conduisent à l'augmentation des fréquences de mortalité. En 2014, 700 000 morts dans le monde seraient attribuables à la résistance bactérienne aux antibiotiques (O'Neill *et al.*, 2014).

P. mirabilis est une bactérie pathogène qui fait partie de la microflore de l'appareil digestif. Les microbiologistes sont fascinés par cette bactérie depuis plus d'un siècle en raison de sa différenciation unique en essaimage (Armbruster et Mobley, 2012). Cette bactérie est considérée comme l'une des principales causes des maladies infectieuses dans le milieu communautaire hospitalier (O'hara *et al.*, 2000 ; De Champs *et al.*, 2000 ; Pearson *et al.*, 2008). C'est une bactérie opportuniste fréquemment impliquée dans plusieurs types d'infections, même chez des personnes saines. *P. mirabilis* est la deuxième cause des infections des voies urinaires en France (Aragón *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2012). Ainsi, elle est isolée de 40% des échantillons d'urine (Jordan *et al.*, 2014).

P. mirabilis a été décrit comme un agent infectieux de la folliculite, de pneumonie, de bactériémie, de méningite (Gaston *et al.*, 1995 ; Marx *et al.*, 1988), d'abcès hépatique (Walker *et al.*, 2000), splénique, ostéomyélite (Williams *et al.*, 1983 ; Marx *et al.*, 1988), sinusite, abcès cérébral, la méningite néonatale (Grahniquist *et al.*, 1992). Elle attaque principalement les nouveau-nés et les hôtes immunodéprimés (personnes âgées) (Becker *et al.*, 1986 ; Müller *et al.*, 1986).

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses épidémies nosocomiales causées par cette bactérie ont été décrites, notamment chez les personnes ayant un système immunitaire affaibli, comme les diabétiques. *P. mirabilis* est intrinsèquement résistante à certains antibiotiques (polymyxine B et tétracycline et nitrofurantoïne) selon sa plasticité structurelle et la morphologie de ces molécules. Elle est naturellement sensible aux β -lactamines, aux aminosides et aux fluoroquinolones. Cependant, elle a démontré une capacité d'incorporation de plusieurs mécanismes chromosomique et plasmidique portant une résistance aux

Introduction

antibiotiques. Chaque jour, des clones multi-résistants voient le jour et se propagent à l'échelle internationale (**Chanal et al., 2000 ; Stock, 2003; Aragón et al., 2008; Azmounet et al., 2016**).

Cette situation place les médecins dans une impasse, face à des clones indésirables à modèles thérapeutiques limités (**Vasudevan et al., 2014**). La persistance d'infections, à *P. mirabilis*, intraitables par des antibiotiques de dernier recours est une complication dans l'état actuel. Ce qui nécessite une meilleure compréhension des mécanismes d'acquisition de résistance et un suivi minutieux et attentif pour éradiquer ce problème.

L'implantation de souches extrêmement résistantes aux antibiotiques dans les hôpitaux et les communautés algériennes est principalement due à la résistance aux aminosides et/ou aux quinolones associée à la production des enzymes de β -lactamases à spectre élargi (BLSE), ou à l'hyperproduction de céphalosporinases ou à la production de carbapénémases (**Bonnet et al., 2002 ; Iabadene et al., 2009 ; Khennouchi et al., 2015 ; Gharout-Sait et al., 2015 ; Leulmi et al., 2019**). Elle conduit à des situations dramatiques d'échec thérapeutique.

Cette résistance est nationale, concerne toutes les espèces bactériennes et aucune famille d'antibiotique n'est épargnée. Plusieurs facteurs participent à son expansion dans l'environnement clinique. La carence de nouvelles molécules accentue encore cette problématique.

En Algérie, plusieurs enquêtes épidémiologiques ont rapporté la résistance aux antibiotiques chez plusieurs espèces, d'*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (**Khennouchi et al., 2015 ; Gharout-Sait et al., 2015**) que ce soit dans l'environnement hospitalier ou milieu ambulatoire. Cependant, aucune étude n'a été signalée sur les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *P. mirabilis*, dans l'Ouest algérien.

Les informations sur l'épidémiologie et le profil phénotypique de résistance aux antibiotiques au niveau national, restent rares. Pour cela, dans ce projet de recherche, l'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'état actuel de la prévalence des souches de *P. mirabilis* pour un meilleur processus thérapeutique, les objectifs étant :

Introduction

- Evaluation de l'état actuel de la prévalence des souches de *P.mirabilis* multi résistantes isolées au niveau des hôpitaux et des laboratoires privés (communautaire).
- Caractérisation des mécanismes phénotypiques et génotypiques de la résistance chez *P.mirabilis*.
- Etude des conducteurs génétiques de l'antibiorésistance chez *P.mirabilis* et évaluation de la relation clonale entre les souches multirésistantes pour pouvoir établir un bon diagnostic et proposer un traitement adéquat.

*Synthèse
bibliographique*

I. Proteus mirabilis

I.1. Généralités sur *Proteus mirabilis*

C'est en 1885 le genre de *Proteus* a été décrit pour la première fois par le microbiologiste allemand Gustav Hauser, qu'il a dénommé en fonction de leur caractère typique, c'est la capacité de changer sa forme surtout en contact avec les surfaces solides et d'envahir la gélose «swarming» (**O'Hara et al., 2000**). L'espèce *P. mirabilis* a été découverte par Wenner et Rettger en 1919 sur la base des caractères biochimiques de fermentation du sucre (**Wenner et Rettger, 1919**).

P. mirabilis est une bactérie opportuniste appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est un bâtonnet de 1 à 2 µm de longueur, polymorphe, Gram négatif, asporulée, anaérobie facultatif, mobile. Cette bactérie possède également des caractères morphologiques particuliers, il s'agit de l'essaimage qui est un phénomène permettant de s'auto-allonger sur la surface solide de façon coordonnée entre les deux formes : la première forme s'appelle les cellules nageuses « swimmer » sont hyperflagellaires et allongées (20-80 nm de longueur) lorsqu'il sont transférés dans les milieux liquides (1,0 à 2,0 µm de longueur avec 6-10), et la deuxième forme s'appelle les cellules grouillantes lorsqu'il sont transférés sur un support solide, les cellules sont devenues hyper flagellés (**Różalski et al., 2012**).

Concernant les caractères biochimiques, c'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, se développe sur les géloses ordinaires d'isolement des entérobactéries (Trypticase Soja, Hektoen, Macconkey, XLD Agar, driglski.). Les colonies bactériennes ont un diamètre de 1 à 3 mm, essaimées, la durée d'incubation après 24 heures à 30-40°C, elles n'ont pas besoin des facteurs de croissance (**O'Hara et al., 2000 ; Różalski et al., 2010**). *P. mirabilis* hydrolyse l'urée en ammoniac et carbone dioxyde par l'uréase en quelques minutes. Elle fermente le maltose et incapable de fermenter le lactose. Cette bactérie produit ornithine-décarboxylase (ODC) mais ne synthétise pas l'oxydase, tryptophane désaminase (TDA), ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) (**Różalski et al., 2012 ; Foris et al., 2017**). Le test d'indole ponctuel est souvent utilisé pour séparer entre les espèces de *Proteus* sp. (*P. mirabilis* est souvent indole-négatif).

Synthèse bibliographique

P. mirabilis est une résidente habituelle du tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux sauvages et domestiques (mammifères, oiseaux). Elle se trouve à très faible pourcentage dans l'estomac 8,1% (10^5) (UFC/ml). Cependant, elle existe à très haut pourcentage dans le duodénum (45,5%, 10^2) et dans le jéjunum proximal (45,5%, 10^4), et dans le côlon (ascendant, 33,3%, 10^5) (Zilberstein *et al.*, 2007). C'est une bactérie ubiquitaire isolée de la peau des chevaux et de chameau, des piges et des vaches, des sol contaminés, de boues résiduelles, de l'eau, de l'alimentation (Drzewiecka *et al.*, 2016). En plus, cette bactérie joue un rôle important dans les relations symbiotiques entre les insectes et les bactéries à travers les molécules extracellulaires qui se produisent pendant le quorum sensing ou biofilm (putrescine) (Drzewiecka *et al.*, 2016).

P. mirabilis est une bactérie autochtone responsable du processus de dénitrification, elle contribue à l'élimination de l'ammoniac (NH_4^+) par l'oxydation. Elle peut jouer un rôle de rhizobactéries dans la croissance des plantes surtout les légumes à travers la dégradation des composants nocifs et cancérigènes de l'environnement contaminés (la biodiesel d'éthyle, de pesticide, d'herbicide, de composé aromatique, de colorant azoïque et de métaux). Cette bactérie contribue à la production de lipase et la décomposition des hydrocarbures dans le sol (Drzewiecka *et al.*, 2016).

I.2. Taxonomie

Au cours du XXe siècle, plusieurs descriptions et reclassification ont été introduites dans le genre de *Proteus*. Des nouvelles espèces ont été incluses dans le rang taxonomique du genre *Proteus* basée sur une réévaluation globale phénotypique, biochimique et moléculaire. La technique d'hybridation ADN-ADN a amené à séparer les espèces de *P. vulgaris* en trois différents bio-groupes (Brenner *et al.*, 1978 ; Hickman *et al.*, 1982). La validité de *Proteus hauseri* sp. Nov qui est le biogroupe 3 de *Proteus vulgaris* a été récemment confirmé par la méthode de SDS-PAGE de protéine totale (O'Hara *et al.*, 2000 ; Brenner *et al.*, 1995). Actuellement, le genre de *Proteus* comporte quatre espèces principales: *P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. vulgaris*, et *P. hauseri* (Giammanco *et al.*, 2011 ; Sidorczyk *et al.*, 2002).

L'espèce de *Proteus mirabilis* appartient à la famille des Enterobacteriaceae au sein de l'ordre Entérobactériale, à la classe Gamma Proteobacteria, au phylum Proteobacteria et au domaine

Synthèse bibliographique

des Bactéries(O'Hara *et al.*,2000 ;Sidorczyk *etal.*,2002).

Règne : Bacteria

Embranchement : Protoeubacteria.

Classe : Gamma Proteobacteria.

Ordre : Entérobactériale.

Famille : Enterobacteriaceae.

Genre : Proteus.

Espèce : *Proteus mirabilis*

I.3.Génomome

À ce jour, seuls quatre souches ont été entièrement séquencées(*P. mirabilis* HI4320 et *P. mirabilis* BB2000,*P. mirabilis* K1609, K670)(Pearson *et al.*,2008 ;Selim *et al.*, 2015;Gmitter *et al.*,2019). Le génome de *P.mirabilis* est constitué d'un seul chromosome circulaire entre 3,037,704 bp et 4.063Mbp et un seul plasmide de 36,289 nucléotides. La taille est considérablement plus petite que les chromosomes d'autres membres d'*Enterobacteriaceae*(Pearson *et al.*,2008).

Le génome est caractérisé par trois îlots de prophage. De plus, il possède un transposon conjugatif et un grand îlot génomique codant une adhésine (PMI2575), ainsi qu'un îlot génomique codant la biosynthèse et le transport sidérophore (Pearson *et al.*,2008 ; Gmitter *et al.*,2019). Ce contenu a été potentiellement acquis par contact et échange génétique (transfert latéral) avec les autres espèces bactériennes dans les différents types d'écosystème (Pearson *et al.*,2008). Cela peut expliquer la variabilité et l'instabilité de génome de *P.mirabilis* qui contribue à la diversité de mode de vie et la capacité d'adaptation bactérienne dans les niches écologiques hostiles.

Le contenu en GC de génome (pourcentage de guanine et cytosine) est de 38.88% chez toutes les souches. Le génome de *P.mirabilis* contient plusieurs îlots de pathogénicité avec une teneur en G+C anormale ou asymétrique (Pearson *et al.*,2008 ;Gmitter *et al.*,2019). L'une des régions présente une faible teneur en GC, elle contient seulement 24 gènes intacts codant un

Synthèse bibliographique

système de sécrétion de type III(Pearson *et al.*,2008).Ce dernier joue un rôle clé dans le processus de détermination et la reconnaissance de soi chez les souches de *P. mirabilis*(Gmitter *et al.*,2019). Le génome de cette bactérie se définit par un répertoire énorme de gènes codant pour les facteurs de la virulence(Pearson *et al.*,2008 Gmitter *et al.*,2019). Cette spécificité reflète la grande plasticité qui contribue à l'évolution du génome de *P. mirabilis*.

L'analyse de génome extrachromosomique de *P.mirabilis* montre qu'il y a un plasmide contenant deux transposons indépendants codant une protéine de transfert conjugal(Pearson *et al.*,2008). Le plasmide porte des régions codant pour une bactériocine, cela peut participer à la virulence pendant le processus d'infection de l'hôte. Certaines souches de *P. mirabilis* comportent un plasmide hautement apparenté au plasmide d'*Escherichia coli*(Pearson *et al.*,2008 ;Schaffer *et al.*,2015). Ce qui révèle l'importance du transfert horizontal dans l'acquisition de nouveaux caractères qui favorisent la persistance et la résistance bactérienne à la sélection naturelle(Soucy *et al.*,2015).

I.3.1. Polymorphisme et la diversité génétique

P.mirabilis démontre une grande diversité au niveau de génome qui est due au nombre élevé des mutations silencieuses qui touchent le gène *rsbA* et *rscC* (le régulateur de phénotype de la migration par essaimage). Ces mutations se produisent de manière aléatoire conduisant à la substitution de la position 873 par l'arginine (Gmitter *et al.*,2019). D'autres mutations ponctuelles se situent dans une région non structurée du monomère *TssB*. Elles perturbent la fonction d'exportation T6S globale. La cartographie de mutation consiste à un seul changement d'acide aminé dans une région supposée être impliquée dans la formation de la gaine *TssB-TssC*(Saak *et al.*,2017). Les mutations ne sont pas dirigées vers le milieu à des fins adaptatives, mais cela peut contribuer à la vision de l'évolution génomique et à la persistance de cette bactérie.

P.mirabilis présente un modèle idéal de polymorphisme. La diversité génétique se produit de manière ordonnée lors de l'initiation de phénotype de l'essaimage. Cette variabilité permet d'entraîner des différences au niveau territorialité dirigé par un mécanisme de l'auto-reconnaissance. Ce mécanisme est essentiellement codé par deux gènes *idsABCDEF* et

Synthèse bibliographique

*idr*ABCDE, et des opérons effecteurs *hpc-vgrG* primaires (**Gmter et al., 2019**).

Le polymorphisme a été aussi détecté au niveau de promoteur variable de l'intégron (classe 1) dans les isolats cliniques de *Proteus*. Les souches qui présentent un taux faibles de polymorphisme dans des promoteurs d'intégron peuvent se permettre de porter une charge de gènes de résistance aux antibiotiques extra-intégron plus lourde (**Xiao et al., 2019**).

I.3.2. Mécanisme de l'évolution génétique

P. mirabilis est l'une des espèces qui présente un niveau de diversité génétique très élevé, particulièrement pendant le processus d'infection. L'évolution de génome est un processus dynamique indiquant que les mécanismes de réparation ne fonctionnent pas à niveau constant due au changement du milieu (la sélection naturelle). Elle permet à *P. mirabilis* de résister à l'environnement de l'hôte après sa colonisation et d'exprimer les gènes silencieux au cours du temps afin de persister pendant l'infection, cela peut conduire à la variabilité génétique.

La diversité génétique chez *P. mirabilis* fut l'objet de plusieurs rapports scientifiques ces dernières années. D'après Orr et al., (2009), les mécanismes de l'évolution dans la composition génétique de populations au fil du temps incluent les mutations monogéniques, qui sont des changements aléatoires produits dans le génome de *P. mirabilis*. Les recombinaisons et le transfert de matériel génétique (transformation génétique, conjugaison, transduction) consistent à produire une nouvelle combinaison génétique à partir de l'échange de matériel génétique spontané entre les différentes espèces. L'analyse de l'acquisition horizontale des gènes chez *P. mirabilis* a démontré une protéine homologue de *Yersinia enterocolitica* (**Pearson et al., 2008**).

Récemment, plusieurs documents scientifiques ont décrits une île génomique 1 de *Salmonella* SGI au sein de la population de *P. mirabilis*. Une analyse fonctionnelle plus puissante suggère que l'île génomique 1 de *Salmonella* (SGI1) peut être excisée du chromosome puis être transférée entre les bactéries, ce qui favorise le transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds. L'identification et la caractérisation des nouvelles variantes de SGI1 ont suggéré la diversité des structures de SGI1 qui jouent un rôle clé dans l'évolution des bactéries (**Bie et al., 2018**).

II. Pathogénicité et les facteurs de virulence

II.1. Manifestations cliniques

P. mirabilis est un pathogène fréquemment impliqué dans les infections sévères notamment les infections urinaires, pneumonies et bactériémies. Elle peut se propager rapidement entre les patients hospitalisés surtout dans des unités de soins gériatriques ou pédiatriques (**Schaffer et al., 2015**).

P. mirabilis est à l'origine de 1 à 10% des infections des voies urinaires, en fonction de la localisation géographique de l'étude, des types d'échantillons collectés et des caractéristiques des patients examinés (**Schaffer et al., 2015**). Dans les pays développés, cette espèce présente 4% de près de 3 000 cas d'infection urinaire (**Schaffer et al., 2015**). D'après **Sader et al., (2019)**, dans les pays en développement, cette fréquence varie entre 4 et 12%. Cette espèce a été trouvée dans 5 à 20% de ces cas et atteint un taux de mortalité de 50% chez les patients âgés (**Adams-Sapper et al., 2012**). Un taux de mortalité lié à l'infection urinaire chez les enfants est de 11% (**Sader et al., 2014**).

P. mirabilis est parmi les espèces d'entérobactérie qui a démontré de nombreux facteurs de virulence potentiellement pertinents pour les types de pathologie, peut être simple ou évoluer vers les différents organes (rein, poumons, cerveau). D'après l'OMS, les infections urinaires représentent un second plan des infections bactériennes de l'enfant, après celles des voies respiratoires (**OMS, 2002**). *P. mirabilis* est l'une des causes majeures de l'infection des voies urinaires compliquées ou associées aux sondes urinaires (**Aragón et al., 2008 ; Chen et al., 2012 ; Schaffer et al., 2015**).

P. mirabilis entraîne l'apparition des infections symptomatiques des voies urinaires, y compris la cystite et la pyélonéphrite en présence de malformations des voies urinaires, et aussi une bactériurie asymptomatique, en particulier chez les personnes âgées et les patients atteints de diabète de type 2 (**Pearson et al., 2008 ; Schaffer et al., 2015**). Elle contribue à la formation des calculs vésicaux et rénaux (lithiase urinaire) et des lésions rénales permanentes (**Foxman et Brown et al., 2003 ; Armbruster et al., 2018**).

II.2. Physiopathologie des infections urinaires

Ce pathogène peut utiliser l'urée comme une source d'azote, c'est un composé abondant dans les voies urinaires. *P. mirabilis* migre le long des voies urinaires en dépit du flux urinaire, requiert l'attachement de structures spécifiques bactériennes ou fimbriae sur des récepteurs à la surface des cellules épithéliales (Mariani-Kurkdjian *et al.*, 2004). En effet, cette bactérie possède un réseau de régulation sophistiqué, elle contrôle la modulation entre les différents modes de vie (Pearson *et al.*, 2008 ; Schaffer *et al.*, 2015).

En plus, cette bactérie possède une très forte activité de l'uréase par la cristallisation du calcium et du magnésium dans un pH alcalin. La synthèse de cette nickel-métalloenzyme est inductible par l'urée. L'uréase dégrade l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone, ce qui donne un pH compris entre 8 et 9 dans le tractus urinaire, cela entraîne souvent à la précipitation des ions normalement solubles et ainsi la formation des calculs vésicaux et rénaux qui bloque la lumière du cathéter et provoque une rétention urinaire aiguë (Chen *et al.*, 2012).

Le processus de colonisation de *P. mirabilis* exige des facteurs spécifiques en surface (la catalyse enzymatique, l'interaction fimbrial entre l'adhésine et le récepteur, l'acquisition du fer et l'activité de la cytotoxine). Il se déroule de manière optimale dans un pH alcalin. Dans le cycle de la vie de *P. mirabilis*, on rencontre des environnements qui manquent d'urée. Il est donc intéressant qu'il existe une autre voie par laquelle l'urée peut être synthétisée à partir d'ammoniac et de dioxyde de carbone (Pearson *et al.*, 2008 ; Schaffer *et al.*, 2015).

II.2.1. Mode de transmission

La majorité des infections du tractus urinaire à *P. mirabilis* résultent d'une ascension de la bactérie dans le tractus gastro-intestinal, tandis que d'autres sont dues à une transmission interhumaine, en particulier dans les établissements de soins de santé (O'Hara *et al.*, 2000 ; Schaffer *et al.*, 2015). Ceci est corroboré par la preuve que certains patients atteints de *P. mirabilis* ont la même souche de *P. mirabilis* dans leurs selles, tandis que d'autres n'ont pas de *P. mirabilis* dans leurs selles (Mathuret *et al.*, 2005 ; Schaffer *et al.*, 2015).

II.3. Physiopathologie de lagastro-entérite

P. mirabilis qui est à l'origine des maladies intestinales, se multiplie dans l'intestin de leurs hôtes. Elle recèle un potentiel pathogène important dans les maladies gastro-intestinales (spontanée et d'origine alimentaire), l'appendicite et la colonisation de dispositifs comme les sondes nasogastriques. De plus, il est important de noter que *P. mirabilis* possède une adhérence invasive qui est associée à la maladie de Crohn.

P. mirabilis a démontré sa capacité à provoquer une colonisation plus persistante que d'autres espèces à Gram négatif (O'Fallon *et al.*, 2009; Hamilton *et al.*, 2018). Elle colonise spécifiquement l'œsophage et l'estomac. Les souches de *P. mirabilis* sont génétiquement distinctes, ce qui démontre la diversité des populations de *P. mirabilis* entre les patients d'un même établissement de santé et l'adaptation génétique au niveau de tube digestif.

P. mirabilis est responsable de diverses maladies intestinales, y compris la prolifération de l'intestin grêle, la maladie de Crohn et les lésions ulcéreuses. Cette infection se manifeste par une ulcération chronique de la muqueuse nasale. L'expansion des communautés bactériennes facultatives anaérobies et la translocation bactérienne à travers la barrière intestinale intacte peuvent aboutir à la prolifération bactérienne dans l'intestin grêle (Bouhnik *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 2018).

II.3.1. Infections nosocomiales et la gastro-entérite

P. mirabilis est une cause fréquente des infections nosocomiales. De nombreux patients sont atteints de maladies gastro-intestinales. *P. mirabilis* peuvent coloniser des dispositifs médicaux placés dans le tractus gastro-intestinal, compris les shunts ventriculopéritonéaux (Liu *et al.*, 2007), les sondes nasogastriques (Segal *et al.*, 2006 ; Hamilton *et al.*, 2018), les voies biliaires et endoprothèses pancréatiques (Vaishnavi *et al.*, 2014; Yeh *et al.*, 2003) et les prothèses vocales trachéo-œsophagiennes (Ticac *et al.*, 2010). Elle contamine les gastroscopes et les colonoscopes après une désinfection insuffisante (Machado *et al.*, 2006).

II.3.2. Interactions microbiennes et la maladie de Crohn

Les interactions entre *P. mirabilis* et la communauté microbienne (les Enterobacteriaceae et les champignons (*Candida tropicalis*) sont impliqués dans la dysbiose qui caractérise la maladie de Crohn. Celle-ci est associée à des modifications du métabolisme de l'azote qui est produit à partir de la dégradation de l'urée par l'uréase bactérienne. L'azote est utilisé pour la respiration et la synthèse d'acides aminés par des anaérobies facultatifs pathogènes du phylum des Protéobactéries (Ni *et al.*, 2017 ; Hamilton *et al.*, 2018).

Les patients atteints de la maladie de Crohn avaient une présence accrue de *Candida tropicalis*. Les interactions complexes entre les espèces d'Enterobacteriaceae (*Serratia marcescens* et *Escherichia coli*) et de *Candida* favorisent les bactéries flagellées et/ou fimbriées combinées avec des hyphes fongiques pour former un biofilm robuste et épais. Ce dernier est riche en composants microbiens immunomodulateurs (lipopolysaccharides et oligomannanes, etc.) qui peuvent perpétuer à l'inflammation chez les patients dysbiotiques en induisant des réponses pro-inflammatoires aux cytokines et en apoptose (Hamilton *et al.*, 2018).

II.3.3. Association avec la maladie pancréatique et hépatobiliaire

Depuis les années 1977, *P. mirabilis* a émergé comme un agent d'abcès hépatique primitif survenant chez des patients sans antécédents de pathologie hépatobiliaire. Une enquête plus approfondie basée sur des patients subissant une chirurgie biliaire a montré l'isolement occasionnel de l'espèce de *Proteus* à partir du tractus biliaire (13% des échantillons de bile) (Lou *et al.*, 1977). *P. mirabilis* a également été retrouvé dans la bile obtenue lors d'une cholangiopancréatographie rétrograde endoscopique dans 6% des échantillons cultivés (Misra *et al.*, 2009).

Dans le tractus hépatobiliaire, *Proteus* spp. est une cause rare d'infection, elle est généralement liée à des interventions chirurgicales, chirurgie abdominale. Les dispositifs implantables (les endoprothèses) sont également à risque de colonisation et de formation de biofilms

(Vaishnavi *et al.*,2014 ;Hamilton *et al.*,2018).

L'analyse métagénomique de la communauté muqueuse rectosigmoïde d'individus en bonne santé a été comparée à celle de patients atteints de cirrhose. Les patients atteints de cirrhose présentaient une proportion élevée d'espèce de *Proteus* par rapport aux témoins.L'abondance relative chez les témoins en bonne santé était de 0,0% contre 0,1% chez les patients atteints de cirrhose (Bajaj *et al.*,2012). Dans l'intestin, *P.mirabilis* contribue à la pathogenèse de l'encéphalopathie hépatique par la dégradation de l'urée en ammoniac et en acide carbonique (Lai *et al.*,1972 ;Bajaj *et al.*,2012).

II.3.4.Maladie du pancréas et *P.mirabilis*

P. mirabilis occupe une place importante dans la pathologie du pancréas.Cette infection se manifeste par un pseudokyste pancréatique infecté compressant le canal hépatique commun. Le contenu kystique est polymicrobien :*Proteus vulgaris*, *Morganellamorganii*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Pseudomonas aeruginosa*.*P. mirabilis* est impliquée dans la formation des biofilms sur des stents biliaires et pancréatiques(Hamilton *et al.*,2018).

II.3.5.Polyarthrite rhumatoïde et*P.mirabilis*

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune grave qui touche environ 1% de la population dans les pays développés et atteint principalement les femmes âgées. Plusieurs études ont établi un lien entre *P. mirabilis* et l'arthrite rhumatoïde.*P.mirabilis* est impliqué dans les différentes pathologies de la polyarthrite rhumatoïde en raison de l'homogénéité structurelle de précurseur de l'hémolysine B avec les séquences d'*EQRRAA* (Chrashekara *et al.*,2003 ;Ebringer et Rashid.,2014).

Le mécanisme pathogénétique implique des auto-anticorps agit contre*P.mirabilis*. Les séquences d'acides aminés causales, à savoir *ESRRAL* et *IRRET* contiennent des doublets d'arginine sur lesquels agit la peptidyl arginine désiminase.Cela conduit à l'apparition précoce des anticorps anti-protéines citrullinés chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Par conséquent, les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde doivent être traités par des anticorps anti-*Proteus*(Chrashekara *et al.*,2003 ;Ebringer et Rashid.,2014).

II.4.Les autres types d'infections

Synthèse bibliographique

Plusieurs pathologies infectieuses sont maintenant attachées à l'infection de *P.mirabilis*, elle est responsable d'infections de la cavité nasopharyngée en absence de signe clinique (**Whary et al.,2015**).En outre, elle peut s'associer à des affections des voies respiratoires, des yeux, des oreilles, du nez, de la peau, de la gorge (**Schaffer et al.,2015**) et également la septicémie, la méningo-encéphalite, l'empyème et l'ostéomyélite néonatales,des lésions suppuratives ou nécrotiques (thrombus septiques), les infections urogénitales(**O'Hara et al.,2000 ;Schaffer et al.,2015**).

Elle provoque également des blessures chirurgicales de pied diabétique(**Jneid et al.,2018**), l'infection des brûlures et certaines infections poly-microbiennes. Les infections des tissus muqueux sont communautaires chez des individus sains, ayants des traumatismes (**Marx et al., 1988;Gaston et al.,1995**).

II.5.Épidémiologie

*P.mirabilis*est la plus fréquemment isolée dans les infections à Proteus.*P.mirabilis* est la principale espèce bactérienne responsable des épidémiesd'infection en milieu hospitalier et communautaire(**Champs et al.,2000 ;Schaffer et al.,2015**) .Elleest plus souvent isolée de prélèvements cliniques à visée diagnostiqueaprès l'utilisation anarchique et empirique des antibiotiques.*P.mirabilis*est maintenant souvent trouvé comme un pathogèneassociéà des malades graves et compliquées(**Foris et Snowden.,2017**). Ce pathogène est devenusmaintenant intraitable après l'acquisitionconjugué des multiples gènes de résistance aux antibiotiques.

Bien qu'il n'y ait pas eu récemment de grandes études de prévalence organisées,les rapports épidémiologiques menés indiquent que cette infection attaque principalement les nouveaux-nés ou des nourrissons.Cette incidence indique que la bactérie acquit la capacité de déjouer les défenses immunitaires de l'hôte et de se propager dans l'organisme(**Champs et al.,2000 ;O'hara et al., 2000 ;Aragón et al., 2008 ;Pearson et al., 2008 ;Chen et al.,2012 ;Tumbarello et al .,2012**).

La transmission des germes pathogènesesttransportée sur le site infectieux par l'intermédiaire du personnel ou de dispositifs médicaux.Le risque varie selon le profil du patient, le niveau d'hygiène ou encore les soins pratiqués, la durée et le type du séjour.Les infections sont très

Synthèse bibliographique

fréquemment liées à des interventions invasives: sondage urinaire ou trachéal (ventilation assistée), cathéter veineux, intervention chirurgicale, endoscopie(**Tumbarello et al .,2012 ;Hamilton et al.,2018**).En plus, les infections en général dues à une auto-contamination des germes d'origine digestive étant transportés depuis l'anus jusqu'au méat urinaire ou le vagin ils peuvent ensuite remonter(**Tumbarello et al .,2012 ;Hamilton et al.,2018**).

P.mirabilis fut l'objet de plusieurs études, principalement à cause de sa gravité et sa capacité de causer des multiples dégâts à l'hôte.Les infections à *P.mirabilis* sont endémiques dans quelques pays en Asie et Europe. Ce pathogène a eu l'habitude à coloniser les hôpitaux, la première bactériémie à *P.mirabilis* a été rapportée à l'hôpital de l'Italie, entre 1999 et 2009.Cette espèce responsable d'une mortalité globale de 30.3% est liée à une bactériémie, pneumonies et infections postchirurgicales en raison d'un traitement antimicrobien initial inadéquat et de longs séjours à l'hôpital (**Tumbarello et al .,2012**).

Dans les pays développés, le seuil épidémique est très élevé. Des rapports épidémiologiques Japonais et Coréens ont rapporté que les souches de *P.mirabilis* multirésistantes provenaient de prélèvements urogénitaux de patients hospitalisés ont été associées à une épidémie d'infection nosocomiale (**Nagano et al., 2003**).Les patients atteints de *P. mirabilis* sont souvent des personnes âgées dues à plusieurs conditions préexistantes.Cette situation qui peut réduire leur capacité à tolérer des retards importants de l'administration d'un traitement efficace (**Tumbarello et al .,2012**).

En 2007, 3,000 cas d'infection des voies urinaires dues à *P. mirabilis* ont été enregistrés aux États-Unis. L'incidence est élevée chez des patients immunodéprimés, en particulier les enfants et les patients âgés.*P. mirabilis* est à l'origine de 1 à 10% des infections du tractus urinaire, en fonction de la localisation géographique de l'étude et des types d'échantillons prélevés (**Schaffer et al .,2015**) .En Beijing Chine, une épidémie d'intoxication alimentaire est associée à la consommation de boulettes de viande de porc mal cuites contaminées par *P.mirabilis*(**Wang et al.,2010**).

En France, une caractérisation moléculaire rétrospective a été effectuée par Cremet et ses collaborateurs en 2011 a présenté une épidémie nosocomiale due à des isolats de *P.mirabilis* qui

Synthèse bibliographique

produisent une β -lactamase à spectre étendu chez des patients atteints d'une lésion de la moelle épinière avec une bactériurie récurrente (l'incidence cumulative) (**Crement *et al.*, 2011**).

La prévalence de l'infection des voies urinaires varie d'une région à l'autre, le taux plus élevé de la prévalence des souches productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) par *P. mirabilis* a été estimé à 10,1% en 1998 et de 23,1% en 2003. L'épidémiologie moléculaire a révélé que toutes les souches résistantes produisaient exclusivement la β -lactamase de type CTX-M. Ces résultats indiquent une épidémie régionale de *P. mirabilis* au Japon, cela suggère que la propagation de l'épidémie s'est produite dans les hôpitaux et les communautés sous forme de souches clonales étendues (**Nakano *et al.*, 2012**). La présence de ces bactéries peut être attribuée à une contamination fécale de cette zone, en particulier durant les périodes pluvieuses.

Selon l'Organisation mondiale de santé (OMS), la majorité des infections à *P. mirabilis* pourraient être évitées par un assainissement et le respect des mesures de l'hygiène (surveillance de l'hygiène de l'environnement et du matériel et isolement septique des patients), la stérilisation adéquate des équipements médicaux et des surfaces et également par la surveillance de l'usage des antibiotiques dans les hôpitaux malgré la réduction de la durée de séjours du patient via le développement de la chirurgie ambulatoire (**OMS, 2018**).

II.6. Facteurs de virulence

P. mirabilis conferte son pouvoir pathogène et de ces facteurs de virulence contribuent à la colonisation et à l'infection de l'hôte. Plusieurs types de facteurs impliquent dans la virulence comme l'uréase, fimbriae, toxines, protéases cytolytiques, système d'acquisition de fer, flagelles, systèmes de sécrétion (**Jones *et al.*, 2005; Armbruster *et al.*, 2018**).

La plupart des personnes infectées développent une maladie asymptomatique ou silencieuse, ce qui a conduit à l'apparition des complications après une longue durée. Les facteurs de virulence interviennent en plusieurs étapes de la pathogénicité. Nous envisagerons particulièrement ici les étapes «épithéliales» de la pathogénicité urinaire, c'est-à-dire la production de toxines, la colonisation et l'adhérence, l'invasion et la survie intracellulaire (**Jones *et al.*, 2005; Armbruster *et al.*, 2018**).

II.6.1. Facteurs de pathogénécité

A. Uréase

Les souches de *P. mirabilis* synthétisent unemétalloenzyme de l'uréase, ce dernier dégrade l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone. L'ammoniac augmente le pH et provoque la précipitation des minéraux, cela peut conduire à la formation des calculs au niveau de la vessie et du rein, ainsi que la formation de biofilms cristallins le long d'un cathéter. L'ammoniac est la source d'azote préférée par de nombreuses espèces bactériennes, il peut être assimilé en biomolécules via la glutamine synthétase (GlnA) ou la glutamate déshydrogénase (GdhA) (Moblely *et al.*, 1996, Schaffer *et al.*, 2018 ; Armbruster *et al.*, 2018)

L'activité de l'uréase et la production de l'ammoniac résultent directement de l'augmentation de pH local. Dans les voies urinaires, le pH alcalin entraîne la précipitation des ions calcium et magnésium, il conduit aussi à la formation des calculs urinaires composés de phosphate de magnésium et d'ammonium (struvite) et de phosphate de calcium (apatite) (Schaffer *et al.*, 2018 ; Armbruster *et al.*, 2018).

B. IgA Protéase

Parmi les facteurs de persistance les plus connus, c'est la protéase produite par *P. mirabilis* qui est une métalloprotéase de la famille de serralyisin de protéase de zinc. Les protéases IgA dégrade complètement la protéine zapA qui ne clive que la région charnière de l'IgA. Le pH alcalin favorise l'activité d'un grand nombre de ces types de protéases. Il a été également montré que la protéine zapA est en mesure de cliver de nombreuses autres protéines présentes dans le tractus urinaire comprenant: des composants du complément, des éléments du cytosquelette, et les peptides antimicrobiens (Schaffer *et al.*, 2018; Armbruster *et al.*, 2018).

C. Hémolysine

L'activité hémolytique est fréquemment retrouvée chez *P. mirabilis*. La fonction de l'hémolysine est de former des pores dans les cellules hôtes cibles, ce qui permet à *P. mirabilis* de se propager dans les reins lors de l'infection. Ceci est probablement médiée par la capacité accrue des cellules hémolytiques de *P. mirabilis* à envahir les tissus de l'hôte. L'activité hémolytique est codée par les gènes d'hpmAB. Des études montrent que l'activité de l'hémolysine est redoublée pendant la colonisation du tractus urinaire (Schaffer *et*

al.,2018 ;Armbruster *et al.*,2018).

D.Toxine Agglutinine de Proteus

La toxine Pta produite par *P. mirabilis* est à la fois cytotoxique et possédant la capacité d'agglutination (Armbruster *et al.*,2018).La toxine Pta est une protéine de calcium dépendante reste à la surface de la cellule. L'activité cytotoxique liée à la toxine Pta commence quand elle est associée à une cellule ou dans une forme purifiée (Różalski *etal.*,2012 ;Armbruster *et al.*,2018).La toxine Pta est exprimée au cours d'une infection (Różalski *etal.*,2012 ;Armbruster *et al.*,2018).

II.6.2.Facteurs de colonisation et adhésion

A. Essaimage

L'essaimage est un phénomène très répandu chez *P.mirabilis*. La mobilité des *P.mirabilis* s'effectue soit par le mécanisme classique (flagelle) soit par l'essaimage.C'est un phénomène collectif et coordonné observé quand les cellules sont cultivées sur un milieu solide (Figure 1)(Schaffer *et al.*.,2015 ; Armbruster *et al.*,2018).

Elles donnent alors la naissance des formes courtes et faiblement mobiles, mais l'appauvrissement progressif du milieu provoque l'apparition des formes longues qui repartiront vers des zones de milieu neuf. L'essaimage est déclenchée par des facteurs inhibant la rotation des flagelles (telle que l'augmentation de viscosité du milieu) et par la présence de signaux extracellulaires(Figure 1)(Schaffer *et al.*,2015 ;Leulmi.,2015 ;Armbruster *et al.*,2018).

L'essaimage est un processus très compliqué qui nécessite plusieurs facteurs contribuant à la mobilité et la différenciation et l'élongation de la cellule. Les cellules s'allongent (la longueur peut atteindre 80 µm) et deviennent polyploïdes (par exemple, les formes de 40 µm de longueur contiennent environ 20 chromosomes), leur membrane externe devient plus fluide, le lipopolysaccharide (LPS) possède des chaînes latérales plus longues, la synthèse d'uréase et de protéase et d'hémolysine extracellulaire augmente. elles sont pourvues d'une abondante ciliature (plusieurs centaines à plusieurs milliers de flagelles) (Schaffer *et al.*.,2015 ;Armbruster *et al.*,2018).

Synthèse bibliographique

En effet, la glutamine semble jouer un rôle très important pendant le déroulement de ce processus. C'est le seul acide aminé capable d'initier la transformation en formes longues pourvues d'une abondante ciliature. En fait, il semble que les flagelles se comportent comme des structures aptes à analyser les conditions du milieu ambiant et à transmettre des signaux à la cellule. Plusieurs rapports scientifiques ont démontré une relation entre essaimage et les infections urinaires (**Figure 1**) (Verstraeten *et al.*, 2008 ; Schaffer *et al.*, 2015).

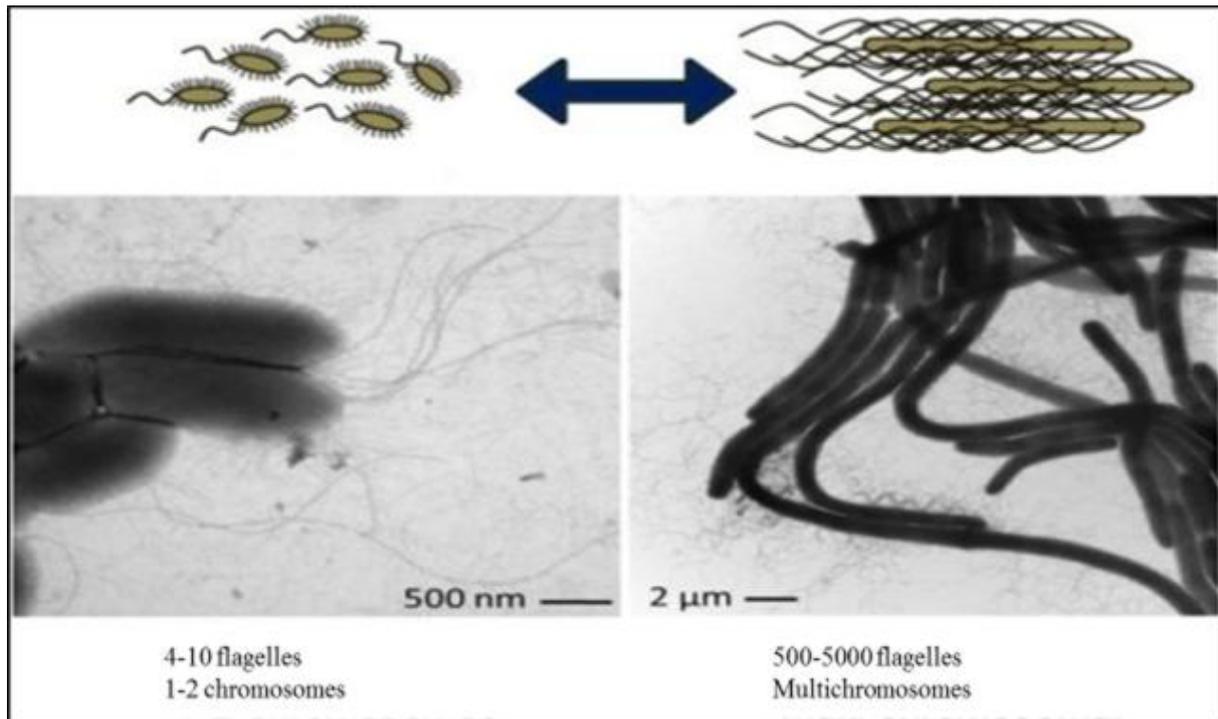


Figure 1. Processus de l'essaimage chez *P. mirabilis* (Schaffer *et al.*, 2015).

B. Fimbriae

Les fimbriae de *P. mirabilis* sont des facteurs de virulence essentiels qui jouent un rôle dans le processus de la vie et du cycle infectieux (Schaffer *et al.*, 2015 ; Armbruster *et al.*, 2018). Au total, 17 fimbriae ont été mises en évidence chez cette bactérie. Ce sont des appendices sur la surface des bactéries qui confèrent à la cellule bactérienne la capacité de former un biofilm. En effet, *P. mirabilis* peut exprimer simultanément plusieurs types de fimbriae (Figure 2) (Schaffer *et al.*, 2015 ; Armbruster *et al.*, 2018).

Le fimbriae non agglutinante F17 possède un diamètre de 4 à 6 nM et une longueur de 0,09 à 0,83 µm. Il est le plus connu et est capable de se lier sur la surface des cellules uroépithéliales, il constitue deux sous-unités structurelles qui favorisent la colonisation pendant

l'infection (Schaffer *et al.* ,2015 ; Armbruster *et al.*,2018). Parmi les fimbriaesles plus connus chez *P.mirabilis* :MR/P sont résistantes au mannose de type Klebsiella (MR/K) (Schaffer *et al.* ,2015 ; Armbruster *et al.*,2018).Les fimbriaes MR/P sont des fimbriaesde 7 nm de diamètre,ilssont responsables d'une hémagglutination non inhibée par le mannose(Figure2)(Schaffer *et al.* ,2015 ; Fernández-Delgado *et al.*,2015 ;Armbruster *et al.*,2018).

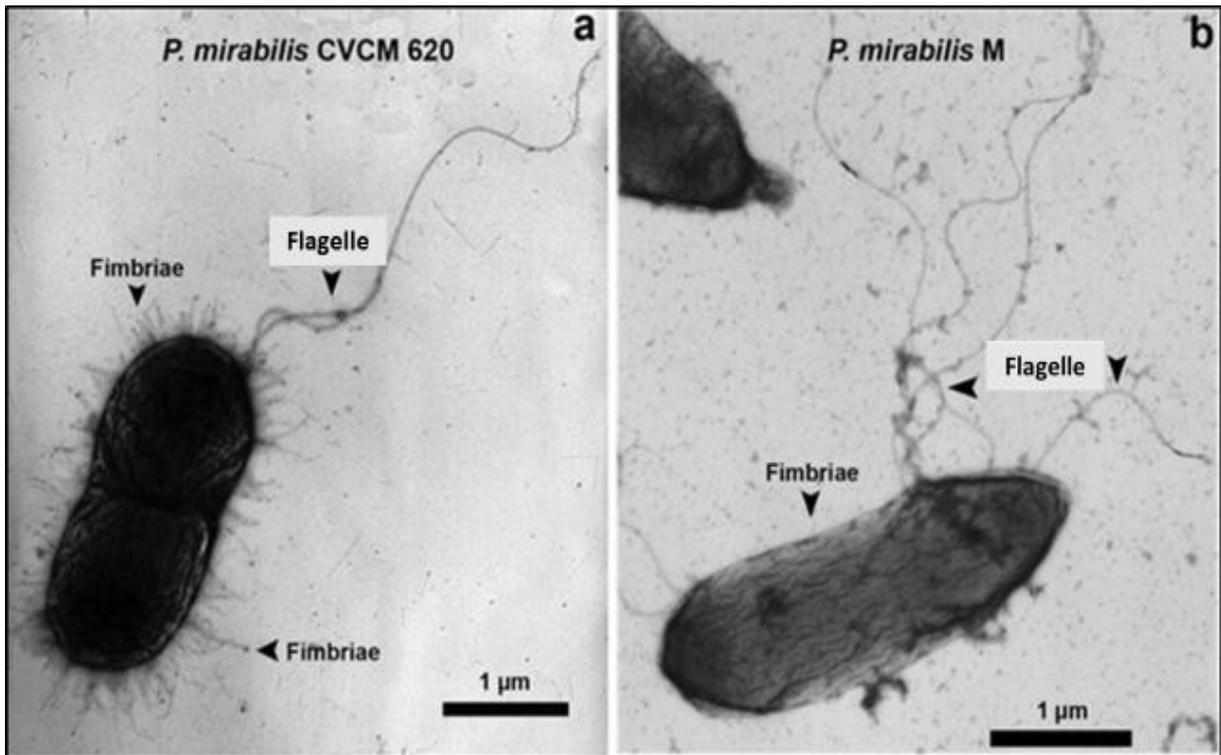


Figure2. Fimbriae et flagelle de *P. mirabilis* (Fernández-Delgado *et al.*,2015).

II.6.3. Facteurs de persistance

A. Biofilm

En dépit d'une réponse immunitaire de l'hôte dirigée face *P.mirabilis*. Cette bactérie est capable de persister et de se maintenir durant des années. Pour ce faire, *P. mirabilis* est particulièrement disposée d'un moyen à former les biofilms en raison de leur capsule qui aide aussi à la formation des structures en cristal. Ces cristaux ont un effet sur la virulence de *P. mirabilis* de multiples façons. Tout d'abord, l'augmentation de l'ammoniac peut provoquer la lyse des cellules hôtes, ce qui conduit à l'augmentation de nutriments pour les bactéries. Ensuite, les cristaux vont créer un refuge pour les bactéries de se cacher et d'échapper non seulement des cellules immunitaires, mais également des antibiotiques. Les calculs rénaux /

Synthèse bibliographique

urinaires et les biofilms cristallins sur cathéters peuvent bloquer le flux de l'urine dans les uretères et peuvent être la cause des problèmes plus graves telles que la pyélonéphrite et éventuellement la septicémie (Leulmi *et al.*, 2015 ; Schaffer *et al.*, 2018).

B. Système de sécrétion

Le système de sécrétion de type VI (T6SS) est une méthode d'exportation des protéines dans l'étape de persistance pendant l'infection, soit entre deux bactéries ou une bactérie et une cellule hôte eucaryote. Généralement, des études suggèrent que le système de type VI chez *P.mirabilis* est considéré comme un principal mécanisme de formation de la ligne de défense due à la sécrétion des protéines toxiques (Silverman *et al.*, 2012). Le système de sécrétion chez *P.mirabilis* peut être impliqué dans la virulence, le commensalisme ou la compétition bactérienne (Schaffer *et al.*, 2015). Les nanomachines contractiles du système de sécrétion permettent aux bactéries d'injecter des toxines directement dans les membranes des cellules ou dans le cytoplasme. La machine est parfaitement assemblée de manière ordonnée afin de mettre en évidence les liens entre T6SS et la communication bactérienne (Schaffer *et al.*, 2015 ; Armbruster *et al.*, 2018 ; Alteri *et al.*, 2013).

Une gamme de trois types de système de sécrétion a été identifiée dans le génome de cette bactérie, six protéines potentielles autotransporteurs (système de sécrétion de type I et III et V). Ces protéines possèdent un terminal canonique autotransporteur C (pfam03797) et également des motifs de sérine protéase peuvent donc servir comme des toxines. En outre, trois régions codantes de la séquence (PMI2028 à PMI2030) codent un système de sécrétion de type I qui est impliqué dans la sécrétion de certaines toxines et adhésines (Alamuri *et al.*, 2008 ; Pearson *et al.*, 2008).

II.6.4. Traitement d'une infection à *P.mirabilis*

II.6.4.1. Gestion de l'infection

L'antibiothérapie empirique des infections acquises en soins intensifs doit être adaptée au contexte clinique et épidémiologique local. Généralement, les infections diminuent ou guérissent après la destruction de *P.mirabilis* par des antibiotiques. L'infection à *P.mirabilis* est difficile à traiter dans certaines conditions. Le médecin ambulatoire ou le médecin hospitalier doit faire le bon choix d'un antibiotique parmi plusieurs candidats en prenant en considération les caractéristiques optimales des antibiotiques disponibles et à l'adéquation de la sensibilité *in vitro* de l'agent pathogène (Leekha *et al.*, 2011).

Les principales classes d'antibiotiques utilisées pour gérer les infections à *P.mirabilis* sont les bêta-lactamines, les carbapénèmes, les fluoroquinolones, les aminosides et le triméthoprim / sulfaméthoxazole. Comme la plupart des espèces, *P.mirabilis* peut développer une résistance au cours d'un traitement antimicrobien, le choix d'un agent antimicrobien approprié sera compliqué et restreint.

Le traitement empirique et ambulatoire d'une infection causée par *P. mirabilis* (un peu comme les autres infections urinaires non compliquées) implique triméthoprim / sulfaméthoxazole (TMP / SMZ) ou une fluoroquinolone orale (la ciprofloxacine) (Kwak *et al.*, 2017).

Pour un patient hospitalisé, le traitement d'antibiotique est appliqué par l'administration intraveineuse de ceftriaxone, de gentamycine, de fluoroquinolone, avec d'ampicilline ou d'aztréonam. Dans la plupart des cas, la thérapie antimicrobienne est préférable en combinaison de 2 agents antimicrobiens ou plus recommandé dans les infections graves. La synergie entre agents antimicrobiens signifie que l'effet combiné est important, il est dû

Synthèse bibliographique

à l'activité synergique contre un microorganisme(**Leekha et al .,2011**).

II.6.4.2. Antibiothérapie empirique

La présence d'une infection due à une bactérie productrice de bêta -lactamase est élevée. Dans ce cas, le taux élevé d'échec thérapeutique en cas de traitement par céphalosporine peut justifier l'inclusion des carbapénèmes dans les schémas de traitement empirique des infections sévères tels que le choc septique et la pneumonie nosocomiale(**Rodriguez-Villalobos et Struelens,2006**).

En cas de situation épidémique ou endémique locale, le clinicien envisage ce type de schéma thérapeutique pour les patients présentant des facteurs de risque d'infections par entérobactérie productrice de bêta-lactamase, ou connus comme porteurs. Les fluoroquinolones peuvent être utilisées dans certains cas pour le traitement des infections urinaires compliquées par la souche productrice de bêta-lactamase. Néanmoins, le traitement empirique avec les fluoroquinolones est risqué à cause de la haute fréquence de résistance à ces antibiotiques des souches productrices de bêta-lactamase(**Rodriguez-Villalobos et Struelens,2006**).

En cas de présence de *P.mirabilis* productrice de carbapénémase considérée parmi les bactéries extrêmement résistantes. Le médecin doit établir un profil épidémiologique et clinique et prescrire une antibiothérapie adaptée qui comprend les associations entre les antibiotiques : colistine/imipénème, imipénème/ amikacine et fosfomycine/tigécycline. Les molécules les plus souvent prescrites étant l'imipénème et la colistine. En cas de présence d'une souche clinique multirésistante, l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de ces derniers a permis de montrer que l'aztréonam et le méropénème constituent des armes potentiellement très utiles dans l'arsenal thérapeutique contre ces bactéries(**Maamaret al.,2019**)

III. Les antibiotiques

III.1. Généralités sur antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules naturelles ou synthétiques produites par des microorganismes(**Russell, 2004 ; Saga et al .,2009**). Le terme antibiotique a été inventé du mot "antibiosis" qui signifie littéralement "contre la vie" (**Russell, 2004**). L'utilisation abusive

Synthèse bibliographique

généralisée d'antibiotiques est la principale cause de l'évolution rapide de la résistance au sein des bactéries pathogènes. Pour éviter la crise mondiale de la résistance aux antibiotiques, les chimistes ont appliqué une stratégie de la synthèse chimique moderne en combinant les deux approches synthétiques et biosynthétiques, ce qui facilite la découverte et la mise sur le marché des nouveaux antibiotiques (Figure 3). De ce fait, ces différentes forces peuvent être exploitées pour trouver les meilleurs antibiotiques (Saga *et al.*, 2009) qui ont la propriété d'inhiber à faible dose les virus, bactéries, champignons ou certaines cellules, d'organismes pluricellulaires (cellule cancéreuse).

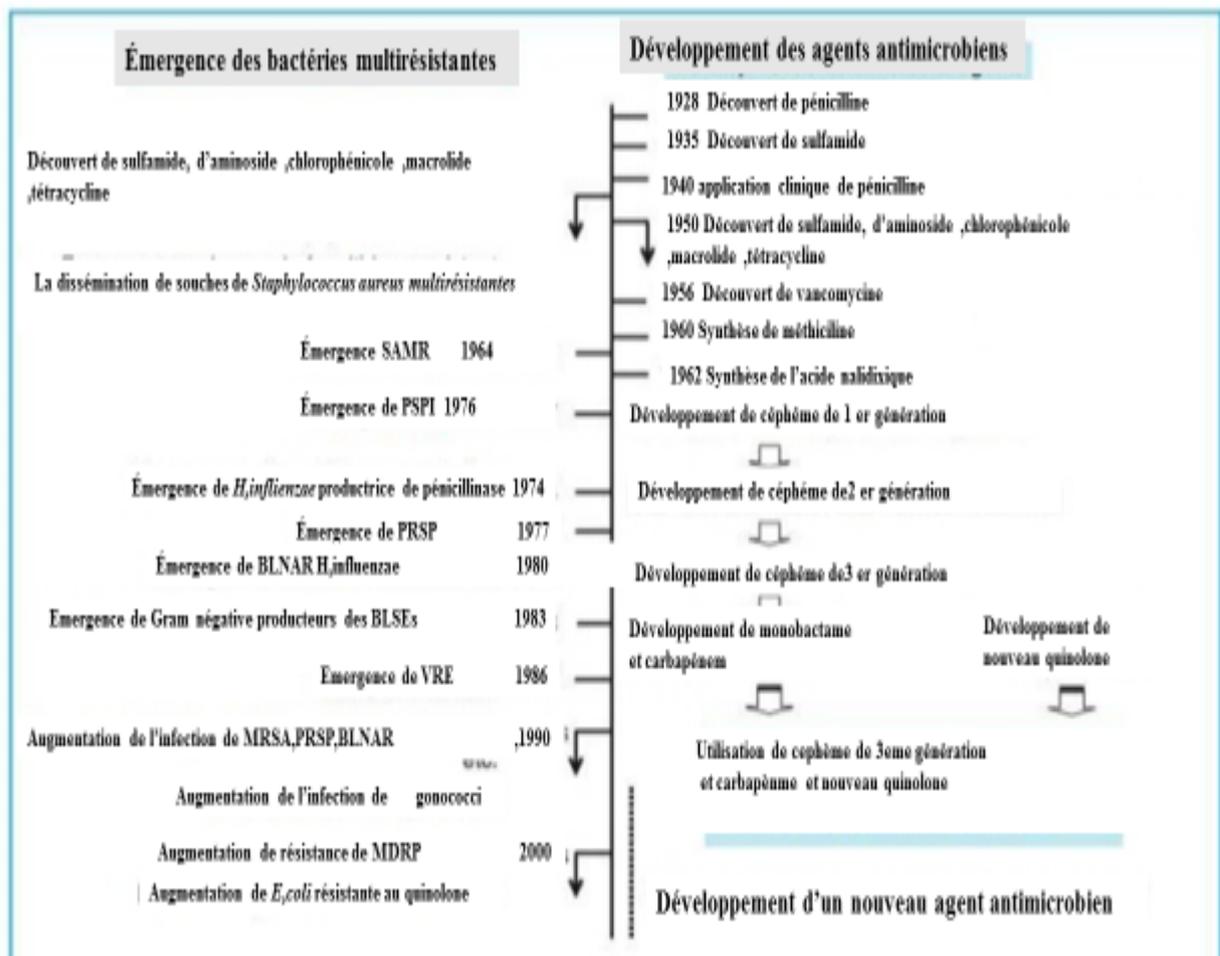


Figure 3. Développement des agents antimicrobiens et l'émergence de l'antibiorésistance (Saga *et al.*, 2009).

III.2. Classification des antibiotiques

Synthèse bibliographique

La classification des antibiotiques est basée sur plusieurs paramètres, parmi lesquels, le spectre d'activité, la structure de la molécule, l'origine de la molécule (Calderon et Sabundayo, 2007 ; Saga *et al.*, 2009), le mécanisme d'action (l'antibiotique affecte la synthèse des protéines ou la synthèse d'acide nucléique, métabolite). Ils sont également classés selon les voies d'administration (voie injectable, orale et topique) et les effets secondaires (Etebu *et al.*, 2016). Les principales familles d'antibiotiques sont : les bêta-lactames, les macrolides, les tétracyclines, les quinolones, les aminoglycosides, les sulfamides, les glycopeptides et les oxazolidinones (Adzitey *et al.*, 2015).

III.2.1. Bêta-lactamines

Les β -lactames sont des agents antibactériens bactéricides. Ils représentent l'un des groupes d'antibiotiques le plus important aujourd'hui pour traiter des différents types d'infections (Etebu *et al.*, 2016). Elles incluent les céphalosporines, les carbapénèmes, les pénicillines, les monobactames et les céphamycines (Lewis, 2013; Öster *et al.*, 2005).

A. Structure et classification

La présence du groupe méthoxy sur le cycle de β -lactame a rendu la molécule plus active contre les agents pathogènes à Gram négatif et les bactéries anaérobies (Bryskier, 1999). La base commune à toutes les β -lactames est le cycle azétidinone qui possède la structure carbonyle lactame essentielle à l'activité de ces molécules (Bryskier, 1999). À partir de cette structure, cinq groupes ont été évalués par l'incorporation d'un cycle latéral (les pénames, les céphèmes, les monobactames et les inhibiteurs de β -lactamases) (Figure 4) (Cavallo *et al.*, 2004).

B. Mode d'action

Les β -lactamines attaquent principalement la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne en inhibant la protéine de liaison à la pénicilline (PBP), également appelé DD-transpeptidase (Matagne *et al.*, 1999). Dans l'étape finale de transpeptidation, les protéines de liaison à la pénicilline (PBP) sont des enzymes membranaires qui catalysent la réticulation des polymères de peptidoglycane pendant la synthèse du peptidoglycane de la paroi cellulaire, en particulier la séquence d-Ala-d-Ala situé entre le carboxylate ou le sulfonate (monobactames)

Synthèse bibliographique

et l'amide cyclique (Van Bambeke *et al.*, 2010).

Les β -lactames doivent traverser principalement les canaux poreux en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire. Les β -lactames agissent en tant que pseudosubstrats de PBP (faux substrat pour les d-alanyl-d-alanine transpeptidases) et des acylates du cycle β -lactame. Leur site actif sérine forme un complexe covalent acyl-enzyme stable. Le résidu sérine des transpeptidases également réagit avec le cycle carbonyl de β -lactame pour donner des enzymes acyl-inactives «inhibition du suicide». Elle empêche la synthèse du peptidoglycane en inhibant la transglycosylation et la transpeptidation. Leur effet est bactéricide et le résultat de mécanisme est indirect (l'activation des enzymes autolytiques) (Van bambeke *et al.*, 2010).

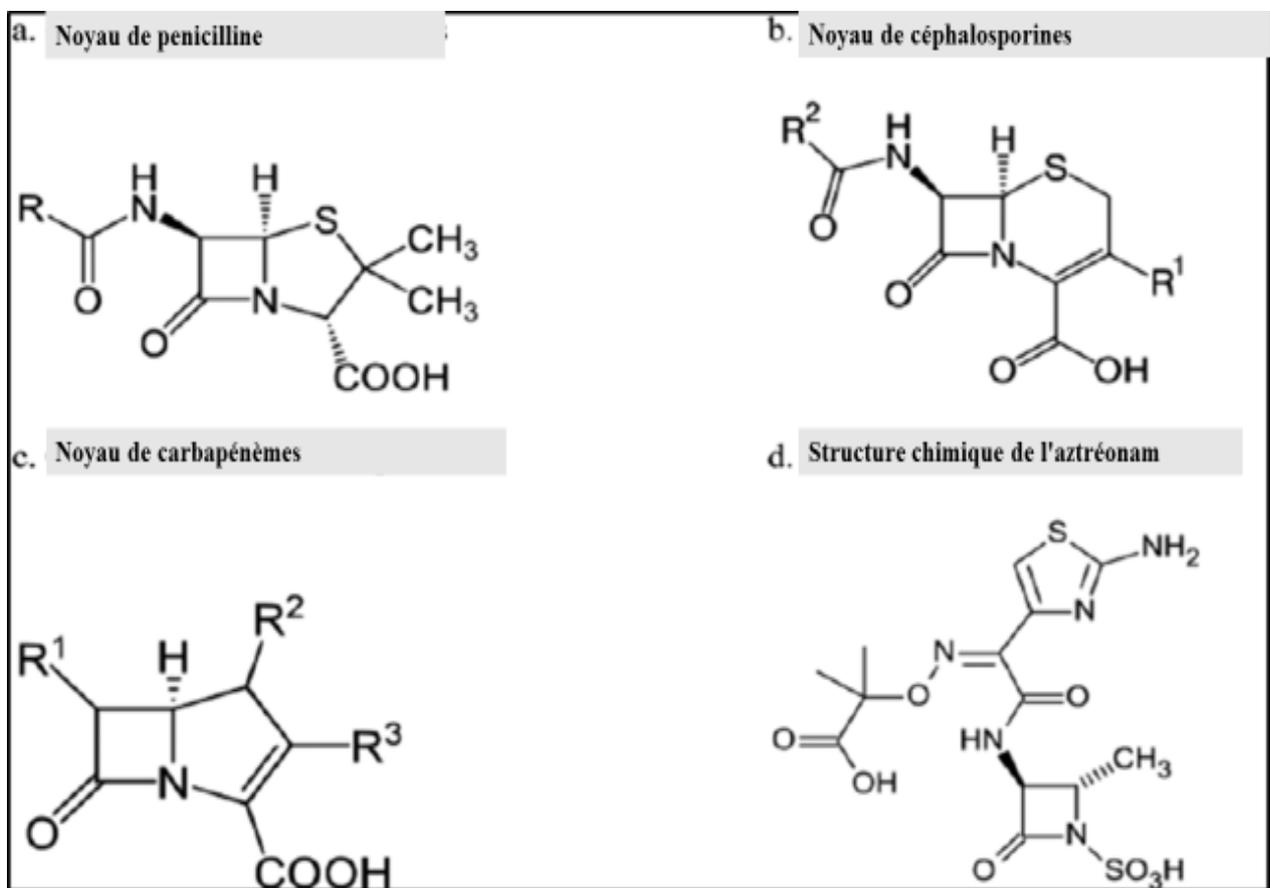


Figure 4. Structure chimique du noyau de céphamycine de la famille de β -lactamine (Asselineau *et al.*, 1973)

III.2.2. Quinolones

Les quinolones ont été découvertes au début des années 1960. C'est une classe de médicaments à l'heure actuelle les antibiotiques les plus utilisés pour le traitement des infections grâce à

Synthèse bibliographique

leur puissance élevée et leur large spectre d'activité, bonne biodisponibilité, formulations orales et intraveineuses, taux sériques élevés, un volume de distribution important indiquent une concentration tissulaire et une incidence faible d'effets secondaires (Andersson *et al.*, 2003). C'est un antibiotique synthétique hydrophile qui a été développé par Leshner (Leshner *et al.*, 1962).

A. Structure et classification

La structure de base de quinolone est un acide pyridine- β -carboxylique avec un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4 (Figure 5). Plusieurs modifications chimiques ont été effectuées sur la base du cycle 4-quinolone afin de minimiser les effets secondaires et d'améliorer l'activité antimicrobienne et d'accroître leur efficacité (Andersson *et al.*, 2003). Le noyau d'acide pyridine- β -carboxylique commun à tous les quinolones, dans lequel des substitutions atomiques sont appliquées à diverses positions stratégiques, ce qui permet la création des nouvelles molécules (Andersson *et al.*, 2003).

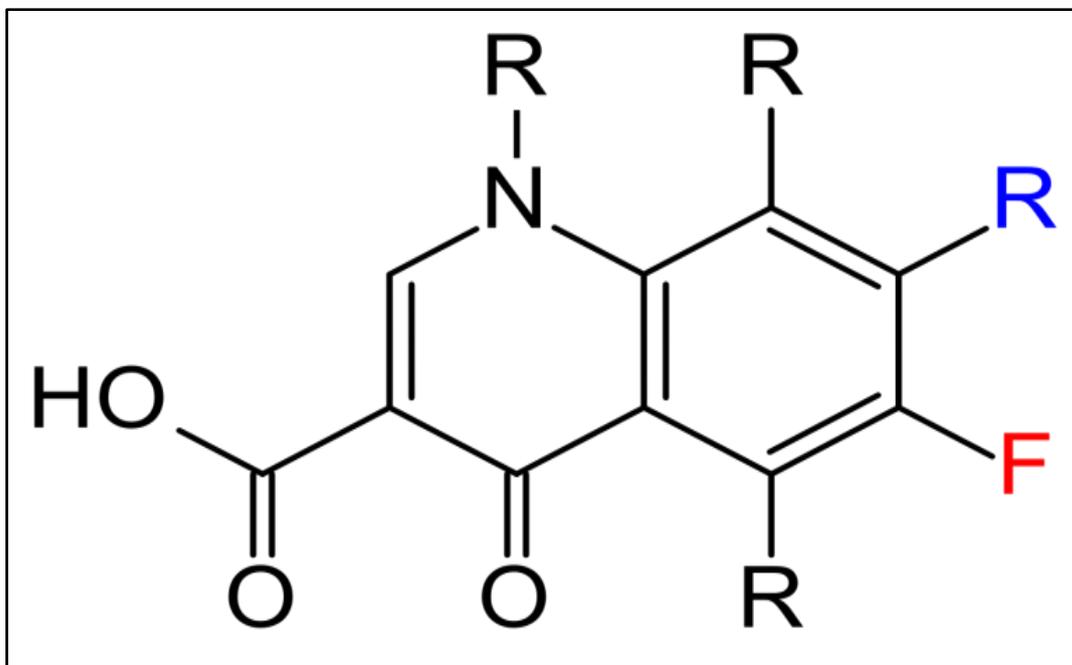


Figure 5. Structure de l'anneau de 4-quinolone (Asselineau *et al.*, 1973)

Le premier changement de la structure des fluoroquinolones ou quinolones de 2^{ème} génération est par l'addition d'une molécule de fluor en position 6 et d'un cycle azoté en position 7, la

Synthèse bibliographique

quinine avec une molécule de fluor en position 6. Cette modification augmente de plus de 10 fois l'inhibition de la gyrase et de 100 fois l'amélioration de la concentration minimale inhibitrice (Andersson *et al.*, 2003). Les autres quinolones ont été améliorées en ajoutant des groupes aux positions N1, C-5 et C-7 (Andersson *et al.*, 2003).

B. Mécanismes d'action

En général, l'ADN gyrase est considéré comme une principale cible de quinolone pour les espèces à Gram négatif et de la topoisomérase IV pour les espèces à Gram positif. Les quinolones agissent par deux actions (Correia *et al.*, 2017).

Mécanisme réversible : le mécanisme d'action des quinolones passe en réalité par la formation d'un complexe enzyme-ADN associant avec l'ADN bactérien, l'une des deux topoisomérases de classe II. Ce complexe bloque ensuite toutes sortes de réplication de l'ADN bactérien, ce qui explique l'activité bactériostatique des quinolones (Tillotson, 1996).

Les quinolones inhibent les topoisomérases de type II (gyrase) et IV empêchent leur action dans le déroulement harmonieux de l'ADN qui est nécessaire pour sa réplication (Hooper, 2003). L'ADN gyrase introduit un super-enroulement négatif dans la double hélice d'ADN bactérien. Cette activité est essentielle pour l'initiation de la réplication de l'ADN ainsi que pour sa transcription (Levine *et al.*, 1998).

La topoisomérase IV a une activité de décaténation, qui permet la séparation des chromosomes répliqués à la fin d'une séquence de réplication (Levine *et al.*, 1998). De plus, les coupures d'ADN double brin par les quinolones constitueraient des lésions non réparables de l'ADN, capables de déclencher l'inactivation de certaines synthèses protéiques responsable de l'effet bactéricide de ces antibiotiques (Drlica *et al.*, 2003).

Mécanisme irréversible : Il semble que l'action bactéricide passe en moins, par l'expression d'une protéine appelée « suicide », il est directement inductible par la présence de quinolone. Ceci peut expliquer le paradoxe observé par cette classe d'antibiotique, la présence de quinolone à haute concentration conduit à une réduction significative de la transcription bactérienne, ainsi le blocage de la traduction des protéines bactériennes, (la protéine suicide) qui serait manquante pour que l'effet bactéricide soit complet (Drlica, 2003).

III.2.3. Aminosides

Les aminosides, également connus sous le nom aminoglycosides, d'oligosaccharides ou d'amino-cyclidols constituent l'une des familles d'antibiotiques les plus puissantes utilisées pour traiter les infections bactériennes. La streptomycine est le premier aminoside découvert en 1944, suivie par la néomycine en 1949 (Umezawa, 1958), la Kanamycine en 1957 (Weinstein, 1963) et la gentamicine en 1963. De nombreux composés apparentés ont été isolés par la fermentation ou par des méthodes semi-synthétiques. Les composés sont chimiquement stables et bactéricides, avec un large spectre d'activité inhibitrice (Davies *et al.*, 2006). Ils constituent l'un des meilleurs choix pour le traitement des infections sévères à Gram négatif. L'activité antimicrobienne de l'aminoside peut être additive ou synergique en association avec les β -lactamines contre les infections à Gram-négatives et Gram-positives (Silverstein *et al.*, 2014).

A. Structure et classification

La structure chimique de base des aminosides est constituée d'un noyau d'aminocyclitol (streptamine, 2-désoxystreptamine ou streptidine) est relié à deux ou plusieurs sucres aminés. La fonction amine est ionisée formant des polycations. Parmi les trois principaux groupes structuraux d'aminoglycosides atypiques, les composés 4,6-disubstitués sont les plus couramment utilisés en clinique (Silverstein *et al.*, 2014). Les composés 2-DOS regroupent la plupart des composés utilisés en thérapeutique humaine comme, la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine et la nétilmicine (Nguyen et Lambert, 2012).

B. Mécanisme d'action

Tous les aminosides ont le même mode d'action antibactérien, le ribosome est la principale cible. Les aminoglycosides s'attachent d'abord sur les composés anioniques à la surface bactérienne. Dans le cas des bactéries à Gram négatives, ces composés sont des lipopolysaccharides, phospholipides, et des protéines de la membrane externe. Dans le cas des bactéries à Gram positives, il s'agit principalement d'acides téichoïques et phospholipides. Ces interactions produisent une augmentation de la perméabilité qui entraîne la pénétration de certaines molécules d'aminoglycosides dans l'espace périplasmique (Ramirez *et al.*, 2010).

Synthèse bibliographique

Ces molécules inhibent la synthèse des protéines bactériennes se liant au site aminoacyl de l'ARN 16S de la sous-unité du ribosome 50S. La liaison de l'aminoglycoside avec les sous-unités du ribosome bactérien perturbe la synthèse des protéines de trois façons:

Les aminoglycosides attaquent les ribosomes pour se séparer de l'ARNm (**Ramirez et al., 2010**). Le blocage du mouvement des ribosomes peut survenir après la formation d'un seul complexe d'initiation, il conduit à la séparation de la chaîne d'ARNm avec un seul ribosome, appelé un monosome. Cela entraîne une synthèse protéique inefficace (**Ramirez et al., 2010**). Le mécanisme est appelé de "prise en charge auto-promue".

La première étape "phase I dépendant de l'énergie": un petit nombre des molécules d'aminoglycosides atteignent le cytoplasme avec la participation d'un système de transport d'électrons fonctionnel. En conséquence, ces protéines membranaires cytoplasmiques induisent des dommages de l'intégrité de la membrane cytoplasmique en facilitant l'entrée de la molécule d'aminoglycosides en quantités abondantes (**Ramirez et al., 2010**).

Cette deuxième étape «phase II dépendant de l'énergie»: un nombre élevé d'aminoglycoside à l'intérieur de la cellule produisent des niveaux élevés des erreurs de la synthèse des protéines entraînant plus de dommages dans la membrane cytoplasmique, ce qui permet un taux d'absorption encore plus élevé qui aboutit finalement à la mort de la cellule (**Ramirez et al., 2017**). Cette stratégie suggère que l'action des aminosides peut ne pas être limitée à la synthèse protéique et donc explique leur effet bactéricide rapide (**Forgeat Schacht, 2000**).

III.2.4. Facteur d'échec de gestion d'infection

Les principaux facteurs d'échec de gestion d'infection causée par *P. mirabilis* sont la résistance aux antibiotiques issue de l'antibiothérapie probabiliste non orientée dans les hôpitaux et les centres ambulatoires (dispensaires publics).

III.2.4.1. Antibiothérapie probabiliste non orientée

L'antibiothérapie non orientée semble être une cause majeure d'échec de traitement. La résistance aux antibiotiques peut résulter de la mauvaise façon de prendre des antibiotiques ou lorsqu'ils ne sont pas nécessaires. Les bactéries changent ou s'adaptent avec le temps, cela est particulièrement vrai pour les bactéries exposées à un antibiotique mais non tuées. Lorsque les

Synthèse bibliographique

bactéries survivent à un traitement d'antibiotique, un autre antibiotique doit être utilisé. Si les bactéries deviennent résistantes à celui-ci, il en faut un autre. Le problème peut persister jusqu'à ce qu'une bactérie particulière ne puisse plus être traitée.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 80% des antibiotiques sont utilisés dans la communauté, dont environ 20 à 50% sont utilisés de façon inappropriée (WHO,2007).Des études avaient démontré que le taux d'utilisation inappropriée d'antibiotiques était associée aux différents facteurs: culture (Cizman, 2003), insatisfaction des services de santé (Saradamma *et al.*,2000)et stockage d'antibiotique à domicile (Yu *etal.*,2014).

III.2.4.2.La résistance aux antibiotiques

Des cas de résistance de *P.mirabilis* ont été exposés vis-à-vis de tous les antibiotiques proposés pour le traitement.Le taux de résistance aux antibiotiques atteint un seuil élevé en cas d'échec de traitement. L'analyse statistique a révélé des profils de résistance aux antibiotiques beaucoup plus complexes chez les souches de *P. mirabilis*.

Endimiani *et al*(2005) ont constaté que l'échec du traitement et la mort sont susceptibles de se produire chez les patients atteints de *P. mirabilis* productrices de bêta-lactamase (Endimiani *et al.*,2005).Les raisons des échecs thérapeutiques associées aux infections causées par des bactéries résistantes sont probablement multifactorielles,mais comprennent la structure bactérienne, la sévérité de la maladie (Patel *et al.*,2008 ;Friedman *et al.*,2016),le retard dans l'instauration d'un traitement efficace (Lautenbach *etal.*,2001 ;Friedman *et al.*,2016).La propagation des clones à haut risque provoquent des infections difficiles à traiter (Friedman *et al.*,2016).Ceci aurait aussi pu permettre la prescription d'une antibiothérapie probabiliste adaptée(Maamar *et al.*, 2019).Les infections à *P.mirabilis* multirésistantes aux antibiotiques sont associées à des résultats plus lourds, dont la durée d'hospitalisation plus longue, des taux de mortalités plus élevés et une augmentation des dépenses de soins(Maamar *et al.*, 2019).

III.3.*Proteus mirabilis* et la résistance aux antibiotiques

III.3.1. Résistance naturelle chez *P. mirabilis*

Ce type de résistance associée à des caractéristiques structurelles de la bactérie n'est pas de

Synthèse bibliographique

propriété héréditaire (résistance innée). Dès le début, les antibiotiques n'atteignant pas sa cible en raison de caractéristiques de l'antibiotique. *P. mirabilis* est naturellement résistant à polymyxines B (colistine), la pénicilline G, l'oxacilline, macrolide, lincosamide, streptogramine, glycopeptide et l'acide fusidique, tétracycline (Sud *et al.*, 1970).

Ce modèle intrinsèque de résistance à la colistine est dû à la modification de la composition du lipopolysaccharide (LPS) chez *P. mirabilis*. Ces modifications ont la conséquence de la diminution la charge négative du lipopolysaccharide (LPS) essentiellement via l'ajout de résidus chargés positivement, ce qui entraîne une diminution d'affinité de la colistine (elle-même chargée positivement) pour sa cible. D'autres mécanismes de résistance sont la synthèse d'une capsule externe qui absorbe le piégeage de la colistine et empêche ainsi son adhésion sur lipopolysaccharide (LPS). La surexpression de certaines pompes à efflux (la protéine de la membrane externe OprH) entraînent l'expulsion de l'antibiotique de la bactérie vers le milieu extracellulaire (Olaitan *et al.*, 2014). Les altérations du lipopolysaccharide (LPS) sont liées aux modifications du lipide A via l'addition de deux types distincts cationiques (phosphoéthanolamines [petn] ou 4-amino-4-désoxy-L-arabinose [L-Ara4N]).

L'étude de la résistance au carbapénème chez *P. mirabilis* définit l'affinité de l'imipénème réduit la protéine de liaison à la pénicilline (PBP). La modification de la protéine de liaison à la pénicilline (PBP) peut résulter d'une résistance à l'imipénème chez *P. mirabilis*, comme indiqué pour *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* (Neuwirth *et al.*, 1995).

III.3.2. Evolution de la résistance chez *P. mirabilis* (Acquisition verticale)

III.3.2.2. Mutation chromosomique spontanée (évolution verticale)

L'adaptabilité et la flexibilité de génome de *P. mirabilis* jouent un rôle important dans l'apparition des différents types de mécanismes de résistance. *P. mirabilis* peut s'acquérir des mutations chromosomiques à cause des prescriptions anarchiques qui sont souvent mal ciblées, ou incorrectement dosées. La résistance chez *P. mirabilis* résulte essentiellement des mutations ponctuelles au niveau des gènes codant pour les sous-unités A et B de l'ADN gyrase (*gyrA* et *gyrB*) et les sous-unités C et E de la topoisomérase IV (*ParC* et *ParE*) en fonction de la cible privilégiée de la molécule (Mérens *et al.*, 2010). En général, les mutations provoquent une résistance aux antibiotiques par la modification de l'action des antibiotiques.

Chez *P. mirabilis*, ces mutations sont principalement localisées dans de courtes régions situées

Synthèse bibliographique

entre les acides aminés 67 et 106 du gène *gyrA* et les acides aminés 63 et 102 du gène *parC*, appelées QRDR (Quinolone Resistance Determining Region). Le premier site de mutation est l'ADN gyrase car c'est la cible principale, les substitutions en positions 83 et 87 du *gyrA*, notamment celles du type Ser83Leu et Asp87Asn et la substitution en position 80 du *parC*, notamment celle du type Ser80e (Weigel *et al.*, 2002 ; Mérens *et al.*, 2010 ; Siebor *et al.*, 2018).

En Algérie, plusieurs études ont rapporté la prédominance de ces types de mutations chez des souches d'*E. coli* résistantes aux quinolones (Weigel *et al.*, 2002 ; Mérens *et al.*, 2010 ; Siebor *et al.*, 2018). Des mutations associées à la résistance au fluoroquinolone ont été détectées chez *P. mirabilis*. Elles sont déterminées par l'analyse génétique de la région déterminant la résistance à la quinolone de *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* (Weigel *et al.*, 2002 ; Siebor *et al.*, 2018).

III.3.2.3. Evolution horizontale de résistance chez *P. mirabilis* (acquisition horizontale)

L'évolution horizontale de la résistance chez *P. mirabilis* procède par l'acquisition des gènes de résistance par l'intermédiaire d'un plasmide, de transposon ou d'intégrant, à la faveur de 3 mécanismes d'échanges possibles : conjugaison, transformation ou transposition (Guinoiseau, 2010).

À l'heure actuelle, il semble probable que de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques proviennent de germes environnementaux dotés d'une plasticité génétique naturelle. Ce qui permet de réagir à un large éventail de menaces liées aux substances antimicrobiennes offrant une protection contre les substances toxiques. De plus, selon cette hypothèse, les bactéries proches de ces microorganismes et de la même niche écologique acquièrent des gènes de résistance intrinsèque permettant une capacité de survie et de se multiplier dans cet environnement hostile (Pagès *et al.*, 2008 ; Munita et Arias, 2016).

Cette théorie est encore renforcée par l'existence de nombreuses similitudes génétiques et biochimiques entre les déterminants de la résistance provenant des bactéries produisant l'antibiotique et les gènes de résistance les plus largement répandus actuellement identifiés dans les bactéries à Gram négatif et Gram positif (Pagès *et al.*, 2008 ; Munita et Arias, 2016). *P. mirabilis* peut acquérir une résistance vis-à-vis d'un antibiotique par le biais de

Synthèse bibliographique

mutations chromosomiques verticalement transmissible. Par la suite, la résistance transmise horizontalement vers les autres souches est induite par des mécanismes moléculaires complexes.

L'utilisation systématique d'antibiotique dans les pratiques médicales et agricoles entraîne un transfert horizontal généralisé des éléments génétiques mobiles porteurs d'un ou de plusieurs gènes de résistance (Levesque *et al.*, 1995 ; Soucy *et al.*, 2015). Les plasmides, transposons et intégrons jouent un rôle majeur dans la diffusion de cassettes codant la résistance aux antibiotiques parmi les espèces bactériennes (Hansson *et al.*, 2002).

De nombreux gènes de résistance aux antibiotiques chez *P. mirabilis* se trouvent dans des éléments mobiles (cassettes de gène) (Recchia et Hall, 1995). Les intégrons sont constitués de deux segments d'ADN conservés séparés par une région variable contenant une ou plusieurs cassettes de gènes de résistance aux antibiotiques. La mobilité de la cassette de gène contribue à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques (Recchia et Hall, 1995). De plus, la flexibilité génétique permet de réarranger de nombreuses cassettes sous pression sélective des antibiotiques (Kim *et al.*, 2004).

III.4. Mécanisme de résistance aux antibiotiques

P. mirabilis semble avoir développé certains mécanismes de résistance par rapport à d'autres. Le mécanisme prédominant de résistance aux β -lactames chez *P. mirabilis* est la production de β -lactamase (mécanisme enzymatique), alors que la résistance de ces composés chez les bactéries à Gram positif est principalement obtenue par la modification de leur site cible (protéines de liaison à la pénicilline) (mécanisme non enzymatique) (González-Bello, 2017). Cette différence est probablement due à la différence entre l'enveloppe de la bactérie Gram négatif et celle de Gram positif.

III.4.1. Mécanisme de résistance enzymatique (production de bêta-lactamases)

La production des enzymes est l'une des stratégies bactériennes les plus efficaces pour désactiver les antibiotiques. Elle implique des modifications chimiques qui détruisent la molécule elle-même et empêchent ainsi l'antibiotique d'interagir avec sa cible chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Nikaido., 2009).

III.4.1.1. Modification enzymatique de la molécule

Les mécanismes de résistance déployés par *P.mirabilis* est la modification enzymatique de la molécule qui consiste à transformer le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou addition d'un groupe chimique. Cette modification empêche l'antibiotique de se lier avec sa cible et provoque une perte d'activité. Les β -lactamases sont des enzymes produites par des bactéries qui détruisent le lien amide sur le cycle lactame, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle (**Ambler, 1980**).

III.4.1.2. Mécanisme d'action des bêta-lactamases

La présence d'une membrane externe permet de contrôler l'entrée de la molécule dans l'espace périplasmique. En effet, la plupart des β -lactames ont besoin des porines spécifiques pour atteindre les protéines de liaison à la pénicilline (PBPs), situées dans la membrane interne. Par conséquent, la cellule bactérienne contrôle l'accès de ces molécules dans l'espace périplasmique, permettant ainsi la production de β -lactamases à des concentrations suffisantes pour faire pencher la cinétique en faveur de la destruction de la molécule d'antibiotique (**Munita et Arias., 2016**).

Le mécanisme principal de la résistance aux β -lactames repose sur la destruction de ces composés par l'action des β -lactamases. Ces enzymes détruisent la liaison amide du cycle β -lactame rendant l'antibiotique inefficace. En 1960, le découvreur de première β -lactamase qui est portée par un plasmide (hydrolyser l'ampicilline). Depuis lors, l'émergence rapide de l'enzyme est capable de détruire tous les nouveaux composés est un processus qui constitue un excellent exemple d'évolution adaptative des bactéries (**Munita et Arias., 2016**).

III.4.1.3. Classification des bêta-lactamases

À ce jour, plus de 1 000 différentes β -lactamases ont été décrites dans le cadre du processus normal d'évolution bactérienne (**Munita et Arias., 2016 ; Bush et al., 2016**). Ces enzymes sont classées en fonction de leurs caractéristiques fonctionnelles (**Bush et Jacoby, 2010**) ou de leur séquence en acides aminés (**Ambler, 1980**). Cette classification divise les bêta-lactamases en quatre groupes (A, B, C, D) en fonction des caractéristiques structurelles de la séquence

protéique.

La classe A correspond aux «pénicillinases» inhibées par l'acide clavulanique, la classe B correspond aux « carbapénémases» inhibées par l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), la classe C regroupe les « céphalosporinases » non inhibées par l'acide clavulanique, la classe D correspond aux oxacillinases de sensibilité variable à l'acide clavulanique. Les enzymes des classes A, C et D sont des serine-enzymes.

En revanche, les enzymes de la classe B sont des métallo- β -lactamases comportant deux atomes de zinc dans leur site actif. La classification fonctionnelle de Bush, Jacoby et Medeiros repose sur l'activité hydrolytique et la sensibilité des β -lactamases aux inhibiteurs. Elle rend compte de leur diversité fonctionnelle au sein des quatre classes structurales d'Ambler.

A. Bêta-lactamases de classe C (AmpC chromosomique)

P. mirabilis présente plusieurs systèmes enzymatiques responsables de la dégradation des bêta-lactamines, qui permettent à cette bactérie de résister aux différents niveaux de concentration. Elle sécrète une céphalosporinase chromosomique inductible de type AmpC qui peut entraîner une résistance aux diverses β -lactamines dont : la ticarcilline, la pipéracilline, les céphamycines, les céphalosporines de troisième génération, l'aztréonam et combinaisons des pénicillines avec les inhibiteurs de β -lactamases, les céphalosporines de quatrième génération (céfépime, cefpirome) (**Philippon et Arlet, 2002; Bonnet et al., 2012**).

La régulation de l'expression de céphalosporinase d'AmpC chez cette espèce diffère considérablement de celle chez les autres entérobactéries productrices naturellement d'une céphalosporinase AmpC inductible. Cette différence est due à l'absence du gène régulateur *ampR* et à la présence d'un atténuateur transcriptionnel diminuant ainsi la force du promoteur (**Jacoby et al., 2009**). Cependant, l'hyperproduction de céphalosporinase AmpC associée à une certaine diminution de la perméabilité au carbapénème peut aussi causer la résistance à ces agents (**Bush et al., 1995; Jacoby et al., 2009**). Cette hyperproduction est due à des mutations dans le promoteur et / ou l'atténuateur, ce qui augmente le taux de transcription du gène (**Bush et al., 1995; Jacoby et al., 2009**).

B-Bêta-lactamases de classe C (AmpC plasmidique)

Le groupe 1 est subdivisé en sous-groupe 2^e, ils sont appelés les β -lactamases à spectre étendu AmpC. Le groupe 1 possède une plus grande activité contre la céftazidime et d'autres oxyimino- β -lactames (**Bush et Jacoby ., 2010**). Les gènes de β -lactamases d'AmpC décrits chez *P. mirabilis* appartiennent aux familles ACC et CMY, ce sont des gènes chromosomiques de *Hafnia alvei* et *Citrobacter freundii*. Ils sont codés par des plasmides ou insérés dans le chromosome (probablement par transposition) chez *P. mirabilis* (**Decré et al., 2002**). En Algérie, la production de β -lactamase de classe C (CMY-4, CMY-2, CMY-16) a été décrite chez 3 souches de *P. mirabilis* (**Decré et al., 2002 ; Iabadene et al., 2009 ; Gharout-Sait et al., 2015**).

La découverte des gènes chromosomiques chez de nombreuses entérobactéries naturellement productrices de β -lactamase a constitué une nouvelle étape de la résistance acquise par la mobilisation des gènes chromosomiques (**Philippon et al., 2002**). De nombreuses céphalosporinases plasmidiques ont été décrites dans le monde chez des souches hospitalières et communautaires (**Jacoby, 2009**). Des différences dans leurs séquences en acides aminés ont permis de les classer en plusieurs familles : CMY, ACT, ACC, DHA, FOX, MOX, LAT, MIR et CFE. Ils peuvent induire une résistance aux carbapénèmes, en particulier, à l'ertapénème (**Bush et Jacoby., 2010**).

La première description de DHA-1 chez *Proteus mirabilis* a été décrite en France (**Bidet et al., 2005**). Les β -lactamases de classe C (CMY-4, CMY-2, CMY-16) chez *P. mirabilis* ont été décrites dans le monde d'entier, en particulier chez des patients d'origine de Grèce, Algérie et Égypte (**Decré et al., 2002**).

C- Bêta-lactamases de classe A (BLSE)

Ces derniers temps, de nombreux rapports épidémiologiques ont démontré l'échec thérapeutique et le manque d'éradication des souches *P. mirabilis* productrices de bêta-lactamases qui est dûe à l'utilisation massive. Cette résistance est typiquement causée par l'acquisition des plasmides contenant des gènes de bêta-lactamase (BLSE), ces plasmides portent souvent d'autres gènes de résistance (**Luzzaro et al., 2001**).

Ces enzymes sont définies comme des β -lactamases appartenant à la classe A selon la

Synthèse bibliographique

classification d'Amblar (**Philipponet et al., 2002**). Ils sont capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de 1ère, 2ème, 3ème et 4ème génération et les monobactames. Par contre, les céphamycines (céfoxitine, céfotétan) et les carbapénèmes restent actifs (**Livermore, 2008**). Les bêta-lactamases de type TEM et SHV, CTX-M sont portées sur un chromosome de l'espèce de *Kluyvera* (**Bonnet et al., 2004**). Les enzymes de CTX-M hydrolysent le céfotaxime plus facilement que la céftazidime et le céfépime. Les enzymes de type CTX-M sont inhibées par le tazobactam et l'acide clavulanique (**Bonnet et al., 2004**).

Les premières bêta-lactamases ont émergé chez des souches mutantes de *P. mirabilis* suite à l'utilisation massive des bêta-lactamines à la fin des années 90 (**Bonnet et al., 1999**). Elles ont d'abord été décrites en France (**Bonnet et al., 1999 ; Chanal et al., 2000 ; Champs et al., 2001**), puis en Italie chez des souches de *P. mirabilis* multirésistantes d'origine nosocomiales (**Luzzaro et al., 2001 ; Aragón et al., 2008**). Ces enzymes ont rapidement diffusé à travers tous les continents (**Karapavlidou et al., 2005**). Ces enzymes ont été classées en 12 familles différentes en fonction de leurs séquences en acides aminés: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES, SFO, IBC, BEL (**Cantón et al., 2000**).

Plus de 100 dérivés de bêta-lactamases de type TEM sont produits par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés à partir du TEM-1 au niveau de quelques résidus (238 et 240) (**Partridge et Hall, 2005**). La diversité de bêta-lactamases de type TEM-1a a été décrite chez *P. mirabilis*, il est responsable de plusieurs épidémies nosocomiales dans le monde (**Biendo et al., 2005**).

Une centaine de bêta-lactamases de type SHV-1 (SHV-5, SHV-12, SHV-14) dérivent par la substitution d'un ou de plusieurs acides aminés (**Szabo et al., 2005**). Récemment, le gène SHV-128 a été décrit en Asie chez des souches cliniques *P. mirabilis* (**Ho et al., 2005 ; Chong et al., 2013**). Seulement quelques études ont signalé la présence des variants SHV-12, SHV-2 et SHV-5 chez *P. mirabilis* d'origine hospitalière en France et en Tunisie (**Chanal et al., 2000 ; Mahrouki et al., 2012**).

Une nouvelle enzyme de bêta-lactamases de type CTX-M appartenant à la classe A est apparue, elle hydrolyse préférentiellement le céfotaxime. A ce jour, plus de 150 variants CTX-M ont été décrits et répartis en 6 groupes phylogénétiques en fonction de la similitude

Synthèse bibliographique

de leurs séquences en acides aminés (**Livermore et al., 2007**). Depuis leurs apparitions, ces enzymes sont rapidement dispersées à travers les continents. L'enzyme de CTX-M-15 a été détecté dans toutes les régions géographiques (**Mahrouki et al., 2012 ; Harada et al., 2010 ; Leulmi et al., 2018**). Ils ont été trouvés dans la plupart des pays en Europe (**D'Andrea et al., 2011**).

D- Carbapénèmases de classe B

Ces dernières décennies, les carbapénèmes sont les antibiotiques de dernier recours utilisés pour traiter les infections compliquées dues aux souches multirésistantes. Cette résistance est principalement associée à la production d'une céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique) (**Girlich et al., 2016**). Le mécanisme met en jeu des carbapénèmases qui hydrolyse fortement les carbapénèmes (**Girlich et al., 2016**). Elles représentent plus de 350 enzymes génétiquement diverses. Les carbapénèmases de classe A confèrent une résistance à toutes les β -lactamines. Elles sont peu inhibées par l'acide clavulanique (**Bush et al., 1995**).

Les enzymes de groupe A ont été trouvées chez *P. mirabilis* d'origine clinique (**Nordmann et al., 2010**). Les enzymes de type KPC ont été découvertes chez *P. mirabilis* en France et aux États-Unis (**Poirel et al., 2007**). L'enzyme porte une résistance à tous les agents antimicrobiens du β -lactame (les céphalosporines, céphamycines, pénicillines et monobactames, carbapénèmes) (**Tibbetts et al., 2008 ; Chong et al., 2013**).

P. mirabilis peut développer la résistance aux carbapénèmes via la production des métallo- β -lactamases. Ces enzymes sont classées en groupe B ou métallo- β -lactamases (MBL). Celles-ci sont résistantes aux inhibiteurs de la sérine β -lactamase. Les enzymes de groupe B sont: IMP, VIM, GIM, SPM, SIM, KHM, AIM, NDM sont actuellement les plus répandues chez les isolats cliniques (**Miriagou et al., 2010 ; Markovska et al., 2017**).

Les métallo- β -lactamases de type VIM et IMP chez *P. mirabilis* ont été trouvées dans plusieurs régions du monde (**Miriagou et al., 2010 ; Markovska et al., 2017**). Le métallo- β -lactamase de type IMP a été décrite aux États Unis chez *P. mirabilis* entre 2009 et 2015. Le gène a été porté par un intégrons de classe 2 (**Dixon et al., 2016**). Ces enzymes sont portées sur des éléments génétiques mobiles qui facilitent leurs propagations chez toutes les

entérobactéries.

***Bêta-lactamases de classe D selon Ambler**

Les β -lactamases de classe D dérivent de 440 variants. Ce sont des enzymes qui dégradent l'oxacilline. Elles sont codées par des plasmides ou des transposons qui peuvent être transférés par conjugaison d'espèces de staphylocoque (Bush *et al.*, 1995). Par la suite, ces gènes ont été diffusés vers plusieurs bactéries à Gram négatif. L'enzyme OXA-48 représente le carbapénémase le plus fréquemment isolé chez les entérobactéries (Girlich *et al.*, 2016). Les souches de *P. mirabilis* productrices de l'enzyme d'OXA-48 ont émergé en France (Girlich *et al.*, 2016).

Le gène *bla*_{OXA-58} localisé sur un élément de 31 kb est associé à un gène de type *bla*_{AmpC}, cela montre l'importance de transfert horizontal des gènes de résistance et la plasticité génétique (Girlich *et al.*, 2016). En Palestine, le gène *bla*_{OXA-48} a été détecté chez *P. mirabilis* en association avec le gène de la β -lactamase *bla*_{CTX-M-14} localisé sur un plasmide IncL/M de taille 72 kb (Chen *et al.*, 2015). En France, le gène OXA-23 a été détecté sur un chromosome de *P. mirabilis* (Bonnet *et al.*, 2002). En Algérie, cette enzyme est parmi les carbapénémases les plus répandues à Béjaïa (Agabou *et al.*, 2014).

III.4.1.4. Support génétique et les conducteurs moléculaires

Comme beaucoup d'autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, *P. mirabilis* peut héberger de nombreux déterminants de la résistance aux antimicrobiens induits par les plasmides et les intégrons (Nikaido, 2009). L'appareil génétique bactérien est constitué par les éléments extrachromosomiques (plasmides, transposons, intégrons, séquences d'insertion, etc.). Les gènes accessoires sont localisés sur un transposon ou un phage portant l'information génétique permettant à la cellule d'acquérir une meilleure adaptation.

Les enzymes de type AmpC sont généralement codées par des éléments génétiques mobiles (Nikaido, 2009). Ces gènes font partie d'intégrons, ce qui facilite leur dissémination. En termes d'expression, la transcription de ces gènes peut être constitutive ou nécessiter un signal externe pour induire leur production. Actuellement, plus de 200 bêta-lactamases sont en général portées par des plasmides et des transposons expliquant la rapidité de leur diffusion

(Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006). La dissémination de gène est aussi facilitée par le fait qu'ils fassent partie des transposons (Uemura *et al.*, 2010). L'emplacement de ces enzymes sur des plasmides favorise leur transfert entre les bactéries du même genre et de genre différent (Uemura *et al.*, 2010).

Les gènes CTX-M ont été capturés grâce à des éléments génétiques mobiles de type séquence d'insertion ou grâce à des phages, et transférés sur des plasmides conjugatifs qui ont ensuite diffusé parmi les entérobactéries pathogènes (Rodriguez-Villalobos et Struelens, 2006).

III.4.2. Destruction enzymatique de la molécule (aminoside)

La destruction enzymatique d'aminoside est l'un des mécanismes de résistance les plus courants chez les bactéries à Gram négatifs et positifs.

III.4.2.1. Classification

Il existe trois classes d'enzymes classées en fonction du radical qu'elle catalyse : les N-acétyltransférases (AAC) qui neutralisent les fonctions -N112, les O-nucléotidyltransférases (ANTs), et les O-phosphotransférases (APHs) (Ramirez *et al.*, 2010). De nombreux d'enzymes modifiant les aminoglycosides (AMEs) sont devenus le mécanisme prédominant de la résistance aux aminosides dans le monde (Ramirez *et al.*, 2010).

Le site de la modification représente un nombre compris entre 1 et 6 correspondant au carbone (Munita et Arias ., 2016). Ces enzymes se propagent d'une façon variable en fonction des espèces bactériennes spécifiques qu'elles affectent. Par exemple, la famille d'APH (3) est l'enzyme qui modifie la kanamycine et la streptomycine.

Les aminoglycosides phosphotransférases (APHs) appartiennent à la famille d'isozymes. Il existe sept classes de phosphotransférases d'aminoglycosides: APH(3'), APH(2''), APH(3''), APH(7''), APH(4), APH(6) et APH(9) (Munita et Arias ., 2016). La classe la plus importante étant des APH(3') (Munita et Arias ., 2016). Plusieurs variants d'APH ont été notés chez *P. mirabilis* dans le monde: APH(4)-Ia, APH(6)-Ic, APH(6)-Id, APH(3')-Ia, APH(3')-Ib, APH(3')-IIa et APH(2'')-Iia (Munita et Arias ., 2016).

Synthèse bibliographique

Les informations génétiques de ces enzymes sont codées par des transposons ou des intégrants, elles peuvent aussi acétyler les aminoglycosides au niveau un hydroxyle en position 6' (Munita et Arias ., 2016). Chez *P.mirabilis*, plusieurs gènes d'acétyltransférases ont été identifiés dans les différentes régions géographiques: *AAC(1)*, *AAC(3)-Ia*, *AAC(3)-IIb*, *AAC(3)-IIc*, *AAC(3)-IVa*, *AAC(3)-VIa*, *AAC(6')-Ia*, *AAC(6')-Im* et *AAC(6')-Ib-cr* (Miró et al., 2013).

Les aminoglycosides nucléotidyltransférases (ANT) représentent la famille d'enzyme la moins diversifiée tant par le nombre d'enzymes existantes. Il existe 5 classes regroupent plusieurs isozymes dont: ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6) et ANT(9). L'activité et la distribution des enzymes AMEs au sein d'une même famille varient également en fonction de type d'antibiotique (Ramirez et al., 2010). C'est une enzyme bifonctionnelle qui possède une activité d'acétylation et de phosphotransférase, il est probablement dérivée de la fusion de deux gènes codant pour les enzymes (AMEs). Le gène codant ANT(2'') est le plus détecté chez *P.mirabilis*. Le gène ANT (3'') a été également trouvé chez *enterobacter cloacae* en Est de l'Algérie (Khennouchi et al., 2015).

III.4.2.2. Supports génétiques des gènes de résistance aminoside

Chez *P.mirabilis*, les gènes codant les enzymes modifiant les aminoglycosides (AMEs) sont très mobiles. Ils sont souvent associés aux gènes de résistance aux β -lactamines et aux quinolones (Les AMEs sont très mobiles). Les enzymes modifiant les aminoglycosides (AMEs) sont transférés par des plasmides, des intégrons, des transposons et d'autres éléments transposables (Wachino et Arakawa ., 2012). Les enzymes AMEs sont codées dans le chromosome chez certaines espèces bactériennes, comme *Providencia stuartii*, *Serratia marcescens* et *Enterococcus faecium* (Ramirez et al., 2010).

III.4.3. Destruction enzymatique de la molécule (quinolones)

La résistance aux quinolones « *qnrA1* » a été décrite pour la première fois en 1998. La famille des pentapeptides (*qnrA*, *qnrB* et *qnrS*) inhibent la fixation de quinolone sur la cible ADN gyrase/ADN (Tran et Jacoby, 2002 ; Mahrouki et al., 2013). À ce jour, Six déterminants *qnr* ont été décrits (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD* et *qnrVC*) ainsi que des différents variants des protéines ont été identifiés *qnrA* (n=8), *qnrB* (n=88), *qnrS* (n=9), *qnrD* (2) et *qnrVC* (7)

(Andersson *et al.*, 2003).

La prévalence de la déterminante *qnr* chez des souches de *P.mirabilis* a été évaluée dans le monde entier (*qnrA1*, *qnrB2*, *qnrB4*, *qnrB10*, *qnrB24*, *qnrS1* et *qnrS2*) (Mahrouki *et al.*, 2013). Un mécanisme de résistance aux quinolones a été décrit chez des souches isolées en Algérie est souvent relié avec d'autres mécanismes de résistance comme les bêta-lactamases (BLSEs) (Ibadene *et al.*, 2008). Chez *P.mirabilis*, les déterminants de *qnr* sont principalement détectés dans plusieurs régions en prenant l'exemple de gènes *qnrA6* et *qnrD* en Tunisie (Mahrouki *et al.*, 2013) et de gène *qnrD* en Europe (Koncanet *et al.*, 2010).

- **Support génétique des gènes de résistance aux quinolones**

Le support de la résistance aux quinolones était supposé être uniquement chromosomique. Des études récentes indiquent que *P.mirabilis* présente également des mécanismes de résistance enzymatique médiés par des plasmides. Le support de la résistance aux quinolones est un plasmide transférable (Martinez-Martinez *et al.*, 1998).

III.4.4. Mécanisme de résistance non enzymatique

III.4.4.1. Modification de la cible de l'antibiotique

- **Les bêta-lactamines : modification des « protéines de liaison à la pénicilline (PLP) »**

La modification de la cible est un mécanisme de résistance décrit pour presque tous les antibiotiques. Les cellules bactériennes sont entourées d'une paroi cellulaire constituée de peptidoglycane (polymères à long sucre). Le peptidoglycane subit une réticulation des brins de glycanes par l'action de transglycosidases. Les chaînes peptidiques prolongent les sucres dans les polymères qui forment des liaisons croisées peptide par peptide. La partie D-alanyl-alanine de la chaîne peptidique est réticulée par des résidus glycine en présence de protéines de liaison à la pénicilline (PLP) (Kapoor *et al.*, 2017).

Les β -lactames et les glycopeptides inhibent la synthèse de la paroi cellulaire en modifiant l'affinité d'une ou de plusieurs cibles de type PLP (protéines liant la pénicilline) (Munita et Arias, 2016).

Le changement de la protéine (PLP) chez *P.mirabilis* a mené à la résistance car les protéines (PLPs) modifiées présentent une affinité plus faible pour les bêta-lactamines. Elles sont

relativement résistantes à l'inactivation par les pénicillines et sont capables de remplir les fonctions des protéines (PLP) lorsque ces dernières sont inactivées (**Gruner et al., 1985**).

- **Support génétique des protéines de liaison à la pénicilline**

Ce type de résistance peut être acquis par du matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique ou peut-être d'une mutation de la séquence nucléotidique de la cible (**Munita et Arias ., 2016**).

III.4.4.2. Altération des sites de liaison ribosomale

Les modifications de la cible ribosomale comportent plusieurs mécanismes : la mutation de l'ARN 16S, et méthylation de l'ARN 16S sur certaines bases situées au niveau du site A de l'ARNr 16S (site de liaison des aminosides sur le ribosome), ce qui inhibe la liaison de ces antibiotiques sur la sous-unité 30S ribosomale (**Munita et Arias ., 2016**).

L'expression de la résistance requiert l'altération de la majorité des ribosomes. Chez la plupart des bactéries, il existe plusieurs copies de l'opéron RNAr qui constitue donc un facteur limitant pour l'apparition de la résistance ((**Munita et Arias ., 2016**)).

La méthylation de l'ARN 16S est un mécanisme émergent chez *P. mirabilis* (**Fritsche et al., 2008**). Les gènes de la méthyltransférase ARNr16S sont divisés en onze déterminants: celles qui méthylent en position N7 du nucléotide G1405 (les gènes codant *ArmA*, *RmtA*, *RmtB*, *RmtC*, *RmtD1*, *RmtD2*, *RmtE*, *RmtF*, *RmtG* et *RmtH*) et celles qui méthylent en position N1 de A1408 comme RMTase NmpA N1-A1408 qui confère une résistance totale aux aminosides (**Fritsche et al ., 2008**). Les enzymes *RmtB* et *ArmA* sont actuellement les RMTases 16S prédominantes et leurs gènes sont répandus dans le monde entier (**Fritsche et al., 2008 ; Galani et al., 2012**).

Le gène codant pour l'enzyme méthyltransférase *rmtC* a été découvert chez 2 isolats cliniques de *P. mirabilis* au Japon et en Australie entre 2006 et 2008 (**Fritsche et al., 2008**). Le gène codant pour l'enzyme *RmtB* a été détecté pour la première fois chez *P. mirabilis* en Europe exactement en Grèce (**Galani et al., 2012**).

- **Support génétique**

Les gènes responsables de l'altération des sites de liaison ribosomale sont généralement portés par des éléments génétiques mobiles qui sont intégrés dans des plasmides transférables

Synthèse bibliographique

appartenant à divers groupes d'incompatibilité, ce qui favorise leur propagation mondiale (**Wachino et Arakawa, 2012**). Les méthylases *ArmA* et *RmtB* sont les plus fréquemment décrites chez *P.mirabilis* (**Galimand et al., 2003; Bogaerts et al., 2007; Yamane et al., 2007; Fritsche et al., 2008**).

L'enzyme *ArmA* est la première méthylase responsable de ce type de résistance détectée chez *Klebsiella pneumoniae*, il est porté par un transposon situé sur un plasmide conjugatif. Ce gène code pour une enzyme qui méthyle la position N7 de la guanine 1405 de l'ARN 16S au niveau du site A (**Galimand et al., 2003**).

III.4.4.3. Diminution de la perméabilité membranaire

C'est un mécanisme de résistance bien connu chez *P.mirabilis*. Les antibiotiques hydrophiles pénètrent dans la bactérie via des protéines transmembranaires appelées les porines, tandis que les molécules hydrophobes diffusent simplement à travers la couche phospholipidique. Le passage se fait par diffusion passive à travers les canaux que forment les protéines caniculaires appelées porines (**Pagès et al., 2008 ; Munita et Arias ., 2016**).

En outre, des mutations dans les gènes qui codent les porines entraînent leur perte ou la réduction de leur taille ou la diminution de leur expression. L'effet se traduira par l'acquisition de bas niveaux de sensibilité vis-à-vis de nombreux antibiotiques (**Pagès et al., 2008 ; Munita et Arias ., 2016**). La réduction de la perméabilité cellulaire se produit en diminuant l'entrée de l'antibiotique sur son site provoquant un changement de la perméabilité de la membrane interne ou externe de la bactérie. L'altération des porines dans la paroi des bactéries à Gram négatif peut réduire ou bloquer la pénétration de l'antibiotique jusqu'à son site d'action (**Pagès et al., 2008**).

Toute modification des porines rend le passage des molécules hydrophobes (telles que la famille des bêta-lactamines) encore plus difficile. L'absence de passage ou l'augmentation du temps de passage protège les bactéries et les rend résistantes. Une inhibition du transport actif à travers les peptidoglycane recouvre la membrane plasmique chez les bactéries à Gram positif. La modification de la composition du lipopolysaccharide (LPS), soit dans le polysaccharide, que ce soit dans le noyau peut également être à l'origine d'une diminution de la perméabilité (**Pagès et al., 2008**).

Synthèse bibliographique

P. mirabilis reçu un nouveau modèle de la résistance par des modifications de la perméabilité membranaire et le changement dans l'expression des porines (Nielubowicz *et al.*, 2008 ;Fernández et Hancock., 2012). Les 5 porines OmpA, OmpF, OmpW, PMI1017, et RafY ont été identifiés chez *P. mirabilis* qui réduisent l'entrée des antibiotiques (les fluoroquinolones et les bêta-lactamines) (Nielubowicz *et al.*, 2008 ;Fernández et Hancock., 2012). Le porine OmpA a été reliée à la virulence en promouvant l'adhérence bactérienne et l'entrée dans des cellules épithéliales (Nielubowicz *et al.*, 2008).

III.4.4.4. Pompes d'efflux (transporteurs)

Les pompes à efflux ou transporteurs actifs sont des protéines transmembranaires qui attribuent une résistance aux antibiotiques via la réduction de concentration de l'agent antimicrobien dans le cytoplasme de la bactérie. Ce mécanisme nécessite de l'énergie pour éliminer les antibiotiques à l'extérieur de la bactérie (efflux). Ces pompes à efflux représentent un mécanisme important dont les gènes sont fréquemment chromosomiques ou portés par des éléments génétiques mobiles (Nikaido, 2009).

Il existe deux pompes à efflux sur la base de leur spécificité de substrats et de la source d'énergie employée. Certains de ces transporteurs sont très spécifiques et on les appelle pompes MFP (MFP: Membrane Fusion Protein) alors que d'autres agissent sur une multitude de molécules et on les nomme pompes MDR (multiple-drug-resistance) (Nikaido, 2009).

Les pompes sont classées en deux groupes en fonction de la source d'énergie utilisée : des transporteurs ABC (cassette de liaison à l'ATP) qui utilisent l'ATP et certains composés. Les transporteurs secondaires qui exploitent le gradient électrochimique transmembranaire des protons et des ions sodium expulsent la molécule à l'extérieur de la cellule conduisant à la résistance aux multiples antibiotiques (Nikaido, 2009).

La nouvelle pompe *QepA* d'efflux à médiation plasmidique a été identifiée chez *P. mirabilis*. Elle est responsable de l'augmentation de la résistance au quinolone (la ciprofloxacine, la norfloxacine et l'enrofloxacine) (Yamane *et al.*, 2007). La pompe AcrAB Multidrug Efflux est associée à une réduction de la susceptibilité au tigécycline (GAR-936) chez *Proteus mirabilis* (Visalli *et al.*, 2003). Le système d'efflux Bcr / CflA a déjà été identifié comme un mécanisme important pour le développement de biofilms cristallins de *P.*

mirabilis(Nzakizwanayo *et al.*,2017).

III.5. Méthodes de typage

Les méthodes de typage sont essentielles pour comprendre l'épidémiologie des infections à *P.mirabilis*. Le typage des souches est important pour détecter les voies et la source de l'infection et connaître les souches épidémiques et endémiques et prévenir la transmission de l'infection entre les patients(Hafiane et Ravaoarino, 2008). À cet égard, les méthodes de typage moléculaire sont particulièrement importantes dans les foyers endémiques et épidémiques à *P.mirabilis* pour améliorer la gestion de ces épidémies. Du point de vue épidémiologique, les méthodes moléculaires développées depuis la décennie passée se distinguent par leur pouvoir discriminatoire élevé et leur reproductibilité (Hafiane et Ravaoarino, 2008). Dans de nombreux cas, les techniques moléculaires ont remplacé les méthodes de typage phénotypique. Plusieurs techniques de typage utilisées différentes les unes des autres en ce qui concerne les objectifs de l'étude, les coûts, la fiabilité et le pouvoir discriminant.

Les méthodes moléculaires et les méthodes ribotypage sont très discriminantes pour les isolats de *P.mirabilis*. L'électrophorèse en champ pulsé est une technique de référence, reproductible et discriminante mais relativement longue. Les techniques d'amplification aléatoire (RAPD, ERIC-PCR) sont faciles à mettre en oeuvre mais moins discriminantes ; elles peuvent être néanmoins adaptées à l'épidémiologie locale(Foxman *et al.*,2005).

L'électrophorèse en champ électrique pulsé (PFGE) permet d'établir une empreinte fine du génome bactérien en séparant des fragments d'ADN de très grande taille. Cette technique permet de visualiser les différentes séquences génomiques consécutives à des délétions, insertions ou réarrangements qui distinguent les bactéries d'une même sous-espèce. Elle est sensible et universelle mais nécessite une main d'œuvre coûteuse et bien entraînée (Foxman *et al.*,2005).

Matériel et méthodes

IV. Matériel et méthodes

IV.1. Origine des souches collectées et les centres d'étude

➤ Les souches cliniques

Des souches d'origine communautaire ont été isolées de laboratoires privés au niveau de trois communes Chlef, Ain Defla, Khemis Miliana (Nord-Ouest d'Algérie).

Des souches d'origine hospitalière ont été isolées dans les services de réanimation, de chirurgie, de dermatologie, de médecine interne des hopitaux suivants : Etablissement Public Hospitalier Merouani Abed Chettia de Chlef et le centre Hospitalo-Universitaire d'Oran.

IV.1.1. La durée et lieu d'étude

Cette étude a été réalisée durant la période de quatorze mois allant du Décembre 2015 au Janvier 2017. Les examens bactériologiques ont été réalisés au sein du laboratoire central de Microbiologie de l'hôpital de Chettia et le laboratoire de recherche de Bioressources naturelles locales de l'Université Hassiba Ben Bouali de Chlef. Les techniques de spectrométrie de masse MALDI-TOF et de biologie moléculaire ont été menées en partenariat avec l'unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes à l'hôpital de Timone, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille-Université, Marseille, France.

IV.1.2. Les critères de cette étude

C'est une étude prospective et multicentrique portant sur 237 échantillons isolés de patients hospitalisés ou non qui souffrent des infections sévères et adressés pour examen bactériologique. Les prélèvements humains ont été analysés pour déterminer la prévalence de l'infection due à *P. mirabilis* et les mécanismes moléculaires associés à cette résistance. Pour réussir à analyser cette bactérie, il a fallu inclure et exclure certains critères chez les patients.

➤ Les critères d'inclusion

Nous avons inclus tous les cas de prélèvements positifs à *Proteus Sp.* diagnostiqués sur la culture préliminaire. Les prélèvements ont été recueillis à partir des malades hospitalisés plus de 48 heures ou ceux ayant un historique hospitalier selon le diagnostic des médecins.

Nous avons inclus tous les patients ambulatoires âgés de 2 mois et plus. Si plus d'un isolat a été

signalé pour le même patient, seule la culture initiale a été incluse dans l'étude. Lorsque la croissance bactérienne monomorphe était supérieure à 10^5 UFC/ml, la culture était classée comme positive. La culture a également été réalisée lorsque le résultat de la culture d'urine était compris entre 10^4 et 10^5 UFC /ml.

➤ Les critères d'exclusion

Nous avons exclues patients avec desinfections causées par des *Enterobacteriaceae*. Les cultures d'urine ont été classées en trois types : négatives, positives et contaminées. Les échantillons ont été classés comme contaminés lorsque la croissance bactérienne est polymorphe (croissance de deux espèces bactériennes ou plus). Les cultures d'urine ont été classées négatives lorsque la croissance bactérienne était inférieure à 10^3 UFC/ml (critère d'exclusion).

IV.1.3.Approbation éthique et étude statistique

Tous les laboratoires privés ont donné l'accord pour l'échantillonnage. Les informations épidémiologiques ont été analysées dans un fichier Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). Une analyse statistique a été réalisée par le logiciel Epi-info version 7 selon les recommandations du Center de contrôle des maladies. La valeur de $P < 0,01$ est statistiquement significative. Le khi-carré a été utilisé pour comparer les proportions à l'aide du même logiciel.

IV.2.Etude phénotypique de *P.mirabilis*

IV.2.1. Prélèvements des échantillons de *P.mirabilis*

Les souches étudiées ont été recueillies à partir des prélèvements d'origine humaine (urines, pus, pertes, pied diabétique, abcès) selon les normes pratiques de prélèvement clinique. Les prélèvements ont été transportés au laboratoire d'analyse bactériologique. L'analyse a été effectuée dans une période ne dépassant pas 7 heures. Les informations sur chaque patient, y compris : le sexe, l'âge, la date de prélèvement et le type d'échantillon ont été recueillies et enregistrées dans le logiciel WHONET, puis transférées et traitées sur Excel (Microsoft, 2013).

IV.2.2. Transport des prélèvements

Les prélèvements ont été initialement repiqués et identifiés au niveau de laboratoire puis transférés directement au laboratoire de recherche dans lequel nous confirmons l'identification des souches de *P.mirabilis*. Tous les isolats cliniques obtenus ont été transférés aux laboratoires puis maintenus à -20°C dans un bouillon cœur-crevelle (Institut Pasteur) additionné avec du glycérol (25%) jusqu'à leur utilisation pour une deuxième analyse.

IV.2.3. Isolement des souches de *P.mirabilis*

Les souches cliniques de *P.mirabilis* ont été isolées à partir des prélèvements cliniques sur une gamme de milieux de culture sélectifs choisis selon la disponibilité (gélose nutritif, gélose trypticase soja, milieu chromocult, gélose Hektoen). Les échantillons cliniques ont été enrichis dans un bouillon cœur-crevelle (Institut Pasteur, Alger) et incubés à 37 °C pendant 24 h. Une goutte de bouillon enrichi a été repiquée puis incubée à 37°C en aérobies pendant 18 à 24h.

IV.2.4. Identification des souches de *P.mirabilis*

L'identification préliminaire du genre de *Proteusa* a été réalisée par l'observation macroscopique directe sur le milieu de gélose nutritif ou gélose trypticase soja (Bio-Mérieux, France). L'examen microscopique se déroule à l'aide des tests biochimiques conventionnels (Mini galerie classique) (Institut Pasteur) puis confirmé par l'AP20E (Bio-Mérieux, France) et le spectromètre de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight) (Ultraflex MALDI-OF, Bruker Daltonik, Allemagne).

IV.2.4.1. Examen macroscopique

Les prélèvements ont été réalisés à partir de divers sites sur les patients hospitalisés ou non hospitalisés (urine, liquide péritonéal, abcès péri-anal, escarre infectée). Les échantillons d'urine ont été homogénéisés et transférés dans un tube conique de 10 ml. L'urine a été centrifugée à 2500 tr/min pendant sept minutes et le surnageant a été décanté. Le culot a été

homogénéisé et déposer sur des lames directement examinées.

L'identification des souches de *Proteus* a été réalisée par la caractérisation de phénomène macroscopique de l'essaimage sur un milieu solide enrichi.

➤ Examen bactériologique

Les échantillons ont été inoculés dans différents milieux de culture. Une boucle calibrée de 1 μL a été plongée en position verticale dans l'échantillon. La boucle a été utilisée pour l'ensemencement sur les milieux de culture. Les boîtes de pétri ont été incubées à 37 ° C pendant 24 à 72 heures.

IV.2.4.2. Tests biochimiques préliminaires

Les mini galeries classiques sont des techniques conventionnelles permettant d'identifier une bactérie après 24h sur la base de quelques réactions biochimiques.

➤ Mini galerie biochimique classique

Pour l'identification de *P.mirabilis*, des tests biochimiques classiques ont été effectués (le test de l'uréase, indole, le nitrate de motilité de Mannitol, décarboxylation des acides aminés). Le milieu de Fer triple sucre et le milieu urée-tryptophane sont aussi utilisés.

➤ Système d'API 20E

Il s'agit d'une technique biochimique miniaturisée permettant l'identification des bactéries à Gram négatif. Elle contient 20 micro-tubes comprenant 23 tests biochimiques sous forme des substrats desséchés (Manuel de Bio-Mérieux API 20E., 2002).

IV.2.4.3. La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry method)

• Principe de la technique

La spectrométrie de masse associée à la désorption-ionisation laser permet l'identification des bactéries en quelques minutes avec une haute précision, sur la base de l'ionisation des biomolécules de grande taille, d'une faible volatilité et d'une sensibilité à la chaleur sans les dégrader (Seng *et al.*, 2010 ; Treviño *et al.*, 2012 ; Singha *et al.*, 2015).

La bactérie est ionisée par une source de laser dirigée vers la cible (spectromètre Microflex

LT). Les ions traversent un champ électrique en mesurant le temps nécessaire aux différentes particules pour atteindre le détecteur (un analyseur de temps de vol) (TOF = Time-Of-Flight mass spectrometry) (Seng *et al.*, 2010).

Les ions sont ainsi séparés en fonction de leur rapport masse/charge. Une fois l'ion est arrivé au détecteur, le spectre obtenu est ensuite comparé à une collection de spectres contenus dans des bases de données afin d'identifier la souche bactérienne. La spectrométrie de masse permet de mesurer une empreinte moléculaire unique d'un micro-organisme. Le logiciel Biotyper MALDI mesure les protéines très abondantes qui se trouvent dans tous les micro-organismes. L'identification d'un germe est considérée correcte lorsque le score est supérieur à 2.00 (Seng *et al.*, 2010).

A. Nettoyage de la plaque de spectrométrie de masse (la cible) et préparation de la matrice

- Laver la plaque de spectrométrie de masse sous l'eau chaude plusieurs fois et par l'éthanol à 70% et frotter la cible de spectrométrie de masse avec du papier de précision (type Kim Wipes).
- Immerger la cible de spectrométrie de masse dans l'éthanol pendant 15 minutes puis laisser sécher à l'air libre.
- Préparer la matrice dans un tube à Eppendorf par des solutions suivantes : 10 mg d'acide alpha-cyano-4 hydrocinnamique ; 500 µL d'acétonitril HPLC ; 250 µL de TFA à 10% (acide trifluorocétique) (Sigma-Aldrich Chimie) ; 250 µL d'eau HPLC.
- Soniquer le mélange pendant 10 minutes dans un bain à ultrasons. Ensuite, centrifuger pendant 5 minutes à 13000 tours/min.
- Transférer le surnageant dans un autre tube d'Eppendorf propre et le conserver à 4°C à l'abri de la lumière. La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux de laser (Manuel d'IHU de Timone., 2017).

B. Dépôt des échantillons sur la cible de spectrométrie de masse

- Réaliser un plan de dépôt de la cible de spectrométrie de masse en indiquant la référence des échantillons déposés ;
- sur la ligne de la 1^{ère} colonne, déposer 2 spots du témoin négatif (1.5 µL de matrice).

- Sur les lignes suivantes, déposer chaque échantillon en fine couche homogène d'une colonie bactérienne en 4 exemplaires maximum sur la cible à l'aide d'une pointe de cône de pipette de 10 µL ;
- Déposer 1.5 µL de la matrice sur chaque spot ;
- Laisser sécher pendant 5 min sous poste de sécurité microbiologique pour permettre la co-cristallisation avec l'échantillon bactérien (Manuel d'IHU de Timone., 2017).

C. Interprétation des résultats de l'analyse spectrométrique

- Introduire la cible dans le spectromètre de masse Microflex.
- Remplir la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control (Micro Flex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), la cible est exposée sous vide au tris du laser.
- Lancer la machine spectromètre de masse (Micro Flex).
- L'identification est correcte quand la valeur de score identifiée par le MALDI/TOF est >2.00 (Manuel d'IHU de Timone., 2017).

IV.2.5. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques a été réalisée par trois techniques différentes selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Européenne de la Microbiologie clinique et les maladies infectieuses 2015 (EUCAST-SFM), il s'agit de :

- La méthode de diffusion de disque sur support solide (gélose Mueller Hinton) ;
- La concentration inhibitrice minimale (technique E-test) ;
- La caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance.

IV.2.5.1. Méthode de diffusion de disque sur gélose Mueller Hinton

Deux panels d'antibiotiques ont été testés : un panel principal de 17 antibiotiques qui comprend les trois major familles d'antibiotiques : amoxicilline (25µg), amoxicilline/acide clavulanique (20/10 µg), aztréonam (30µg), céfotaxime (30µg), céfoxitine (30µg), céfépime (30µg), imipénème (10µg), ertapénème (10µg), amikacine (30µg), gentamicine (15µg), rifampicine (10µg), ciprofloxacine (5µg), ticarcilline (5µg), colistine (50µg), triméthoprim/sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg).

Un panel secondaire de 4 antibiotiques ont été testés seulement avec les souches résistantes aux antibiotiques : (Ticarcilline/l'acide clavulanique (75/10 mg), méropénem (30 ug/ml), ofloxacine (200 mg/40 ml), levofloxacine (500 mg/ml), céftazidime (30µg).

➤ Protocole

- Inoculer la suspension bactérienne en solution physiologique (0,9 % NaCl) standard à 0.5 MacFarland à partir d'une culture bactérienne jeune (18h à 24h).
- Ensemencer la suspension directement sur les géloses de Mueller Hinton à l'aide d'un écouvillon stérile,
- Déposer les disques d'antibiotiques à l'aide d'un distributeur automatique.
- Les boîtes ont été ensuite incubées pendant 18 à 24 h à 37°C (**Tableau 1**).
- La lecture des résultats a été effectuée par la mesure avec précision de différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques, qui ont été mesurés suivant les recommandations de la CA-SFM/EUCAST 2015 (www.sfm.asso.fr) (**Annexe 3**).

IV.2.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par E-test

➤ Protocole

- Inoculer préalablement la suspension bactérienne jeune de concentration 10^8 UFC/ml par écouvillonnage.
- Appliquer les bandelettes d'E-test à la surface de la boîte de gélose de Mueller Hinton.
- Incuber les boîtes pendant 18 à 24 h à 37°C.

La lecture est exécutée selon un gradient de concentration continue de 0,002 à 32 µg/ml, de 0,016 à 256 µg/ml ou de 0,064 à 1024 µg/ml selon les antibiotiques. La CMI correspond à la valeur lue à l'inhibition de la croissance qui se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette. Elle s'exprime directement en microgramme par millilitre (**Joly-Guillou, 2006**) (**Annexe 3**).

Matériel et méthodes

Tableau01.Liste des antibiotiques testés et leurs diamètres critiques (CA SFM/EUCAST.2015).

Nom d'antibiotique	Charge du disque(ug)	Diamètres critiques	
Famille: Bêta-lactamines			
Ampicilline (AMC)	30	≥26	<23
Amoxicilline (AMX)	30	≥26	<23
Céftriaxone (CRO)	30	≥26	<21
Céftazidime (CTX)	30	≥24	<21
Céfotaxime (FOX)	20/10	≥20<17	
Céfépime (FEP)	30	24≥<21	
Famille: Monobactame			
Aztréonam (AZT)	10	24 ≥	<21
Famille:Carbapénèmes			
Imipénème (IPM)	10	22 ≥	<16
Ertapenem (ERT)	10	25 ≥	<22
Famille: Quinolones			
Ciprofloxacine (CIP)		22 ≥	<19
Famille: Aminosides			
Amikacine (AMK)	10	16 ≥	<13
Gentamicine (GNT)	10	17 ≥	<14
Fosfomicine (FOS)	10	16 ≥	<13
Famille: Sulfamides			

Matériel et méthodes

Triméthoprim Sulfaméthoxazole (SXT)	1,25/23,75	16 ≥	<13
Famille: Polymyxines			
Colistine (CL)	50	Naturel resistant	

µg : microgramme ; S : sensible ; R : résistante.

IV.2.5.3. Caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance

➤ **La recherche phénotypique des bêta-lactamases à spectre élargi chez *P.mirabilis* par le test de double synergie**

Le test de synergie est un test phénotypique qui permet de détecter les souches productrices de bêta-lactamases à spectre élargi. Des disques de céphalosporines de 3^{ème} génération sont placés côte à côte sur la gélose de Mueller-Hinton (céfotaxime/céftriaxone et céfoxitine et/ou aztréonam) en parallèle avec un disque d'amoxicilline+ acide clavulanique (2 cm entre les disques) (**Figure 6**) (**Jarlier *et al.*, 1988**).

L'augmentation de l'activité des céphalosporines de 3^{ème} génération sont inhibées par l'acide clavulanique (**Siroto *et al.*, 1996**), cela indique la présence de bêta-lactamases à spectre élargi par la description d'une image de synergie en « bouchon de champagne » entre les céphalosporines de 3^{ème} génération et l'Aztréonam et l'acide clavulanique (**Annexe 3**).

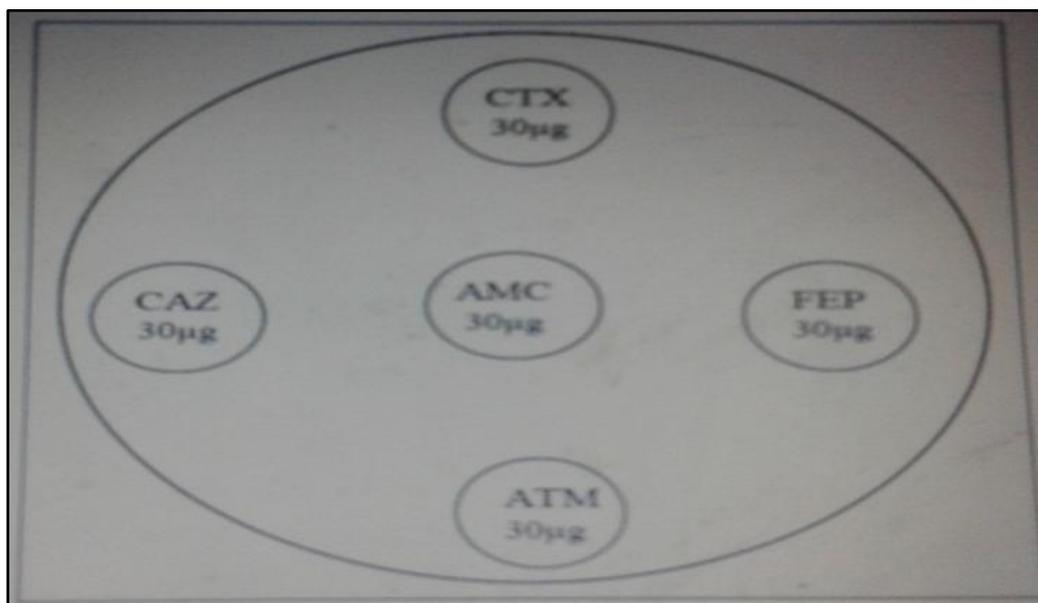


Figure 6. Test de double synergie pour la recherche des souches productrices des bêta-lactamases à spectre élargi.

- **La recherche des souches de *P.mirabilis* productrices des bêta-lactamases à spectre élargi par Milieu chromogène BLSE (chromID® BLSE DRIG /MAC, bioMérieux)**

La gélose de chromIDBLSE est un milieu chromogénique sélectif utilisée pour le dépistage des entérobactéries productrices des bêta-lactamases à spectre élargi. Le repiquage sur le milieu chromogène conduit à la production des colonies bactériennes colorées. La gélose de chromID™ BLSE est spécifiquement conçu pour permettre la croissance sélective des *Entérobactéries* productrices de bêta-lactamases. L'apparition des colonies colorées signifie un résultat positif (présence de bêta-lactamases) (**Annexe 3**).

- **La recherche phénotypique des carbapénèmases chez *P.mirabilis* par Milieu chromID® CARBA (CARB/OXA)**

La gélose de chromID® CARBA (OXA/CARBA) (bioMérieux) est un milieu chromogène sélectif destiné à la dépistage des entérobactéries productrices de carbapénèmases particulièrement, les enzymes de classe D et les enzymes de classe A. Le milieu est une base nutritive riche associée aux mélanges d'antibiotiques. Nous ensemençons la bactérie par strie dans un compartiment et nous incubons à 37°C pendant 18 à 24h. La présence d'une culture marron jaune désigne la souche de *P.mirabilis* productrice de carbapénémase (**Girlich et al., 2013**) (**Annexe 3**).

- **Test Carba NP**

Le test de Carba NP est un test biochimique rapide et précis basé sur les réactions biochimiques. Il permet l'identification rapide des bactéries à Gram négatif productrices de la carbapénémase. La détection accélérée se fait par la dégradation de l'imipénème. Le rouge de phénol à pH 7 utilisé comme indicateur de couleur (**Bakour et al., 2015**).

Protocole

- Préparer une solution concentrée de rouge de phénol 0.5% poids/volume.
- Verser 2mL de la solution concentrée de rouge de phénol dans 16.6ml de l'eau distillée.
- Additionner au mélange 180µL d'une solution de ZnSO₄ 10mM.
- régler le pH à 7 avec une solution de NaOH (1N).

- Pour détecter la production d'une carbapénémase, on procède comme suit : Dans un tube Eppendorf, mettre 200µL de tampon de lyse (CTAB 0.02 %).
- Ajouter 10µL de colonies bactériennes dans le tampon de lyse et vortexer pendant 1 à 2 min.
- Transférer 100µL dans les 2 tubes d'Eppendorf "A" et "B".
- Ajouter 100µL de solution A dans le tube Eppendorf "A" et 100µL de la solution A+6mg/ml de l'imipénème dans le tube Eppendorf "B".
- Vortexer pendant 5 sec, puis incuber à 37°C pendant un maximum de 2h.
- La lecture visuelle est effectuée pour chaque tube Eppendorf et les résultats sont interprétés selon le tableau ci-dessous (**Bakour et al., 2015**).

IV.3. Etude géntypique de la résistance aux antibiotiques chez *P.mirabilis*

Les souches de *P.mirabilis* multirésistantes présentent un niveau élevé de la résistance aux antibiotiques détectées par les méthodes phénotypiques mentionnées ci-dessus ont été sélectionnées pour des analyses moléculaires.

IV.3.1. Extraction d'ADN génomique de *P.mirabilis*

➤ Principe

L'ADN total des souches de *P.mirabilis* multirésistantes a été extrait en utilisant un biorobot EZ1 Advanced XL avec un kit d'extraction d'ADN EZ-1 tissu de Qiagen (Courtaboeuf, France). Cette technique est rapide et spécifique qui permet d'établir un ADN d' haute qualité. Le tampon permet de détruire la membrane de la cellule et libérer le contenu de l'ADN qui est ensuite capturé par les particules magnétiques qui seront rincées plusieurs fois. Lors de l'éluat, l'éluat se dissocie des billes et celles-ci sont capturées par un système d'aimantation qui les retient (**Manuel d'Advanced XL EZ1., 2002**).

➤ Protocole

*Pipeter 210µL de volume de Buffer G2 et le mettre dans tube EZ1.

* Remplir complètement la pipette stérile par une colonie bactérienne pure de culture fraîche.

*Vortexer pendant 15 s afin d'obtenir une solution homogène.

*Rechauffer dans un bain sec à 70°C pendant 10 min.

*Placer le contenu dans le robot l'EZ1 Advanced XL.

*Insérer la carte EZ1 DNA Bactérie (Qiagen) dans l'automate et suivre les instructions de l'appareil

*Mettre les tubes sous tension de l'appareil EZ1 et suivre les instructions données sur l'écran.

* Choisir le volume d'éluion 200 µL.

*S'assurer que chaque élément est correctement positionné et puis lancerle protocole. L'extraction dure 17 minutes.

* Recueillir les acides nucléiques purifiés dans les tubes d'éluion.

*Récupèrer les tubes d'ADNs purifiés et les garder à +4°C.

*Quantifier l'ADN à l'aide d'un Spectrophotomètre NanoDrop d'UV visible (Thermo scientific) et mesurer par absorbance la quantité d'ADN (Labtech, France) afin de vérifier la concentration d'ADN(**Manuel d'Advanced XL EZ1., 2002**).

IV.3.2. Amplification de l'ADN par la PCR standard

La polymérase réaction standard (PCR) est une méthode qui consiste à amplifier une seule copie de gène en milliers de copies identiques par la Taq Polymérase, en utilisant un ensemble de réactifs basée sur un cycle de base de chauffage et de refroidissement.

Dans cette étude,laPCR standard a été utilisée pour identifier les génotypes responsables de larésistance aux antibiotiques chez *P.mirabilis*.Les gènes codant pour les β-lactamases: les β-lactamases de classe A selon la classification de Ambler: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} (**Siebor and Neuwirth, 2011**). Lesgènes codant pour β-lactamases de classe C : *bla*_{CMY-2},*bla*_{AmpCI}, et *bla*_{AmpCI} (**D'Andrea et al., 2006; Decré et al.,2002**).Les gènes codant pour carbapénèmases de classe D :*bla*_{OXA-48-}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like} (**Woodford et al.,2006 ;Mazzariol et al., 2012 ;Mathlouthi et al., 2016**)(**Annexe2**).Les gènes codant la résistance aux aminosides: les gènes codant acétyltransférases *aac(3)-I-*, *aac(6')-Ib*, *aac(3)-II*, *aac(3)-III/IV*,*aac(6')-I*, *aac(6')-II*. Les gènes codant pour 16S ARNr méthytransférases*armA* et *rmtB*, *rmtE*.Les gènes codant pour nucléotidyltransférases*ant(2')-II*, *ant(3'')-I*.Lesgènes codant phosphotransférases *aph(3')-VI*-(**Kim et al.,2008 ;Kim et al.,2009**) (**Annexe 2**). Les gènes codant la résistance *qnrA*, *qnrB*, et *qnrS*aux quinolonesetles gènes codant les régions

déterminant la résistance *gyrA*, *gyrB*, *parC* à la quinolone (Weigeletal.,2002 ;Cattoir et al.,2007)(Annexe 2).

IV.3.2.1.Contenu du mélange réactionnel et les conditions d'amplification

Chaque réaction d'amplification de PCR a été réalisée dans desependorfsMiniSpin®. La composition du mélange réactionnel estde 25 µL(**Tableau2**).

Tableau2.Les composants utilisés pour la PCR standard

Réactifs	Volume (µL) pour un échantillon
La matrice d'ADN	5 µL
L'amorce (Forward)	0.75µL
L'amorce(Reverse)	0.75 µL
AmpliTaQ Gold DNA Polymerase	12.5 µL
L'eau ultra pure	6 µL
Vol final	25 µL

Les conditions d'amplification (dénaturation, hybridation, élongation) sont différentes, elles sonten fonction du gène de résistance recherché. Pour toutes les réactions de PCRs, des contrôles négatifs sont utilisés. Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur ABI 2700 (Applied Biosystems).

La durée de réaction allant de 2 à 3 heures, elle dépend de la température d'élongation de gène recherché.La PCR standard comprendtrois différents cycles.La température est choisie selon le type de gène amplifié. Une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin est suivie de cycles d'amplification de l'ADN (élongation),letemps est variable selon la taille du fragment à amplifier.

Les conditions d'amplification pour les gènes codant la résistance aux quinolones(**Annexe2**) étaient suivantes : un cycle dénaturation à 95°C pendant 10min, cycle d'élongation(à 95°C pendant 1min, 54°C pendant 1 min, 72°C, pendant 1min), cycle d'amplification (35 fois), 72°C pendant 10min.

Les conditions d'amplification de PCR pour les gènes de la résistance aux β -lactamines(**Annexe2**) sont: pour les gènes de classe C: un cycle de dénaturation à 94°C pendant 1min, 25 cycle d'amplification à 72°C pendant 5min ; pour les gènes de beta-lactamase de classe A: un cycle de dénaturation à 94°C pendant 10min, un cycle d'élongation à 94°C pendant 1min, à 50°C pendant 1 min, à 72°C pendant 5min, puis un cycle d'amplification à 72°C pendant 10 min ; pour les gènes codant pour les carbapénèmases: un cycle de dénaturation à 96°C pendant 12 min, un cycle d'élongation à 96°C pendant 20sec, à 55°C pendant 20sec, à 72°C pendant 1min30 et un cycle d'amplification à 72°C pendant 5 min. Pour les gènes codant la résistance aux aminosides(**Annexe2**), l'amplification a été effectuée dans les conditions suivantes : un cycle de dénaturation à 94°C pendant 1min, un cycle d'élongation à 94°C pendant 1min, à 58°C pendant 1 min et un cycle d'amplification de 25 fois à 72°C pendant 5min.

IV.3.2.2. Révélation des gènes par l'électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique utilisée pour révéler les produits de PCR amplifiés et également pour déterminer leur taille. Les produits de PCR ont été mélangés avec 1.5 μ L de réactif de Sybr Safe et déposés dans une cuve d'électrophorèse. Nous avons utilisé un gel d'agarose de 1,5% pour les gènes ayant une taille >500pb et un gel d'agarose à 2% pour les gènes ayant une taille <700pb.

Protocole

➤ Préparation du gel

La manipulation se fait sous une hotte chimique et avec des gants,

- Mélanger 6g de poudre d'agarose avec 400mL de TAE (Tris, Acétate, EDTA) à 0.5X dans un flacon en verre.
- Déposer le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement homogène et laisser refroidir.
- Ajouter le tampon de bromure d'éthidium (3 fois 31.5 μ L pour 50mL) et bien mélanger.

- Couler le gel dans le support d'électrophorèse après avoir mis les peignes et laisser refroidir jusqu'à solidification de gel.

➤ **Electrophorèse des produits d'amplification**

- Retirer les peignes après la solidification du gel.
- Mélanger les produits de PCR avec 1.5 µL de réactif Sybr Safe.
- Rajouter le tampon de TAE (Tris, Acétate, EDTA) à 0,9X.
- Laisser les fragments d'ADN migrer pendant 30 minutes sous 130 Volts
- Déposer 4 µL de marqueur de taille 100 pb DNA Ladder de 1 kb DNA (Promega, USA) sur le gel.
- Fermer le couvercle de la cuve et brancher la cuve au générateur.
- Mettre l'alimentation sous tension à 135V et régler la durée de migration (pendant 20min).

➤ **Visualisation des bandes d'ADN aux rayons UV**

Après la migration, les bandes d'ADN ont été révélées par des rayons ultra-violets. Le poids moléculaire des bandes a été comparé avec le poids moléculaire de gène pour connaître la taille de fragment amplifié du gène recherché, et celui du témoin positif.

IV.3.3. Séquençage des produits positifs de la PCR par la méthode de Sanger

Afin de séquencer les produits de la PCR positive, nous avons utilisé la méthode de Sanger développée (Sanger *et al.*, 1977) qui implique un kit BigDye terminateur v3.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems) et le séquenceur automate ABI 3130 (Applied Biosystems).

IV.3.3.1. Purification des séquences

La purification des séquences de l'ADN a été réalisée par deux méthodes: par nettoyage enzymatique (le réactif ExoSAP-IT) (Thermo Fisher Scientific) et par la purification à haute pression (aspiration avec pompe de l'ADN).

Protocole

➤ **Purification à haute pression par aspiration avec la pompe**

- Mélanger le produit de PCR avec 100µl d'eau ultrapure dans une plaque à filtre (Macherey Nagel) ;

- Déposer la plaque sur une pompe sous vide pendant 20 min ;
 - Ajouter 50µL d'eau ultrapure;
 - Agiter pendant 20 min avec une vitesse de 600 tours/min;
 - Récupérer les 50 µL de produit de PCR purifié dans des tubes.
- **Purification des produits de PCR par nettoyage enzymatique**
- Ajouter 1,5 µL du réactif ExoSAP-IT aux produits positifs de la PCR.
 - Incuber le mélange à 37 ° C pendant 2h
 - Le produit purifié est prêt pour la PCR BigDye.

IV.3.3.2. Réaction de séquençage de la PCR Big-Dye

Le séquençage consiste à déterminer la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN. L'élongation des brins d'ADN est stoppée d'une façon aléatoire après l'incorporation d'un didésoxyribonucléotide. Chacun des 4 didésoxyribonucléotides est présent en faible quantité par rapport au désoxyribonucléotide correspondant. Tous les 4 didésoxyribonucléotides sont marqués par un fluorochrome spécifique.

Tableau 3. Composition des réactifs pour les PCR BigDye.

Réactifs	Volume (µL) pour un échantillon
La matrice d'ADN	4 µL
L'amorce (Forward)	1 µL
L'amorce (Reverse)	1 µL
Mix BigDye	2 µL
Tampon	3 µL
L'eau UP	10 µL
Vol final	20 µL

Le programme d'amplification de thermocycleur nécessite des conditions spécifiques qui consiste à : une étape de dénaturation initiale de 96°C pendant 5 min ; une étape d'hybridation pendant (10 min à 96°C, et de 50°C, pendant 1 min), suivi d'une étape d'élongation finale de

60°C pendant 50 sec, +15).

IV.3.3.3. Purification des produits de la PCR

A. par la méthode de Séphadex

Le but de cette étape est de purifier les produits de la PCR avant d'injecter l'ADN dans le séquenceur capillaire. Le séphadex G50 élimine les particules de faible poids moléculaire (moins de 20 μm) tels que les nucléotides non incorporés et les amorces de PCR en excès qui sont capturées à travers les pores de diamètre déterminés (20 à 50 μm). En effet, les didésoxyribonucléotides libres non incorporés au cours de la réaction pourraient induire les signaux de fluorescence spécifiques.

➤ Protocole

- Préparer la plaque à filtre spécifique de séphadex G50 dans une plaque Millipore MAHV5 (sigma Aldrich).
- Mettre la poudre de séphadex dans les puits de la plaque dans laquelle on ajoute 300 μL d'eau ultra pure et laisser gonfler 2 à 3 heures.
- Effectuer une centrifugation à 1200 tours/min pendant 10 min à 10°C pour éliminer l'excès d'eau.
- Rajouter 10 μL aux produits de PCR bigdye dans la plaque à filtre qui sera placée sur une plaque microamp N801-560 pour collecter les produits d'ADN,
- Déposer les 30 μL dans la plaque (20 μL des produits de PCR bigdye + 10 μL de l'eau ultra pur), après centrifugation (12000 tours/min pendant 10 min à 10°C), les produits de PCR sont donc purifiés.
- Recouvrir la plaque par un papier de protection.

B. Par la méthode de kit BigDyeXterminator

Le processus de purification par BigDye Xterminator est simple : c'est une méthode traditionnelle, nécessitant l'addition de plusieurs réactifs. Le kit nécessite deux réactifs séquentielle ou pré-mélangé (solution Xterminator™).

Protocole

- Effectuer la séquence de cycle avec Terminateurs BigDye®.
- Avant le séquençage du cycle, centrifuger la plaque de réaction, puis pipeter la solution SAM™.

- Pipeter le volume correct de la solution XTerminator dans chaque puit et vortexer la solution XTerminator, en utilisant un embout de pipette à large diamètre, aspirer la solution et ajouter à chaque puit.
- Sceller la plaque à l'aide d'un thermoscellage ou film adhésif transparent (P / N 4306311).
- Vortexer pendant 30 minutes, puis centrifuger la plaque de réaction.
- Placer le plateau de réaction dans l'analyseur d'ADN d'Applied Biosystems.
- Séquencer le produit préparé par un séquenceur capillaire 96 ABI3730XL (Thermo Fisher Scientific).

IV.3.3.4. Analyse des séquences ADN

A la fin du séquençage, nous obtenons un chromatogramme qui porte les séquences nucléotidiques.

- Corriger les séquences par un logiciel Chromas Lite ® 2.01 (Technelysium Pty Ltd).
- Aligner les séquences corrigées par le logiciel CHROMAS Pro (Technelysium Ltd) pour créer le Contig Complet du gène.
- Comparer avec les séquences déposées dans le GenBank par le logiciel BLAST disponible « en ligne » du centre national de l'information en biotechnologie (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)
- Aligner les séquences avec les séquences de la base de données ARG-ANNOT (Annexe 25) (Gupta *et al.*, 2014).

IV.3.4. Étude de typage bactérien

Le typage bactérien a été fait pour confirmer la relation épidémiologique entre les souches bactériennes, le lieu, le moment de l'échantillonnage et les caractéristiques phénotypiques et génotypiques de *P. mirabilis*. Le typage moléculaire facilite la détection de la chaîne de transmission et la source d'infection. C'est un moyen qui permet de renforcer les données de surveillance pour la détection précoce des épidémies (Foxman *et al.*, 2005). L'étude de la relation épidémiologique entre les souches multirésistantes de *P. mirabilis* a été faite par deux méthodes différentes : typage protéomique par la technique de MALDI-TOF, typage moléculaire par la technique d'ERIC-PCR.

IV.3.4.1. Typage moléculaire des groupes de l'incompatibilité plasmidique

Afin de détecter les groupes d'incompatibilités plasmidiques, Carattoli et ses collaborateurs ont inventé une technique pour analyser les plasmides conjugatifs des souches portant les gènes multirésistants chez les entérobactéries (Carattoli *et al.*, 2005). Les 18 PCR simplex ont été utilisées afin d'identifier les différents types de plasmides en utilisant 18 amorces spécifiques : HI1, HI2, I1-I, X, L/M, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A/C, T, FIIA, F, K et B/O (Annexe 2).

➤ Protocole

- Extraire l'ADN total à partir des souches de *P. mirabilis* multirésistantes.
- Préparer le mélange réactionnel comme décrit précédemment (4.3.2.1).
- Rajouter les amorces citées dans le tableau (Annexe 2).
- Régler le programme de PCR: 5 min à 94°C; 1 min à 94°C; 1 min à 60°C ; 30 cycles 1 min à 72°C ; 5 min à 72°C (Carattoli *et al.*, 2005).
- Identifier les produits d'amplification de PCR par la migration sur le gel d'agarose à 2% (2 g d'agarose dans 200 mL de TBE à 0.9X) avec utilisation de marqueur du poids moléculaire appropriée 100pb (Carattoli *et al.*, 2005).

IV.3.4.2. Typage protéomique par la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est un outil fiable, moins coûteux utilisé pour détecter la relation clonale entre les bactéries en utilisant des empreintes de protéines. Les profils des protéines obtenues ont été visualisés par le logiciel Flex analyse v.3.3 et analysés par le MALDI-Biotyper v.3.0 (Bruker Daltonics, Allemagne) pour le traitement des données (lissage, soustraction de base et sélection de spectres). Les clusters ont été évalués afin de prendre une idée sur les niveaux des souches.

L'analyse de protéotypage des souches de *P. mirabilis* a été réalisée avec le logiciel Flex analysis v.3.3 transféré vers le logiciel ClinProTools 2.2 (Bruker Daltonics, Allemagne) afin d'obtenir le pseudogel de masse bactérienne et le spectre de protéine ribosomale. Le dendrogramme de projection spectrale moyenne a été créé par le logiciel MALDI-Biotyper v.3.0 (Bruker Daltonics, Allemagne) sur la base des similitudes entre les profils de spectres. La liste des pics d'un isolat inconnu a été comparée avec le modèle de référence spectral principal de la base de données en utilisant la fonction de corrélation logicielle par

défaut.

Le typage protéomique des souches *P.mirabilis* multirésistantes a été réalisé par la construction et la comparaison des spectres de référence caractéristiques (spectres principaux) par le logiciel MALDI-Biotyper v.3.0 (Bruker Daltonics, Allemagne).

Les dendrogrammes de projection des spectres moyens ont été construits sur la base de la comparaison par les paires (de spectre principal et spécifique de différentes souches > 2). Le dendrogramme de similitude entre les profils de spectres est ensuite interprété et analysé selon le niveau de distance arbitraire (Seng *et al.*, 2010 ; Treviño *et al.*, 2012 ; Singhal *et al.*, 2015).

IV.3.4.3. Typage moléculaire par la technique d'ERIC-PCR

La technique d'ERIC-PCR est une technique utilisée pour analyser la relation épidémiologique entre les souches multirésistantes. Les séquences de consensus intergéniques répétitifs d'entérobactéries (les séquences d'ERIC) sont des courtes séquences répétitives intergéniques présentes dans le génome de ces bactéries. Elles diffèrent par leur répartition dans le génome de nombreux d'espèces bactériennes. La technique d'ERIC-PCR est une méthode rapide pour étudier la relation clonale entre les souches bactériennes et détecter l'épidémie suspectée (Bosi *et al.*, 1999 ; Gillings *et al.*, 1997).

Afin de réaliser cette technique, la réaction de PCR a été préparée comme décrit précédemment, nous avons utilisé 3 différentes amorces (Annexe 2). Les réactions de PCR ont été réalisées par le programme suivant: dénaturation initiale (94 ° C pendant 5 min), suivi par élongation (35 cycles de 94 ° C pendant 1 min, à 54 ° C pendant 1 min et à 72 ° C pendant 5 min), suivi d'une extension finale de 72 ° C pendant 10 minutes. Les produits amplifiés ont été visualisés par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% après une coloration de réactif Sybr safe avec un marqueur de taille de 1 kb. Une image a été capturée par un analyseur plus poussé avec un logiciel Gel compare II version 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgique). Les résultats ont été interprétés en comparant le profil des séquences.

Résultats et discussion

V. Résultats et Discussion

V.1. Isolement des souches de *Proteus*Spp.

Durant la période allant de Décembre 2015 à Janvier 2017, 237 souches de *Proteus* spp ont été récupérées au niveau de deux hôpitaux CHU d'Oran (22 souches) et EPH de Chlef (4 souches) ainsi qu'au niveau de huit laboratoires privés situés au nord-ouest d'Algérie dont 2 laboratoires d'Ain Defla (111 souches), 3 laboratoires de Khemis Miliana (24 souches) et 3 laboratoires de Chlef (76 souches) (**Tableau 4**).

Tableau 04. Distribution des prélèvements de *Proteus* spp. selon l'origine et les régions.

La ville	Laboratoires privés			Les hôpitaux	
	Ain Defla	Khemis Miliana	Chlef	Oran	Chlef
	2 Laboratoires	3 Laboratoires	3 Laboratoires	CHU	EPH
Nombre de souches de <i>Proteus</i> spp	111	24	76	22	4

L'isolement des souches de *P.mirabilis* a été effectué à partir de prélèvements cliniques des patients hospitalisés et ambulatoires sur milieu riche ou milieu chromogène. Le milieu chromogène permet d'isoler facilement les souches de *P.mirabilis* et de les identifier quasiment de façon immédiate. Il s'agit d'un milieu qui permet à certaines souches de produire ou non un pigment particulier (déchet métabolique). La culture est la méthode de diagnostic la plus spécifique qui s'appuie sur l'identification phénotypique et l'examen bactériologique (**Dubourg et al., 2018**).

V.2.2. Fréquence d'isolement des souches de *P.mirabilis*

Durant cette étude, *P.mirabilis* est l'espèce la plus fréquemment isolée parmi les 237 prélèvements collectés. Elles représentent 75.9% des souches collectées ; 91% des souches isolées de milieu hospitalier et 74.4% des souches collectées de milieu communautaire. Ceci est compatible avec plusieurs documents scientifiques (**Champs et al., 2000 ; Foris et al.,**

2017 ; Armbruster *et al.*, 2018 ; Leulmi *et al.*, 2018).

La fréquence de classement des souches de *P.mirabilis* obtenues au niveau des laboratoires cliniques étudiés est inférieure à celles rapportées dans l'étude en Pologne (90%) (Drzewiecka *et al.*, 2016) et supérieure à celles retrouvées au Sub-Saharan Africa (69.2%) entre 2007-2009 (Jombo *et al.*, 2012) et au Canada (58.7%) entre 2000 et 2005 (Laupland *et al.*, 2007), et à Korea (62.5%) (Pathirana *et al.*, 2018).

La fréquence d'isolement de *P.mirabilis* varie selon l'origine de prélèvement (communautaire ou hospitalière), les types de prélèvements pratiqués, les mesures d'hygiène hospitalières entre les différentes institutions, l'écosystème et la démographie de la région, le site de laboratoire clinique et la durée d'échantillonnage (Cornaglia *et al.*, 2004).

V.2. Prévalence des souches de *P. mirabilis*

V.2.1. Identification macroscopique et biochimique

L'identification de 75.9% souches de *P. mirabilis* d'origine clinique a été effectuée au premier temps par des tests macroscopiques, galeries classiques et Api système (Api 20 E). Toutes les souches ont répondu aux profils numériques spécifiques de l'espèce de *P. mirabilis*. Cependant, (24.05%) de souches ont été identifiées comme *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* et *Proteus penneri*.

➤ L'aspect macroscopique

La culture bactériologique des prélèvements cliniques, a montré l'apparition des colonies qui donnent un aspect en nappe ou vague. *P. mirabilis* présente un type de motilité appelé «essaimage», c'est un caractère macroscopique spécifique pour le genre de *Proteus*. Il se caractérise par des radeaux multicellulaires allongés et hyperflagellés. *P. mirabilis* a la capacité de se déplacer rapidement sur des surfaces solides (Figure 7), ce qui précède l'identification préliminaire des souches de *P.mirabilis*. L'identification est complétée par les tests biochimiques conventionnels et modernes.



Figure7. Phénomène de l'essaimage chez *P.mirabilis*

En plus,*P.mirabilis* est une entérobactérie commensale, donc la plus part des milieux ordinaires permettent la croissance de cette bactérie sans l'addition d'aucun facteur de croissance ou réactifs supplémentaires.

➤ Tests biochimiques

P. mirabilis est isolée à partir de prélèvements cliniques, elle présente une activité uréasique très forte (test positif après 4 minutes) (Kaiser, 2007). Les tests biochimiques et l'aspect macroscopique ne sont pas suffisants pour identifier toutes les souches de *P.mirabilis*.

➤ Recherche de l'activité uréasique

Dans cette étude, l'uréase est l'un des caractères biochimiques importants et indispensables pour l'identification de *Proteus mirabilis* qui présente une activité d'uréase lors d'un contact avec l'urée. L'uréase (un catalyseur enzymatique) provoque la décomposition de ce dernier en ammoniac et en dioxyde de carbone (Armbruster *et al.*, 2012). La modification du pH est importante lors de la colonisation de *Proteus*, ce qui facilite l'adhérence bactérienne (Nicholson *et al.*, 1991). *P.mirabilis* est parmi les bactéries uréolytiques qui dégradent l'urée par l'uréase en quelques minutes.

Résultats et discussion

➤ Recherched'indole

L'indole est le produit d'hydrolyse du tryptophane par une enzyme de tryptophanase. Il est mis en évidence grâce à la coloration rouge, caractéristique qu'il donne avec le réactif de Kovacs. Le test d'indole a permis de distinguer *Proteus mirabilis* du *Proteus vulgaris*. C'est un test clé pour identifier totalement les souches de *P.mirabilis*.

V.2.2. Identification par la spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse MALDI-TOF-Microflex a confirmé l'identification de toutes les souches avec un très bon score allant de 2 à 2.5, dont 100% ont donné les mêmes résultats que les Api20e système (**Figure8**)(Annexe1).

Organism (second best match)	Score Value
<i>Proteus mirabilis</i>	<u>1.93</u>
<i>Proteus mirabilis</i>	<u>2.05</u>
<i>Proteus mirabilis</i>	<u>2.113</u>
<i>Proteus mirabilis</i>	<u>2.119</u>
<i>Proteus mirabilis</i>	<u>1.933</u>
<i>Proteus mirabilis</i>	<u>2.2</u>
not reliable identification	<u>1.588</u>

Figure 8. Score d'identification de *P.mirabilis*(>2) par la technique de MALDI-TOF/MS.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une technique très fiable et rapide. Elle est utilisée pour identifier les bactéries sur la base de l'ionisation des protéines bactériennes. Le spectre de masse des protéines ribosomiques est analysé et comparé avec la base de données de référence. Le logiciel d'analyse évalue la corrélation entre le spectre de l'isolat et les spectres connus stockés dans la base de données. Cette technique a été recommandée par plusieurs chercheurs (**Biswas et al., 2013 ; Patelet et al., 2013 ; Singhal et al., 2015**). En plus, la complémentarité entre le spectromètre de masse MALDI-TOF et les réactions biochimiques

Résultats et discussion

conventionnelles a permis d'avoir une identification bactérienne précise et fiable.

V.2.3. Répartition des souches de *P.mirabilis* selon le laboratoire

Dans cette étude, un total de 180 souches de *P.mirabilis* sont isolées au niveau de 10 laboratoires cliniques (communautaires et hospitaliers). Parmi lesquels, 88.9% de souches ont été isolées au niveau des laboratoires privés et de l'EPH de Chlef (communautaire). 11.1% de souches ont été recueillies au niveau de CHU d'Oran (hospitalier).

Au total, 75.9 % de souches de *P.mirabilis* ont été isolées de patients communautaires et hospitalier; 76.6 % des souches ont été trouvées dans les laboratoires d'Ain Defla, 58.3% de souches ont été collectées dans les laboratoires de Khemis Miliana, 80.3% de souches ont été recueillies dans les laboratoires privés de Chlef, *P.mirabilis* représente l'espèce la plus prédominante du groupe des proteas dans tous les laboratoires (Figure 9).

Le taux d'isolement dans les laboratoires cliniques d'Ain Defla est le plus élevé (53.1%) par rapport aux laboratoires de Chlef (38.1%) et aux laboratoires de Khemis Miliana (8.8%). En revanche, le taux d'isolement des souches de *P.mirabilis* d'origine hospitalière du CHU Oran est le plus élevé (91%) par rapport aux souches d'origine communautaire (74.4%) (Figure 10).

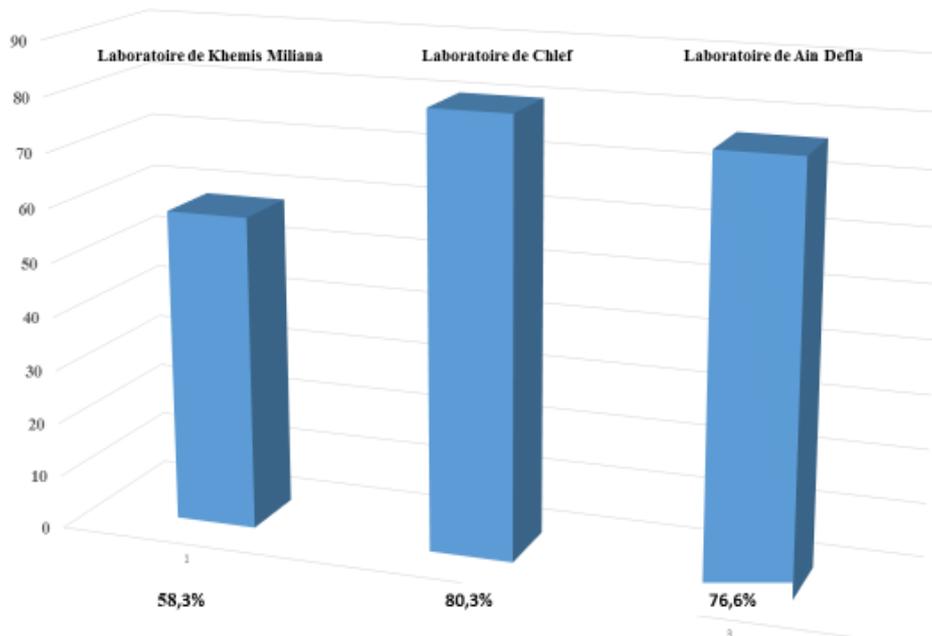


Figure 9. Répartition des souches communautaires par rapport au nombre d'échantillons.

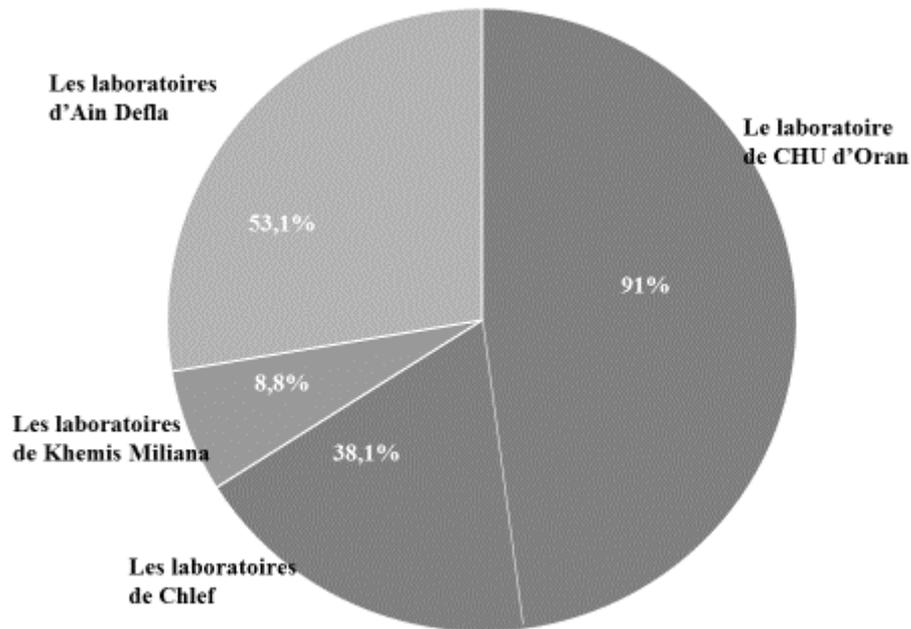


Figure 10. Répartition des souches de *P. mirabilis* hospitalières et communautaires selon la région.

Les infections provoquées par des souches communautaires de *P. mirabilis* sont différentes de celles trouvées en milieu hospitalier (Linhares *et al.*, 2013; Ben Ayed *et al.*, 2019). Dans ce travail, *P. mirabilis* représente souvent la bactérie la plus isolée des infections nosocomiales dans les hôpitaux. Cette fréquence d'isolement obtenue au niveau de CHU d'Oran est supérieure à celle trouvée au CHU de France (7,7%) en 1998 (de Champs *et al.*, 2000), au CHU de Taiwan (22,4%) en 2014 (Chen *et al.*, 2012), et au CHU d'Égypte (14,2%) (El-Gamasy *et al.*, 2017). Nos résultats concordent avec ceux retrouvés récemment en Tunisie 2,2% (Ben Ayed *et al.*, 2019) et au Portugal (7,6%) entre 2000 et 2009 (Linhares *et al.*, 2013).

L'infection acquise à l'hôpital peut s'expliquer par l'interaction de trois facteurs : l'environnement hospitalier (les germes), les pratiques des soins et enfin le terrain du malade c'est-à-dire son état nutritionnel, physiologique et immunitaire (Said, 2005).

L'Algérie est l'un des pays africains qui présente des taux d'infections supérieurs à 50%, ce qui peut expliquer la fréquence plus élevée de cette bactérie dans les infections urinaires au niveau communautaire par rapport à d'autres pays. Certaines études ont montré que

Résultats et discussion

P.mirabilis possède un fort risque de devenir endémique dans la communauté et que cela aurait un impact significatif sur la maîtrise du *P.mirabilis* dans les hôpitaux (**Linhares et al., 2013 ; Ben Ayed et al., 2019**).

En effet, beaucoup d'études ont montré la présence de cette bactérie avec une fréquence élevée dans la communauté chez des patients non hospitalisés ou des patients qui ont subi des procédures médicales telles qu'une dialyse, une intervention chirurgicale ou un cathéter (**Linhares et al., 2013**). La fréquence d'isolement de *P.mirabilis* varie selon les laboratoires cliniques, ce qui est apparemment lié à la propagation des infections dans les zones géographiques, les populations, le traitement antimicrobien empirique inapproprié, l'émergence des nouveaux agents pathogènes et les changements de résistance aux antimicrobiens, l'évaluation périodique de l'épidémiologie des agents pathogènes, les conditions d'exercice médical et à l'environnement médical (**Magliano et al., 2012 ; Horcajada et al., 2013**).

Durant notre étude (Décembre 2015 à Janvier 2017), les résultats ont montré que les services de réanimation, de dermatologie, de service de maladies infectieuses et parasitaires sont respectivement les plus touchés (30, 30 et 15%), suivi par le service de chirurgie (10%).

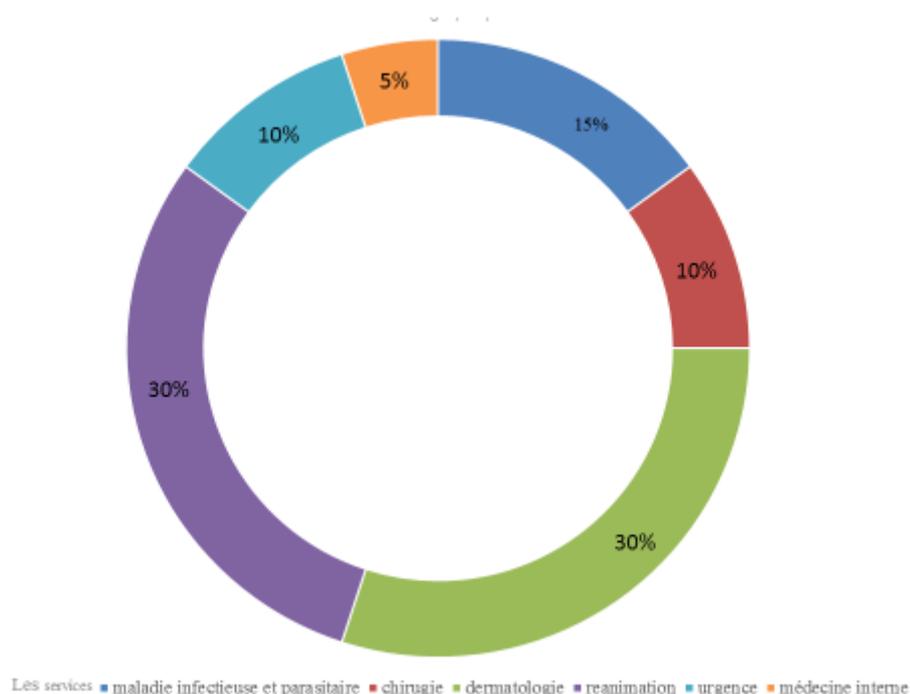


Figure 11. Distribution des souches nosocomiales de *P. mirabilis* selon les services.

Conformément à d'autres études (**De champs et al., 2000**), les souches de *P. mirabilis* ont été essentiellement collectées au niveau des services de soins de longue durée et les unités chirurgicales de 14,9 et 14,7% respectivement. Cela peut être expliqué par une transmission par voie aérienne ou par contact direct/indirect ou par une combinaison des deux voies. La transmission par voie aérienne est plus difficile à contrôler. De plus, cette espèce est une bactérie nosocomiale et communautaire, ceci peut être associé avec le contact entre les patients, le personnel et l'environnement (**Eames et al., 2009**). Des études ont montré qu'il est possible de mettre fin aux épidémies en améliorant l'observation des règles d'hygiène des mains et le nettoyage de l'environnement (**Eames et al., 2009**).

Les caractéristiques des patients influent sur le risque de développement de diverses infections nosocomiales. Les personnes âgées sont les plus à risque de développer des infections nosocomiales ; ceci peut-être d'une part, à cause d'immunosénescence, le déclin du système immunitaire et d'autre part, la prévalence très élevée de comorbidités. Le sexe joue également un rôle dans le développement de certaines infections nosocomiales (**Eckenrode et al., 2014**).

V.2.4. Répartition des souches selon le sexe

Parmi les 160 patients ayant des infections d'origine communautaire à *P. mirabilis*, nous remarquons un pourcentage très élevé (48.10%) chez les femmes par rapport aux enfants (30.6%) et les hommes (21.30%) (**Figure 12**). Concernant les souches d'origine hospitalière, le sexe féminin est plus dominant (55%) que chez le sexe masculin (35%) et les enfants (10%) (**Figure 13**).

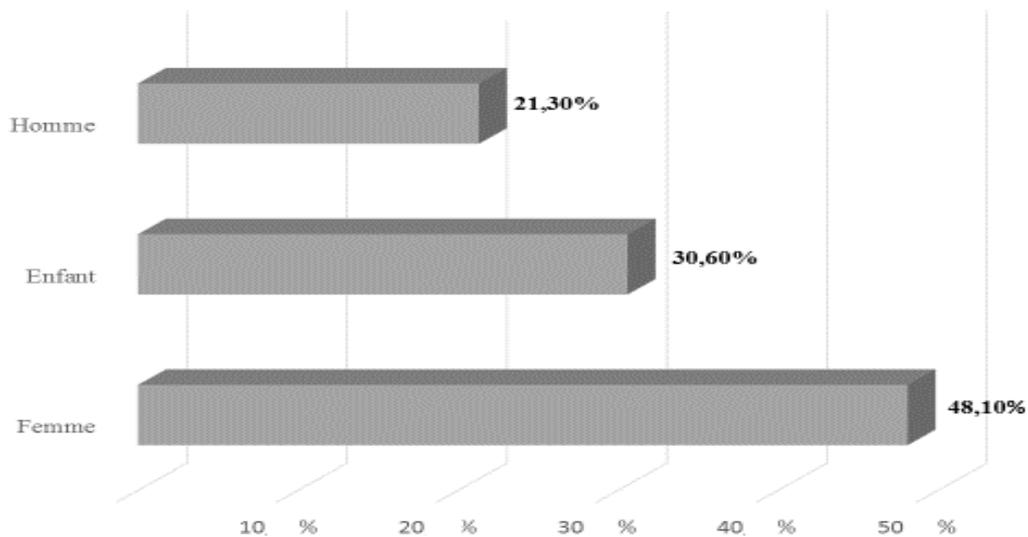


Figure 12. Répartition des souches de *P.mirabilis* d'origine communautaire selon le sexe.

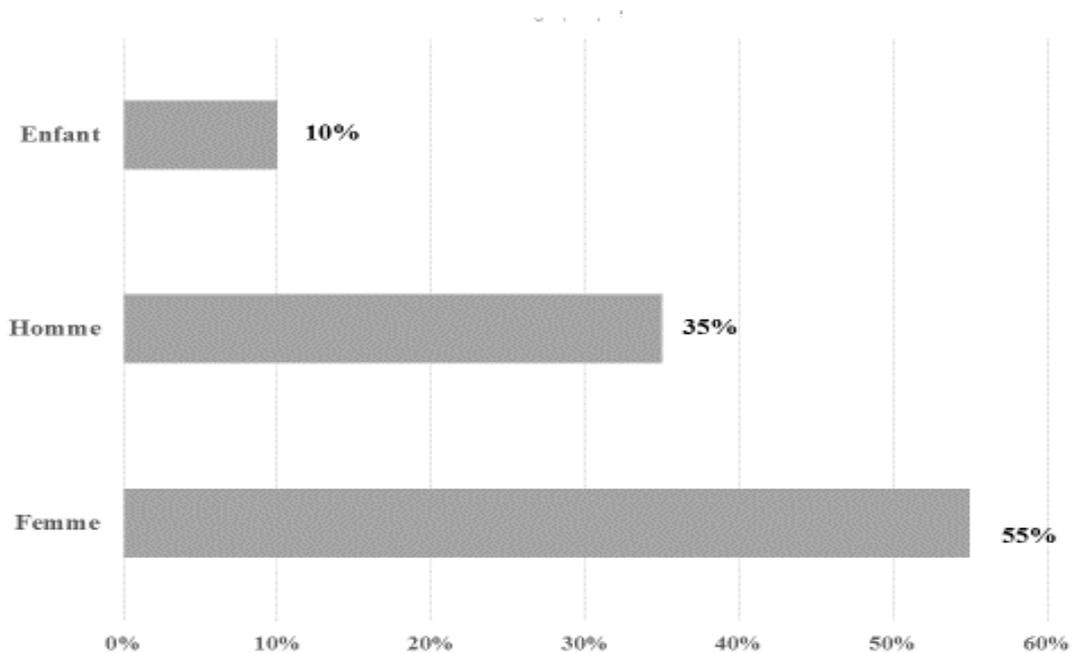


Figure 13. Répartition des souches de *P.mirabilis* d'origine hospitalière selon le sexe.

Ces résultats sont similaires à ceux de plusieurs études dans le monde, l'étude Canadienne a rapporté la prédominance de l'infection à *P.mirabilis* chez les femmes (73%)(**Laupland et al., 2007**). Une autre étude prospective sur les infections à *P.mirabilis* en Taiwan a également montré la prédominance du sexe féminin (61.2%) (**Chen et al., 2012**). Une étude d'incidence américaine basée sur l'auto-déclaration a retrouvé une incidence annuelle de 12% chez les femmes(**Astal et al., 2004 ;Foxman.,2010 ;Vranic et al.,2017**). La prédominance féminine serait liée à la configuration anatomique : brièveté de l'urètre, proximité des orifices génital et

anal, insuffisance des pratiques d'hygiène, rapport sexuel et grossesse(**Kamga, 2014**).

Cependant, l'environnement hospitalier a présenté la prédominance du sexeféminin (55%),suivi par le sexemasculin (35%).Ces résultatssont en accordavec ceux rapportés par des études françaises (59%)qui montrent une prédominance de l'infection à *P.mirabilis*chez le sexeféminin dans le milieu hospitalier(**de Champs et al.,2000**).Ces différences peuvent être expliquées par la variabilité des facteurs épidémiologiques et la stratégie d'utilisation des antibiotiques etle choix d'un traitement antimicrobien empirique. Parmi les facteurs susceptibles d'accroître le risque d'infection par *P. mirabilis* figurent le sexe homme, un cathéter plus long, un nettoyage ou un soin inapproprié du cathéter, une maladie sous-jacente et le manque d'antibiotiques systémiques (**Astal et al., 2004**).

V.2.5.Répartition des souchesde *P.mirabilis* selon les prélèvements

Parmiles 20souches hospitalières de *P.mirabilis*qui ont été isolées à partir de différents types de prélèvements, 45% de souches de*P. mirabilis*sont été trouvéesau niveau depus,10% au niveau des abcès,5%dans les infections urinaires,dans les infections vaginales, dans le liquide péritonéal, abcès périanal et escarre infectée (**Figure 14**).Tandis que les souches communautaires sont répandues dansl'urine (84.4%),8.1%de souches de*P. mirabilis*sont été trouvées dans les infections vaginales,5%dans le pus,1.3%dans les abcès, et 1.3% dans les abcès diabétiques(**Figure 15**).

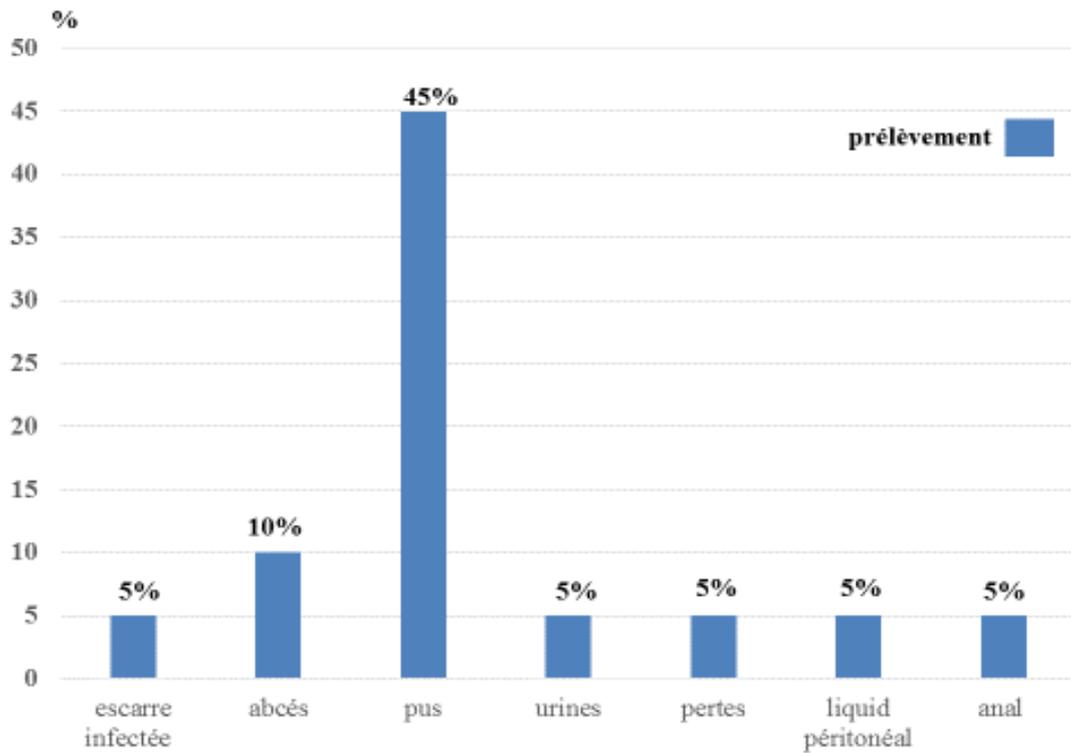


Figure 14. Répartition des souches de *P.mirabilis* hospitalières selon les prélèvements.

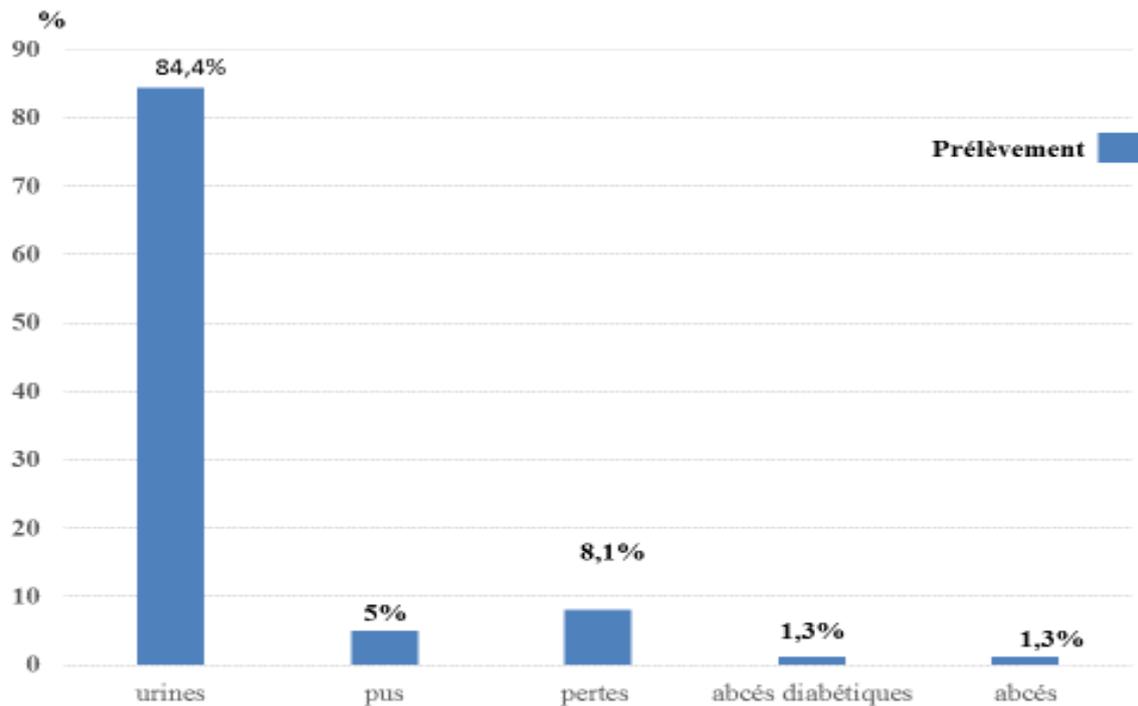


Figure 15. Répartition des souches de *P.mirabilis* communautaires selon les prélèvements.

Résultats et discussion

Dans ce travail, les infections urinaires sont les plus prédominantes dans la communauté (84.4%), ceci est en accord avec les études réalisées à Guelma (70%) (**Bentroki et al., 2012**), en France (70.2%) (**Dechamps et al., 2000**), au Sub-Saharan Africa (12.9%) (**Jombo et al., 2012**), au Canada (85.6%) (**Laupland et al., 2007**), au Taiwan (>10%) (**Chen et al., 2012**), au Japon (19%) (**Nagano et al., 2003**), (66.0%) (**Chonget al., 2013**), et (40%) en Russie (**Fursova et al., 2015**).

Les infections acquises en communauté due à *P. mirabilis* sont associées à une mortalité plus élevée (**Chen et al., 2012**). Cela est en relation avec la physiopathologie de ce type d'infection et l'ascension de bactéries du tractus gastro-intestinal vers le tractus urinaire. Le taux d'infection varie en fonction de la localisation géographique et la durée de l'étude, et les caractéristiques des patients examinés (l'âge, le sexe et l'état matrimonial des patients) (**Astal et al., 2004**).

Les souches hospitalières ont été essentiellement isolées de prélèvements de pus (45%), cela a été corroboré avec plusieurs rapports internationaux qui ont décrit que *P. mirabilis* peut provoquer une infection de la peau et de la muqueuse buccale chez les patients hospitalisés. Cette infection est due à une transmission interhumaine, en particulier dans les hôpitaux (**Forson et al., 2017; Leulmi et al., 2018**). Les services de réanimation et de chirurgie sont les principaux sites d'isolement; les deux tiers des infections nosocomiales de plaies sont survenues dans le service de chirurgie (**Adler et al., 1971; Mahrouk et al., 2012**).

Les hôpitaux sont des milieux qui réunissent les différentes maladies et constituent un milieu propice pour la propagation de ces infections. La promiscuité des malades dans les salles et dans les chambres d'hospitalisation favorise les infections transmissibles. Les principaux facteurs favorisants sont liés aux infections hospitalières et le long séjour. Ainsi une implication totale de toute la communauté hospitalière et alliés dans la sensibilisation sur les mesures d'hygiène hospitalière est indispensable pour prévenir ce fléau (**Lukuke et al., 2017**).

V. 3. Etude phénotypique de la résistance aux antibiotiques

V.3.1. Étude de la résistance des souches cliniques aux antibiotiques

Actuellement en Algérie, le phénomène de la propagation des bactéries multirésistantes est

Résultats et discussion

devenu un problème majeur, il a souvent été signalé comme un problème de santé dans les hôpitaux et les unités de soin ambulatoire. La surveillance épidémiologique de la résistance aux antibiotiques chez *P. mirabilis* est donc nécessaire pour évaluer un traitement approprié et de créer un programme national de surveillance. Le traitement d'une infection à *P. mirabilis* inclut au moins deux antibiotiques ou plus. Parmi les différentes familles d'antibiotiques proposées, les β -lactamines, les aminosides et les quinolones.

L'antibiogramme de 180 souches de *P. mirabilis* étudiées a montré un niveau de résistance très variant entre les souches d'origine communautaire et d'origine hospitalière vis-à-vis de 17 antibiotiques testés. Selon les lignes principales d'EUCAST/SFM, le niveau de résistance aux antibiotiques testés chez *P. mirabilis* isolée au milieu communautaire est très bas, notamment l'ertapénème (2.5%) et aztréonam (0.6%). Par contre, la totalité des souches de la communauté ont présenté des taux de résistance très élevés à l'ampicilline et l'amoxicilline de 28 à 42% à Khemis Miliana, de 41% à 55% à Ain Defla, et de 54 à 55% à Chlef. La résistance est supérieure de 20% pour le triméthoprime/sulfaméthoxazole, la fosfomicine et la rifampicine. Cette résistance est acquise et serait la conséquence de la pression de sélection liée à la consommation abusive de ces antibiotiques dans les pays en développement (**Kamga et al., 2014**). Ces taux élevés de résistance à l'amoxicilline justifient que les aminopénicillines ne soient plus actuellement recommandées en traitement probabiliste des infections (**Rakotovo-Ravahatra et al., 2017**).

- **Les bêta-lactamines**

Les isolats de CHU d'Oran ont présenté des pourcentages de résistance significativement plus élevés (45%) aux céphalosporines de troisième génération (cefotaxime, ceftriaxone) par rapport aux souches communautaires (5%) ($P < 0.01$). Nous avons remarqué que le taux de résistance aux amoxicillines est plus important (53,6%) chez les souches communautaires par rapport aux souches hospitalières (52,7%) du CHU d'Oran (**Figure 16 et 17**).

Dans cette étude, le taux de résistance (5%) des souches communautaires a été noté vis-à-vis des céphalosporines de 2ème, 3ème et même pour la 4ème génération. Il est important de noter que les souches de *P. mirabilis* d'origine hospitalière ont montré une résistance assez importante surtout aux céphalosporines, vis-à-vis de la cefotaxime (45%), de la ceftriaxone (45%), de la céfoxitine (45%) et de la céfépime (50%); la majorité des souches résistantes aux céphalosporines de 3ème génération sont aussi résistantes à la céftazidime. Cependant, un taux faible (2.5%) de résistance aux carbapénèmes (ertapénème) a été constaté (**Figure 16 et 17**).

Résultats et discussion

- **Les quinolones**

Ce fut également le cas pour la résistance aux quinolones (ciprofloxacine):un taux de résistance de 45% a été noté pour les souches hospitalières (CHU d'Oran) versus 8.7% pour les souches communautaires ($P<0.01$) (**Figure 16et 17**).

- **Les aminosides**

Le taux de résistance très élevé (50%) aux aminosides (la gentamicine) a été obtenu pour les souches hospitalières (CHU d'Oran) par rapport aux souches communautaires (10.62%) ($P<0.01$). Un taux de résistance très élevé (50%) a été trouvé vis-à-vis de la fosfomycine pour les souches hospitalières par rapport aux souches communautaires (26.9%) (**Figure 16et 17**).

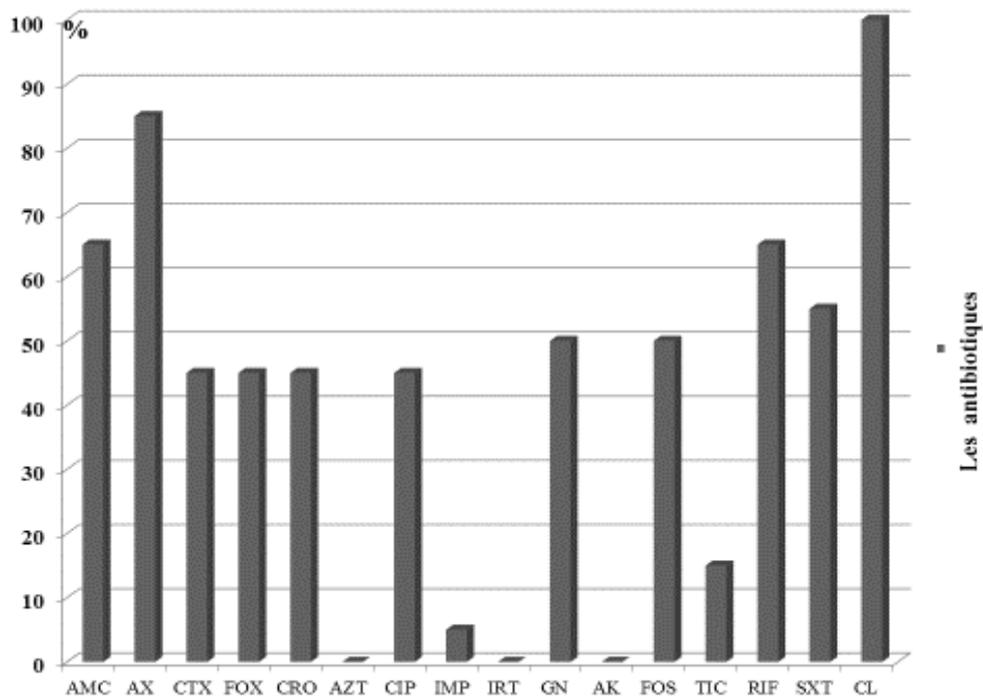


Figure 16. Antibiorésistance des souches de *P.mirabilis* d'origine hospitalière.

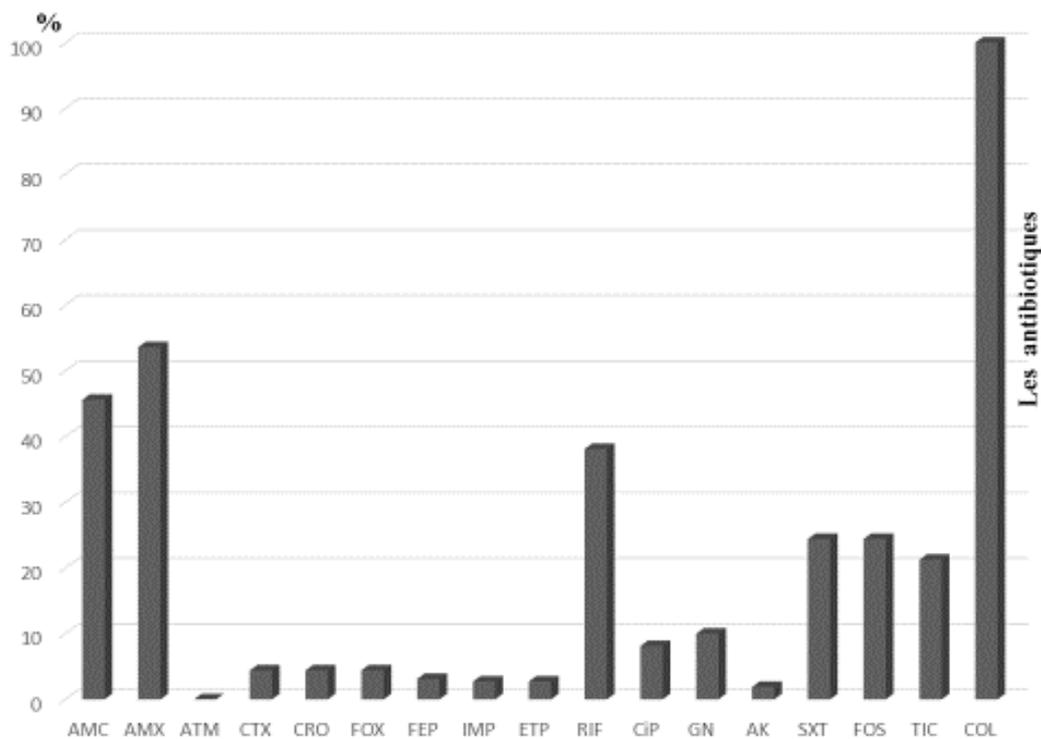


Figure 17. Antibiorésistance des souches de *P.mirabilis* communautaires.

AMX, amoxicillin; AMC, amoxicilline/ acide clavulanique; TIM, ticarcillin/ acide clavulanique; FOX, cefoxitine; AZT, Aztréonam; CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxone; CAZ, Ceftazidime; IPM, imipenem; ERT, ertapenem; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; AMK, amikacine; GEN, gentamicine; CIP, ciprofloxacine; FOS, fosfomycine; RIF, rifampicine.

En Algérie, très peu d'études ont été réalisées sur l'évolution de mécanisme de la résistance aux antibiotiques chez *P. mirabilis*. Le présent document évoque les différents phénotypes de la résistance aux antibiotiques chez *P. mirabilis* dans le milieu communautaire et hospitalier du Nord-Ouest d'Algérie. Des taux de résistance à certaines antibiotiques testés (la céfotaxime, ceftriaxone, céfoxitine, céfépime) sont supérieurs à ceux rapportés dans certaines études en Algérie (**Iabadene et al., 2009; Leulmi et al., 2018**) et en France (**Chanal et al., 2000 ; Biendo et al., 2005**).

En plus, ces taux de résistance sont généralement plus élevés en comparant avec le programme de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (AARN). En effet, sur l'ensemble des souches de *P.mirabilis* isolées à l'échelle nationale, la résistance aux céfotaxime/ceftriaxone était de 17,40% (**AARN, 2015**). En plus, une étude récente en Algérie a montré que des souches de *P.mirabilis* sont résistantes à la céfoxitine (1,03%), céfazoline (25,77%) et céfoxitine (99%) (**Aouf et al., 2018**). Une étude réalisée en Tunisie a montré que

Résultats et discussion

10,5% d'isolats ont présenté une sensibilité réduite aux céphalosporines de troisième génération (**Mahrouki et al., 2012**).

D'autres enquêtes au Canada et en France ont également montré que 1% et 6.9% des souches sont résistantes à la céfotaxime, céftriaxone, céftazidime (**De Champs et al., 2000 ; Laupland et al., 2007**). Contrairement en Asie, nos résultats sont assez inférieurs à ceux rapportés dans une étude au Taiwan entre 2002 et 2012, qui a révélé un taux de résistance à la céfotaxime variant de 81.7% à 92.6% sur l'ensemble des souches de *P. mirabilis* isolées. La résistance à la céftazidime est de 95.2% à 100% (**Chen et al., 2012 ; Wang et al., 2014**).

L'élimination d'une infection à *P. mirabilis* nécessite l'utilisation des antibiotiques le plus souvent en association avec des bêta-lactamines (des céphalosporines de 1, 2, 3 et 4^{ème} génération), mais leur large utilisation a contribué à l'émergence des souches résistantes conduisant ainsi à l'antibiothérapie restreinte et complique souvent leur prise en charge (**Hounsa et al., 2010 ; Rakotovao-Ravahatra et al., 2017**).

En effet, le choix du traitement empirique des infections urinaires (traitement probabiliste) augmente la résistance aux antibiotiques. De même, l'automédication antibiotique pose un problème dans les pays en développement où ces médicaments sont facilement disponibles souvent sans ordonnance médicale (**Hounsa et al., 2010 ; Rakotovao-Ravahatra et al., 2017**).

V.3.2. Co-résistance associée chez les souches de *P. mirabilis*

La résistance des souches aux céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération par la production des bêta-lactamases à spectre élargi est associée à une résistance aux quinolones et aux aminosides chez 14 souches soit 7.8%. Cela montre l'apparition de souches multirésistantes aux antibiotiques.

Le phénomène de la résistance aux antibiotiques (la fosfomicine, la quinolone, le triméthoprime/sulfaméthoxazole, la rifampicine) était plus fréquent chez les souches produisant des β -lactamases à spectre étendu seules ou en association avec des céphalosporinases (**Tableau 5**). Pour ces dernières, 23.3% de souches étaient résistantes au triméthoprime/sulfaméthoxazole, c'est un antibiotique qui a présenté une efficacité moyenne au milieu communautaire. Pour la rifampicine, des taux de résistances très élevés (37%) ont été notés chez les souches productrices de β -lactamases. Cette étroite association entre la

Résultats et discussion

production de β -lactamase et la résistance aux autres antibiotiques représente un grand risque d'échec thérapeutique.

L'antibiogramme de panel secondaire a également révélé un niveau très élevé (100%) de résistance aux ofloxacine, levofloxacine, céftazidime. Les taux restent moyens vis-à-vis de ticarcilline/l'acide clavulanique (**Tableau5**). Ce qui montre la gravité des infections nosocomiales et communautaires et déclare l'état d'alarme dans les hôpitaux. La pression de sélection liée à l'utilisation d'antibiotiques à large spectre et l'existence même dans l'environnement hospitalier d'un support génétique permettant la sélection de cette résistance, ce sont autant de facteurs importants dans l'évolution de la résistance aux antibiotiques (**Paterson et al., 2000**).

Dans la plus part des cas, la résistance associée chez la bactérie multirésistante est due à la prescription de bithérapie ou polythérapie dans les unités ambulatoires et même dans les services de soins.

Tableau5. Profil phénotypique de résistance chez les souches de *P.mirabilis* multirésistantes

Profil phénotypique de résistance

Code de souches	Souches communautaires
Souche1	AX ;AMC ;SXT;CTX;FEP;CRO;CAZ;GN;AK;FOS; CIP;OFL;LVL
Souche2	AX;AMC; SXT;CTX;FEP;CRO;CAZ;TIC;GN;AK; FOS; CIP;OFL;LVL;IMP
Souche3	AX;AMC; SXT;CTX;FEP;CRO;CAZ;TIC;GN;AK; FOS; CIP;OFL;LVL
Souche4	AX ;AMC;SXT;CTX;FOX;FEP;CRO;CAZ;GN;FOS;RIF; CIP;OFL;LVL
Souche5	AX;AMC;TIM;SXT;CTX;FOX;FEP;CRO;GN;FOS;RIF;CIP;OFL; LVL
	Souches hospitalières

Résultats et discussion

Souche50	AX;AMC;SXT;CTX;FEP;CRO;CAZ;GN;TIC;FOS;TIM;CIP;OFL;LVL;AN
Souche878	AX;AMC;SXT;CTX;FEP;CRO; CAZ;TIC; GN; TIM; FOS; CIP;OFL;LVL;AN
Souche844	AX;AMC;SXT;CTX;FEP;CRO;CAZ;TIC;GN;TIM;FOS;CIP;OFL;LVL;AN;
Souche33	AX;AMC;SXT;CTX;FOX;FEP;CRO;CAZ;GN;FOS;RIF;CIP;OFL;LVL;AN
Souche40	AX;AMC;TIC;TIM;SXT;CTX;FOX;CAZ;CRO;GN;FOS;RIF;CIP;OFL;LVL;AN
Souche971	AX;AMC;TIC;TIM;SXT;CTX;FOX;CAZ;CRO;GN;FOS;RIF;CIP;OFL;LVL;AN
Souche1259	AX;AMC;SXT;CTX;FOX;FEP;CRO;CAZ;TIC;TIM;GN;FOS;CIP;OFL;LVL
Souche47	AX;AMC;SXT;CTX;FOX;FEP;CRO;CAZ;TIC;GN;FOS;CIP;OFL;LVL
Souche252S	AX;AMC;TIM;SXT;CTX;FOX;FEP;CRO;CAZ;GN;TIC;FOS;RIF;CIP;OFL;LVL
ouche43	AX;AMC;TIM;SXT;CTX;FOX;FEP;CRO;GN;FOS;RIF ;AX
Souche51	AMC;SXT;CTX;FOX;FEP;CRO; CAZ; FOS;RIF; CIP;OFL; LVL

AMX, amoxicillin; AMC, amoxicilline/ acide clavulanique; TIM, ticarcillin/ acide clavulanique; FOX, cefoxitine; AZT, Aztréonam; CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxone; CAZ, Ceftazidime; IPM, imipenem; ERT, ertapenem; SXT, triméthoprim/sulfaméthoxazole; AMK, amikacine; GEN, gentamicine; CIP, ciprofloxacine; FOS, fosfomycine; RIF, rifampicine.

Dans cette recherche, la plupart des souches résistantes aux céphalosporines avaient montrée une résistance associée aux aminosides (gentamicine, amikacine), aux quinolones, aux triméthoprim/sulfaméthoxazole, au rifampicine, et au fosfomycine. Ces derniers sont efficaces sur les souches communautaires de *P. mirabilis* (Paterson *et al.*, 2000). L'émergence des souches de *P. mirabilis* multirésistantes a été déjà constatée dans plusieurs rapports scientifiques (Endimiani *et al.*, 2005 ; Tumbarello *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2015; Gharout-Sait *et al.*, 2015).

Concernant la co-résistance associée, nous avons remarqué que les souches de *P. mirabilis* communautaires et hospitalières ont exprimé un phénotype de production de β -lactamase (BLSE); elles sont aussi résistantes aux fluoroquinolones. Ces résultats sont plus élevés (8.9%) par rapport à ceux retrouvés dans d'autres études en Algérie (0%) (ARNN., 2014 ; ARNN., 2015 ; Leulmi *et al.*, 2018), mais elle est plus basse que celle trouvée dans l'Europe (16%) (Saito *et al.*, 2007). Notre étude montre que le taux des souches résistantes au

Résultats et discussion

fluoroquinolone (ciprofloxacine) est supérieure à ceux enregistrés dans plusieurs régions dans le monde (Saito *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012).

Les quinolones peuvent être considérées comme un traitement de choix pour soigner les infections moins graves causées par des micro-organismes producteurs de β -lactamases tels que les infections des voies urinaires. L'augmentation de la résistance aux quinolones chez des isolats qui sont également producteurs de β -lactamases limitera le rôle de ces antibiotiques dans le traitement des infections (Paterson *et al.*, 2000). L'évolution de la résistance aux antibiotiques est toujours liée à l'émergence des souches multirésistantes et la diffusion de plusieurs mécanismes de résistance dans un moment donné telles que : l'hyperproduction de céphalosporinases chromosomiques, les céphalosporinases plasmidiques, les β -lactamases à spectre étendu.

De ce fait, l'analyse des mécanismes phénotypiques des souches de *P. mirabilis* multirésistantes a démontré que 100% des souches résistantes à la gentamicine sont aussi résistantes aux β -lactamines. En plus, 15% des souches totales ont été résistantes à la gentamicine. Nos résultats sont plus élevés par rapport à ceux notés à l'échelle nationale (11.3%) (Leulmi *et al.*, 2019) et en Europe (0%) (Saito *et al.*, 2007). En revanche pour la résistance à l'amikacine, nous avons noté un taux de résistance assez diminuée (1.9%). Ce taux est inférieur à celui constaté par le Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance (4.6%) (AARN., 2015) et à celui retrouvé en Italie (12%) (AARN, 2012 ; Aogáin *et al.*, 2016).

Le taux de résistance au sulfaméthoxazole-triméthoprimine retrouvé dans le milieu nosocomial est de 55 % ; ce pourcentage est élevé par rapport à celui trouvé dans les hôpitaux au niveau national (52,4%) (Bentroki *et al.*, 2012 ; AARN., 2016), en Europe (43.9%) (De Champs *et al.*, 2000) et en Asie (34.3%) (Chen *et al.*, 2012). La même remarque a été notée vis-à-vis de la rifampicine au milieu hospitalier (65%) et au milieu communautaire (37%).

Le sulfaméthoxazole-triméthoprimine (co-trimoxazole) est une association entre deux antibiotiques : le triméthoprimine et le sulfaméthoxazole. C'est un bactériostatique très fort contre les bactéries d'origine communautaire. Il est souvent prescrit dans les unités de soins ambulatoires et dans les services de santé communautaire. Leur prescription en ville a démontré son intérêt sur la prévention contre l'émergence de la résistance (Pichard, 2002). Ce pourcentage (23.3%) de résistance de cet antibiotique en milieu communautaire et hospitalier pourrait être expliqué par une prescription aléatoire et non orienté pour traiter les bronchites et les pharyngites.

Résultats et discussion

Notre étude montre un pourcentage de résistance réduit (2.7%)aux carbapénèmes (l'imipénème,l'ertapénème).Ce taux est élevé par rapport à celui retrouvé dans les rapports nationaux(2,6%) (AARN,2015),(2.3%) (AARN, 2016) ,et faible par rapport à celui constaté dans les rapports internationaux (34.7-92.4%)au Taiwan (Wang *et al.*, 2014), et en Russie(43%)(Fursova *et al.*,2015).Par ailleurs, ces souches restent très sensibles à l'aztréonam avec un taux de résistance de1.6 %. Celaconcorde avec les rapports algériens(AARN,2015 ;AARN, 2016) ainsi que le rapport Français(Endimianiet *al.*,2005).L'aztréonamreste l'antibiotique de choix,ce qui permet d'éviter la difficulté detrouver un traitement.

V.3.3.Résistance aux antibiotiques et provenance des souches

La résistance de *P.mirabilis*aux antibiotiques varie d'un laboratoire à l'autre et d'une région à l'autre. Effectivement, les taux de résistance sont plus faibles pour les souches isolées au niveau de laboratoire de Chlef, ils varient de 1.7% à 13.1% pour les céphalosporines. Le taux de résistance présente 13.1% pour les aminosides et 4.9% pour la ciprofloxacine. Concernant, les taux de résistance pour les souches isolées au niveau du laboratoire d'Ain Deflasont entre 5% -8.2% pourles céphalosporines, 9.8% pour ciprofloxacine, entre0.6% et 9.4% pour les aminosides.Les souches de*P.mirabilis* d'origine hospitalière (CHU Oran) a révélé une forte résistance à tous les antibiotiques testés, particulièrement, les β -lactamines,la gentamicine, la ciprofloxacine (de 45% à 50%) (Tableau 6).

Tableau 6.Pourcentage de résistance des souches de *P.mirabilis*communautaires et hospitalières.

Souches communautaires (N=160)		Souches hospitalières	
<i>P.mirabilis</i> de Khemis Miliana (n=14)	<i>P. mirabilis</i> d' Ain Defla(n=85)	<i>P. mirabilis</i> de Chlef(n=61)	<i>P.mirabilis</i> d'Oran (n=20)
R %	R %	R %	R %

Résultats et discussion

AX	6	42.9	47	55.3	33	54.1	17	85
AMC	4	28.6	35	41.2	34	55.7	13	65
CTX	1	7.1	5	5.9	1	1.7	9	45
FOX	1	7.1	7	8.2	8	13.1	9	45
CRO	1	7.1	6	5	3	4.91	9	45
ATM	0	0	0	0	1	1.6	0	0
IPM	2	14.3	2	2.4	1	1.6	2	10
ETP	2	14.3	2	2.4	1	1.6	0	0
CIP	1	7.1	10	11.8	3	4.9	9	45
GN	1	7.1	8	9.4	8	13.1	10	50
AK	1	0.6	1	0.6	1	0.6	0	0
FOS	6	42.9	22	21.2	15	24.6	10	50
RIF	3	21.4	27	31.8	30	49.1	13	65
SXT	3	21.4	10	32.3	10	16.4	11	55
CL	14	100	85	85	9	14.8	20	100
TIC	1	7.1	27	25.9	61	100	3	15

AMX, amoxicillin; AMC, amoxicilline/ acide clavulanique; TIM, ticarcillin/ acide clavulanique; FOX, ceftoxitine; AZT, Aztréonam; CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxone; CAZ, Ceftazidime; IPM, imipenem; ERT, ertapenem; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; AMK, amikacine; GEN, gentamicine; CIP, ciprofloxacine; FOS, fosfomycine; RIF, rifampicine. N, nombre total des souches; R, souches résistantes.

Les raisons de variations de la résistance aux antibiotiques sont très incomplètement élucidées mais sont probablement en rapport avec le fait que d'une part, la résistance bactérienne est un phénomène complexe, polymorphetouchant selon les cas un antibiotique, une famille d'antibiotiques (résistance croisée) ou plusieurs familles d'antibiotiques (résistance associée) et que d'autre part, l'émergence de la résistance chez un pathogène donné est souvent le résultat d'une chaîne d'événements de sélection. La résistance aux antibiotiques varie d'une région du monde à l'autre selon les conditions d'utilisation des antibiotiques et leur usage massif et répété; que ce soit en communauté ou à l'hôpital, en santé animale. La résistance varie selon la molécule d'antibiotique considérée, et aussi selon la capacité de diffusion dans l'environnement et la transmission à d'autres patients (Skurnik et Andreumont, 2006).

V.3.4. Identification phénotypique des mécanismes de résistance

Dans notre travail, nous avons utilisé plusieurs méthodes pour confirmer le phénotype de résistance chez *P. mirabilis*, parmi lesquelles : la mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI), le test de synergie et les géloses de chromogène (Figure 18).

- **Concentration minimale inhibitrice (CMI) et la résistance au panel secondaire**

La mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par les bandelettes d'E-test a concerné 16 souches multirésistantes dont 10 souches productrices de β -lactamases seules ou en association avec des céphalosporinases. Les souches présentent des niveaux élevés de résistance à tous les antibiotiques testés. Les CMI de la céftriaxone et la céfotaxime varient de 12 à 256 mg / ml.

Les CMI des souches résistantes à l'amikacine sont entre 4 μ g/ml et 8 μ g/ml. L'aminoside est un antibiotique bactéricide souvent utilisé en bithérapie associée avec les bêta-lactamines afin d'induire une synergie et prévenir l'apparition de la résistance. Dans ce cas, les bactéries présentent un niveau de résistance aux aminosides conduisant à une baisse au niveau de l'efficacité du traitement et affaiblir le spectre empirique de la couverture.

- **Test de synergie**

Sur l'ensemble des souches étudiées, une image de synergie a été observée entre les disques contenant les antibiotiques (AMC et CTX et/ou FOX et ATM et FEP) chez 5 souches de *P. mirabilis*. Cette image de synergie indique clairement la production des β -lactamases à spectre étendu chez 8.9% de souches. Cependant, une absence de synergie a été observée chez 5.6% des souches multirésistantes. Cela peut être expliqué par l'hyperproduction de céphalosporinase de type AmpC chromosomique qui est probablement masquée par les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) (**Figure 18**).

- **Gélose chromogène BLSE (chromID™ DRIG/MAC BLSE, bioMérieux, France)**

La gélose chromogène BLSE permet de sélectionner (8.9%) de souches productrices de β -lactamases (**Figure 18**). Le milieu chromogénique a montré des performances égales en termes de la sensibilité, lorsque tous les isolats producteurs de β -lactamases ont été sélectionnés. Cette évaluation a démontré que la gélose chromogène BLSE fonctionne très bien favorisant la croissance des isolats producteurs de β -lactamases à spectre étendu et inhibant les souches sensibles. Plusieurs rapports scientifiques ont confirmé la fiabilité de ce milieu et suggère que ce milieu pourrait être un excellent outil pour le dépistage rapide des souches productrices de β -lactamases à spectre étendu (**Huang et al., 2010**). Nous avons pu confirmer la capacité de milieux sélectifs à différencier la résistance induite par les β -lactamases à spectre étendu (**Huang et al., 2010**).

Résultats et discussion

Les tests de confirmation de phénotype de résistance aux antibiotiques (l'antibiogramme, le test de synergie et la CMI) réalisés sur l'ensemble des souches de *P.mirabilis* ont permis de classer les souches en deux phénotypes de résistance en faveur de la production de β -lactamase. Ces souches multirésistantes sont productrices des β -lactamases ou/et céphalosporinases (**Figure 18**).

- **Gélose chromogène CARBA (CARB/OXA)**

Au total, cinq souches résistantes aux carbapénèmes ont été détectées par l'antibiogramme sur la gélose de Mueller-Hinton, deux souches résistantes à imipénem détectées par le milieu de gélose CARBA chromogène (2,2%). En revanche, trois souches résistantes à carbapénème produisent l'oxacilinase (2,7%) (**Figure 18**). Les résultats de l'antibiogramme sur la gélose de Mueller-Hinton ont été consolidés par ceux du gélose chromogène, qui viennent supposer les modèles de la résistance chez les souches de *P.mirabilis*.

D'après nos résultats, nous avons constaté que la chromIDCarba est un milieu chromogénique le plus sensible et le plus spécifique pour la détection de carbapénémase. Nous avons pu interpréter plus facilement les résultats. En effet, plusieurs études ont confirmé que le chromIDCarba est plus spécifique que le test de synergie sur gélose Mueller-Hinton (**Simner et al., 2015**).

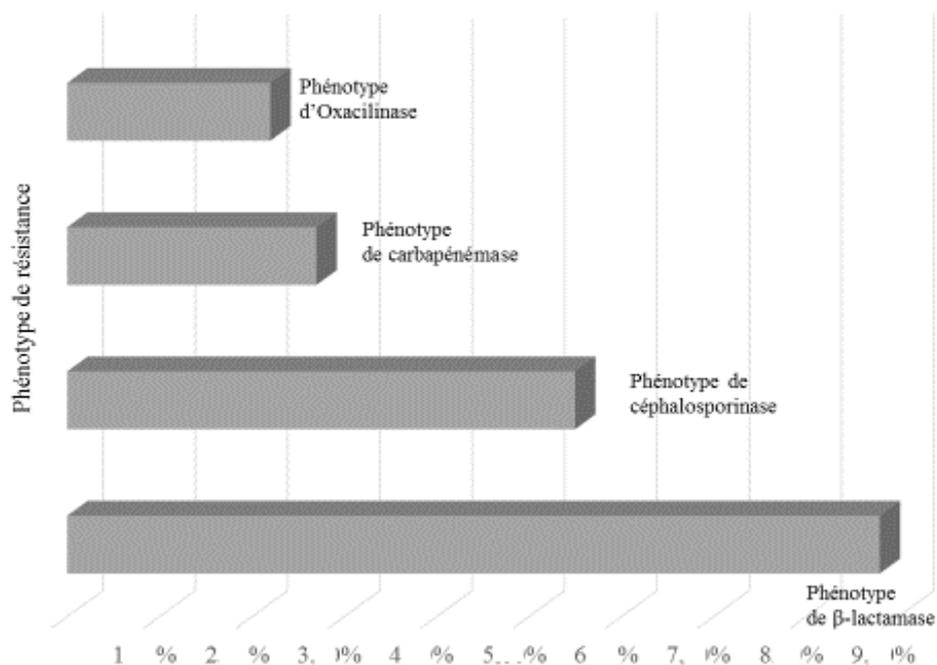


Figure 18.Prévalence des phénotypesde résistance aux antibiotiques chez *P.mirabilis*.

Conformément à d'autres études (**Chanal et al., 2000; Biendo et al., 2005; Laupland et al., 2007; Mahrouki et al., 2012**), la prévalence des souches productricesde bêta-lactamasesisolées de l'hôpital est de 45%.Ce pourcentage est supérieur à ceux rapportés en France(1.3%),au Canada (1%) et en Tunisie (6.5%).Ce taux reste supérieur à celui retrouvé au milieu communautaire (4.37%) (**ARNN., 2014**).Par ailleurs, le taux d'isolement des souches productrices de bêta-lactamasesdans cette étude est assez élevé.Ces résultatsont en accord avec ceux obtenus à l'hôpital de Pavia (Nord de Italie) où les souches productrices de bêta-lactamasesont arrivés à 48% sur l'ensemble dessouches de *P. mirabilis* recensées (**Pagani et al., 2002**).Le pourcentage des souches productrices de céphalosporinase (AmpC) est de 5%à l'hôpital d'Oran et de 3.6% dans les hôpitaux de la Corée(**Song et al., 2011**).

En revanche, le taux de prévalence des souches productrices de bêta-lactamase dans le milieu communautairea été analysédans les huit laboratoires en Algérie.Il semble être inférieure(4.37%) à celui rapporté dans le rapportde Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des bactéries (5,04 %)(**AARN., 2015**).Il est très réduit par rapport ce qui a été trouvé au Japon (19.6%) et au Taiwan (35.8%)(**Chen et al.,2012 ;Chonget al., 2013**).

- **Détection des souches productrices de carbapénémase (test Carba NP)**

Dans notre travail, nous n'avons paspu détecter les souches productrices de carbapénémase par la technique de carbaNP test(**Figure19**).

La détection des souches productrices de carbapénémase est un élément de base de la prévention de leur diffusion épidémique.Aujourd'hui, cette détection est réalisée au laboratoire avec des méthodes diverses (carba NP test, tests d'inhibition, PCR). L'intérêt de test Carba NP requièreune quantité de temps technique significative et permet d'obtenir un diagnostic rapide (<30 minutes) à partir de colonies suspectes obtenues sur milieu chromogène.

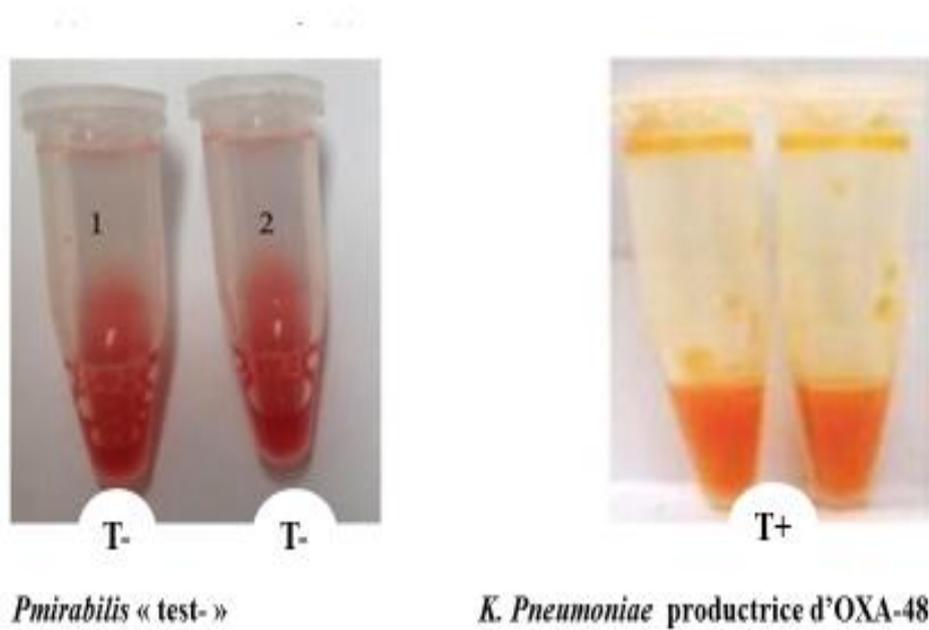


Figure 19. Résultat négatif (T-) ou positif (T+) du CarbaNP test chez *P. mirabilis*.

Ces résultats négatifs (Faux négatifs) sont forcément associés à la classe d'enzyme ou à l'inhibition par un tampon mais pas aux espèces ou clones (Österblad *et al.*, 2014). En effet, plusieurs études ont observé une certaine corrélation entre le taux d'hydrolyse et les résultats de Carba NP test. Le taux d'hydrolyse (mesuré par spectrophotométrie UV) est souvent inférieur pour les enzymes de type OXA-48. Ainsi, la lyse incomplète et la quantité de bactéries sont considérées parmi les facteurs responsables des résultats négatifs (Österblad *et al.*, 2014).

V. 4. Recherche moléculaire des gènes de résistance

Parmi les 180 souches de *P. mirabilis*, 16 souches multirésistantes ont été sélectionnées sur la base de leurs profils phénotypiques de résistance aux antibiotiques. Afin de caractériser les conducteurs de la résistance, les gènes de la PCR positifs ont été séquencés et corrigés par le logiciel Sequencher 4.1.4 et ChromasPro 2.4.1.

V.4.1. Gènes de résistance aux β -lactamines

La PCR standard couplée avec la technologie à haut débit (séquençage) ont montré que

Résultats et discussion

100% des souches portent des gènes de résistance aux β -lactamines (**Figure 20-22**). En utilisant la PCR standard, nous avons pu amplifier des fragments de différentes tailles, correspondant aux gènes de résistance de bêta-lactamine.

Au cours de ce travail, nous notons que plus de la moitié des souches multi-résistantes ont le gène de β -lactamases de classe C. Le profil génotypique des β -lactamases est comme suit : le gène *bla_{CTX-M-2}* a été détecté chez 2.2% des souches d'origine communautaire. Le gène *bla_{SHV-2a}* a été observé chez 1.1% des souches de *P. mirabilis*. Les gènes *bla_{CMY-2}* et *bla_{TEM-1}* ont été détectés chez (5.5%) de souches hospitalières (**Figure 20-22**).

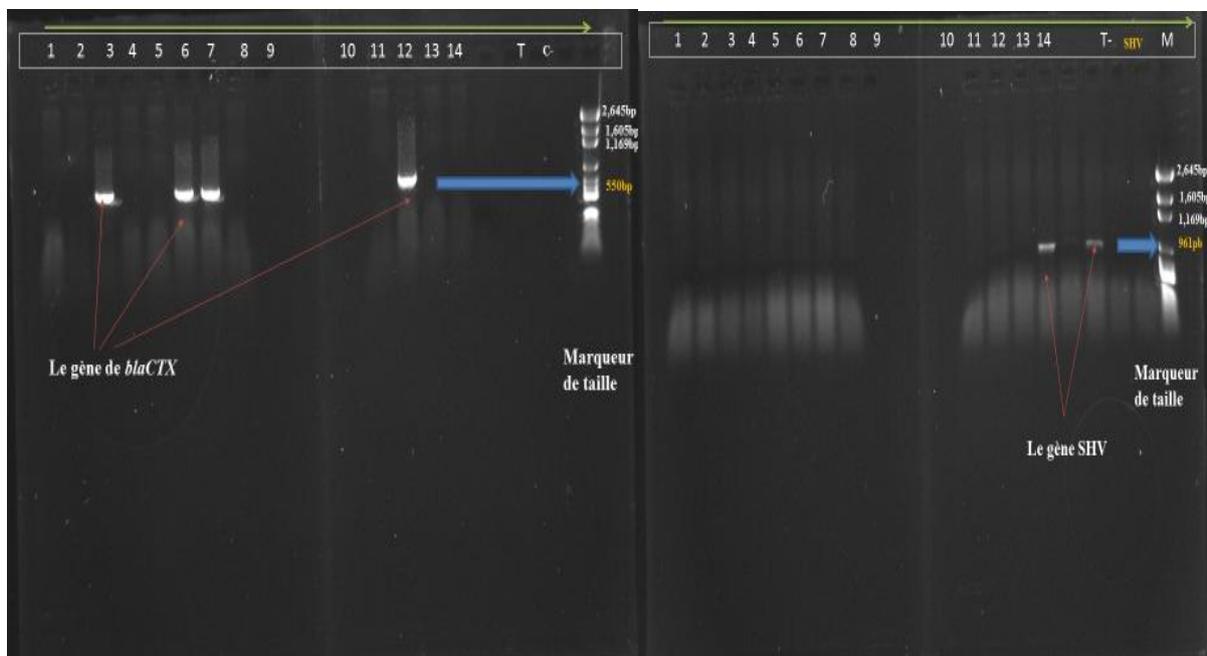


Figure 20. Profil électrophorétique des produits de la PCR des gènes *bla_{CTX-2}* et *bla_{SHV-1}*.

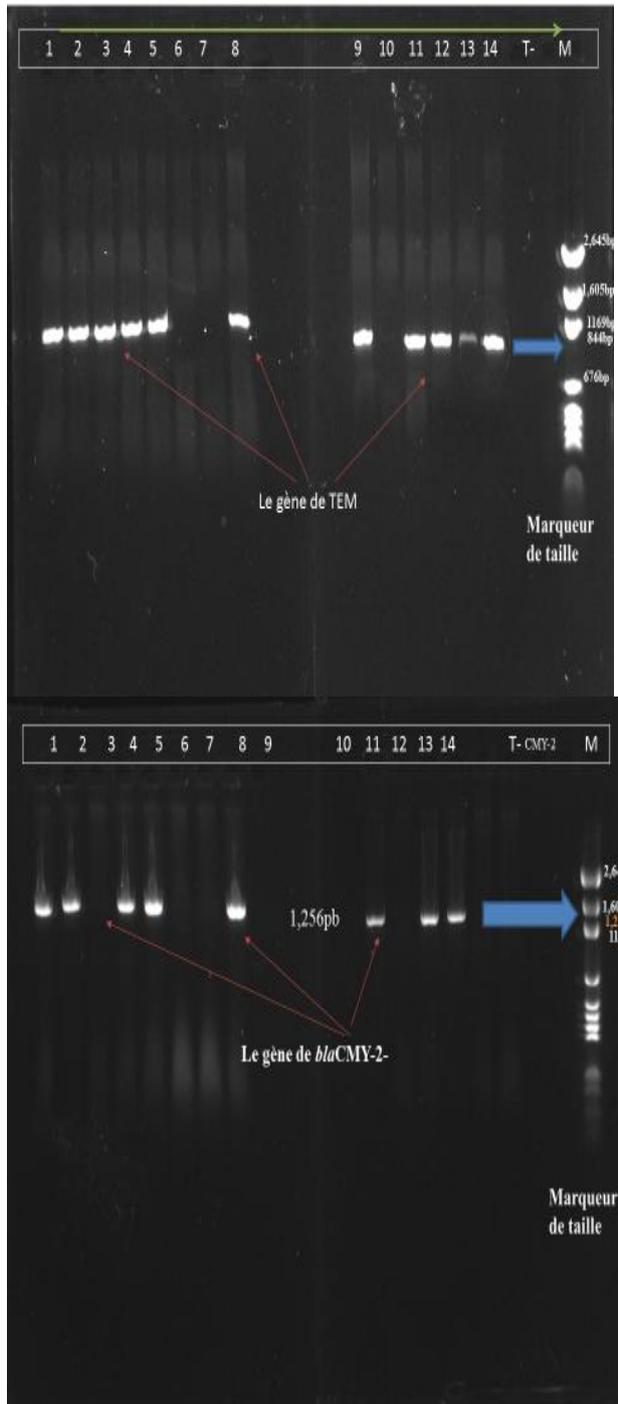


Figure21. Profil électrophorétique des produits de la PCR des gènes *bla*_{CMY-2}- et *bla*_{TEM-1}-.

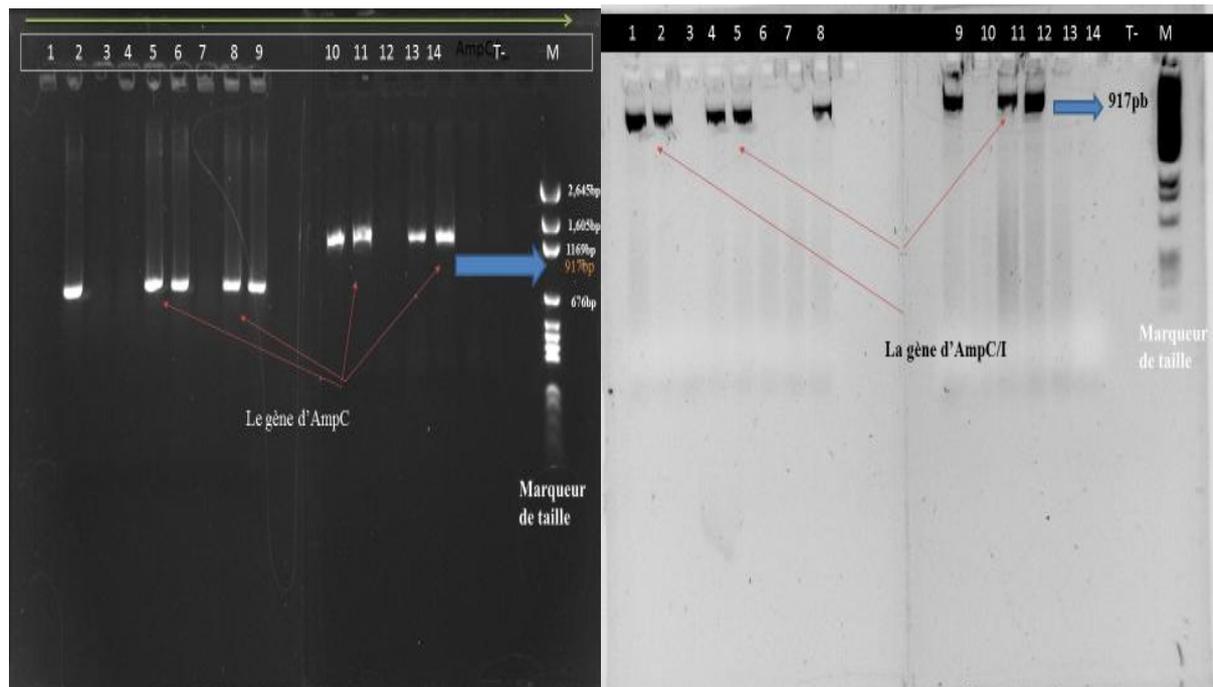


Figure 22. Profil électrophorétique des produits de la PCR des gènes bla_{AmpC1} et bla_{AmpC1} .

La prévalence des gènes de résistance chez *P. mirabilis* diffère d'une manière significative entre les pays. Les bêta-lactamases de type TEM-1 et CMY-2 ont été déjà décrits chez *P. mirabilis* à l'hôpital de Beni-Messous à Alger et dans la communauté de Béjaïa (Labanden *et al.*, 2013 ; Gharout-Sait *et al.*, 2015).

Le gène codant la bêta-lactamase de type CTX-M-2 est le plus fréquent dans les souches communautaires. Il a été détecté plus récemment chez des souches cliniques dans plusieurs régions au Japon et au Brésil (Rodriguez *et al.*, 2005 ; Kato *et al.*, 2017). Yaici *et al.* (2017) ont déjà observé ce gène chez un isolat d'*Escherichia coli* en Algérie (Yaici *et al.*, 2017). Il n'y a aucune description de ce gène chez *P. mirabilis* en Algérie. A l'heure actuelle, le gène SHV-12 a été détecté chez d'autres espèces d'entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) en Algérie (Labanden *et al.*, 2009 ; Gharout-Sait *et al.*, 2015) et dans plusieurs pays du monde (Song *et al.*, 2011 ; Chouchani *et al.*, 2011).

La diffusion du gène CTX-M est la conséquence d'une longue chaîne de mobilisation entre les différents microorganismes combinée avec des structures plus proches de la nature (intégrons, transposons ou plasmides reliés avec ce gène). Les bêta-lactamases sont associées à différents éléments génétiques (les transposons et les intégrons). Les intégrons sont capables de capturer et de mobiliser des cassettes de gènes de résistance dont l'expression est contrôlée par

Résultats et discussion

unpromoteur orienté au niveau d'un site spécifique à médiation par l'intégrase, c'est un site de la recombinaison (*attI*) (**Power et al., 2005**).

Dans cette étude, le gène codant la β -lactamase de classe C (CMY-2) a été détecté chez toutes les souches d'origine hospitalière et une seule souche communautaire avec un fragment de 1256pb. Le gène CMY-2 a été identifié pour la première fois dans une souche de *P.mirabilis* isolée en 2002 chez un patient algérien transféré en France (**Decré et al., 2002**). Le même gène a été observé dans une souche isolée à l'hôpital d'Alger en 2007 (**Iabadene et al., 2009**) et dans plusieurs pays (**Chanal et al., 2000; Biendo et al., 2005; Laupland et al., 2007; D'Andrea et al., 2011; Chérif et al., 2016; Aogáin et al., 2016**).

Le gène CMY-2 est la principale cause de la résistance aux céphalosporines. Dans cette étude, la résistance des souches de *P.mirabilis* est due à l'enzyme de céphalosporinase d'AmpC qui est d'origine plasmidique et d'autres supports inconnus. En général, les enzymes d'AmpC sont codées à la fois par des gènes chromosomiques et plasmidiques acquis qui sont transférés du chromosome de certaines espèces vers des plasmides, à la suite de mobilisations méditées par des éléments génétiques comme IS26, ISEcp1 ou ISCR1 (**Jacoby., 2009**).

Le réservoir de gène AmpC est *Citrobacter freundii*. Ceci peut confirmer l'hypothèse de l'acquisition du conducteur par transfert horizontal (**Soucy et al., 2015**). Ces enzymes hydrolysent les pénicillines et la plupart des céphalosporines à spectre étroit et des céphalosporines à spectre étendu et l'aztréonam (**D'Andrea et al., 2006; Jacoby., 2009**). Dans cette situation, les carbapénèmes restent la seule solution pour le traitement contre les infections aiguës dues à une bactérie productrice de céphalosporinases (AmpC).

En effet, l'analyse des rapports relatifs sur la propagation des conducteurs des gènes de type *bla_{CMY-2}* chez *P. mirabilis* révèle que ce gène a été acquis et inséré dans le chromosome des entérobactéries depuis les années 1990 en Europe. Plusieurs études montrent aussi leur propagation progressive dans le monde. Il est donc probable qu'ils représentent un véritable groupe clonal international de *P. mirabilis* en cours de la diversification continue dans le temps et l'endroit (**Chanal et al., 2000; Biendo et al., 2005; Laupland et al., 2007; Jacoby., 2009; D'Andrea et al., 2011; Chérif et al., 2016; Aogáin et al., 2016**).

V.4.2. Gènes de résistance aux carbapénèmes

Dans cette étude, 5 souches de *P.mirabilis* communautaires et hospitalières ont été caractérisées par une sensibilité réduite à la famille de carbapénèmes (Imipénème et Ertapénème). Trois

Résultats et discussion

souches ont été reliées à la résistance aux carbapénèmes. Notre étude rapporte l'émergence de gène *bla*_{OXA-48} parmi les souches de *P.mirabilis* d'origine humaine. Ces souches ont été isolées au niveau du laboratoire privé d'Ain Deflaet à l'hôpital de Chlef (Figure 23).

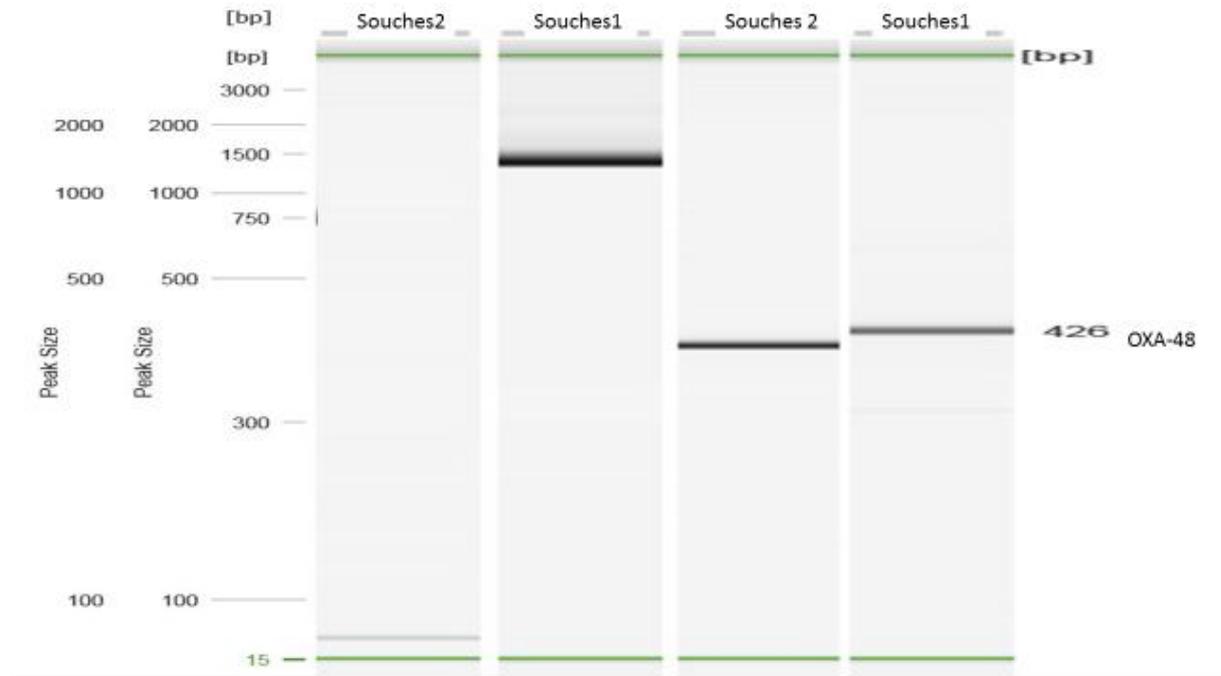


Figure 23. Profil électrophorétique des produits de la PCR du gène *bla*_{OXA-48}.

Ce travail met en évidence la large distribution de même clone de *P.mirabilis* producteur d'enzyme carbapénémase OXA-48 dans des différentes régions géographiques en Algérie. Le gène d'OXA-48 qui confère la résistance à toutes les molécules de carbapénèmes a été trouvé chez des souches *Escherichiacoli*, *Klebsiellapneumoniae* d'origine humaine et animale en Algérie (Yanat *et al.*, 2016 ; Mairi *et al.*, 2018).

Les gènes de classe D ont été détectés au niveau de différents écosystèmes, y compris l'environnement clinique et l'environnement externe (animaux de compagnie, aliments destinés à la consommation humaine). Ces endroits peuvent être considérés comme des réservoirs des bactéries multirésistantes (Mairi *et al.*, 2018), ce qui renforce la diffusion de gène *bla*_{OXA-48} qui constitue aujourd'hui le variant le plus fréquent de classe D. Ce gène est impliqué aussi bien dans des infections et qui est responsable de diverses pandémies à l'échelle internationale (Yanat *et al.*, 2016 ; Mairi *et al.*, 2018).

Résultats et discussion

Le gène codant l'enzyme d'OXA-48 a été identifié pour la première fois en 2003 dans une souche de *Klebsiella pneumoniae* en Turquie (Poirel *et al.*, 2012). Depuis, le nombre de cas de portage et/ou infection due à une souche productrice d'enzyme OXA-48 augmente régulièrement dans les pays d'Asie, Europe, Afrique (Poirel *et al.*, 2012). Selon le rapport de la Société Française de Microbiologie (CA/SFM), le gène codant les carbapénèmases (OXA-48-like) est le plus fréquent en France (CA/SFM, 2018). Concernant les souches de *P. mirabilis* qui sont résistantes au carbapénème sans production de carbapénèmases, leur résistance à l'imipénème est due à la protéine de liaison à la pénicilline altérée (PLP) ou à l'affinité réduite à l'imipénème (Neuwirth *et al.*, 1995) et aussi à l'augmentation de l'expression de gène d'OMP et sa régulation par le gène ARNs (Tsai *et al.*, 2015).

Nos résultats montrent qu'il existe un potentiel de transmission des gènes de résistance chez *P. mirabilis* de l'hôpital à la communauté et inversement. Tout d'abord, ces gènes d'OXA-48-like sont endémiques et se trouvent dans tous les biotopes. Cette diffusion est due essentiellement à la contamination croisée entre les mains de professionnels de la santé et les équipements hospitaliers ou due au contact direct des patients hospitalisés porteurs des gènes de résistance avec les patients sains. Ceci favorise la persistance de la contamination bactérienne dans l'environnement (Oliveira *et al.*, 2010). Pour cette raison, la nécessité de mettre en place des nouvelles mesures antimicrobiennes sous la surveillance des médecins algériens est une priorité, afin de prévenir la résistance, particulièrement, dans le cas des souches de *P. mirabilis*.

Les souches de *P. mirabilis* productrices de carbapénèmases ont également émergé, elles sont devenues épidémiques en Algérie. Les carbapénèmes sont parmi les molécules encore actives en cas d'infection due à une souche productrice de bêta-lactamase, la diffusion des souches de *P. mirabilis* sont capables de les dégrader, conduisant à des situations d'échec thérapeutique.

P. mirabilis est parmi les entérobactéries qui échangent régulièrement des informations génétiques entre elles ou avec d'autres bactéries présentes dans leur écosystème. Ces échanges de gènes peuvent aboutir à l'acquisition des gènes de résistances aux antibiotiques, notamment grâce aux éléments génétiques mobiles qui constituent de véritables véhicules de la résistance. Ces derniers jouent un grand rôle dans l'émergence et la diffusion de la

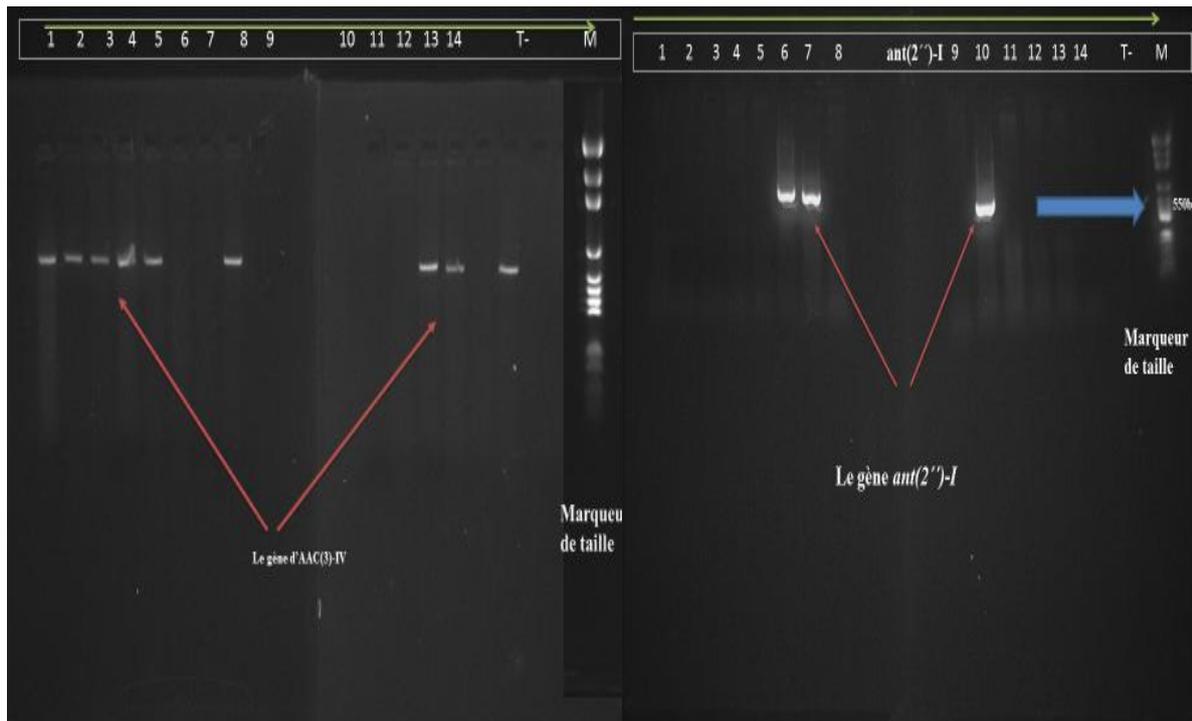


Figure 25. Profil électrophorétique des produits de la PCR des gènes *aac(3)-IV* et *ant(2'')-I*.

Dans cette étude, nous avons signalé que la majorité des souches de *P. mirabilis* de CHU d'Oran comportent le gène *AAC(3)-IV* codant aminoglycoside 3-N-acétyltransférase. Le gène *aac(3)-IV* fait partie des gènes rares appelés les gènes de résistance à l'apramycine (Magalhaes *et al.*, 2005) qui confère la résistance à la plupart des aminosides principalement l'apramycine et la gentamicine. Ce gène a récemment été découvert chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* isolées en Algérie (Brahmi *et al.*, 2018). Le gène *AAC(3)-IV* a été décrit essentiellement en Asie (Magalhaes *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2009), et en USA chez 48.33% des souches d'*Escherichia coli* (Jakobsen *et al.*, 2007).

La classe des gènes *AAC(3)-IV* codant N-acétyltransférases est généralement portée sur un plasmide. Ce dernier a été retrouvé chez des isolats cliniques à cause de la propagation rapide chez les animaux (Chalus-Dancla *et al.*, 1997; Magalhaes *et al.*, 2005). La présence du plasmide dans des isolats cliniques humains indique un défi thérapeutique très compliqué, car tous les aminosides utilisés en antibiothérapie humaine sont des substrats de cette enzyme, ce qui confirme la chaîne de transmission entre les animaux et la communauté humaine. Ceci exige le transfert horizontal de gènes et confère l'évolution à l'échelle mondiale. Plusieurs rapports scientifiques locaux et internationaux ont rapporté la relation entre la résistance aux aminosides associées à l'homme et les isolats fécaux associés à l'animal (Ho *et al.*,

2010 ;Brahmi *et al.*, 2018).

Nous avons également noté que 4 souches de *P.mirabilis* portent les gènes *ant(3)-I* et *aac(3)-I* et 1 souche de *P.mirabilis* porte le gène *aac (6')-Ib-cr* qui confèrent la résistance simultanée à la ciprofloxacine. Le gène *aac (6')-Ib-cr* a été récemment rapporté chez des souches d'*Enterobacter cloacae* à Annaba (Khennouchi *et al.* , 2015), aussi chez les souches communautaires de *Klebsiella pneumoniae* à Béjaïa (Gharout-Sait *et al.* ,2015). L'émergence actuelle des souches de *P.mirabilis* qui ont un haut niveau de résistance à tous les aminosides est un phénomène préoccupant qui nécessite un suivi épidémiologique.

Toutes les souches qui portent le gène *ant(3)-I* ont exposé des niveaux élevés de CMI (8µg/ml) à l'amikacine et à la gentamicine. L'utilisation clinique de ces médicaments dans les années 1960 et 1970 a conduit à l'apparition des souches résistantes (Davies, 1997). Ce gène a été distribué chez plusieurs espèces bactériennes à Gram négative et positive dans plusieurs régions du monde, notamment en Egypte, Inde et l'Europe (Heuer *et al.*, 2002 ;Xiao *et al.*, 2012 ;Fernández-Martínez *et al.* ,2018 ;El-Mahdy *et al.* , 2018;Veeraraghavan *et al.*,2019).

Les gènes codant des enzymes modifiant la gentamicine (AME) sont connus chez des isolats cliniques. Les gènes d'AMEs ont été retrouvés dans l'environnement clinique : des échantillons d'eaux usées, de fumier ou d'eau de mer prélevés à proximité d'une sortie d'eaux usées, échantillons de sol, de rhizosphère et de déjections animales ou de fumier (Heuer *et al.*,2002). Cela a été également détecté au cours de la présente étude.

V.4.4. Gènes de résistance aux quinolones (médiation plasmidique)

Dans notre travail, nous avons trouvé une forte corrélation entre les résultats génotypiques et les tests phénotypiques. Cette étude représente la description du gène *qnrA* qui confère une résistance à la quinolone. Les gènes *qnrB* et *qnrS* ont été détectés chez deux souches de *P.mirabilis* (Figure 26).

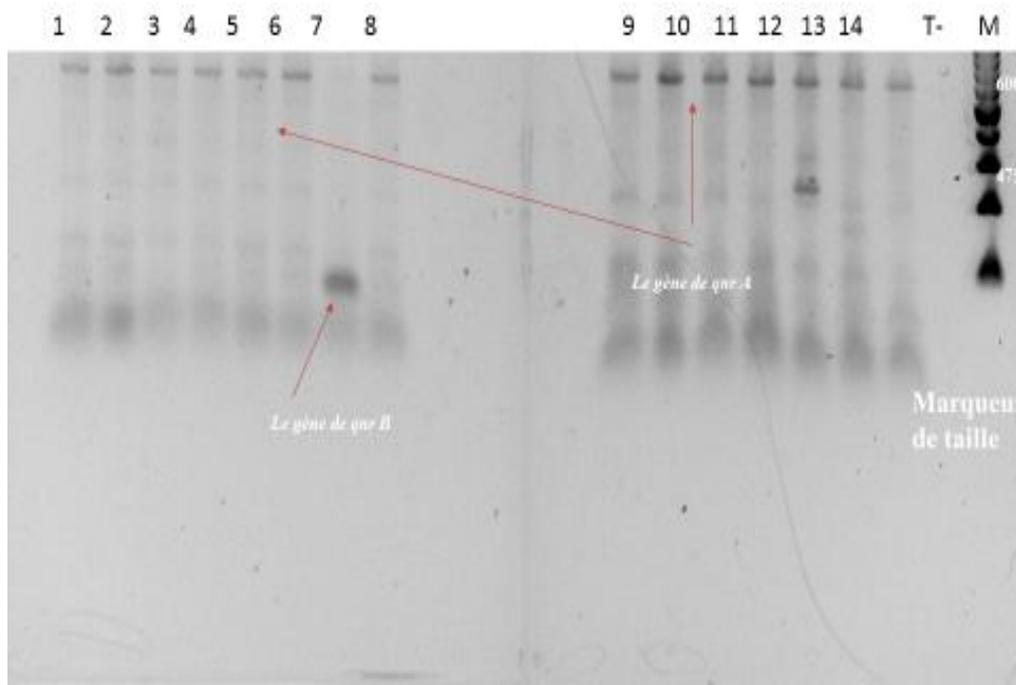


Figure 26. Profil électrophorétique des produits de la PCR des gènes *qnrA*, *qnrB* et *qnrS* des souches de *P. mirabilis*.

Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de l'apparition de cette résistance. Nous rapportons la présence de gène *qnrS* et de gène *qnrA* chez des isolats de *P. mirabilis* en Algérie. Cela témoigne d'un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones. Le gène *qnrA* a déjà été identifié en association avec plusieurs gènes de résistances aux antibiotiques chez des isolats d'*Enterobacter cloacae* (Yaici *et al.*, 2017) et chez des souches d'*Escherichia coli* (Yanat *et al.*, 2017) et chez une souche clinique de *P. mirabilis* (Siebor *et al.*, 2011). Le gène *qnrB* a déjà été décrit chez des souches de *P. mirabilis* isolées de la communauté (Yanat *et al.*, 2017) et d'*Enterobacter cloacae* isolées de l'hôpital d'Annaba (Khennouchi *et al.*, 2015). Les déterminants de la résistance aux quinolones induits par les gènes *qnrA*, *qnrB* et *qnrS* ont été déjà trouvés chez *P. mirabilis* et les *Enterobacteriaceae* en France (Nordmann *et al.*, 2005) et en Corée (Tamang *et al.*, 2008).

Ce travail révèle que la plupart des isolats de *P. mirabilis* sont résistants à la ciprofloxacine ; ils sont résistants à la céfotaxime et à l'aminoside. Cette co-résistance peut être expliquée par le fait que les gènes de β -lactamases portés généralement sur des plasmides, seraient souvent associés à des gènes de résistance aux autres antibiotiques (Saito *et al.*, 2006). Nous notons que la présence à la fois de la résistance à la ciprofloxacine et de la production de β -lactamase peut être une conséquence de l'interaction d'une utilisation

Résultats et discussion

importante d'antibiotiques dans le passé et de conditions favorisant le transfert d'un patient à l'autre. D'autres explications possibles incluent l'efflux actif, les altérations de la membrane externe et des plasmides contenant un gène de β -lactamase de classe A.

V.4.4.1. Gènes de résistance aux quinolones (mutation de *Gyr A* et *ParC*)

Au total, deux souches de *P. mirabilis* isolées de deux patients sont hautement résistantes à la ciprofloxacine, l'ofloxacine, et la norfloxacine. Ces patients souffrent des infections urinaires et de prostatites. Nous avons détecté une souche de *P. mirabilis* dans les spermés d'un jeune patient de 34 ans. La PCR standard a détecté deux fragments de 300 et 750 pb pour les gènes de *gyrB* et *parC* (Figure 27 et Figure 28). Ce résultat montre que le principal mécanisme de la résistance aux fluoroquinolones est probablement dû à des mutations dans les gènes codant pour les gyrases ou les topoisomérases.

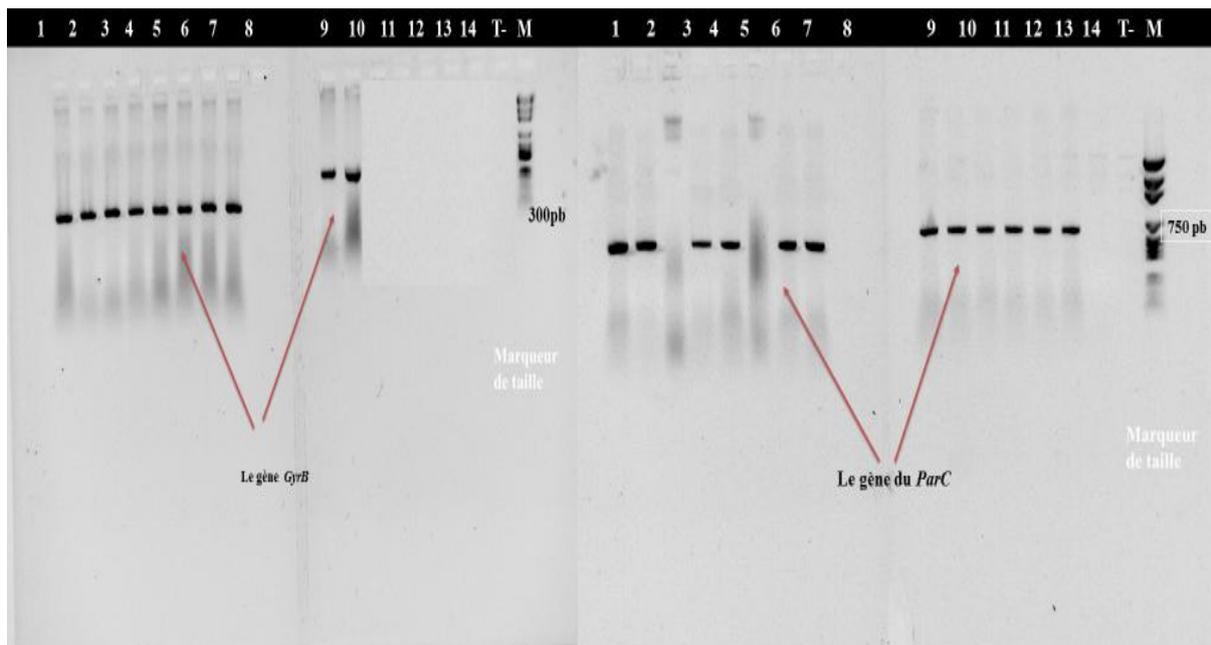


Figure 27. Profil électrophorétique des produits de la PCR des gènes *GyrB* et *ParC*.

Cette étude représente la description des mutations des gènes qui se produisent généralement dans des zones hautement conservées de gènes appelés le déterminant de la résistance à la quinolone de *gyrB* et *parC*. Des substitutions multiples se produisent souvent dans différentes positions de nucléotide. Les changements dans *gyrB* incluaient S464Y, S464F et E466D. Une insertion de trois nucléotides a été détectée dans le *gyrB*, elle donne lieu à un résidu de lysine supplémentaire entre K455 et A456. Cela reflète le taux d'évolution élevé au niveau du gène *gyrB*. Des substitutions multiples ont été aussi observées au niveau de *parC* (S80R or -I),

Résultats et discussion

G78 (T en A), V87 (A en G), et F115 (C en T) (**Figure 30 et 31**).Ce qui élimine l'effet inhibiteur de fluoroquinolone sur la protéine cible (ADN gyrase).

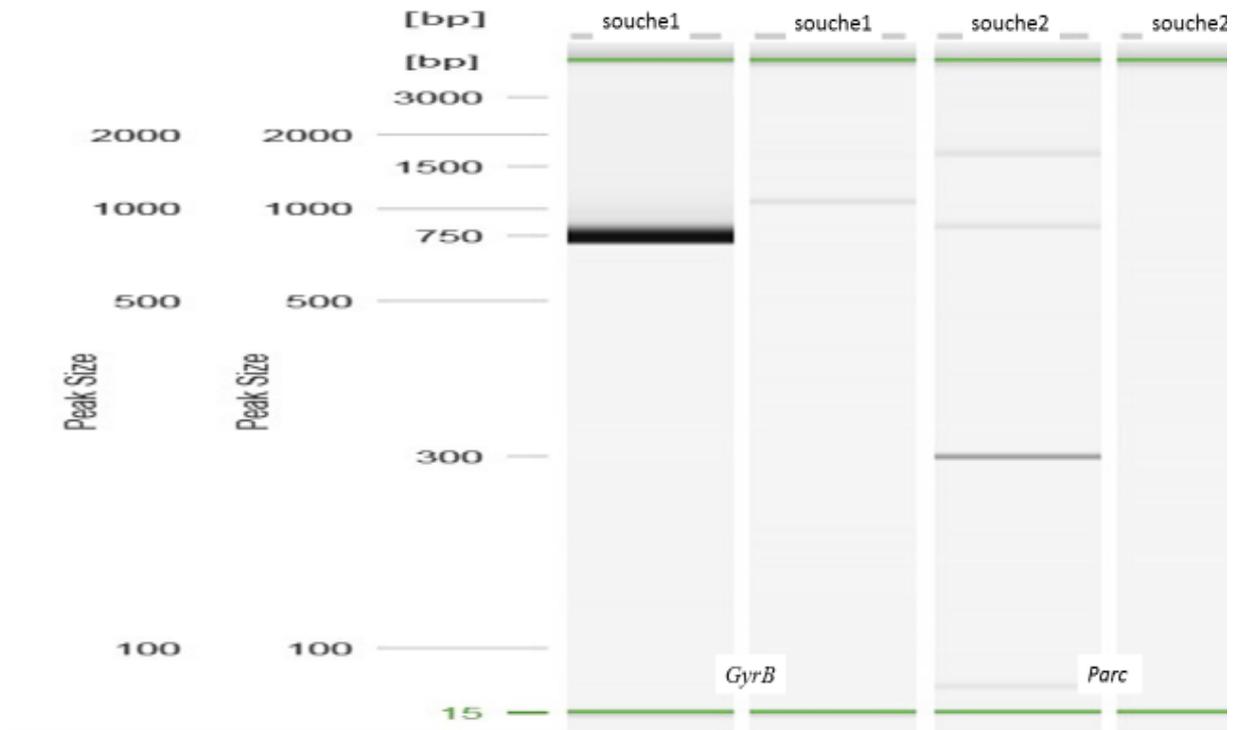


Figure 28. Amplification des produits de la PCR des gènes *gyrB* et *parC*.

Cette étude représente la description des mutations des gènes qui se produisent généralement dans des zones hautement conservées de gènes appelés le déterminant de la résistance à la quinolone de *gyrB* et *parC*. Des substitutions multiples se produisent souvent dans différentes positions de nucléotide. Les changements dans *gyrB* incluaient S464Y, S464F et E466D. Une insertion de trois nucléotides a été détectée dans le *gyrB*, elle donne lieu à un résidu de lysine supplémentaire entre K455 et A456. Cela reflète le taux d'évolution élevé au niveau du gène *gyrB*. Des substitutions multiples ont été aussi observées au niveau de *parC* (S80R or -I), G78 (T en A), V87 (A en G), et F115 (C en T) (**Figure 29 et Figure 30**). Ce qui élimine l'effet inhibiteur de fluoroquinolone sur la protéine cible (ADN gyrase).

Ces résultats concordent avec plusieurs études (Weigel *et al.*, 2002 ; Saito *et al.*, 2006). Des concentrations plus élevées (>32 fois) de quinolone ont été observées chez les souches qui ont des mutations au niveau des gènes *gyrB* et *parC*.

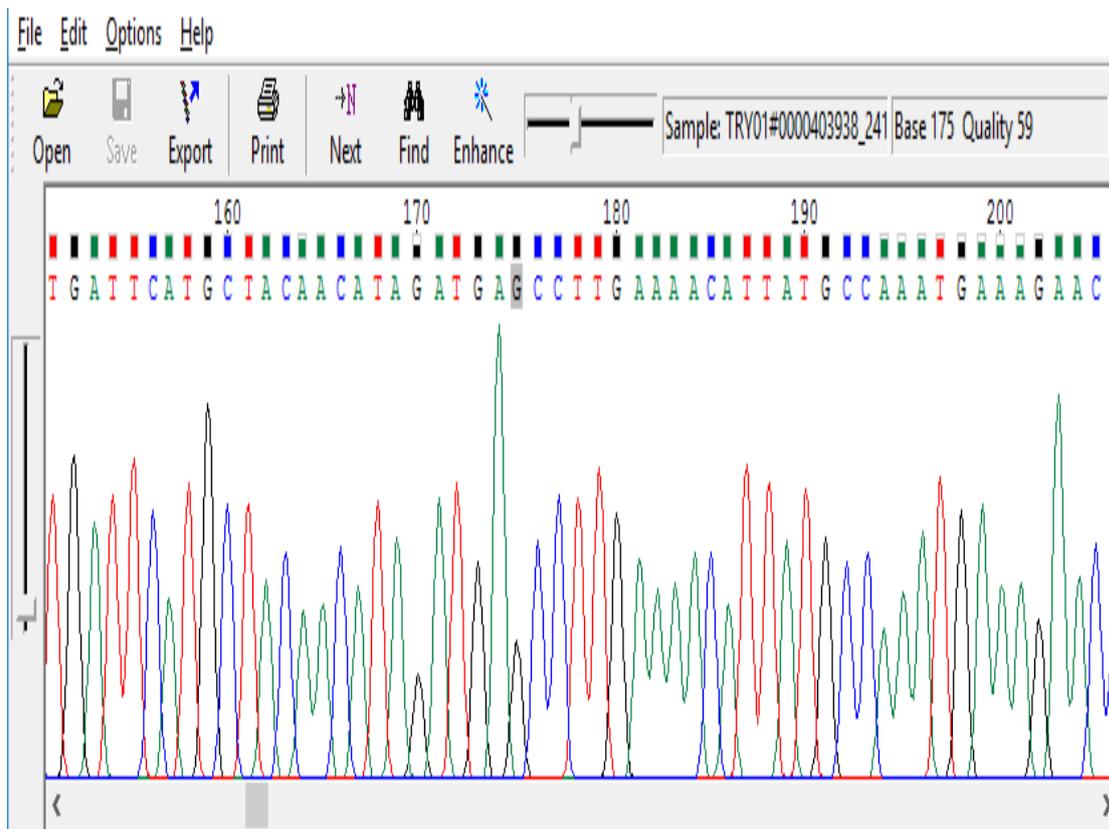


Figure 29. Spectre du gène *gyrB* sur logiciel CHROMAS Pro.

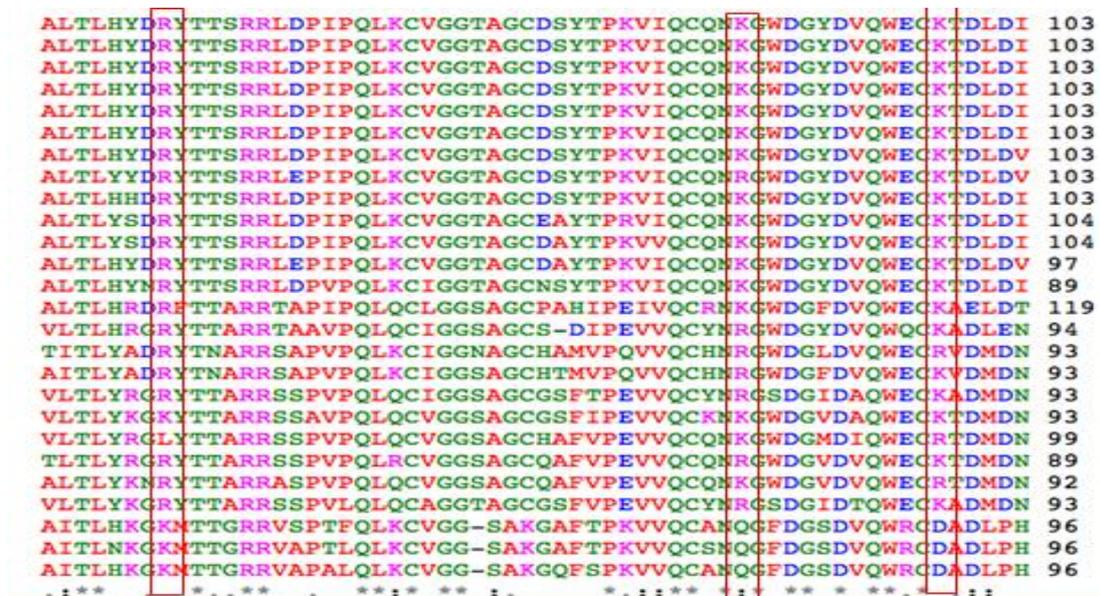


Figure 30. Alignement multiple du gène *gyrB* sur le logiciel BLST (NCBI).

Il est maintenant établi que la résistance de *P. mirabilis* aux quinolones est corrélée avec la consommation aléatoire de quinolones à l'échelle des hôpitaux, des cabinets de médecine

Résultats et discussion

générale et de la communauté en général (**Rakotovao-Ravahatra et al .,2017**). Le respect strict des recommandations d'antibiothérapie des infections courantes doivent permettre de limiter drastiquement l'utilisation des quinolones dans les infections urinaires, en limitant les indications et les durées du traitement et en pratiquant une stratégie thérapeutique quand l'antibiogramme le permet. Une modification majeure des pratiques de prescription est rapidement nécessaire afin de sauvegarder l'efficacité de cette classe thérapeutique très utile en pratique courante(**Rakotovao-Ravahatra et al .,2017**).

Nous avons constaté que la co-présence des gènes de résistance aux β -lactamines, aux aminosides et aux quinolones additionnés à la résistance naturelle et intrinsèque chez cette bactérie (la tétracycline et à la colistine),(**Stock ,2003**) complique le choix antibiotique thérapeutique au niveau des unités des soins ambulatoires du Nord-Ouest d'Algérie en raison de la propagation des souches extrêmement résistantes aux antibiotiques.

Parmi les principales causes de l'émergence des souches de *P.mirabilis* multirésistantes dans le centre hospitalo-universitaire (CHU) d'Oran et les unités des soins ambulatoires sont : le choix de l'agent et la durée du traitement peuvent être incorrects dans 50% des cas de prescription d'antibiotiques (**Dellit et al., 2007**). Cependant, plusieurs rapports scientifiques ont illustré que l'indication du traitement de 30% d'antibiotique reçus par des patients adultes hospitalisés étaient inutiles. Les antibiotiques ont souvent été utilisés pendant une durée supérieure à celle recommandée ou pour le traitement des micro-organismes colonisateurs ou contaminants (**Fridkin et al., 2014**).

La prescription incorrecte d'un antibiotique par les prestataires de soins de santé expose chaque patient à des complications potentielles du traitement d'antibiotique sans aucun bénéfice thérapeutique. L'une de ces complications est l'infection due à *P.mirabilis* multirésistante(**Fridkin et al., 2014**).

L'émergence de la résistance bactérienne aux antibiotiques constitue un enjeu de santé publique partout dans le monde. L'épidémiologie variable de la résistance bactérienne aux antibiotiques impose la mise en place d'une surveillance continue et régulière de l'écologie microbienne isolée en milieu hospitalier. De ce fait, cette étude propose de faire un premier état des lieux concernant les bactéries multirésistantes. L'émergence de la résistance est à

Résultats et discussion

l'origine des hospitalisations prolongées et entraîne une augmentation des dépenses médicales et de la mortalité. Une meilleure connaissance de l'écologie bactérienne locale permet d'instaurer des conduites basées sur des données objectives (Said, 2005).

Ainsi, la propagation de ces bactéries multirésistantes et l'absence de nouveaux antibiotiques font courir un risque d'impasse thérapeutique de plus en plus fréquent. Pour faire face à cette situation, l'idée n'est pas de trouver une solution permettant d'éviter l'apparition des résistances, car les bactéries trouveront toujours un moyen de s'adapter ; il convient plutôt de préserver le plus longtemps possible l'efficacité des antibiotiques disponibles. Des mesures élémentaires comme le lavage systématique des mains reste fondamental pour éviter la diffusion d'entérobactéries résistantes. La dissémination de la résistance bactérienne à l'antibiotique est étroitement corrélée à l'ampleur de la pression de sélection. Le seul espoir est d'essayer de retarder cette dissémination par l'usage prudent, ciblé et raisonné des antibiotiques (Said, 2005).

V.5. Caractérisation des groupes d'incompatibilité plasmidique

Le typage des replicons plasmidiques est une technique qui peut déceler le support génétique porteur des gènes de résistance selon le mode de répllication de plasmide. Elle donne le groupe d'incompatibilité en se basant sur les origines de répllication isologue. C'est une méthode épidémiologique qui permet le typage des plasmides associés à la résistance aux antibiotiques (Carattoliet al., 2009).

La méthode de PCR basée sur les replicons est potentiellement applicable sur tous les *Enterobacteriaceae*, elle est souvent utilisée pour montrer la diffusion des principaux groupes d'incompatibilité plasmidique dans les différentes espaces (Carattoliet al., 2009). Cette méthode a révélé l'implication des plasmides comme un support génétique de la résistance.

Dans cette étude, nous avons pu démontrer 4 souches communautaires qui hébergent des plasmides IncA/C, porteuses de gène *bla_{CMY-2}* (Figure 31). Les résultats de typage des replicons plasmidiques ont également montré deux souches de la communauté qui hébergent les plasmides IncFII2 et IncP; elles sont porteuses d'un mélange de gènes de résistance (*TEM-1/CTX-M-2* et *aac (6')-Ib-cr*, *ant(3')-Ia* et *qnrA*) aux antibiotiques (Figure 32). Aucun groupe d'incompatibilité plasmidique n'a été détecté chez 8 souches testées.

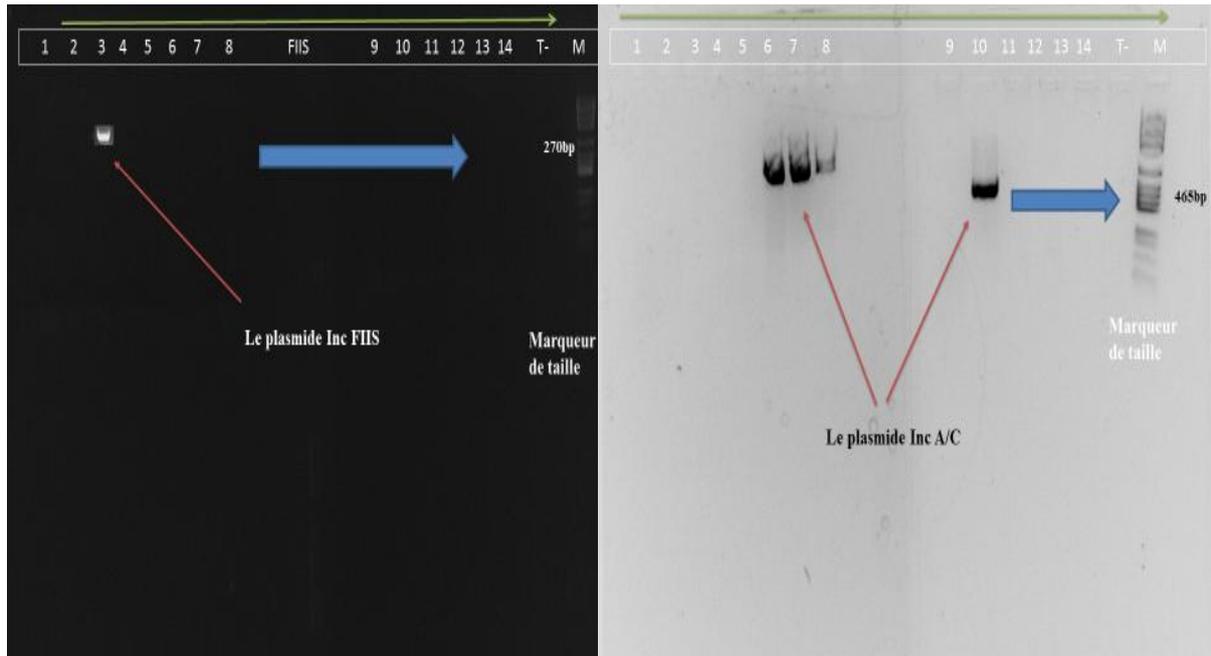


Figure 31. Les produits de la PCR des plasmides Inc A/C et Inc FIIS sur le gel d'agarose 1%

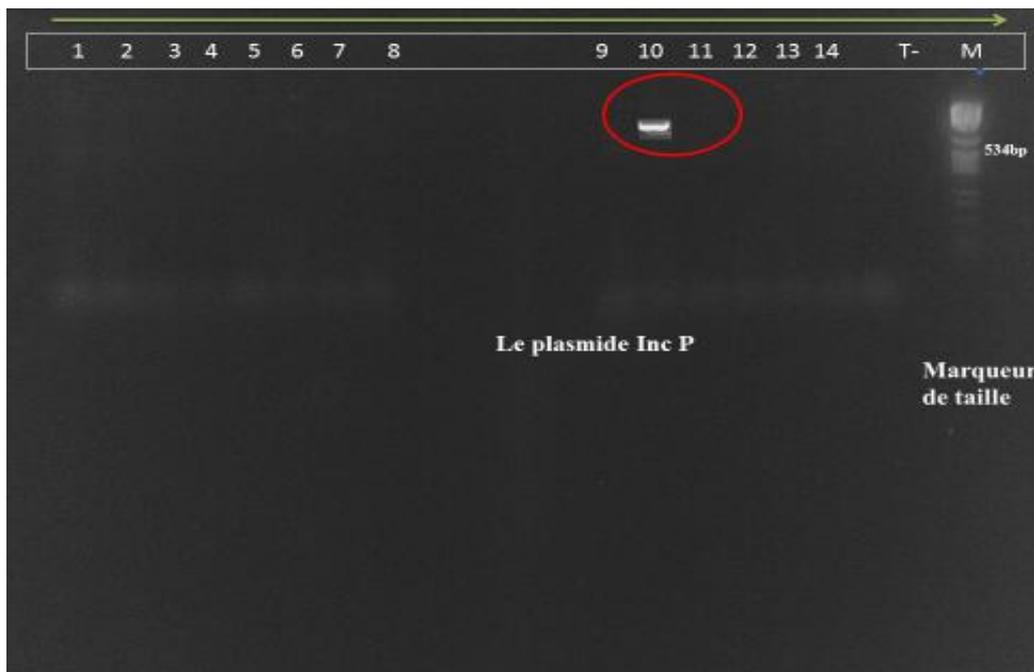


Figure 32. Produits de la PCR de plasmide Inc P sur gel d'agarose 1%.

Dans notre étude, le typage des replicons plasmidiques a montré que les plasmides Inc A/C se trouvent chez deux souches hospitalières qui portent les gènes (*bla_{CMY-2}/TEM-1* et *qnrA* et *aac3-IV/aac3-I*) codant la résistance aux antibiotiques et chez une souche communautaire qui porte un mélange des gènes de résistance (*bla_{CTX-2}* et *qnrA* plus *ant-3-II/aac3-I*) aux antibiotiques. Ce type de plasmide a été déjà rapporté dans plusieurs études en Algérie et en Europe

Résultats et discussion

(Iabadene *et al.*, 2009; Carattoliet *al.*, 2009 ;Gharout-Sait *et al.*, 2015).Au cours des dernières décennies, nombreuses études ont décrit le plasmide de type IncA/C qui est le principal facteur impliqué dans la propagation du gène *bla*_{CMY-2}. Il a été fréquemment identifié chez *P.mirabilis* dans diverses régions dans le monde (États-Unis, Chine, France) (Verdet *et al.*, 2009; Harada *et al.*, 2010).

Les plasmides du groupe d'incompatibilité IncA/C sont des éléments génétiques mobiles qui ont un large spectre d'hôte. Ils ont été isolés de bactéries à Gram négatif provenant de tous les environnements (Verdet *et al.*, 2009 ; Harada *et al.*, 2010) suggérant la possibilité d'une transmission clonale des souches multirésistantes. Le plasmide du groupe IncA/C est le support génétique de gène de résistance aux sulfamides et aux tétracyclines. Il a été isolé en 1971 d'une souche d'*Aeromonas hydrophila*. Ce qui illustre les capacités de diffusion et de persistance qui investissent des niches écologiques distinctes à travers le monde. Ils s'adaptent à un large spectre d'espèces bactériennes (Verdet *et al.*, 2009 ; Harada *et al.*, 2010). Des études ont confirmé que les plasmides du groupe IncA/C possédaient un squelette très conservé et synthétique, sans réarrangement génétique, qui code pour les fonctions de réplication, de transfert et de maintien. Cette forte conservation du squelette de plasmide IncA/C évolue très probablement en milieu hospitalier en intégrant le gène *bla*_{CMY-2} (Verdet *et al.*, 2009 ; Harada *et al.*, 2010).

En effet, l'association du plasmide IncA/C avec la dissémination de gène CTX-2 a été décrite chez les souches d'origine humaine au Brésil (Dropa *et al.*, 2015). Ce gène a été déjà signalé chez des souches de *P. mirabilis* au Japon. Il est localisé sur un plasmide transférable IncT (Dropa *et al.*, 2015). Seules quelques publications décrivent la liaison entre les souches produisant des bêta-lactamases de type CTX-2 et le plasmide IncA/C (Dropa *et al.*, 2015). Iabadene *et al.* (2019) ont montré que le plasmide d'IncA/C est lié avec le gène CMY-2 chez deux isolats de *P.mirabilis* (Iabadene *et al.*, 2009). Ce qui illustre la diversité des plateformes plasmidiques associées à ce gène.

Plusieurs études ont déjà montré la relation entre les gènes codant les β -lactamases à spectre étendu (*bla*_{CTX-M}) et les plasmides IncFII2 et IncP dans les souches de *P.mirabilis* (Mahrouki *et al.*, 2012) et dans les isolats cliniques d'*Escherichia coli* (Doumith *et al.*, 2012). Ce qui

Résultats et discussion

montre l'importance des plasmides dans la diffusion des épidémies et la diversité génotypique des souches étudiées.

Le squelette des plasmides IncFII2 et IncP porte de nombreux gènes codant pour un appareil conjugatif, ce qui permet à ces plasmides d'être transférés d'une cellule à une autre. Le large spectre d'hôte de ces plasmides nécessite que ces derniers soient, non seulement capables de se répliquer et de se maintenir au sein des souches de diverses espèces bactériennes mais aussi qu'ils puissent être transférés à de nombreuses bactéries. L'appareil conjugatif a donc une influence sur le spectre d'hôte du plasmide (**Doumith et al., 2012**).

Cependant, nous n'avons pas pu déterminer l'emplacement du gène de CMY-2 chez huit souches. Donc l'intégration d'un élément conjugatif (Tn6450SXT/ R391) dans le chromosome ou plasmide peut être responsable de la présence de ce gène (**Verdet et al., 2009**). En plus, le transposon spécifique d'ISEcp1 est responsable de la propagation de gène *bla_{CMY-2}* entre les membres de la famille des *Enterobacteriaceae* (**Harada et al., 2010**).

Les plasmides de résistance conjugatifs qui sont ubiquitaires confèrent un avantage sélectif et adaptatif chez la bactérie hôte. Dans la plupart des cas, ce sont des porteurs de multiples gènes de résistance qui peuvent jouer un rôle important dans le transfert et la dissémination horizontale du matériel génétique entre les différentes souches de *P. mirabilis* non reliées génétiquement. Cela facilite l'émergence des épidémies et des clones extrêmement résistants aux antibiotiques (**Frost et al., 2005**).

Une des premières fonctions de la mobilité plasmidique est de permettre le brassage génétique, aussi bien entre des souches de *P. mirabilis*, qu'entre différentes d'espèces (**Frost et al., 2005**). Cet échange de gènes permet de créer une diversification bactérienne qui leur permet de s'adapter rapidement à un nouvel environnement (**Frost et al., 2005**). Cela peut expliquer l'évolution rapide de génome de *P. mirabilis* et la diversité génétique intra-espèce.

V.6. Typage et relation clonal entre les souches

V.6.1. Typage moléculaire parla technique ERIC-PCR

Le typage des souches par la technique de consensus intergénique répétitif entérobactérien (ERIC)-PCR a été réalisé pour étudier la relation clonale entre les souches de *P.mirabilis* multirésistantes. Les profils d'ADN étaient clairement détectables via des modèles d'empreintes digitales spécifiques. Les résultats de la technique d'ERIC-PCR ont montré une diversité génétique très importante. Cette technique a identifié trois profils génétiques différents.

Le clone ERIC-type A a englobé 8 souches prédominantes d'origine hospitalière (57,14%) qui présentent le même profil de migration sur gel d'électrophorèse. Les souches de clone ERIC-type A sont porteuses de gène *debla_{CMY-2}*. Le clone ERIC-type A est principalement isolé de service de réanimation/chirurgie. L'ERIC-type B qui regroupe trois souches (21,42%), portent le gène *debla_{CTX-2}* d'origine communautaire. L'ERIC-type C qui comprend trois souches (21,42%) d'origine hospitalière (CHU d'Oran), présentent un génotype différent (Figure 33).

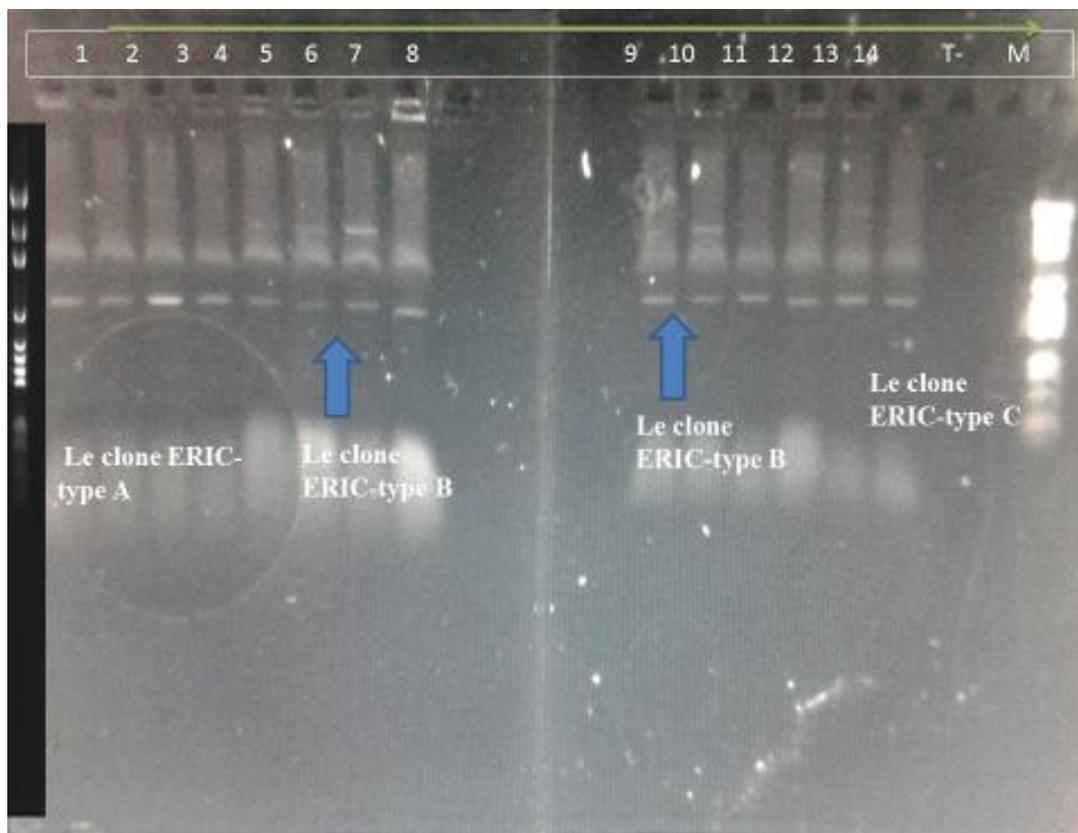


Figure 33. Typage de *P.mirabilis* par la technique d'ERIC-PCR.

Résultats et discussion

Pour confirmer la diversité trouvée par la technique d'ERIC-PCR, nous avons pratiqué la technique d'ERIC2*-PCR sur la même collection des souches de *P.mirabilis*. Les profils de la technique d'ERIC-PCR ont montré les mêmes résultats que les profils de la technique ERIC2*-PCR. Cette technique a permis de voir les isolats possédant le même génotype. Ils sont descendants d'une même souche et donc nous confirmons la notion d'hétérogénéité intrinsèque des souches de *P.mirabilis* (Figure 34).

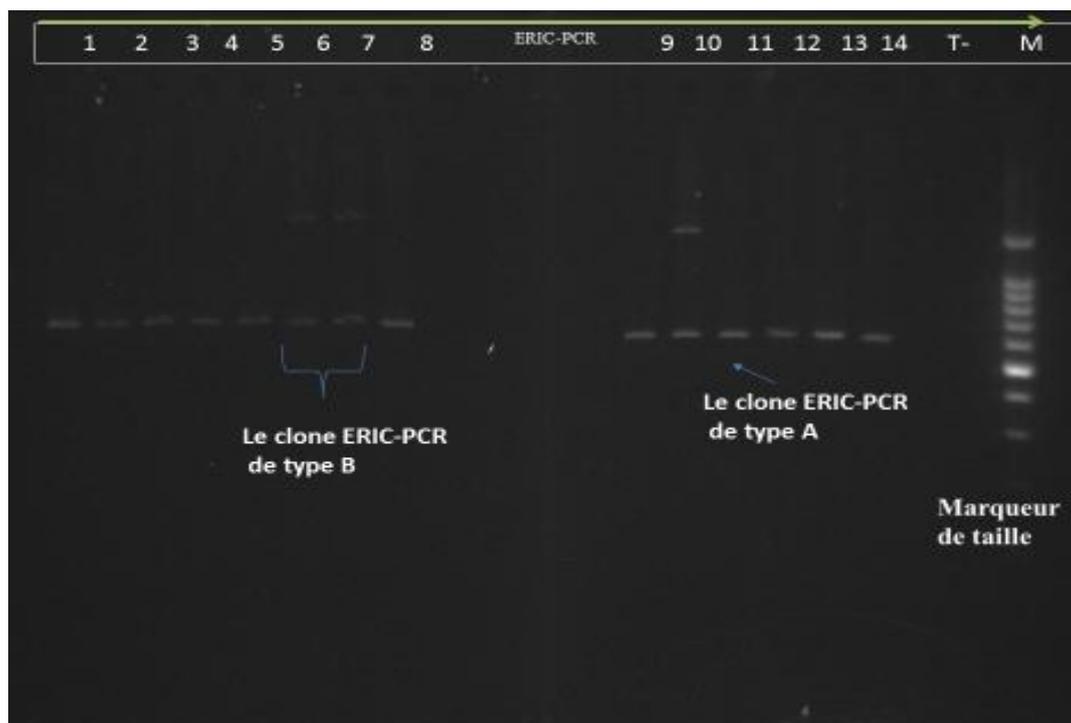


Figure 34. Typage de *P.mirabilis* par la technique d'ERIC-PCR.

Les techniques d'ERIC-PCR et ERIC2*-PCR ont révélé que les souches de *P. mirabilis* sont séparées en trois clones différents. Cette méthode génotypique est actuellement considérée comme un outil puissant pour analyser les foyers épidémiques (Gillings et al., 1997 ; Bosi et al., 1999), se basant sur la position de la séquence d'ERIC dans le génome (séquence dans les génomes entérobactériens). La technique d'ERIC-PCR est une technologie de génotypage simple, efficace et économique qui permet de discriminer la diversité et la relation clonale entre les souches. En effet, les séquences d'ERICs sont reconnues comme des séquences d'ADN mobiles en association avec des éléments transposables inversés (Ranjbar et al., 2017).

Les séquences d'ERIC sont reconnues dans un très grand nombre de génomes bactériens, y compris la famille d'*Enterobacteriaceae*. Les séquences de palindrome incomplètes chez

Résultats et discussion

P.mirabilis sont généralement détectées dans des zones transcrits en association avec un consensus intergénique. De plus, il existe différents nombres de copies de séquences ERIC dans les souches de *P.mirabilis*. Une diversité significative du nombre de copies a été trouvée au niveau de génome de *P.mirabilis*. Cette diversité évoque de processus de l'évolution des souches bactériennes au sein de la population de *P.mirabilis* (**Ranjbar et al., 2017**).

Le clone d'ERIC-type A présente huit souches de *P. mirabilis*, il a été détecté au niveau de CHU d'Oran et possède le même génotype de résistance (CMY-2- / TEM-1 / *qnrA* / AAC (3) -IV). Ce groupe spécifique de clone d'ERIC-type A suggère une circulation d'une gamme de souches de *P. mirabilis* dans les différents services de la réanimation / chirurgie de CHU d'Oran. Ceci est comparable à ce qui a été retrouvé dans les études de **Khennouchi et al (2015)**, **Tervino et al (2010)** dans la région de l'Est d'Algérie et du bassin méditerranéen.

Dans le clone d'ERIC-type B, nous avons constaté que la présence du même plasmide d'incompatibilité IncA/C chez les souches de *P.mirabilis*. Ce résultat a montré l'importance de transfert plasmidique dans l'émergence des épidémies au fil du temps. Ce qui augmente la gravité des infections communautaires. La pression de sélection liée à l'utilisation d'antibiotiques à large spectre conduit à l'émergence des clones bactériens résistants aux antibiotiques.

En outre, de nombreuses études ont montré qu'il y a une corrélation entre le protéotypage par la technique de spectrométrie en masse MALDI-TOF et le génotypage par la technique d'ERIC-PCR pour certaines souches bactériennes (**Trevino et al., 2010**; **Khennouchi et al., 2014**). La technique d'ERIC-PCR est une bonne approche pour le typage moléculaire des souches de *P.mirabilis* isolées de différentes sources. Les résultats de la technique d'ERIC-PCR peuvent être traités par différents types de logiciels tels que GelClust pour générer des dendrogrammes utiles. C'est une méthodologie très intéressante et inestimable pour la classification phylogénétique des souches de *P.mirabilis*.

Plusieurs publications ont fait l'objet de l'étude de la diversité de cette bactérie par la technique d'ERIC-PCR. **Chen et al (2017)** et **Tsakris et al (2007)** ont examiné 317 souches de *P.mirabilis*. La technique d'ERIC-PCR a confirmé que la dissémination clonale de l'intégron fonctionnel de classe 1 hébergeant dans les souches de *P. mirabilis*.

Michelim et al (2008) ont évalué le pouvoir discriminant de plusieurs méthodes: RAPD-PCR, ISSR-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR et rep-PCR pour analyser des isolats cliniques de *P.*

mirabilis. Ils ont trouvé que les résultats de la technique d'ERIC-PCR donnent une efficacité discriminante élevée et constituent une alternative rapide et fiable.

V.6.2. Typage protéomique par la technique de MALDI-TOF

Le typage protéomique par la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF a été utilisé pour étudier les relations épidémiologiques entre les différents isolats de *P. mirabilis*. Le typage protéomique analyse leurs protéines ribosomales et étudie la similarité protéomique. C'est une technique alternative utilisée pour réaliser les meilleures enquêtes épidémiologiques sur les bactéries pathogènes, en particulier sur l'émergence des clones spécifiques (Khennouchi *et al.*, 2015). Les détails de regroupement des dendrogrammes ont été déchiffrés sur la base du seuil arbitraire défini à différents niveaux de distance (Khennouchi *et al.*, 2015). Le seuil arbitraire 540, 1000 a été sélectionné pour le dendrogramme de 14 souches de *P. mirabilis* multirésistantes; Le seuil arbitraire 900, 140 a été sélectionné pour le dendrogramme de 166 souches cliniques de *P. mirabilis*.

La phyloprotéomique de toutes les souches de *P. mirabilis* a été construite en utilisant le logiciel Biotyper Bruker 3.0 (Bruker Daltonics). Les protéines ribosomales et les protéines associées aux membranes ont partagé les souches en clusters. Ce regroupement est associé aux origines de prélèvements (les régions géographiques). Selon le niveau de distance arbitraire 140, le dendrogramme de 180 souches cliniques de *P. mirabilis* (Figure 35) a montré un sous-cluster spécifique regroupe tous les isolats produisant des enzymes de β -lactamases (BLSE) ou/et céphalosporinases (AmpC).

Selon le niveau de distance arbitraire 950, le dendrogramme a dévoilé l'embranchement des souches en 4 clusters (Figure 35): la phyloprotéomique de groupe G1 qui rassemble les 5 souches de *P. mirabilis* isolées d'Ain Defla, la phyloprotéomique de groupe G2 était significativement associée aux souches isolées de Chlef ($p < 0.01$), le groupe G3 regroupe des souches des régions géographiques différentes. Le groupe G3 était significativement lié aux souches isolées d'Ain Defla ($p < 0.01$); Le groupe G4 était significativement associé aux souches isolées de Khemis Miliana ($p < 0.01$) (Figure 35).

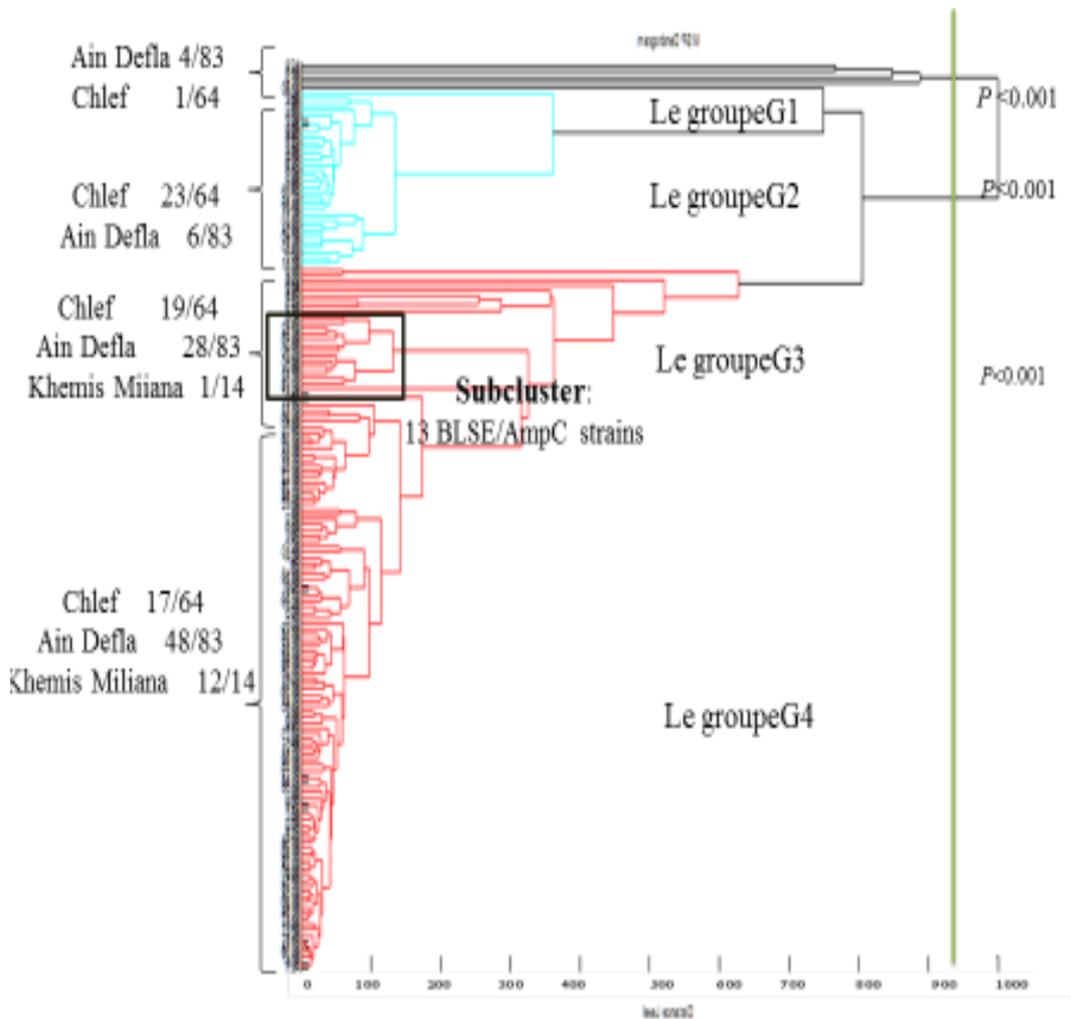


Figure 35. Typage protéomique de *P. mirabilis* par la technique de MALDI-TOF/MS.

Les résultats de cette étude sont compatibles avec d'autres études, qui ont montré que la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF est capable d'identifier et classer les souches bactériennes dans des unités séparées selon le profil de résistance et la région géographique (Khenouchi *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent que les souches isolées de la même région géographique sont très proches par leur structure et la masse protéique. Ce qui est intéressant pour la caractérisation rapide des sources de clones à haut risque épidémique.

En outre, la plupart des spectres de MALDI-TOF sont composés de protéines bien conservées, dotées de fonctions ménagères affectées de manière minimale par les conditions environnementales. Elles sont donc considérées comme optimales pour le typage protéomique des bactéries qui diffère considérablement du typage génétique (Spinali *et al.*, 2015 ; Sauget *et al.*, 2017).

Résultats et discussion

Le typage protéomique par la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF de 14 isolats de *P. mirabilis* a montré que nos isolats sont séparés en trois regroupements en fonction de leur génotype de résistance spécifique et de leur origine (Communauté/CHU). Ce qui est peut être important pour identifier rapidement les sources d'isolats et leurs conducteurs moléculaires (Trevino *et al.*, 2010 ; Khennouchi *et al.*, 2015).

Selon les données générées par l'analyse de similarité, toutes les souches de clone d'ERIC-type A sont productrices des enzymes de β -lactamases (CMY-2-/TEM-1-); elles sont situées dans le même cluster de spectrométrie de masse MALDI-TOF (Cluster 2). Des souches de clone d'ERIC-type B qui ont été isolées de la communauté ; elles sont productrices de β -lactamases de type CTX-2. Alors que les clones de type C rassemblaient une souche de CHU d'Oran et deux souches de la communauté ; elles sont productrices des enzymes de β -lactamases (CMY-2/CTX-2). Les clones d'ERIC-type C ont été regroupés dans le dendrogramme de spectrométrie de masse (Groupe 1) avec une souche de clone type B (Figure 36). Ce qui reflète un taux plus élevé d'évolution intrinsèque et une diversité du génotype chez les souches de *P. mirabilis*.

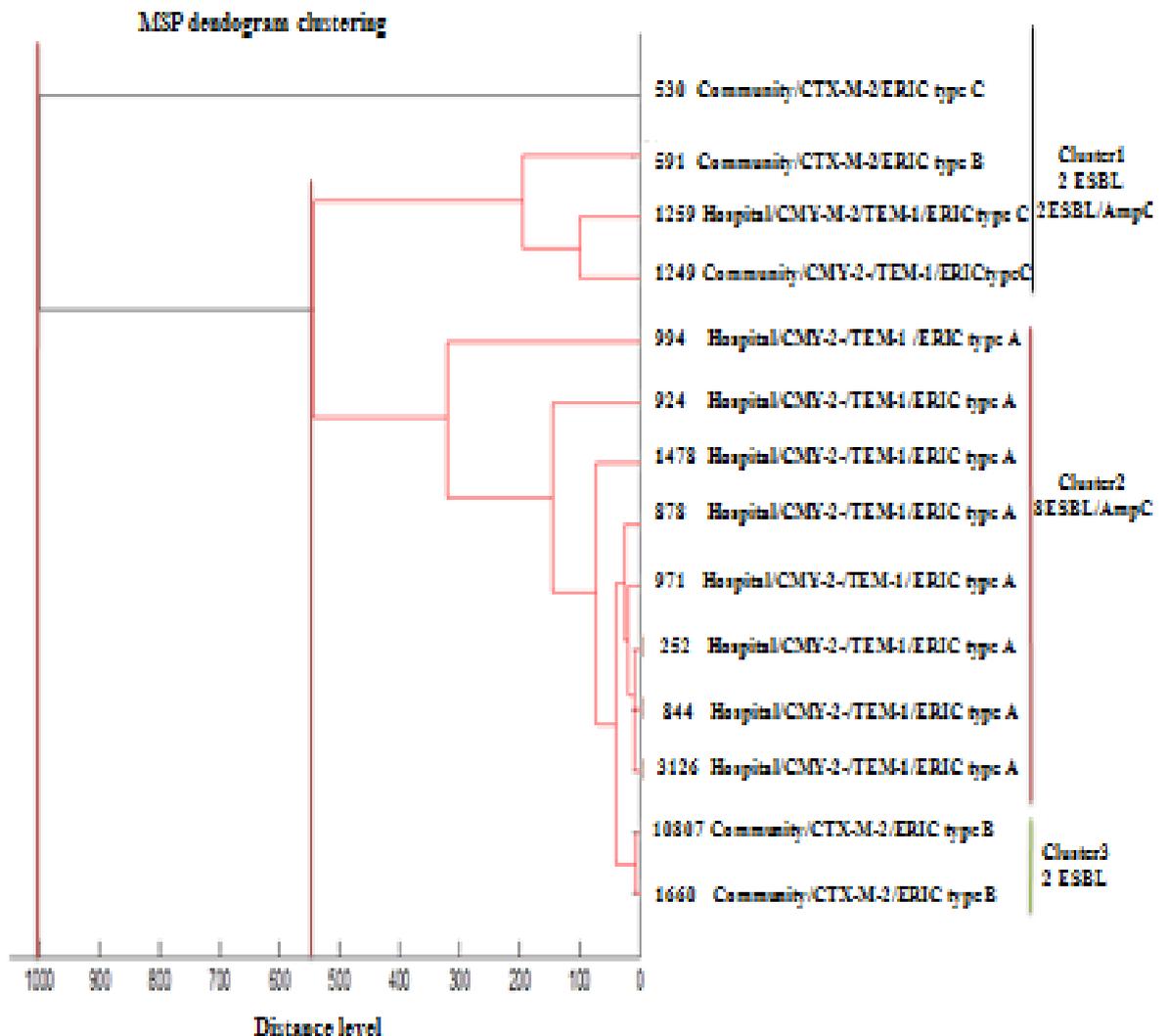


Figure 36. Protéotypage des souches de *P. mirabilis* par la technique de MALDI-TOF.

Le typage protéomique bactérien par la spectrométrie de masse d'ionisation désorption laser (MALDI-TOF/MS) est un outil épidémiologique qui pourrait se positionner comme une technologie à haut débit. Cette technique peut être utilisée pour distinguer les isolats bactériens. Des unités de recherche dans le monde ont réussi à réorienter la fonction initiale de cette technologie de leur objectif principal à l'étude de la chaîne de transmission bactérienne et de créer des programmes de surveillance épidémiologique à grande échelle.

Cependant, des sous-groupes bactériens identiques pourraient être identifiés par des pics non liés à des méthodes indépendantes qui limitent ainsi leur robustesse et leur exploitabilité (Spinali *et al.*, 2015 ; Sauget *et al.*, 2017). De manière générale, les différentes recherches scientifiques ont confirmé récemment l'utilité et la fiabilité de typage bactérienne par la

technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF(Trevino *et al.*,2010 ;Spinali *et al.* , 2015;Khennouchi *et al.*, 2015 ;Sauget *et al.*,2017).

En effet, l'analyse génomique basée sur les gènes conservés classe les bactéries en fonction de leur génome central qui représente moins de 10% du génome,tandis que 90% du génome est composé de gènes accessoires(éléments génétiques mobiles). Par conséquent, ce génome central ne représente pas la majorité des protéines exprimées.Contrairement à l'analyse protéomique qui repose sur les protéines fonctionnelles exprimées de cellules entières. Par conséquent, ces deux approches pourraient être complémentaires.La technique de typage de séquences multifocales (MLST) est basée sur l'analyse du génome central.Elle permet de classer les bactéries en fonction de leurs gènes conservés indépendamment de leurs gènes accessoires(Spinali *et al.*, 2015 ; Sauget *et al.*,2017).

V.6.3.Traitement et instabilité de *P.mirabilis*

P.mirabilis est un agent pathogène important avec un pan-génome complexe responsable des infections graves.L'extrême diversité observée au sein des souches de *P.mirabilis* est devenue un important point qui attire des scientifiques.Plusieurs rapports scientifiques ont démontré que chaque souche de *P.mirabilis* est caractérisée par un degré d'instabilité très élevé selon le biotope.Le plus souvent,l'échec thérapeutique est due à la présence de multiples gènes de résistance développés à cause de la variation génomique élevée de souche d'origine,ou l'apparition des souches résistantesà partir de la sélection naturelle.

Le génotypage et le protéotypage des souchesde *P.mirabilis* multirésistantes sont très importants pour caractériser les clones qui causent des infections graves et qui résistent le plus au traitement.Ces informations peuvent être d'un grand intérêt pour les médecins et peuvent les orienter pour l'adaptation d'un traitement adéquat.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Actuellement, l'émergence des souches multirésistantes est une étape vers l'impasse thérapeutique de santé publique en Algérie. En effet, nous assistons à une importante recrudescence des infections graves due aux bactéries multirésistantes.

Les principales causes de survenue de ce phénomène sont le choix erroné de l'antibiotique, le long séjour à l'hôpital, le choix empirique de la prescription de traitement, la diffusion des épidémies de résistance et le transfert de la résistance d'un milieu à l'autre via la pression de la sélection.

L'émergence mondiale des souches de *P. mirabilis* multirésistantes constitue une réelle menace car cette bactérie est commensale aérobie majeure du tube digestif de l'homme et la première espèce responsable des infections urinaires.

À cet égard, une caractérisation moléculaire de la résistance aux antibiotiques chez *P. mirabilis* est donc nécessaire pour évaluer le traitement approprié et de créer un programme national de surveillance pour contrôler et prévenir l'émergence de la résistance de cette bactérie en Algérie.

Dans notre étude, 180 souches de *P. mirabilis* ont été collectées à partir de 237 prélèvements pathologiques provenant de différents établissements de santé de Nord-ouest d'Algérie. De plus, les techniques biochimiques conventionnelles et les techniques protéomiques modernes ont montré une forte prévalence de l'infection communautaire et nosocomiale de *P. mirabilis* (75.9%), soulignant l'importance de recombinaison des techniques pour le diagnostic rapide de *P. mirabilis*, avec une sensibilité et une spécificité très élevée.

Nos résultats ont présenté une fréquence élevée de la résistance des souches d'origine nosocomiale aux grandes familles d'antibiotiques : céphalosporines (45%), quinolones (45%), aminosides (50%) par rapport au taux modéré des souches d'origine communautaire de la résistance aux antibiotiques : quinolones (45%), aminosides (15%). Un taux faible (2.5%) de résistance vis-à-vis des carbapénèmes a été constaté dans les deux milieux. Cela montre que le pourcentage des souches multirésistantes est en perpétuelle évolution en Algérie.

Cette étude évoque que *P. mirabilis* présente plusieurs phénotypes de résistance (bêta-lactamase BLSE et/ou céphalosporinase AmpC), ces derniers sont associés à la résistance aux quinolones, aminosides. Ces résultats confirment en général que l'efficacité de l'antibiotique décroît au fil des temps et révèle l'augmentation de la résistance à diverses familles d'antibiotiques.

Conclusion et Perspectives

La recherche moléculaire par la PCR standard et le séquençage permet non seulement la détection de génotype, mais également le support génétique associé à la résistance aux antibiotiques. Dans cette étude, nous rapportons l'émergence des gènes codant la résistance aux aminosides, aux β -lactamines et la résistance aux quinolones des souches de *P. mirabilis* isolées du CHU d'Oran et de la communauté dans quatre villes situées dans l'ouest-nord d'Algérie.

En Algérie, les céphalosporines, les quinolones, et les aminosides sont les antibiotiques les plus utilisés dans la stratégie de traitement thérapeutique de *P. mirabilis*. Le taux de résistance est élevé et les mécanismes associés sont très variés. Une diversité génétique avec l'émergence des nouveaux gènes a été détectée dans la région géographique de l'Ouest. Notre étude a permis la détection chez des souches cliniques de *P. mirabilis* des gènes de résistance CMY-2, CTX-2, TEM-1 et SHV aux bêta-lactames, des gènes de résistance *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3')-IV*, *ant(3')-I* et *aac(3')-I* aux aminosides, des gènes de résistance OXA-48 aux carbapénèmes et des gènes de résistance *qnrA*, *qnrB* et *qnrS* aux quinolones. Cela pourrait être dû à une utilisation croisée des antibiotiques dans le traitement des infections dans les hôpitaux. La diffusion rapide des souches multirésistantes dans la communauté confirme que celles-ci viennent du milieu hospitalier.

Nos résultats révèlent que le support de la multirésistance est porté sur des plasmides de type IncFIA, IncA/C, IncP. Ceci peut suggérer que la source d'une épidémie est due à leur transfert et leur circulation d'une bactérie à l'autre et/ou d'une souche à l'autre. Ces plasmides sont porteurs de plusieurs gènes de résistance aux grandes familles d'antibiotiques qui facilitent l'apparition des souches de *P. mirabilis* multirésistantes et leur dissémination dans la communauté.

Il est important de noter que la résistance totale des souches de *P. mirabilis* aux β -lactames, aux aminosides et aux quinolones est due à l'acquisition des plasmides multirésistants ou des gènes codés par des chromosomes. L'analyse de la diversité génétique et la relation clonale des isolats sur la base phyloprotéomique par la spectrométrie de masse MALDI-TOF et l'approche moléculaire par la technique d'ERIC-PCR présente un subcluster spécifique composé de plusieurs souches isolées chez des patients au niveau du service de chirurgie et de réanimation de CHU d'Oran.

Les souches de *P. mirabilis* étudiées ont montré une forte présence de gènes de résistance associés aux risques épidémiques. Ces résultats suggèrent la nécessité de surveiller et de

Conclusion et Perspectives

traiter les patients, en vue de prévenir la dissémination des souches multirésistantes impliquées dans les maladies graves comme les calculs rénaux.

Nous constatons, dans cette étude, que les souches multirésistantes sont implantées sous formes de petits foyers dans la région ouest-nord d'Algérie. Ceci conduit à l'extension des souches vers les autres régions. La gestion du risque infectieux exige une vigilance en détectant les clones à haut risque et prendre des mesures pour suivre leur dynamique d'évolution.

D'autre part, grâce à cette étude, nous avons identifié une évolution de cette bactérie chez un patient infecté, les interactions moléculaires que subit cette bactérie dans les différents écosystèmes pour s'adapter à son biotope et résister aux molécules antimicrobiennes qu'elle peut rencontrer durant sa longue infection de l'homme.

Le géotypage et le protéotypage sont des techniques très importantes pour caractériser les souches multirésistantes qui causent les infections les plus graves. Ceux-ci sont très importants pour prévenir l'écllosion d'épidémies hospitalières et communautaires et ainsi engager des mesures prophylactiques et thérapeutiques adéquates.

Cette étude montre l'importance des techniques protéomiques (MALDI-TOF) qui permettent la détection de *P.mirabilis* et la caractérisation directe des conducteurs moléculaires de résistance par comparaison aux méthodes génotypiques, d'autant plus que ces méthodes sont faciles à standardiser.

Nos résultats montrent l'importance de l'élimination de *P.mirabilis* pour prévenir la dissémination des souches hautement résistantes en Algérie. D'autres études plus poussées sont souhaitables. Pour plus d'efficacité de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Etude de la résistance de *P.mirabilis* aux carbapénèmes.
- Etude des mécanismes moléculaires de la résistance des plasmides.
- La construction d'une base de données de séquence type par la technique de typage de séquences multifocales (MLST).
- Approfondir les recherches sur les génomes et leur diversité de *P.mirabilis*.

***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

- **Adams-Sapper S, Sergeevna-Selezneva J, Tartof S, Raphael E, Diep B A, Perdreau-Remington F, Riley L W.** (2012). Globally dispersed mobile drug-resistance genes in Gram-negative bacterial isolates from patients with bloodstream infections in a US urban general hospital. *Journal of medical microbiology*, **61(7)** : 968.
- **Adler J L, Burke J P, Martin D F, Finland M.** (1971). *Proteus* infections in a general hospital. II. Some clinical and epidemiological characteristics. *Ann Intern Med*, **75(4)**: 531-536.
- **Adzitey F.** 2015. Antibiotic classes and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from selected poultry; a mini review. *World Vet. J.* **5 (3)**:36-41.
- **Alteri C J, Himpsl S D, Pickens S R, Lindner J R, Zora J S, Miller J E, Mobley H L.** (2013). Multicellular bacteria deploy the type VI secretion system to preemptively strike neighboring cells. *PLoS pathogens*, **9(9)**:1-18.
- **Alamuri P, Mobley HL.** (2008). A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both a cytotoxin and an agglutinin. *Mol Microbiol*, **68(4)**:1997-1017.
- **Ambler R P.** (1980). The structure of β -lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **289(1036)**:321-331.
- **Andersson M I, MacGowan A P.** (2003). Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **51(1)**:1-11.
- **Aouf A, Gueddi T, Djeghout B, Ammari H.** (2018). Frequency and susceptibility pattern of uropathogenic Enterobacteriaceae isolated from patients in Algiers, Algeria. *The Journal of Infection in Developing Countries.*, **12(04)**: 244-249.
- **Armbruster C E, Mobley H L.** (2012). Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nature Reviews Microbiology*, **10(11)** : 743-754.

Références bibliographiques

- **Armbruster, C. E., Mobley, H. L., Pearson, M. M.** (2018). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection. *EcoSal Plus*, **8**(1).
- **Aragón L M, Mirelis B, Miró E, Mata C, Gómez L, Rivera A, Navarro F.** (2008). Increase in β -lactam-resistant *Proteus mirabilis* strains due to CTX-M-and CMY-type as well as new VEB-and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **61**(5) : 1029-1032.
- **Asselineau J., Zalta J P.,Boissier J R.** (1973). Les antibiotiques: structure et exemples de mode d'action (1353). Edition Hermann,364.
- **Astal Z, Sharif F A, Abdallah S A, Fahd M I.** (2004). Extended spectrum beta-lactamases in *Eschericia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections in the Gaza Strip, Palestine. *Annals of Saudi medicine*, **24**(1): 55.
- **Azmoun S.** (2016). épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques au CHU de Marrakech (Le, p. e. s. p). Thèse de doctorat,Marrakech, Maroc.
- **Bajaj JS, Hylemon PB, Ridlon JM, Heuman DM, Daita K, White MB, Monteith P, Noble NA, Sikaroodi M, Gillevet PM.** (2012). Colonic mucosal *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens *Clinical Microbiology*,**31**(13):2018.
- **Bakour S, Garcia V, Loucif L, Brunel J M, Gharout-Sait A, Touati A, Rolain J M.** (2015). Rapid identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test. *New microbes and new infections*, **7**: 89-93.
- **Ben Ayed H, Koubaa M, Hammami F, Marrakchi C, Rekik K, Ben Jemaa T, Ben Jemaa M.** (2019). Performance of an easy and simple new scoring model in predicting multi-drug resistant Enterobacteriaceae in community-acquired urinary tract infections. In *Open Forum Infectious Diseases*, Oxford University Press,**6**(4):103.
- **Bentroki A A, Gouri A, Yakhlef A, Touaref A, Gueroudj A, Bensouilah T.** (2012). Antibiotic resistance of strains isolated from community acquired urinary tract

Références bibliographiques

- infections between 2007 and 2011 in Guelma (Algeria). In *Annales de biologie clinique*, **70**(6): 666-668.
- **Becker A H.** (1982). Infection due to *Proteus mirabilis* in newborn nursery. *American Journal of Diseases of Children*, **104**(4) : 355-359.
 - **Bidet P, Verdet C, Gautier V, Bingen E, Arlet G.** (2005). First description of DHA-1 ampC β -lactamase in *Proteus mirabilis*. *Clinical microbiology and infection*, **11**(7): 591-592.
 - **Biendo M, Thomas D, Laurans G, Hamdad-Daoudi F, Canarelli B, Rousseau F, Eb F.** (2005). Molecular diversity of *Proteus mirabilis* isolates producing extended-spectrum β -lactamases in a French university hospital. *Clinical microbiology and infection*, **11**(5):395-401.
 - **Bie L, Fang M, Li Z, Wang M, Xu H.** (2018). Identification and characterization of new resistance-conferring SGI1s (Salmonella genomic island 1) in *Proteus mirabilis*. *Frontiers in microbiology*, **9** : 3172.
 - **Biswas S, Rolain J M.** (2013). Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *Journal of microbiological methods*, **92**(1):14-24.
 - **Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R, Glupczynski Y.** (2007). Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **59**(3), 459-464.
 - **Bonnet R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Labia R, Sirot J.** (1999). Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **43**(11):2671-2677.

Références bibliographiques

- **Bonnet R, Marchandin H, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Sirot J.** (2002). Chromosome-encoded class D β -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. Antimicrobial agents and chemotherapy, **46**(6): 2004-2006.
- **Bonnet R.** (2004). Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother, **48**(1):1-14.
- **Bosi C, Davin-Regli A, Bornet C, Mallea M, Pages J M, Bollet C.**(1999). Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. Journal of clinical microbiology,**37**(7): 2165-2169.
- **Bouhnik Y, Alain S, Attar A, Flourié B, Raskine L, Sanson-Le Pors M J, Rambaud, J. C.** (1999). Bacterial populations contaminating the upper gut in patients with small intestinal bacterial overgrowth syndrome. The American journal of gastroenterology, **94**(5), 1327-1331.
- **Brahmi S, Touati A, Dunyach-Remy C, Sotto A, Pantel A, Lavigne J P.**(2018). High prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae in wild fish from the Mediterranean Sea in Algeria. Microbial Drug Resistance ,**24** (3): 290-298.
- **Brenner D J, Hickman-Brenner F W, Holmes B, Hawkey P M, Penner J L, Grimont P A, O'hara C M.**(1995). Replacement of NCTC 4175, the current type strain of *Proteus vulgaris*, with ATCC 29905. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **45**(4) : 870-871.
- **Bryskier A.** (1999). Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Paris, Ellipses.
- **Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A.** (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial agents and chemotherapy, **39**(6): 1211.

Références bibliographiques

- **Bush K, Bradford P A.** (2016). β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, **6**(8):1-22.
- **Bush K, Jacoby G A.** (2010). Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy, **54**(3): 969-976.
- **Calderon C B, Sabundayo B P.** (2007). Antimicrobial classifications: Drugs for bugs. In: Schwalbe R, Steele-Moore L & Goodwin AC (eds). Antimicrobial susceptibility testing protocols. CRC Press, Taylor and Frances group. ISBN 978-0-8247-4100-6.
- **Cantón R, Coque T M.** (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. Current opinion in microbiology, **9**(5): 466-475.
- **Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins K L, Threlfall E J.** (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. Journal of microbiological methods, **63**(3) :219-228.
- **Carattoli A.** (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. Antimicrobial agents and chemotherapy, **53**(6): 2227-2238.
- **Cattoir V, Poirel L , Rotimi V, Soussy C J , Nordmann P.**(2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in BLSE-producing enterobacterial isolates. Journal of antimicrobial chemotherapy, **60**: 394-397.
- **Cavallo J D, Fabre R, Jehl F, Rapp C, Garrabé E.** (2004). Bêtalactamines. EMC- Maladies infectieuses, **1**(3) : 129-202.
- **Chanal C, Bonnet R, De Champs C, Sirot D, Labia R, Sirot J.** (2000). Prevalence of β -lactamases among 1,072 clinical strains of *Proteus mirabilis*: a 2-year survey in a French hospital. Antimicrobial agents and chemotherapy, **44**(7) :1930-1935.
- **Chaslus-Dancla E, Pohl P, Meurisse M, Marin M, Lafont JP.** (1997). High genetic homology between plasmids of human and animal origins conferring resistance to the

Références bibliographiques

aminoglycosides gentamicin and apramycin. *Antimicrob Agents Chemother*, **35** (3): 590-3.

- **Chen C Y, Chen Y H, Lu P L, Lin W R, Chen T C, Lin C Y.** (2012). *Proteus mirabilis* urinary tract infection and bacteremia: risk factors, clinical presentation, and outcomes. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, **45**(3), 228-236.
- **Chen L, Al Laham N, Chavda K D, Mediavilla J R, Jacobs M R, Bonomo R A, Kreiswirth B N.** (2015). First report of an OXA-48-producing multidrug-resistant *Proteus mirabilis* strain from Gaza, Palestine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **59**(7):4305-4307.
- **Chrashekara S, Ramesh M N, Shobha A, Saravanan Y, Vadiraja H S, Navaneeth B V, Belwadi M S.** (2003). *Proteus mirabilis* and rheumatoid arthritis: no association with the disease. *Clinical rheumatology*, **22**(4-5): 268-270.
- **Chérif T, Saidani M, Decré D, Boubaker I B B, Arlet G.** (2016). Cooccurrence of Multiple AmpC β -Lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* in Tunisia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **60**(1): 44-51.
- Centers for Disease Control and Prevention, Office of Infectious Disease Antibiotic resistance threats in the United States, 2013, Atlanta.
- **Chouchani C, Marrakchi R, El Salabi A.** (2011). Evolution of β -lactams resistance in Gram-negative bacteria in Tunisia. *Critical reviews in microbiology*, **37**(3):167-177.
- **Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Miyamoto T, Kamimura T, Akashi K.** (2013). Community spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*: a long-term study in Japan. *Journal of medical microbiology*, **62**(7):1038-1043.
- **Cornaglia G, Hryniewicz W, Jarlier V, Kahlmeter G, Mittermayer H, Strachounski L.** (2004). Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance

Références bibliographiques

(ESGARS. European recommendations for antimicrobial resistance surveillance. *Clinical Microbiology and Infection*, **10**(4): 349-383.

- **Correia S, Poeta P, Hébraud M, Capelo J L, Igrejas G.**(2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?.*Journal of medical microbiology*, **66**(5): 551-559.
- **Crement L, Bemer P, Rome J, Juvin M E, Navas D, Bourigault C, Perrouin-Verbe B.** (2011). Outbreak caused by *Proteus mirabilis* isolates producing weakly expressed TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in spinal cord injury patients with recurrent bacteriuria. *Scandinavian journal of infectious diseases*, **43**(11-12) :957-961.
- **Cizman M.** (2003).The use and resistance to antibiotics in the community. *International journal of antimicrobial agents*, **21**(4):297–307.
- **D'Andrea M M, Venturelli C, Giani T, Arena F, Conte V, Bresciani P, Rossolini G M.** (2011). Persistent carriage and infection by multidrug-resistant *Escherichia coli* ST405 producing NDM-1 carbapenemase: report on the first Italian cases. *Journal of clinical microbiology*, **49**(7), 2755-2758.
- **D'Andrea M M, Nucleo E, Luzzaro F, Giani T, Migliavacc R, Vailati F** .(2006).CMY-16, a novel acquired AmpC-type β -lactamase of the CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from northern Italy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **50** (2): 618-24.
- **Davies J, Wright GD.**(1997).Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics.*Trends Microbiol*, **5**(6):234-40.
- **Davies J E.** (2006). Aminoglycosides: ancient and modern. *Journal of Antibiotics.*,**59**(9): 529-532.
- **Decré D, Verdet C, Raskine L, Blanchard H, Burghoffer B, Philippon A, Arlet G.** (2002). Characterization of CMY-type β -lactamases in clinical strains of *Proteus*

Références bibliographiques

- mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in four hospitals in the Paris area. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **50**(5): 681-688.
- **De Champs C, Sirot D, Chanal C, Bonnet R, Sirot J.** (2000). A 1998 survey of extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **44**(11):3177-3179
 - **De Champs C, Monne C, Bonnet R, Sougakoff W, Sirot D, Chanal C, Sirot J.** (2001). New TEM Variant (TEM-92) Produced by *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **45**(4): 1278-1280.
 - **Dellit T H, Owens R C, McGowan J E, Gerding D N, Weinstein R A, Burke J P, Brennan P J.** (2007). Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clinical Infectious Diseases*, **44**(2):159-177.
 - **Dixon N, Fowler R C, Yoshizumi A, Horiyama T, Ishii Y, Harrison L, Hanson N D.** (2016). IMP-27: A Unique Metallo- β -Lactamase Identified in Geographically Distinct Isolates of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **60**(10): 6418–6421.
 - **Doumith M, Dhanji H, Ellington M J, Hawkey P, Woodford N.** (2012). Characterization of plasmids encoding extended-spectrum β -lactamases and their addiction systems circulating among *Escherichia coli* clinical isolates in the UK. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **67**(4), 878-885.
 - **Drlica K, Hooper DC.**(2003). Mechanisms of quinolones action. In: Hooper DC, Rubinstein E, *Quinolone Antimicrobial Agents* 3 ed. ASM Press, Washington DC, 2003: 19-40.
 - **Dropa M, Balsalobre L C, Lincopan N, Matté G R, Matté M H.** (2015). Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in clinical Enterobacteriaceae

Références bibliographiques

from a hospital in Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **9**(08) : 890-897.

- **Drzewiecka D.** (2016). Significance and roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments. *Microbial ecology*, **72**(4):741-758.
- **Dubourg G, Baron S, Cadoret F, Couderc C, Fournier P E, Lagier J C, Raoult D.** (2018). From culturomics to clinical microbiology and forward. *Emerging infectious diseases*, **24**(9): 1683.
- **Eames I, Tang J W, Li Y, Wilson P.** (2009). Airborne transmission of disease in hospitals, **6** (6):S697-702.
- **Ebringer A, Rashid T.** (2014). Rheumatoid arthritis is caused by a *Proteus* urinary tract infection. *Apmis*, **122**(5):363-368.
- **Eckenrode J, Smith E G, McCarthy M E, Dineen M.** (2014). Income inequality and child maltreatment in the United States. *Pediatrics*, **133**(3):454-461.
- **El-gamasy M A.**(2017). Prevalence of infective organisms of infections of urinary tract in a sample of arab infants and children. *Journal of integrative nephrology and andrology*, **4**(4):136.
- **El-Mahdy R., Mostafa A., El-Kannishy G.** (2018). High level aminoglycoside resistant enterococci in hospital-acquired urinary tract infections in Mansoura, Egypt. *Germs.*, **8**(4):186.
- **Endimiani A, Luzzaro F, Brigante G, Perilli M, Lombardi G, Amicosante G, Toniolo A.** (2005). *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to the expression of extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **49**(7):2598-2605.

Références bibliographiques

- **Etebu E, Ariekpar I.** (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res*, **4**(2016) : 90-101.
- **Fernández L, Hancock R E.** (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, **25**(4) :661-681.
- **Fernández-Delgado M, Duque Z, Rojas H, Suárez P, Contreras M, García-Amado M A, Alciaturi C.**(2015). Environmental scanning electron microscopy analysis of *Proteus mirabilis* biofilms grown on chitin and stainless steel. *Annals of microbiology*, **65**(3): 1401-1409.
- **Fernández-Martínez M, Ruiz del Castillo B Lecea-Cuello M J, Rodríguez-Baño J, Pascual Á, Martínez-Martínez L.**(2018). Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI) and the Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended Spectrum β -Lactamases Collected in Two Multicenter Studies in Spain. *Microbial Drug Resistance*, **24**(4):367-376.
- **Fleming A.** (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*, **10**(3):226.
- **Foris L A, Snowden J.** (2017). *Proteus Mirabilis* Infections. Editeur: In StatPearls, Island.
- **Forge A, Schacht J.** (2000). Aminoglycoside antibiotics. *Audiology and Neurotology*, **5**(1): 3-22.
- **Forson O A, Ayanka E, Olu-Taiwo M, Pappoe-Ashong P J, Ayeh-Kumi P J.** (2017). Bacterial infections in burn wound patients at a tertiary teaching hospital in Accra, Ghana. *Annals of burns and fire disasters*, **30**(2):116.

Références bibliographiques

- **Foxman B, Zhang L, Koopman J S, Manning S D, Marrs C F.** (2005). Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic perspectives & innovations*, **2**(1): 10.
- **Foxman B.** (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, **7**(12): 653.
- **Foxman B, Brown P.** (2003). Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infectious disease clinics of North America*, **17**(2):227-241.
- **Friedman N D, Temkin E, Carmeli Y.** (2016). The negative impact of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, **22**(5):416-422.
- **Fridkin S, Baggs J, Fagan R, Magill S, Pollack L A, Malpiedi P, Samore M H.** (2014). Vital signs: improving antibiotic use among hospitalized patients. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, **63**(9): 194.
- **Fritsche T R, Castanheira M, Miller G H, Jones R N, Armstrong E S.** (2008). Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **52**(5):1843-1845.
- **Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A.** (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol*, **3**(9):722-32.
- **Fursova N K, Astashkin E I, Knyazeva AI, Kartsev N N, Leonova E S, Ershova O N, Svetoch EA.** (2015). The spread of *bla*_{OXA-48} and *bla*_{OXA-244} carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and Enterobacter spp. isolated in Moscow, Russia. *Annals of clinical Microbiology and Antimicrobials*, **14**(1): 46.

Références bibliographiques

- **Galimand M, Courvalin P, Lambert T.** (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **47**(8):2565-2571.
- **Galani I, Souli M, Panagea T, Poulakou G, Kanellakopoulou K, Giamarellou H.** 2012. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in Enterobacteriaceae isolates from a Greek university hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, **18**(3):E52-E54.
- **Gaston H A.** (1995). Proteus--is it a likely aetiological factor in chronic polyarthritis? *Rheum Dis*, **54**(3):157-8.
- **Gharout-Sait A, Touati A, Guillard T, Brasme L, de Champs C.** (2015). Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal AmpC genes from hospitalized and non-hospitalized patients in Algeria: description of new sequence type in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **19**(2):187-95.
- **Giammanco G M, Grimont P A, Grimont F, Lefevre M, Giammanco G, Pignato S.** (2011). Phylogenetic analysis of the genera *Proteus*, *Morganella* and *Providencia* by comparison of rpoB gene sequences of type and clinical strains suggests the reclassification of *Proteus myxofaciens* in a new genus, *Cosenzaea* gen. nov., as *Cosenzaea myxofaciens* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **61**(7): 1638-1644.
- **Gillings M, Holley M.** (1997). Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters in Applied Microbiology*. **25** (1):17-21.
- **Girlich D, Bonnin R A, Bogaerts P, De Laveleye M, Huang D T, Dortet L, Naas T.** (2016). Chromosomal amplification of the bla_{OXA-58} carbapenemase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **61**(2): e01697-16.

Références bibliographiques

- **Girlich D, Anglade C, Zambardi G, Nordmann P.** (2013). Comparative evaluation of a novel chromogenic medium (chromID OXA-48) for detection of OXA-48 producing Enterobacteriaceae. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, **77**(4): 296-300.
- **Gmiter D, Czerwonka G, Drewnowska J M, Swiecicka I, Kaca W.** (2019). Draft Genome Sequences of *Proteus mirabilis* K1609 and K670: A Model Strains for Territoriality Examination. *Current microbiology*, **76**(2):144-152.
- **González-Bello C,** (2017). Antibiotic adjuvants—A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **27**(18):4221-4228.
- **Grahnquist L, Lundberg B, Tullus K** *APMIS*.(1992), Neonatal *Proteus* meningoenzephalitis. Case report, **100**(8):734-6.
- **Gruner G, Tadros M H, Plapp R.** (1985). Isolation of Labeled Lipoprotein from *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* after Incubation with [14C] Penicillin. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **40**(5-6):415-420.
- **Gupta S K, Padmanabhan B R, Diene S M, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud, L, Rolain J M.** (2014). ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **58**(1): 212-220.
- **Guinoiseau E.** (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action, Thèse Doctoral. Sciences du Vivant. Université de Corse.
- **Hafiane A, Ravaoarinoro M.** (2008). Various typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. *Medecine et maladies infectieuses*, **38**(5) : 238-247.
- **Hamilton A L, Kamm M A, Ng S C, Morrison M.** (2018). *Proteus* spp. as putative gastrointestinal pathogens. *Clinical microbiology reviews*, **31**(3).1-19.

Références bibliographiques

- **Hansson K L, Sundstroöm A, Pelletier and Roy.** (2002). Int12 integron integrase in Tn7. *J. Bacteriol*, **184** (6):1712-21.
- **Harada S, Ishii Y, Saga T, Tateda K, Yamaguchi K.**(2010). Chromosomally encoded *bla*_{CMY-2} located on a novel SXT/R391-related integrating conjugative element in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **54** (9) : 3545-50.
- **Heuer H, Krögerrecklenfort E, Wellington E M H, Egan S, Van Elsas J D, Van Overbeek L, Smalla K.** (2002). Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS microbiology ecology*, **42**(2):289-302.
- **Hickman F W, Steigerwalt A G, Farmer J J, Brenner D J.**(1982). Identification of *Proteus penneri* sp. nov., formerly known as *Proteus vulgaris* indole negative or as *Proteus vulgaris* biogroup 1. *Journal of clinical microbiology*, **15**(6): 1097-1102.
- **Horcajada J P, Shaw E, Padilla B, Pintado V, Calbo E, Benito N,** Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). (2013). Healthcare-associated, community-acquired and hospital-acquired bacteraemic urinary tract infections in hospitalized patients: a prospective multicentre cohort study in the era of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, **19**(10) :962-968.
- **Ho P L, Wong R C, Lo SW, Chow K H, Wong S S, Que T L.** (2010). Genetic identity of aminoglycoside-resistance genes in *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Journal of medical microbiology*, **59**(6): 702-707.
- **Hooper D C.** (2003). Mechanisms of quinolone resistance. In *Quinolone Antimicrobial Agents*, Third Edition American Society of Microbiology 41-67.

Références bibliographiques

- **Hounsa A, Kouadio L, De P M.** (2010). Self-medication with antibiotics obtained from private pharmacies in Abidjan, Ivory Coast. *Médecine et maladies infectieuses*, **40**(6) : 333-340.
- **Huang T D., Bogaerts P, Berhin C, Guisset A, Glupczynski Y.** (2010). Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*, **48**(6), 2091-2096.
- **Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Alouache S, Verdet C, Bakour R, Arlet G.**(2009). Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. *International journal of antimicrobial agents*, **34**(4):340-342.
- **Jacoby G A.** (2009). AmpC β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **22** (1) :161-82.
- **Jarlier V, Nicolas M H, Fournier G, Philippon A.**(1988). Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Clinical Infectious Diseases*, **10**(4) :867-878.
- **Jakobsen L, Kurbasic A, Skjøl-Rasmussen L, Ejrnæs K, Porsbo L J, Pedersen K, Aarestrup F M.** (2010). *Escherichia coli* isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pigs share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling humans and patients with urinary tract infection. *Foodborne pathogens and disease*, **7**(5) : 537-547.
- **Jneid J, Cassir N, Schuldiner S, Jourdan N, Sotto A, Lavigne J P, La Scola B.**(2018). Exploring the microbiota of diabetic foot infections with culturomics. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **8**: 282.

Références bibliographiques

- **Joly-Guillou M L.** (2006). Intérêt d'E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Réanimation*, **15**(3) :237-240.
- **Jombo G T A, Emanghe U E, Amefule E N, Damen J G.**(2012). Nosocomial and community acquired uropathogenic isolates of *Proteus mirabilis* and antimicrobial susceptibility profiles at a university hospital in Sub-Saharan Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **2**(1): 7-11.
- **Jones BV, Mahenthiralingam E, Sabbuba NA, Stickler DJ.** (2005). Role of swarming in the formation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms on urinary catheters. *J Med Microbiol*,**54**(9), 807-813.
- **Jordan R P, Nicolle L E.**(2014). Preventing Infection Associated with Urethral Catheter Biofilms. In *Biofilms in Infection Prevention and Control A Healthcare Handbook*,287-309.
- **Kaiser D.** (2007). Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns. *Current Biology*, **17**(14) : R561-R570.
- **Kamga H G.**(2014). Phénotypes de résistance des souches d'*Escherichia coli* responsables des infections urinaires communautaires dans la ville de Yaounde'(Cameroun). *African Journal of Pathology and Microbiology*, **3** :1-4.
- **Kato K, Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Takakura S., Ichiyama S.** (2017). Regional Spread of CTX-M-2 Producing *Proteus mirabilis* with the Identical Genetic Structure in Japan. *Microbial Drug Resistance*, **23**(5): 590-595.
- **Kapoor G, Saigal S, Elongavan A.** (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, **33**(3): 300.

Références bibliographiques

- **Karapavlidou P, Sofianou D, Manolis E N, Pournaras S, Tsakris A.** (2005). CTX-M-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* in Greece. *Microbial Drug Resistance*, **11**(4): 351-354.
- **Kim J Y, Park Y J, Kim S I, Kang M W, Lee S O, Lee K Y.** (2004). Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in a Korean university hospital. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **54**(6):1144-1147.
- **Kim J Y, Park Y J , Kwon H J,Han K , Kang M W, Woo G J.**(2008).Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **62** (3): 479-483.
- **Kim E S, Jeong J Y, Jun J B , Choi S H , Lee S O, Kim M N .**(2009). Prevalence of *aac (6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme among Enterobacteriaceae blood isolates in Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **53**(6): 2643-2645.
- **Koncan R, Mazzariol A, Kocsis B, Fontana R, Lanzafame P, Rassu M, Cornaglia M.** (2010). First detection in Europe of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance *qnrD* determinant. *Clin Microbiol Infect*, **16**: S126.
- **Kuan L, Schaffer J N, Zouzias C D, Pearson M M.** 2014. Characterization of 17 chaperone-usher fimbriae encoded by *Proteus mirabilis* reveals strong conservation. *Journal of medical microbiology*, **63**(7): 911-922.
- **Kwak Y G, Choi S H, Kim T, Park S Y, Seo S H, Kim M B, Choi S H.** (2017). Clinical guidelines for the antibiotic treatment for community-acquired skin and soft tissue infection. *Infection & chemotherapy*, **49**(4): 301-325.
- **Lai D, Gorbach SL, Levitan R.**(1972). Intestinal microflora in patients with alcoholic cirrhosis: urea-splitting bacteria and neomycin resistance. *Gastroenterology* **62**(2):275–279.

Références bibliographiques

- **Lautenbach E, Baldus Patel J, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO.**(2001). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. Clin Infect Dis ,**32**(8):1162–71.
- **Laupland K B, Parkins M D, Ross T,Pitout J D D.**(2007). Population-based laboratory surveillance for tribe Proteaeae isolates in a large Canadian health region. Clinical microbiology and infection, **13**(7):683-688.
- **Leekha S, Terrell C L, Edson RS.** (2011). General principles of antimicrobial therapy. In Mayo Clinic Proceedings, **86**(2): 156-167. Elsevier.
- **Leulmi Z, Kandouli C, Mihoubi I, Benlabed K, Lezzar A, Rolain J M.** (2018). First report of *bla*_{OXA-24} carbapenemase-encoding gene, *armA* Methyltransferase and *aac (6)-Ib-cr* producing multidrug-resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis* in Algeria. Journal of global antimicrobial resistance, 16:125-129.
- **Levine C, Hiasa H, Marians K J.** (1998). DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, **1400**(1-3), 29-43.
- **Le´vesque C L. Piche´, C. Larose, and P. H. Roy.** (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob. Agents Chemother, **39**(1):185-191.
- **Leshner G Y, Froelich E J, Gruett M D, Bailey J H, Brundage R P.** (1962). 1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. Journal of Medicinal Chemistry, **5**(5):1063-1065.

Références bibliographiques

- **Lewis K.** (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews Drug discovery*, **12**(5):371.
- **Li X, Zhao H, Lockatell CV, Drachenberg CB, Johnson DE, Mobley HLT.** (2002). Visualization of *Proteus mirabilis* within the matrix of urease-induced bladder stones during experimental urinary tract infection. *Infection and Immunity*, **70**(1): 389–394.
- **Linhares I, Raposo T, Rodrigues A, Almeida A.**(2013). Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000–2009). *BMC infectious diseases*, **13**(1): 19.
- **Liu KL, Lee TC, Lin MT, Chen SJ.** (2007). Education and imaging. Gastrointestinal: abdominal abscess associated with a ventriculoperitoneal shunt. *J Gastroenterol Hepatol*,**22**(5):757.
- **Livermore D M, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini G M, Arlet G, Poirel L.**(2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **59**(2):165-174.
- **Lopez F.** (2005). Protéomique et spectrométrie de masse: applications en clinique. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*, **12**(6) : 427-435.
- **Lou MA, Mandal AK, Alexander JL, Thadepalli H.** (1977). Bacteriology of the human biliary tract and the duodenum. *Arch Surg*, **112** (8) : 965-7.
- **Lukuke H M, Kasamba E, Mahuridi A, Ngatu N R, Narufumi S, Mukengeshayi A** (2017). L'incidence des infections nosocomiales urinaires et des sites opératoires dans la maternité de l'Hôpital Général de Référence de Katuba à Lubumbashi en République Démocratique du Congo. *Pan African Medical Journal*, **28**(1).
- **Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Lombardi G, Belloni R, Zollo A, Toniolo A.** (2001). Properties of multidrug-resistant, ESBL-producing *Proteus mirabilis* isolates

Références bibliographiques

and possible role of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. International journal of antimicrobial agents, **17**(2):131-135.

- **Maamar B, Abdelmalek R, Messadi A A, Thabet L.** (2019). Étude épidémioclinique des infections à entérobactéries productrices de carbapénémases chez les brûlés. Annals of Burns and Fire Disasters, **32**(1), 10.
- **Machado AP, Pimenta AT, Contijo PP, Geocze S, Fischman O.** (2006). Microbiologic profile of flexible endoscope disinfection in two Brazilian hospitals. Arq Gastroenterol, **43**(4):255-258.
- **Mac Aogáin M, Rogers T R, Crowley B.**(2016). Identification of emergent *bla*_{CMY-2}-carrying *Proteus mirabilis* lineages by whole-genome sequencing. New microbes and new infections, 9:58-62.
- **Mairi A, Pantel A, Ousalem F, Sotto A, Touati A, Lavigne J P.** (2019). OXA-48-producing Enterobacterales in different ecological niches in Algeria: clonal expansion, plasmid characteristics and virulence traits. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **74**(7), 1848-1855.
- **Mahrouki S, Belhadj O, Chihi H, Mohamed B M, Celenza G, Amicosante G, Perilli M.** (2012). Chromosomal *bla*_{CTX-M-15} associated with ISEcp1 in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* isolated at the Military Hospital of Tunis, Tunisia. Journal of medical microbiology, **61**(9):1286-1289.
- **Mahrouki S, Perilli M, Bourouis A, Chihi H, Ferjani M, Ben Moussa M, Belhadj O.** (2013). Prevalence of quinolone resistance determinant *qnr A6* among broad-and extended-spectrum beta-lactam-resistant *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* clinical isolates with sul 1-type class 1 integron association in a Tunisian Hospital. Scandinavian journal of infectious diseases, **45** (8) : 600-5

Références bibliographiques

- **Magliano E, Grazioli V, Deflorio L, Leuci A I, Mattina R, Romano P, Cocuzza C E.**(2012).Gender and age-dependent etiology of community-acquired urinary tract infections. *The Scientific World Journal*, 2012:6.
- **Magalhaes M L, Blanchard J S.** (2005). The kinetic mechanism of AAC (3)-IV aminoglycoside acetyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*,**44**(49):16275-16283.
- **Mathur S, Sabbuba N A, Suller M T E, Stickler D J,Feneley R C L.** (2005). Genotyping of urinary and fecal *Proteus mirabilis* isolates from individuals with long-term urinary catheters. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **24**(9): 643-644.
- **Mariani-Kurkdjian P.**(2004). Physiopathologie des infections urinaires. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie*, **7**(3), 167-172.
- **Markovska R, Schneider I, Keuleyan E, Ivanova D, Lesseva M, Stoeva T, Mitov I.** (2017). Dissemination of a Multidrug-Resistant VIM-1-and CMY-99-Producing *Proteus mirabilis* Clone in Bulgaria. *Microbial Drug Resistance*, **23**(3) :345-350.
- **Martinez-Martinez L, Pascual A,Jacoby G A.** (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*, **351**(9105):797-799.
- **Matagne A, Dubus A, Galleni M, Frère J M.**(1999). The β -lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *Natural product reports*, **16**(1):1-19.
- **Marx AC, Hartshorne MF, Stull MA, Truwit CL Skeletal.** (1988). Case report 496: Intraosseous gas in *Proteus mirabilis* osteomyelitis complicating bone infarcts in sickle cell disease. *Radiol*, **17**(7):510-3.
- **Mathlouthi N,Al-Bayssari C, El Salabi A, Bakour S, Gwierif S B, Zorgani A A, Chouchani C.** (2016). Carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae isolated from Tunisian and Libyan hospitals. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **10**(07):718-727.

Références bibliographiques

- **Mazzariol A, Kocsis B, Koncan R, Kocsis E, Lanzafame P, Cornaglia G.**(2012). Description and plasmid characterization of *qnrD* determinants in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii*. *Clinical Microbiology and Infection*, **18**(3):E46-E48.
- **Mérens A, Servonnet A.** (2010). Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. *Revue francophone des laboratoires*, **40** (422):33-41.
- **Michelim L, Muller G, Zacaria J, Delamare A P L, Costa S O P D, Echeverrigaray S.** (2008). Comparison of PCR-based molecular markers for the characterization of *Proteus mirabilis* clinical isolates. *Brazilian journal of infectious diseases*, **12**(5), 423-429.
- **Miller S I.** (2016). Antibiotic resistance and regulation of the gram-negative bacterial outer membrane barrier by host innate immune molecules. *MBio*, **7** (5):01541-16
- **Miriagou V, Papagiannitsis C C, Tzelepi E, Casals J B, Legakis N J, Tzouveleki L S.**(2010). Detecting VIM-1 production in *Proteus mirabilis* by an imipenem-dipicolinic acid double disk synergy test. *Journal of clinical microbiology*, **48**(2):667-668.
- **Miró E, Grünbaum F, Gómez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F.** (2013). Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in *Enterobacteriaceae* clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microbial drug resistance*, **19** (2): 94-9.
- **Misra V, Misra SP, Singh PA, Dwivedi M, Verma K, Narayan U.** (2009). Significance of cytomorphological and microbiological examination of bile collected by endoscopic cannulation of the papilla of Vater. *Indian J Pathol Microbiol*, **52**(3):328-331.

Références bibliographiques

- **Mobley HLT.**1996. Virulence of *Proteus mirabilis*. Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management. ASM Press; Washington, D.C.245–269
- **Müller HE J.**(1986).Occurrence and pathogenic role of Morganella-Proteus-Providencia group bacteria in human feces. Clin Microbiol, **23**(2):404-5.
- **Munita J M, Arias C A.** (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiology spectrum, 4(2).
- **National Nosocomial Infections Surveillance** (NNIS) report, data summary from October 1986-April 1996, 1996. A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. Am J Infect Control, **24**(5):380-8.
- **Nagano N, Shibata N, Saitou Y, Nagano Y, Arakawa Y.**(2003). Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum CTX-M-2 type β -lactamase. Journal of clinical microbiology, **41**(12): 5530-5536.
- **Naghavi M, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abera SF, et al.**(2017). Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. Lancet. **390**(10100):1151–210.
- **Nakano R, Nakano A, Abe M, Inoue M, Okamoto R.** (2012). Regional outbreak of CTX-M-2 β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* in Japan. Journal of medical microbiology, **61**(12): 1727-1735.
- **Neuwirth C, Siébor E, Duez J M, Péchinot A, Kazmierczak A.** (1995). Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **36**(2):335-342.

Références bibliographiques

- **Nguyen J C, Lambert T.** (2012). Interprétation phénotypique de l'antibiogramme vis-à-vis des aminosides. *Revue Francophone des Laboratoires*, **2012**(445):75-77.
- **Nordmann P, Poirel L.** (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **56**(3) : 463-469.
- **Nordmann P, Carrer A.** (2010). Les carbapénèmases des entérobactéries. *Archives de pédiatrie*, **17** (4): S154-S162.
- **Nour el Houda Khennouchi N C, Loucif L, Boutefnouchet N, Alleg H, Rolain J M.** (2015). MALDI-TOF MS as a tool to detect a nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-and armA methyltransferase-producing *Enterobacter cloacae* clinical isolates, Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.**59** (10): 6477-83.
- **Nicholson EB, Concaugh EA, Mobley HL.**(1991),*Proteus mirabilis* urease: use of a *ureA-lacZ* fusion demonstrates that induction is highly specific for urea. *Infect Immun*. 59:3360–3365.
- **Nielubowicz G R, Smith S N, Mobley H L.** (2008). Outer membrane antigens of the uropathogen *Proteus mirabilis* recognized by the humoral response during experimental murine urinary tract infection. *Infection and immunity*, **76**(9) : 4222-4231.
- **Ni J, Shen T-CD, Chen EZ, Bittinger K, et al.** (2017). A role for bacterial urease in gut dysbiosis and Crohn's disease. *Sci Transl Med*,**9** (416):1-11.
- **Nikaido H.** (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry*., 78: 119-146.

Références bibliographiques

- **Nzakizwanayo J, Scavone P, Jamshidi S, Hawthorne J A, Pelling H, Dedi C, Patel B A.** (2017). Fluoxetine and thioridazine inhibit efflux and attenuate crystalline biofilm formation by *Proteus mirabilis*. Scientific reports, **7**(1) :12222.
- **O'Hara C M, Brenner F W, Steigerwalt A G, Hill B C, Holmes B, Grimont P A, Brenner D J.** (2000). Classification of *Proteus vulgaris* biogroup 3 with recognition of *Proteus hauseri* sp. nov., nom. rev. and unnamed *Proteus* genomospecies 4, 5 and 6. International journal of systematic and evolutionary microbiology, **50**(5):1869-1875.
- **O'Fallon E, Gautam S, D'Agata EM.** (2009). Colonization with multidrugresistant gram-negative bacteria: prolonged duration and frequent, cocolonization. Clin Infect Dis, **48** (10):1375-81.
- **O'Neill J.** (2014). Antimicrobial resistance. Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. Review on Antimicrobial Resistance (London). Grande-Bretagne. Wellcome Trust (London),14.
- **Olaitan A O, Morand S, Rolain J M.** (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Frontiers in microbiology, **5**: 643.
- **Oliveira M, Santos V, Fernandes A, Bernardo F, Vilela C L.** (2010). Antimicrobial resistance and in vitro biofilm-forming ability of enterococci from intensive and extensive farming broilers. Poultry science, **89**(5): 1065-1069.
- **Österblad M, Hakanen A J, Jalava J.** (2014). Evaluation of the Carba NP test for carbapenemase detection. Antimicrobial agents and chemotherapy, **58**(12) :7553-7556.
- **Öster, Linda.** (2005). Structure-function studies of beta-lactam biosynthetic enzymes. Diss. (sammanfattning/summary) Uppsala: Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Thèse, 73.

Références bibliographiques

- **Pagani L, Migliavacca R, Pallecchi L, Matti C, Giacobone E, Amicosante G, Rossolini G M.**(2002). Emerging extended-spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis*. Journal of clinical microbiology, **40**(4): 1549-1552.
- **Pagès JM, James CE, Winterhalter M.**(2008). Review. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nat Rev Microbiol, **6**(12):893-903.
- **Partridge S R, Hall R M.** (2005). Evolution of transposons containing *bla*_{TEM} genes. Antimicrobial agents and chemotherapy, **49**(3):1267-1268.
- **Patel R.** (2013). MALDI-TOF mass spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology. Clinical chemistry, **59**(2):340-342.
- **Pathirana H N K S, De Silva B C J, Wimalasena S H M P, Hossain S, Heo G J.** (2018). Comparison of virulence genes in *Proteus* species isolated from human and pet turtle. Iranian journal of veterinary research, **19**(1): 48.
- **Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP.**(2008). Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. Infect Control Hosp Epidemiol, **29** (12) : 1099-106.
- **Paterson D L.** (2000). Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). Clinical Microbiology and Infection, **6**(9):460-463.
- **Pearson M M, Sebahia M, Churcher C, Quail M A, Seshasayee A S, Luscombe N M, Hauser H.** (2008). Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. Journal of bacteriology, **190**(11): 4027-4037.
- **Philippon A, Arlet G, Jacoby G A.** (2002). Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy, **46**(1):1-11.

Références bibliographiques

- **Poirel L, Pitout J D, Nordmann P.** (2007). Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *2*(5):501-12.
- **Poirel L, Cattoir V, Nordmann P.** (2012). Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Frontiers in microbiology*, *3*, 24.
- **Power P, Galleni M, Di Conza J, Ayala J A, Gutkind G.** (2005). Description of In116, the first *bla*_{CTX-M-2}-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *55*(4):461-465.
- **Ranjbar R, Tabatabaee A, Behzadi P, Kheiri R.** (2017). Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) genotyping of escherichia coli strains isolated from different animal stool specimens. *Iranian journal of pathology*, *12*(1) :25.
- **Ramirez M S, Tolmasky M E.** (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, *13*(6):151-171.
- **Rakotovao-Ravahatra Z D, Randriatsarafara F M, Rasoanandrasana S, Raverohanta L, Rakotovao A L.**(2017). Phénotypes de résistance des souches d'*Escherichia coli* responsables d'infection urinaire au laboratoire du Centre Hospitalo-Universitaire de Befelatanana Antananarivo. *The Pan African Medical Journal*, *26*:166.
- **Recchia G D, R M Hall.** (1995). Gene cassettes-a new class of mobile element. *Microbiology*, *141* (12):3015-3027.

Références bibliographiques

- **Rodriguez-Villalobos H, Struelens M J.** (2006). Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Réanimation*, **15**(3):205-213.
- **Rodriguez C, Radice M, Perazzi B, Castro S, Juarez J, Santini P, Gutkind G.** (2005). Enzymatic resistance to beta lactam antibiotics within the genus *Proteus* and evaluation of *Proteus mirabilis* phenotypes and genotypes for resistance to third-and fourth-generation cephalosporins. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*, **23**(3), 122-126.
- **Różalski A, Torzewska A, Moryl M, Kwil I, Maszewska A, Ostrowska K, Stańczyk P.**(2012). *Proteus* sp.–an opportunistic bacterial pathogen–classification, swarming growth, clinical significance and virulence factors. *Folia Biologica et Oecologica*, **8**(1): 1-17.
- **Różalski A, Stańczyk P.**(2010). *Molecular detection of human bacterial pathogens*. 1st Edition CRC Press, Boca Raton, 1278.
- Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance aux Antibiotiques, 17 ème Rapport d'évaluation.<http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/Rapport2015%20.pdf>, version 2014, 2015.
- **Russell A D.** (2004). Types of antibiotics and synthetic antimicrobial agents. In: Denyer S P, Hodges N A, German S P. (eds.) *Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology*. 7th Ed. Blackwell Science, UK: 152-186.
- **Saak C C, Zepeda-Rivera M A, Gibbs K A.** (2017). A single point mutation in a TssB/VipA homolog disrupts sheath formation in the type VI secretion system of *Proteus mirabilis*. *PloS one*, **12**(9) :e0184797.
- **Sanger F, Nicklen S, Coulson A R.**(1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, **74**(12):5463-5467.

Références bibliographiques

- **Sader H S, Castanheira M, Arends S J, Goossens H, Flamm R K.** (2019). Geographical and temporal variation in the frequency and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from patients hospitalized with bacterial pneumonia: results from 20 years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2016). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **74**(6) : 1595–1606
- **Said S F.**(2005). Les infections nosocomiales dans le service de chirurgie B de l'hôpital du point G. Université du Mali, Thèse de Doctorat.
- **Saito R, Sato K, Kumita W, Inami N, Nishiyama H, Okamura N, Koike K.** (2006). Mutations of DNA gyrase and topoisomerase IV in clinical isolates of fluoroquinolone-resistant *Proteus mirabilis*. *The Japanese journal of antibiotics*, **59**(1) :41-43.
- **Saito R, Okugawa S, Kumita W, Sato K, Chida T, Okamura N, Koike K.** (2007). Clinical epidemiology of ciprofloxacin-resistant *Proteus mirabilis* isolated from urine samples of hospitalised patients. *Clinical Microbiology and Infection*, **13**(12): 1204-1206.
- **Saga T, Yamaguchi K.**(2009). History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *JMAJ*, **52**(2): 103-108.
- **Sanger F, Nicklen S, Coulson A R.**(1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, **74**(12):5463-5467.
- **Saradamma R D, Higginbotham N, Nichter M.** (2000). Social factors influencing the acquisition of antibiotics without prescription in Kerala State, south India. *Social science & medicine*, **50**(6): 891-903.
- **Sauget M, Valot B, Bertrand X, Hocquet D.** (2017). Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria?. *Trends in microbiology*, **25**(6): 447-455.

Références bibliographiques

- **Schaffer J N, Pearson M M.**(2015). *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. *Microbiology spectrum*, **3**(5):1-66.
 - **Segal R, Dan M, Pogoreliuk I, Leibovitz A.**(2006). Pathogenic colonization of the stomach in enterally fed elderly patients: comparing percutaneous endoscopic gastrostomy with nasogastric tube, **54**(12): 1905-190.
 - **Selim S, Hassan S, Hagagy N.** (2015). Genome sequencing and annotation of *Proteus* sp. SAS71. *Genomics data*, **6**(1) : 70-71.
 - **Seng P, Rolain J M, Fournier P E, La Scola B, Drancourt M, Raoult D.**(2010). MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future microbiology*, **5**(11):1733-1754.
 - **Sidorczyk Z, Zych K, Toukach F V, Arbatsky N P, Agnieszka Zablotni, Shashkov A S, Knirel Y A.**(2002). Structure of the O-polysaccharide and classification of *Proteus mirabilis* strain G1 in *Proteus* serogroup O3. *European journal of biochemistry*, **269**(5): 1406-1412.
 - **Siebor E, de Curraize C, Neuwirth C.** (2018). Genomic context of resistance genes within a French clinical *Proteus mirabilis*: identification of the novel genomic resistance island GI Pmi 1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **73**(7):1808-1811.
 - **Silverman JM, Brunet YR, Cascales E, Mougous JD.**(2012). Structure and regulation of the type VI secretion system., *Annu Rev Microbiol*, **66**(1):453-72.
- Kim**
- **Silverstein D, Hopper K.**(2014). *Small Animal Critical Care Medicine-E-Book*. Elsevier Health Sciences. Second édition. Elsevier Health Sciences.
 - **Simner P J, Gilmour M W, DeGagne P, Nichol K, Karlowsky J A.** (2015). Evaluation of five chromogenic agar media and the Rosco Rapid Carb screen kit for

Références bibliographiques

detection and confirmation of carbapenemase production in Gram-negative bacilli. *Journal of clinical microbiology*, **53**(1) : 105-112.

- **Singhal N, Kumar M, Kanaujia P K, Viridi J S.** (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, **6**(1):791.
- **Sirot J, Courvalin P, Soussy C J.** (1996). Definition and determination of in vitro antibiotic susceptibility breakpoints for bacteria. *Clinical microbiology and infection*, **2** : S5-S10.
- **Siebor E, Neuwirth C.**(2011). The new variant of Salmonella genomic island 1 (SGI1-V) from a *Proteus mirabilis* French clinical isolate harbours *bla*_{VEB-6} and *qnrA1* in the multiple antibiotic resistance region. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **66**(11), 2513-2520.
- **Skurnik D, Andremont A.** (2006). Antibiothérapie sélectionnante. De la théorie à la pratique. *Réanimation*,**15**(3):198-204.
- **Song W, Kim J, Bae I K, Jeong S H, Seo Y H, Shin J H, Lee K.**(2011). Chromosome-encoded AmpC and CTX-M extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Proteus mirabilis* from Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **55**(4):1414-1419.
- **Soucy S M, Huang J, Gogarten J P.** (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, **16**(8), 472-482.
- **Spinali S, Van Belkum A, Goering R V, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, Durand G.**(2015). Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: do we need guidance for data interpretation?. *Journal of clinical microbiology*, **53**(3): 760-765.

Références bibliographiques

- **Stock I.** (2003). Natural antibiotic susceptibility of *Proteus* spp., with special reference to *P. mirabilis* and *P. penneri* strains. *Journal of chemotherapy*, **15**(1):12-26.
- **Sud I J, Feingold D S.** (1970). Mechanism of polymyxin B resistance in *Proteus mirabilis*. *Journal of bacteriology*, **104**(1): 289-294.
- **Szabó D, Bonomo R A, Silveira F, Pasculle A W, Baxter C, Linden P K, Paterson, D. L.** (2005). SHV-type extended-spectrum beta-lactamase production is associated with reduced cefepime susceptibility in *Enterobacter cloacae*. *Journal of clinical microbiology*, **43**(10) :5058-5064.
- **Tamang M D, Seol S Y, Oh J Y, Kang H Y, Lee J C, Lee Y C, Kim J.** (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* among clinical isolates of Enterobacteriaceae in a Korean hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **52**(11) : 4159-4162.
- **Tibbetts R, Frye J G, Marschall J, Warren D, Dunn W.**(2008). Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC β -lactamase in *P. mirabilis*. *Journal of clinical microbiology*, **46**(9):3080-3083.
- **Ticac B, Ticac R, Rukavina T, Kesovija PG, Pedisic D, Maljevac B, Starcevic R.** (2010). Microbial colonization of tracheoesophageal voice prostheses (Provox2) following total laryngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol.***267** (10), 1579-86.
- **Tillotson G S.**(1996). Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *Journal of medical microbiology*, **44**(5): 320-324.

Références bibliographiques

- **Tran J H, Jacoby G A.** (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(8) : 5638-5642.
- **Treviño M, Areses P, Peñalver M D, Cortizo S, Pardo F, del Molino M L P, Regueiro B J.**(2012). Susceptibility trends of *Bacteroides fragilis* group and characterisation of carbapenemase-producing strains by automated REP-PCR and MALDI TOF. *Anaerobe*, **18**(1): 37-43.
- **Tsai Y L, Wang M C, Hsueh P R, Liu M C, Hu R M, Wu Y J, Liaw S J.** (2015). Overexpression of an outer membrane protein associated with decreased susceptibility to carbapenems in *Proteus mirabilis*. *Plos one*, **10**(3):1-14.
- **Tsakris A, Ikonomidis A, Poulou A, Spanakis N, Pournaras S, Markou F.**(2007). Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo- β -lactamase. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **60**(1) :136-139.
- **Tumbarello M, Treccarichi E M, Fiori B, Losito A R, D'Inzeo T, Campana L, Cauda R.**(2012). Multidrug-resistant *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and outcomes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **56**(6):3224-31.
- **Uemura S, Yokota S I, Mizuno H, Sakawaki E, Sawamoto K, Maekawa K, Fujii N.** (2010). Acquisition of a transposon encoding extended-spectrum β -lactamase SHV-12 by *Pseudomonas aeruginosa* isolates during the clinical course of a burn patient. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **54**(9): 3956-3959.
- **Umezawa H.** (1958). Kanamycin: its discovery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **76**(2):20-26.
- **Van Bambeke F, Glupczynski Y, Tulkens P M.** (2010). Mechanisms of action. *Infectious Diseases*, **7**: 128-135.

Références bibliographiques

- **Vaishnavi C, Kapoor P, Kochhar R.** (2014). Bacterial biofilms produced in stents retrieved from patients with biliary and pancreatic diseases. *Gastroenterology* **146**(5): 389.
- **Vasudevan A, Mukhopadhyay A, Li J, Yuen E G Y, Tambyah P A.** (2014). A prediction tool for nosocomial multi-drug resistant gram-negative bacilli infections in critically ill patients-prospective observational study. *BMC infectious diseases*, **14**(1) : 615.
- **Verdet C, Gautier V, Chachaty E, Ronco E, Hidri N, Decré D, Arlet G.** (2009). Genetic context of plasmid-carried *bla*_{CMY-2-like} genes in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **53**(9) : 4002-4006.
- **Veeraraghavan B, Jacob J J, Prakash J A J, Pragasam A K, Neeravi A, Narasimman V, Anandan S.** (2019). Extensive drug resistant Salmonella enterica serovar Senftenberg carrying *bla*_{NDM} encoding plasmid p5558 (IncA/C) from India. *Pathogens and global health*.**113**(1) :20-26.
- **Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaeer J, Vermant J, Michiels J.**(2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in microbiology*, **16**(10): 496-506.
- **Visalli M A, Murphy E, Projan S J,Bradford P A.**(2003). AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **47**(2) :665-669.
- **Vranic S M, Zatric N, Rebic V, Aljicevic M, Abdulzaimovic A.** (2017). The Most Frequent Isolates from Outpatients with Urinary Tract Infection. *Materia socio-medica*, **29**(1):17.
- **Wang Y, Zhang S, Yu J, Zhang H, Yuan Z, Sun Y, Song H.**(2010). An outbreak of *Proteus mirabilis* food poisoning associated with eating stewed pork balls in brown sauce, Beijing. *Food Control*, **21**(3): 302-305.

Références bibliographiques

- **Wang J T, Chen P C, Chang S C, Shiao Y R, Wang H Y, Lai J F, Lauderdale T L Y,**(2014). Antimicrobial susceptibilities of *Proteus mirabilis*: a longitudinal nationwide study from the Taiwan surveillance of antimicrobial resistance (TSAR) program. BMC infectious diseases, **14**(1): 486.
- **Wachino J I, Arakawa Y.**(2012). Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. Drug Resistance Updates, **15**(3):133-148.
- **Walker RA, Lawson A J, Lindsay E A, Ward LR, Wright P A, Bolton FJ, Wareing D R A, Corkish J D, Davies R H, Threlfall EJ.**(2000). Decreased susceptibility to ciprofloxacin in outbreak-associated multiresistant *Salmonella typhimurium* DT 104. The Veterinary Record, **147** (14):395-6.
- **Weinstein MJ, Luedemann GM. Oden EM. Wagman G H.**(1963). Gentamicin, a new broad-spectrum antibiotic complex. Antimicrob. Agents Chemother, 161(1): 1–7.
- **Weigel L M, Anderson G J, Tenover F C.** (2002). DNA gyrase and topoisomerase IV mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Proteus mirabilis*. Antimicrobial agents and chemotherapy, **46**(8): 2582-2587.
- **Wenner J J, Rettger L F.**(1919). A systematic study of the Proteus group of bacteria. Journal of bacteriology, **4**(4) : 331.
- **WHO .**Report.(1984). Report of the WHO Consultation on Veterinary Public Health Aspects of Prevention and Control of Campylobacter Infections. Moscow.
- **WHO.** The world health report. (2007). A safer future: global public health security in the 21st century.: World Health Organization (WHO). 2007.
- **Whary M T, Baumgarth N, Fox J G, Barthold S W.** (2015). Biology and diseases of mice. In Laboratory animal medicine,43(149):1-17.

Références bibliographiques

- **Wilson C, Thakore A, Isenberg D, Ebringer A.** (1997). Correlation between anti-*Proteus* antibodies and isolation rates of *P. mirabilis* in rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*, **16**(5), 187-189.
- **Williams EW, Hawkey PM, Penner JL, Senior BW, Barton LJ J.**(1983). Serious nosocomial infection caused by *Morganella morganii* and *Proteus mirabilis* in a cardiac surgery unit. *Clin Microbiol*,**18**(1):5-9.
- **Wong M H Y, Wan H Y, Chen S.** (2013).Characterization of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolated from chicken carcasses. *Foodborne pathogens and disease*, **10**(2): 177-181.
- **Woodford N, Ellington M J, Coelho J M, Turton J F, Ward M E, Brown S, Livermore D M.**(2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International journal of antimicrobial agents*, **27**(4) : 351-353.
- **Xiao Y, Hu Y.** (2012). The major aminoglycoside-modifying enzyme *AAC (3)-II* found in *Escherichia coli* determines a significant disparity in its resistance to gentamicin and amikacin in China. *Microbial Drug Resistance*, **18**(1):42-46.
- **Xiao L, Wang X, Kong N, Cao M, Zhang L, Wei Q, Liu W.** (2019). Polymorphisms of Gene Cassette Promoters of the Class 1 Integron in Clinical *Proteus* Isolates. *Frontiers in microbiology*, **10**(790) :1-12
- **Yaici L, Haenni M, Métayer V, Saras E, Zekar F M , Ayad M, Madec J Y.**(2017). Spread of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the community through ready-to-eat sandwiches in Algeria. *International journal of food microbiology*, 245:66-72.
- **Yanat B, Machuca J, Yahia R D, Touati A, Pascual Á, Rodríguez-Martínez J M** (2016). First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical

Références bibliographiques

Escherichia coli isolate in Algeria. International journal of antimicrobial agents, **48**(6), 760.

- **Yanat B, Rodríguez-Martínez J M, Touati A.** (2017). Plasmid-mediated quinolone resistance in Enterobacteriaceae: a systematic review with a focus on Mediterranean countries. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, **36**(3) :421-435.
- **Yamane K, Wachino J I, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Arakawa Y.** (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrobial agents and chemotherapy, **51**(9):3354-3360.
- **Yen MR, Peabody CR, Partovi SM, Zhai Y, Tseng YH, Saier MH.**(2002). Review Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. Biochim Biophys Acta.,**1562** (1-2):6-31.
- **Yu M, Zhao G, Stalsby Lundborg C, Zhu Y, Zhao Q, Xu B.**(2014). Knowledge, attitudes, and practices of parents in rural China on the use of antibiotics in children: a cross-sectional study. BMC infectious diseases.**14**(1):112.
- **Zhang X X, Zhang T, Fang H H.** (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. Applied microbiology and biotechnology, **82**(3), 397-414.
- **Zilberstein B, Quintanilha A G, Santos M A, Pajecski D, Moura E G, Alves P R A., Gama-Rodrigues J.**(2007). Digestive tract microbiota in healthy volunteers. Clinics,**62**(1): 47-54.

Annexes

Annexes

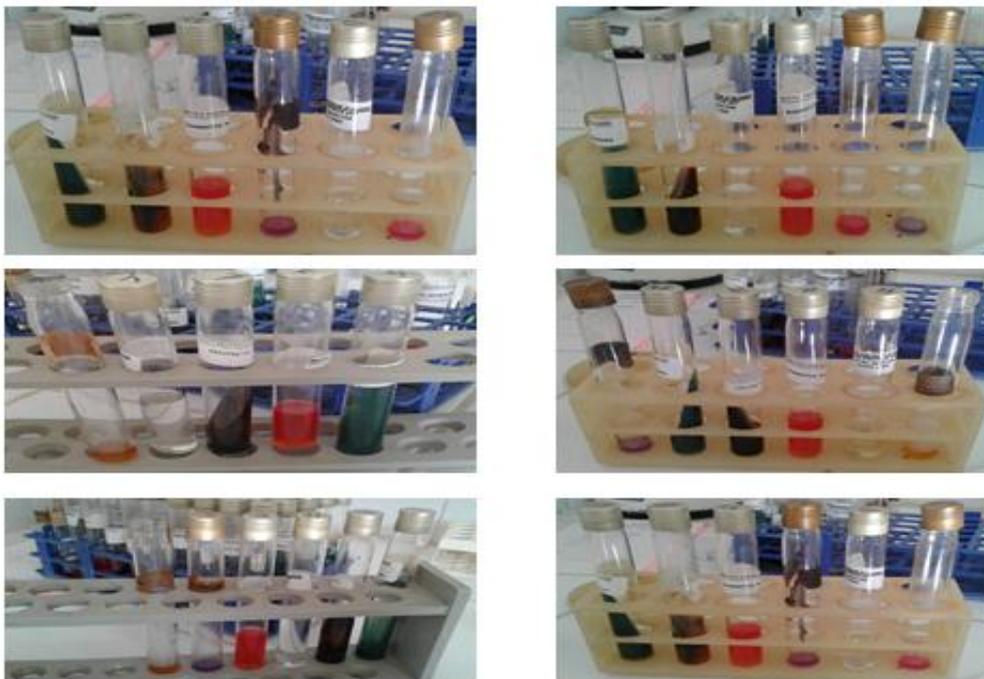
Annexe 1. Identification des souches de *P.mirabilis*

1. Identification conventionnelle de *P.mirabilis* (tests biochimiques)



Identification de *P.mirabilis* par l'Ap20E système.

Figure1.



Identification de *P.mirabilis* par la galerie classique.

Figure2.

Annexes

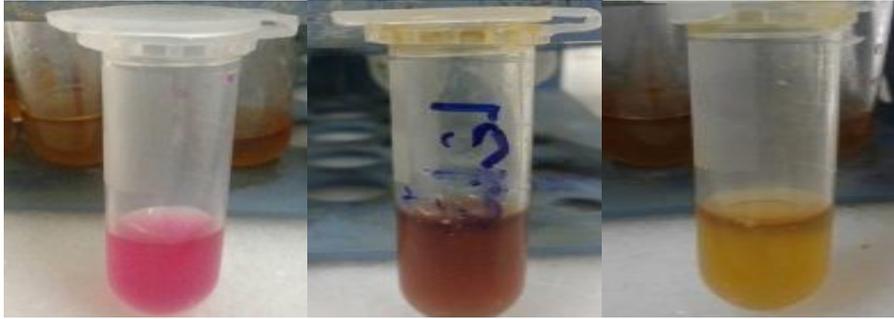


Figure3. Testeuréase positive en quelques minutes de *P.mirabilis*

2. Identification automatique par la technologie haut débit « MALDI-TOF »:



Figure4. Identification des souches par la spectrométrie de masse MALDI-TOF

Annexes

Annexe 2. Les différentes amorces utilisées

Tableau 1. Amorces codant la classe A et classe C utilisées pour les PCR standard et séquençage.

Gène	Séquence 5—3	référence
ampC1	ATG ATG AAA AAA TCG TTA TGC	(Dominique Decré <i>et al.</i> ,2002)
ampC2	TTG CAG CTT TTC AAG AAT GCG C	
AmpC/I-F	GATGGCAARGCCCACTAYTTC	(D'Andrea <i>et al.</i> ,2006)
AmpC/I-R	TTGGCCAGCATGACGATG	
CMY/F	GGGCCCCGGACACCYTTTTGC	(D'Andrea <i>et al.</i> ,2006)
CMY/R	TAAGTGTAGATGACARCAGG	
TEM-F	CTTATTCCCTTTTTTGC	(Siebor and Neuwirth, 2011)
TEM-R	GGTCTGACAGTTACCAATGC	
SHV-F	GGGTATTCTTATTTGTCGC	(Siebor and Neuwirth, 2011)
SHV-R	GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG	
CTX-M-F	ATGTGCAGYACCAGTAA	(Siebor and Neuwirth, 2011)
CTX-M-R	ACCGCRATATCRTTGGT	

Tableau 2. Amorces codant la classe D utilisées pour les PCRs standard et séquençage

Gène	Sequence 5-3	référence
OXA-48-F	5-TTGGTGGCATCGATTATCGG3'	(Mathlouthi <i>et al.</i> ,2016)
OXA-48-R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC3'	
OXA-51-like	5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG3'	(Woodford <i>et al.</i> ,2006)
OXA-51-like	5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC3'	
OXA-58-like	5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA3'	(Woodford <i>et al.</i> ,2006)
OXA-58-like	5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT3'	
OXA-23-like	5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA3'	(Woodford <i>et al.</i> ,2006)
OXA-23-like	5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT3'	
OXA-24-like	5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA3'	(Woodford <i>et al.</i> ,2006)
OXA-24-like	5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT3'	

Annexes

Tableau 3. Amorces codant la résistance aux aminosides pour les PCRs standard et séquençage.

Gène	Sequence 5—3	référence
<i>aac(6')-Ib-F</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	(Kim <i>et al.</i> ,2009)
<i>aac(6')-Ib-R</i>	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	
<i>aac(3)-I-F</i>	AGCCCGCATGGATTTGA	(Kim <i>et al.</i> ,2008)
<i>aac(3)-I-R</i>	GGCATAACGGGAAGAAGT	
<i>aac(3)-II/VI-F</i>	GCCCATCCCGACGCATCSATGG	(Kim <i>et al.</i> ,2008)
<i>aac(3)-II/VI-R</i>	CGCCACCGCTTCGGCATARTGSA	
<i>aac(6')-II-F</i>	AGCCCGCATGGATTTGA	(Kim <i>et al.</i> ,2008)
<i>aac(6')-II-R</i>	GGCATAACGGGAAGAAGT	(Kim <i>et al.</i> ,2008)
<i>rmtA-F</i>	CTAGCGTCCATCCTTTCTC	(Kim <i>et al.</i> ,2008)
<i>rmtA-R</i>	TTTGCTTCCATGCCCTTGCC	
<i>rmtB-F</i>	CCCAAACAGACCGTAGAGGC	
<i>rmtB-R</i>	CTCAAACCTCGGCGGGCAAGC	(Kim <i>et al.</i> ,2008)
<i>aac(6')-II-F</i>	AGCCCGCATGGATTTGA	(Kim <i>et al.</i> ,2008)
<i>aac(6')-II-R</i>	GGCATAACGGGAAGAAGT	
<i>armA-F</i>	AGGTTGTTTCCATTTCTGAG	(Kim <i>et al.</i> ,2008)
<i>armA-R</i>	TCTCTTCCATTCCCTTCTCC	
<i>aph(3')-VI-F</i>	GACGACGACAAGGATATGGAATTGCCCAATATTATT	
<i>aph(3')-VI-R</i>	GGAACAAGACCCGTTCAATTCAATTCATCAAGTTT	

Annexes

Tableau 4. Amorces codant la résistance aux quinolones utilisées pour les PCRs standard et séquençage.

Gène	Sequence5—3	référence
<i>QnrA-F</i> <i>QnrA-R</i>	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	(Cattoir <i>et al.</i> , 2007)
<i>QnrB-F</i> <i>QnrB-R</i>	GGMATHGAAATTCGCCACT TTTGCYGYTCGCCAGTCGAAc	(Cattoir <i>et al.</i> , 2007)
<i>QnrS-F</i> <i>QnrS-R</i>	GCAAGTTCATTGAACAGGG TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	(Cattoir <i>et al.</i> , 2007)
<i>gyrA-F</i> <i>gyrA-R</i>	CCAGATGT(A/C/T)CG(A/C/T)GATGG ACGAAATCAAC(G/C)GT(C/T)TCTTTTT	(Weigel <i>et al.</i> ,2002)
<i>gyrA-F1</i> <i>gyrA-R1</i>	TGCCAGAGAAATCACACCAG3' TTCCAAATCCGCCAGCAG 3'	(Mazzariol <i>et al.</i> ,2012)
<i>parC-F</i> <i>parC-R</i>	TTGCC(A/T)TTTAT(C/T)GG(G/T)GATGG CGCGC(A/T)GGCAGCATTTT(A/T)GG	(Weigel <i>et al.</i> ,2002)
<i>gyrB-F</i> <i>gyrB-R</i>	TGA(C/T)GATGC(G/C/A)CG(T/C)GAAGG CGTACG(A/G)ATGTG(C/A)GA(G/A)CC	(Weigel <i>et al.</i> ,2002)

Annexes

Tableau5. Amorces de Carattoli pour détecter les groupes d'incompatibilité plasmidique

Name	DNA sequence Target		Amplicon size	site (bp)
HI2 FW	5'-tttctcctgagtcacctgttaacac-3'	iterons	644	
HI2 RV	5'-ggctcactaccgttgatcct-3'			
I1 FW	5'-cgaaagccggacggcagaa-3'	RNAi		139
I1 RV	5'-tcgtcgttccgccaagttcgt-3'			
X FW	5'-aaccttagaggctatttaagttgctgat-3'	ori		376
X RV	5'-tgagagtcaattttatctcatgttttagc-3'			
L/M FW	5'-ggatgaaaactatcagcatctgaag-3'	repA,B,C		785
L/M RV	5'-ctgcaggggcgattctttagg-3'			
N FW	5'-gtctaacgagcttaccgaag-3'	repA	559	
N RV	5'-gtttcaactctgccaagttc-3'			
FIA FW	5'-ccatgctggttctagagaaggtg-3'	iterons		462
FIA RV	5'-gtatccttactggcttccgcag-3'			
FIB FW	5'-ggagttctgacacacgattttctg-3'	repA		702
FIB RV	5'-ctcccgtcgcttcagggcatt-3'			
W FW	5'-cctaagaacaacaaagcccccg-3'	repA		242
W RV	5'-ggtgcgcggcatagaaccgt-3'			
Y FW	5'-aattcaacaacactgtgcagcctg-3'	repA	765	
Y RV	5'-gcgagaatggacgattacaaaacttt-3'			
P FW	5'-ctatggccctgcaaacgcgccagaaa-3'	iterons	534P	
PRV	5'-tcacgcgccagggcgcagcc-3'			
FIC FW	5'-gtgaactggcagatgaggaagg-3'	repA2		262
FIC RV	5'-ttctcctcgtcgccaaactagat-3'			
A/C FW	5'-gagaaccaaaagacaaagacctgga-3'	repA		465
A/C RV	5'-acgacaaacctgaattgcctcctt-3'			
T FW	5'-ttggcctgtttgtgcctaaaccat-3'	repA		750
T RV	5'-cgttgattacacttagctttggac-3'			
FII _S FW	5'-ctgtcgtgaagctgatggc-3'	repA		270
FII _S RV	5'-ctctgccacaaacttcagc-3'			

Annexes

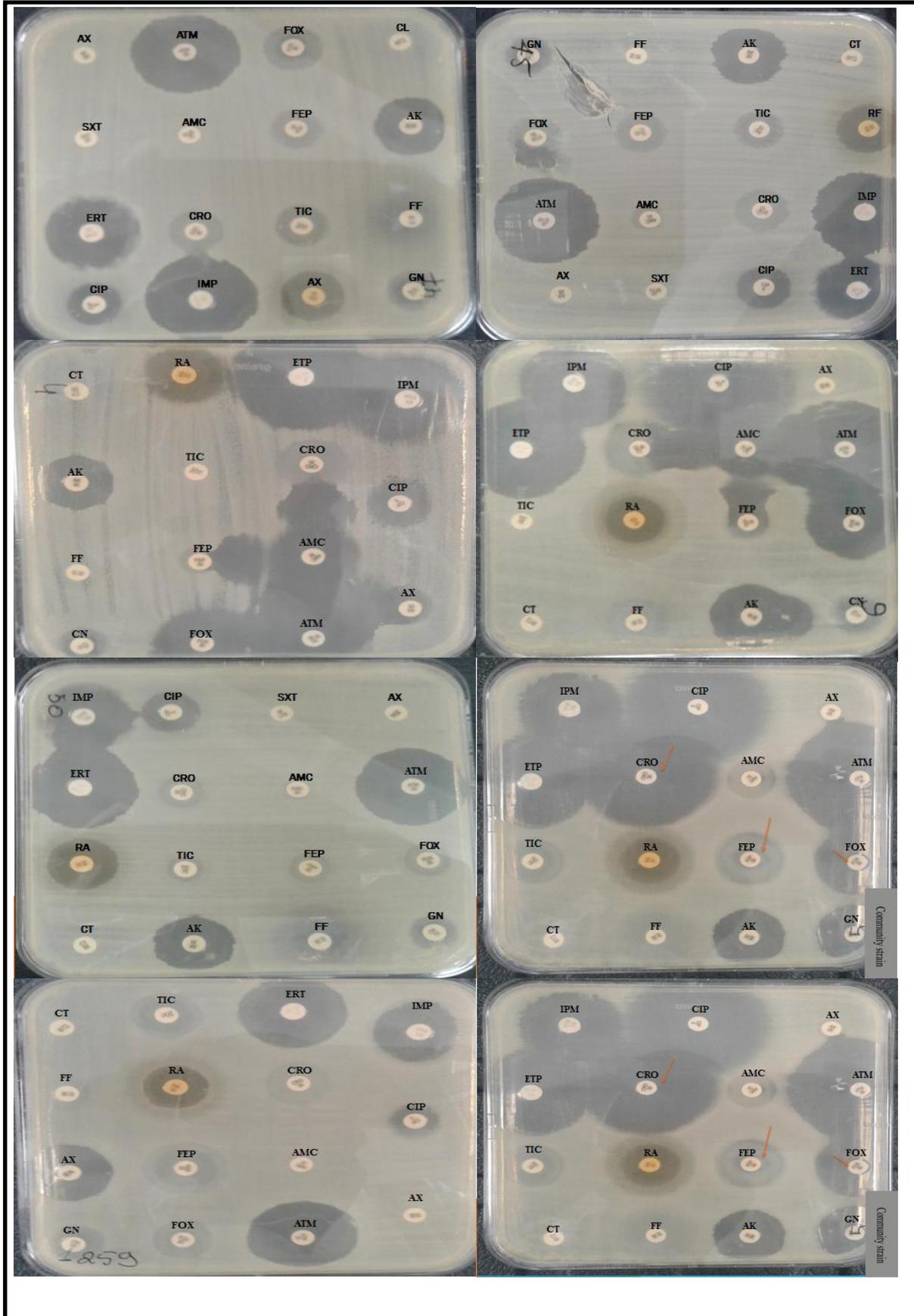
F _{repB} FW	5'-tgatcgtttaaggaatttg-3'	RNAi/repA	270
F _{repB} RV	5'-gaagatcagtcacaccatcc-3'		
K/B FW	5'-gcggtccggaagccagaaaac-3'	RNAi	160
K RV	5'-tctttcacgagcccgccaaa-3'		
B/O RV	5'-tctgcgttccgccaagttcga-3'	RNAi	159

Tableau 6. Amorces de Carattoli *et al.* pour détecter les groupes d'incompatibilité plasmidique

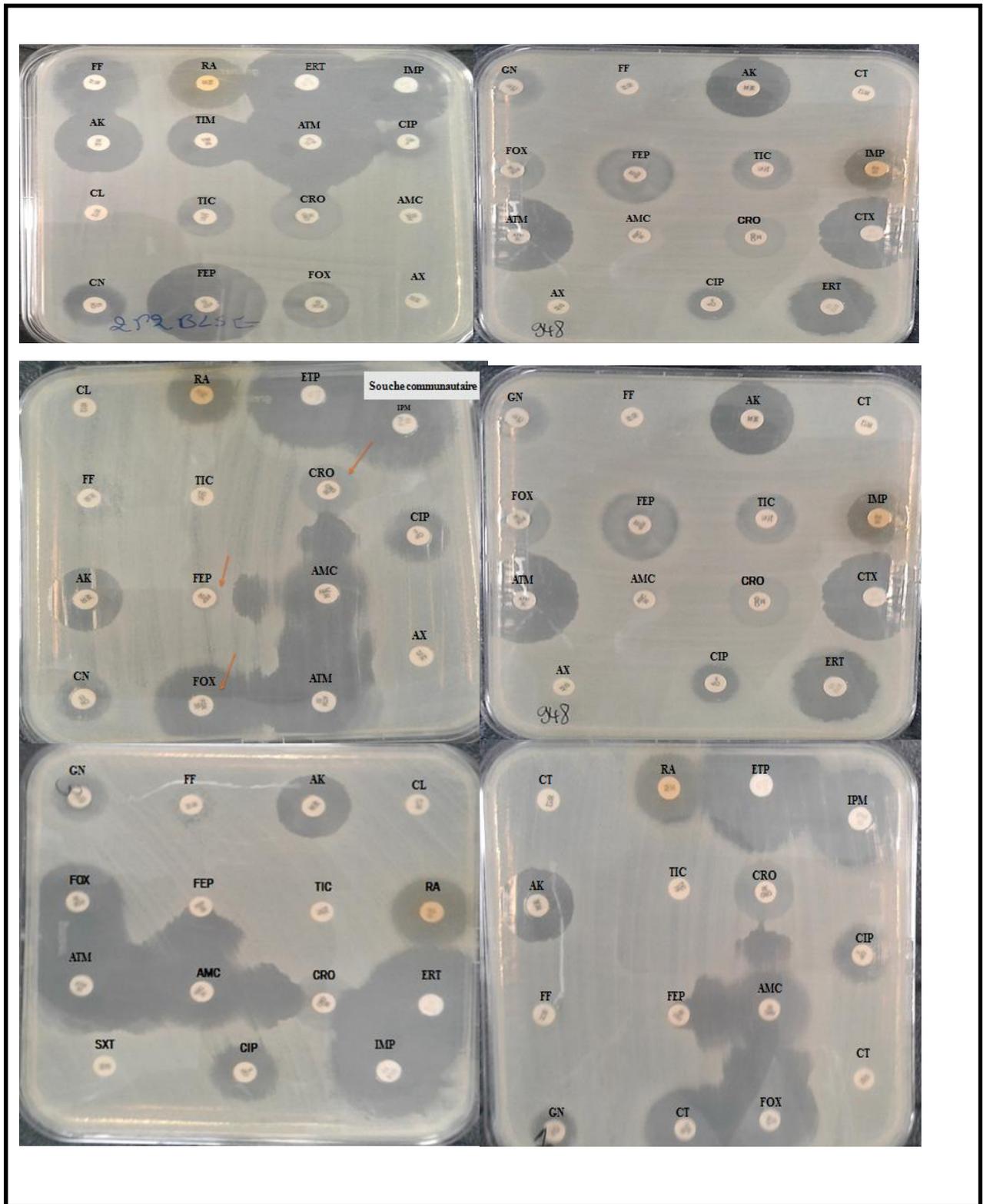
Amorce	Séquence (5'-3')	Référence	programme de PCR
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	(Bosi <i>et al.</i> ,1999)	94°C 4min, [94°C 40s, 40°C 1 min], 72°C 5 min] 40 times, 72°C 10min
ERIC1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	(Gillings <i>et al.</i> ,1997)	94°C 4 min, [94°C 40s, 40°C 1 min] 72°C 5 min] 40 times, 72°C 10 min
ERIC2*	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	(Gillings <i>et al.</i> ,1997)	94°C 4 min, [94°C 40s, 40°C 1 min], 72°C 5 min] 40 times, 72°C 10min

Annexes

Annexe3: l'analyse phénotypiques des souches de *P.mirabilis* multirésistantes



Annexes



Annexes

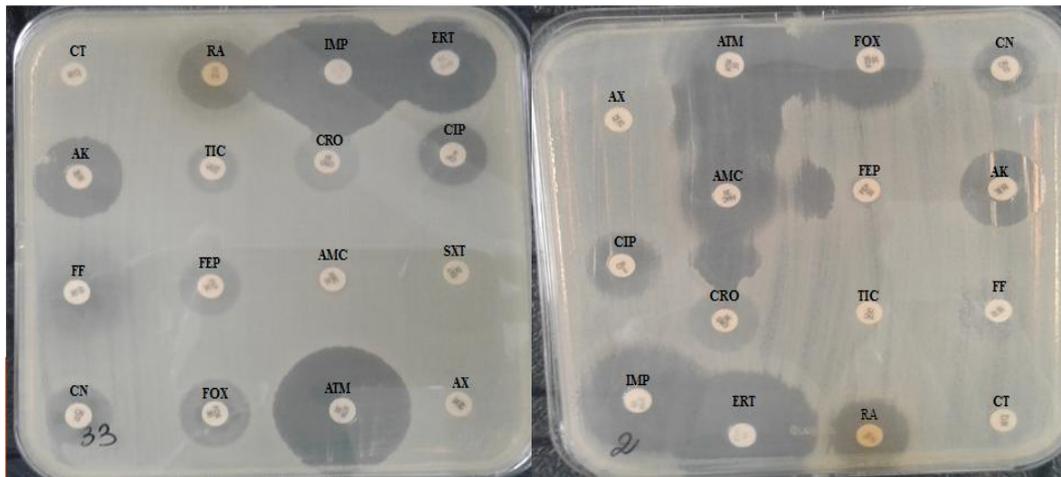
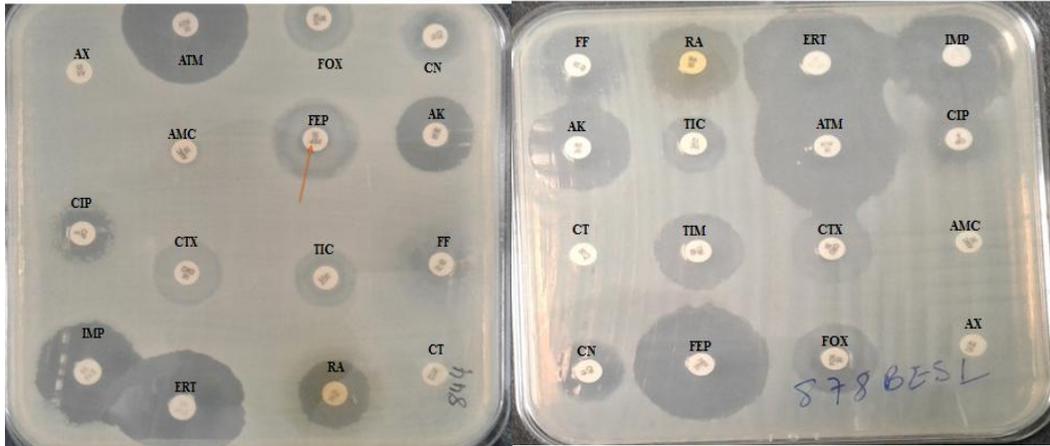


Figure 1.Antibiogramme des souches de *P.mirabilis* multirésistantes selon CA-SFM /EUCAST.



Figure 2.L'Antibiogramme des souches de *P.mirabilis* productrices d'oxacillinase.

Annexes



Figure 3. Mésure de la CMI par E-test des souches de *P. mirabilis* productrices de β -lactamases (BLSE).

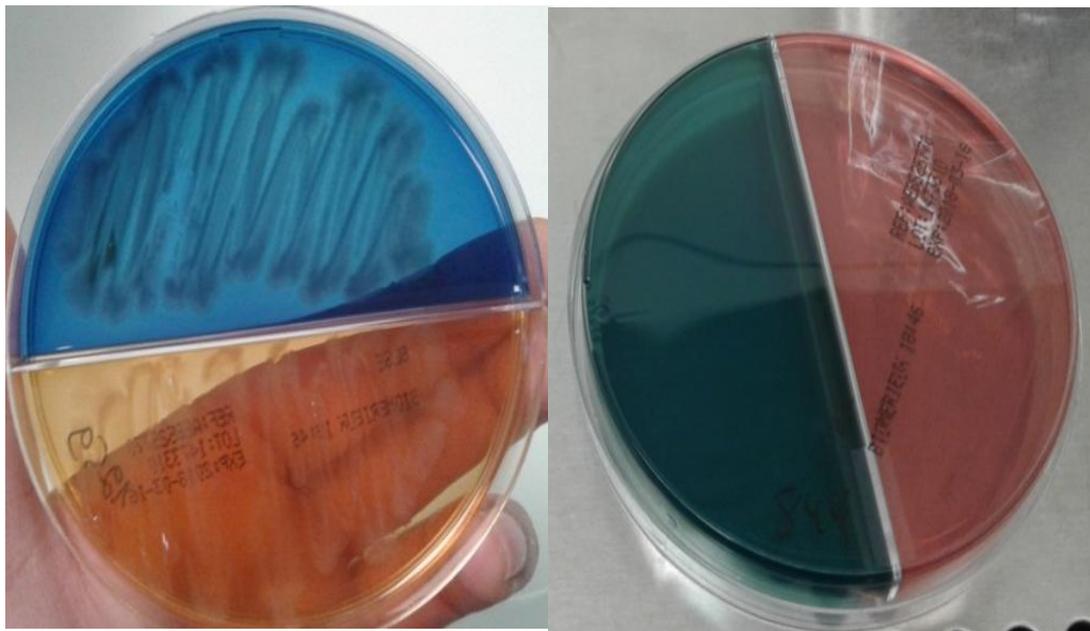


Figure 4. *P. mirabilis* sécrétrice de béta-lactamase sur la gélosechromID® ESBL.

Annexes

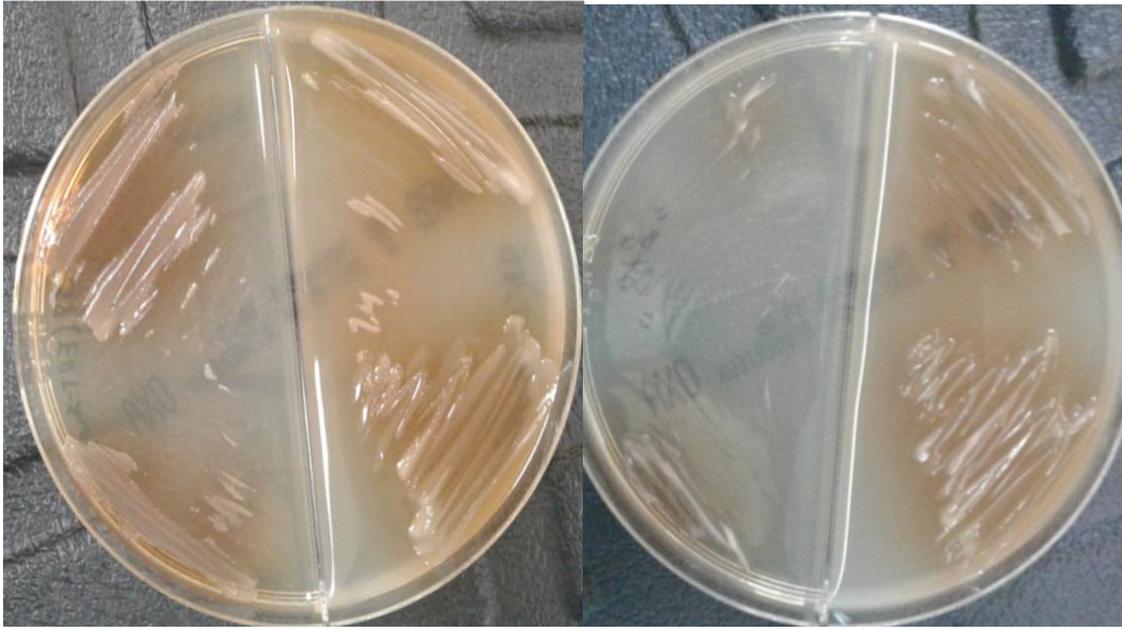


Figure 5. *P. mirabilis* sécrétrice d'oxacillinase sur la gélose chromID® CARBA.