

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Hassiba Benbouali de Chlef
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

Filière : Biologie.

Spécialité : Biologie Moléculaire et Génomique.

Par

OUMEIMA MERAH EPSE FERGANI

Thème :

Analyse moléculaire et génomique d'isolats cliniques de quelques bactéries pathogènes locales.

Soutenue le 15/05/2023, devant le jury composé de :

Mohammed El Amine BEKARA	MCA	UHBC	Président
Mohammed SEBAIHIA	Professeur	UHBC	Rapporteur
Benali SETTI	Professeur	UHBC	Examineur
Fatima NEHAL	MCA	UHBC	Examineur
Farida NATECHE	Professeur	USTHB	Examineur
Aicha Debib	MCA	CU Tipaza	Examineur
Meryem BERRAZEG	MCA	Univ Oran 1	Invité

Remerciements

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse, Pr **SEBAIHIA Mohammed**, pour toute son aide, sa patience et sa compétence.

Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie.

Je remercie également Dr **AMRAOUI Radia** qui m'a accueilli dans son laboratoire de bactériologie à l'hôpital Rabah Bitat de Boumerdès et mis à ma disposition son savoir, son expérience et du matériel pour avancer.

A Pr **ROLAIN Jean Marc** et toute son équipe, j'adresse un respect et un grand remerciement pour la chance qui m'a attribué en acceptant ma présence dans son laboratoire ainsi que pour la formation fournie en Biologie Moléculaire et Bioinformatique.

A mon jury de soutenance qui mon honoré avec la présence, merci de l'occasion et la chance que vous m'avez apporté en partageant avec moi votre savoir et vos connaissances. A Dr **BEKARA Mohammed El Amine** qui a accepté de présider ce jury, à Pr **NATECHE Farida**, Dr **DEBIB Aicha**, Pr **SETTI Benali** et Dr **NEHAL Fatima**, je vous remercie avec reconnaissance du plus que vous avez apporté à ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement Dr **BERRAZEG Meryem** pour son aide.

Et ne jamais oublier de remercier, Dr **Merah Soumia** pour ses orientations et son soutien qui été toujours pour mon intérêt.

Mes derniers et plus forts remerciements vont à Mon Mari **Moussa** qui a tout fait pour m'aider, qui m'a soutenu et surtout supporté dans tout ce que j'ai entrepris.

Dédicaces

Je dédie ce travail particulièrement à mes parents Nacéra et Omar,
et à tous les membres de ma famille ;

Mon mari et Mes petits-enfants, Ishak et Mohammed

Mon frère et sa femme, Islam et Asma

Mes sœurs, Samia, Asma, Soumia, Amina, Hala, Hadil, Batoule.

Mes neveux, Yasser, Haitham, Firas, Lina, Maram, Meriem, Khadidja, Noussaiba, Roudayna,
Chaima

Ma belle-famille, spécialement à mes beaux-parents Tayeb et Nacéra,

Mes belles sœurs, Lila, Hanane, Ryma, Souria

Mes beaux-frères, Rabah, Islam, Dhayae.

Résumé

Cette étude avait comme objectif l'étude de la prévalence et les profils de résistance aux antibiotiques, ainsi que la caractérisation des déterminants génétiques de résistance chez des isolats cliniques d'*Enterobacteriaceae*.

Entre 2012 et 2017, un total de 84 isolats d'entérobactéries ont été isolés à partir de différents échantillons cliniques prélevés de patients à l'hôpital Rabah Bitat de Boumerdès. Les isolats ont été identifiés par des tests microbiologiques et biochimiques et confirmés par MALDI-TOF-MS, dont 49 (58.3%) étaient *Escherichia coli*, 30 (35.7%) *Klebsiella pneumoniae*, 3 (3.6%) *Enterobacter cloacae*, 1 (1.2%) *Enterobacter aerogenes* et 1 (1.2 %) *Klebsiella oxytoca*. La majorité des isolats (78.5%) provenaient d'échantillons d'urine.

Les antibiogrammes ont montré que les taux de résistance variaient entre 10% et 100%, les plus élevés (100%) étaient enregistrés contre amoxicilline et amoxicilline+acide clavulanique chez *E. coli* et *Enterobacter* spp., et les plus bas (entre 0% et 26%) pour ertapénèm et pipéracilline+tazobactam chez *E. coli* et *Klebsiella* spp.

Aucun des isolats n'était résistant à l'imipénème, ce qui fait des carbapénèmes le médicament de choix pour le traitement de ces agents pathogènes. La colistine a également montré une bonne efficacité, notamment contre les *Enterobacter* spp. et les *E. coli*, avec des taux de résistance de 0 % et 2 %, respectivement.

Le taux global de multirésistance était relativement élevé (75%) parmi nos isolats, beaucoup plus élevé parmi *K. pneumoniae* (86.6%) que *E. coli* (69.4%).

La fréquence globale des producteurs de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) était de 57% (n=48), étant plus élevée parmi les *Enterobacter* spp. (100%) et les *K. pneumoniae* (80%) que parmi les *E. coli* (40.8%).

L'analyse des déterminants génétiques de résistances a montré la présence des BLSE de types CTX-M (66.7%) et SHV (33.3%), parmi lesquelles le variant CTX-M-15 était le plus fréquent (41.6%, n=15). Nous rapportons également la première détection en Algérie des variants BLSE CTX-M27, CTX-M55 et SHV-16.

Dans l'ensemble, nos résultats ont démontré que la multirésistance aux antibiotiques et la production de BLSE parmi les entérobactéries pathogènes dans notre étude étaient relativement élevées, soulignant la nécessité d'une surveillance continue de ces agents pathogènes, ainsi que la compréhension de leurs mécanismes moléculaires de résistance et de dissémination, afin d'aider à mettre en place des mesures de prévention appropriées.

Mots clés : *Enterobacteriaceae*, résistance, antibiotiques, β -lactamases, BLSE, TEM, SHV, CTX

ملخص

هدفت هذه الدراسة إلى دراسة مدى انتشار وأنماط مقاومة المضادات الحيوية، وكذلك توصيف المحددات الجينية للمقاومة في العزلات السريرية من الانتيروبكتيريا.

تم جمع عينات سريرية مختلفة من المرضى بين الفترة من 2012 إلى 2017 في مستشفى رابح بيطاط بيومرداس، تم التعرف على العزلات عن طريق الاختبارات الميكروبيولوجية والكيميائية الحيوية وأكدت بواسطة تكنولوجيا المالدي توف ان العزلات تنتمي الى ايشريشيا كولي (49 بنسبة 58.3%)، كلابسيلا بنومونيا (30 بنسبة 35.7%)، انتيروباكتار كلواكي (3 بنسبة 3.6%) و كلابسيلا اوكسيتوكا و انتيروباكتار ايروجانز (1 بنسبة 1.2%). غالبية العزلات (78.5%) كانت من عينات البول.

أظهرت المضادات الحيوية أن معدلات المقاومة تراوحت بين 10% و 100%، وسجلت أعلى معدلات المقاومة (100%) ضد الأموكسيسيلين والأموكسيسيلين + حمض الكلافولانيك في ايشريشيا كولي وانتيروباكتار، وأقلها (0% و 26%) للإرتابينيم والبييراسيلين + تازوباكتام عند ايشريشيا كولي و كلابسيلا بنومونيا.

لم تكن أي من العزلات مقاومة للإيميبينيم، مما يجعل الكاربابينيمات الدواء المفضل لعلاج هذه العوامل المرضية. أظهر كوليستين أيضًا فعالية جيدة، خاصةً ضد ايشريشيا كولي وانتيروباكتار بمعدلات مقاومة 0% و 2% على التوالي.

كما اننا سجلنا نسبة مرتفعة من المقاومة لأدوية متعددة قدرت ب 75% بين جميع العزلات. ولكنها كانت اعلى نسبة عند صنف كلابسيلا بنومونيا بنسبة 86.6% مقارنة بنسبة 69.4% عند ايشريشيا كولي.

نسبة العزلات المنتجة للبيتاكتماز ممتدة الطيف قدرت ب 57% (48 عزلة)، وكانت مقسمة بنسبة 100% عند انتيروباكتار، 80% عند كلابسيلا بنومونيا و 40.8% عند ايشريشيا كولي.

بالنسبة لتحليل المحددات الجينية للمقاومة، فقد تبين وجود البيتاكتماز ممتدة الطيف CTX-M بنسبة 66.7% و SHV بنسبة 33.3% من بينها المتغير CTX-M-15 كان الاكثر شيوعا (41.6%). لقد أبلغنا أيضًا عن أول تقرير في الجزائر لمتغيرات البيتاكتماز ممتدة الطيف: CTX-M27، CTX-M55 و SHV-16.

بشكل عام، أظهرت نتائجنا أن مقاومة الأدوية المتعددة للمضادات الحيوية وإنتاج البيتاكتماز ممتدة الطيف عند البكتيريا المعوية المرضية في دراستنا كانت مرتفعة نسبيًا، مما يبرز الحاجة إلى المراقبة المستمرة لهته البكتيريا المسببة للأمراض، وكذلك فهم آلياتها الجزيئية للمقاومة والانتشار، من أجل المساعدة في وضع التدابير الوقائية المناسبة.

الكلمات المفتاحية: الانتيروبكتيريا - بيتاكتماز ممتدة الطيف - مقاومة الأدوية - CTX-M - SHV - TEM

Abstract

This study aimed to investigate the prevalence and patterns of antibiotic resistance, as well as the characterization of the resistance genetic determinants, in clinical specimens of *Enterobacteriaceae*.

Between 2012 and 2017, A total of 84 *Enterobacteriaceae* isolates were recovered from different clinical specimens collected from patients at the hospital of Rabah Bitat of Boumerdès. The isolates were identified by microbiological and biochemical tests and confirmed by MALDI-TOF-MS, of which 49 (58.3%) were *Escherichia coli*, 30 (35.7%) *Klebsiella pneumoniae*, 3 (3.6%) *Enterobacter cloacae*, 1 (1.2%) *Enterobacter aerogenes* and 1 (1.2%) *Klebsiella oxytoca*. Most isolates (78.5%) were from urine specimens.

The phenotypic antimicrobial susceptibility tests showed that resistance rates varied between 10% to 100%, the highest (100%) were recorded for amoxicillin and amoxicillin+clavulanic acid in *E. coli* and *Enterobacter* spp., and the lowest (between 0% and 26%) for ertapenem and piperacillin+tazobactam in *E. coli* and *Klebsiella* spp.

None of the isolates were found to be resistant to imipenem, keeping carbapenems the drug of choice for the treatment of these pathogens. Colistin also showed good efficacy, particularly against *Enterobacter* spp. and *E. coli*, with 0% and 2% resistance rates, respectively.

The overall rate of multidrug resistance was relatively high (75%) among our isolates, much higher among *K. pneumoniae* (86.6%) than *E. coli* (69.4%).

The overall frequency of Extended-Spectrum β -lactamases (ESBL) producers was 57% (n=48), being higher among *Enterobacter* spp. (100%) and *K. pneumoniae* isolates (80%) than *E. coli* (40.8%).

The genetic analysis showed the presence of the ESBL types CTX-M (66.7%) and SHV (33.3%), among which the variant CTX-M-15 was the most frequent (41.6%, n=15). We also report the first detection in Algeria of the ESBL variants CTX-M27, CTX-M55 and SHV-16.

Overall, our results demonstrated that multi-drug resistance and the production of ESBL among the pathogenic *Enterobacteriaceae* in our study setting were relatively high, highlighting the need for continued monitoring of these pathogens and understanding their molecular mechanisms of resistance and dissemination, in order to help implementing appropriate prevention strategies.

Key words: *Enterobacteriaceae*, antibiotics, resistance, β -lactamases, ESBL, TEM, SHV, CTX.

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....1

Synthèse bibliographique

1. Les antibiotiques.....	6
1.1. Les β -lactamines.....	7
1.1.1 Les principaux groupes de β -lactamines.....	7
1.2. Les aminoglycosides.....	10
1.3. Les quinolones.....	12
1.4. Les polymexines.....	14
1.5. Autres antibiotiques.....	16
1.5.1 Fosfomycine.....	16
1.5.2 Nitrofurantoine.....	17
1.5.3 Sulfamides.....	17
1.5.4 Chloramphénicol.....	19
1.5.5 Tétracyclines.....	19
2. La résistance aux antibiotiques.....	20
2.1.1 Définition de la résistance aux antibiotiques.....	21
2.1.2. Types de résistance aux antibiotiques.....	21
2.1.2.1 La résistance intrinsèque.....	21
2.1.2.2 La résistance acquise.....	21
2.1.3. Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	21
2.1.3.1 Inactivation de l'antibiotique.....	22
2.1.3.2 Modification de la cible.....	23
2.1.3.3 Les pompes à efflux.....	23
2.1.3.4 Prévention de l'entrée de l'antibiotique.....	23
3. La résistance aux antibiotiques chez les <i>Enterobacteriaceae</i>.....	24
3.1 Généralités sur les <i>Enterobacteriaceae</i>	24
3.2. Résistance des <i>Enterobacteriaceae</i> aux β -lactamines.....	26
3.2.1 Les β -lactamases.....	26
3.2.1.1 Les BLSE.....	28
Les BLSE de type TEM.....	28
Les BLSE de type SHV.....	30
Les BLSE de type CTX-M.....	31
3.2.1.2 Les céphalosporinases de classe C.....	33
3.2.1.3 Les carbapénémases.....	33
3.3 La résistance des <i>Enterobacteriaceae</i> aux aminoglycosides.....	34
3.4 La résistance des <i>Enterobacteriaceae</i> aux fluoroquinolones.....	37
3.5 La résistance des <i>Enterobacteriaceae</i> aux polymyxines.....	39
3.6 La résistance des <i>Enterobacteriaceae</i> aux sulfamides et la triméthoprim.....	40
3.7 La résistance des <i>Enterobacteriaceae</i> aux chloramphénicoles.....	41
3.8 La résistance des <i>Enterobacteriaceae</i> aux tétracyclines.....	41

4. Les éléments génétiques mobiles et leurs rôles dans la dissémination des gènes de résistance chez les <i>Entérobacteraiceae</i>	43
4.1 Le transfert horizontal de gènes et les éléments génétiques mobiles.....	43
4.1.1 Les plasmides.....	43
4.1.2 Les bactériophages.....	44
4.1.3 Les éléments transposables.....	45
Les IS.....	45
Les transposons.....	45
4.1.4 Les intégrons.....	47
4.1.5 Les îlots génomiques.....	48
4.2 Les éléments génétiques mobiles associés aux résistances aux antibiotiques chez les <i>Enterobacteriaceae</i>	52
4.2.1 La résistance aux β -lactamines.....	52
4.2.2 La résistance aux fluoroquinolones.....	53
4.2.3 La résistance aux aminoglycosides.....	54
4.2.4 La résistance aux sulfamides.....	54
4.2.5 La résistance aux chloramphenicoles.....	54
4.2.6 La résistance à la colistine.....	54
4.2.7 La résistance aux tétracyclines.....	55
4.2.8 Les multi-résistances.....	55
5. Méthodes de détection des résistances aux antibiotiques	56
5.1 Méthodes phénotypiques.....	56
5.1.1 Méthode de diffusion sur disque.....	56
5.1.2 Méthode de détermination de la CMI.....	57
5.1.2.1 La méthode de dilution en milieu liquide.....	57
5.1.2.2 La méthode de dilution en milieu solide.....	57
5.1.2.3 Le E-test.....	57
5.1.2.4 Méthodes phénotypiques de détection de la production de BLSE ..	58
5.2 Méthodes moléculaires.....	59
5.2.1 Détection de la résistance aux antibiotiques par PCR.....	59
5.2.2 Détection de la résistance aux antibiotiques par les puces à ADN.....	60
5.2.3 Détection de la résistance aux antibiotiques par séquençage.....	60
5.3 Détection de la résistance aux antibiotiques par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	61
Matériel et méthodes	
1. Echantillonnage	64
2. Isolement et identification des bactéries par culture et tests biochimiques	64
2.1 Test de fermentation des sucres.....	64
2.2 Test de l'utilisation du citrate.....	64
2.4 Test du type fermentaire.....	65
3. Confirmation de l'identification des bactéries par MALDI-TOF-MS	66
4. Etude de la résistance aux antibiotiques	68
4.1 Tests d'antibiogrammes par la méthode de diffusion de disque.....	69
4.1.1 Recherche de la production de BLSE par test de synergie.....	70
4.1.2 Recherche de la production des céphalosporinases par test d'inhibition à la cloxacilline.....	71

4.1.3 Recherche de la production de carbapénémases.....	72
4.1.3.1 Le test de Hodge modifié.....	72
4.1.3.2 Le test carba NP modifié.....	73
4.2 Test de sensibilité à la colistine.....	75
4.3 Identification des déterminants génétiques des résistances.....	76
4.3.1 Extraction de l'ADN bactérien.....	78
4.3.2 Amplification de l'ADN par PCR en temps réel.....	78
4.3.3 La PCR standard.....	80
4.3.4 Le séquençage de l'ADN.....	84
4.3.5 Analyses bioinformatiques.....	87
5. Analyses statistiques	87
Résultats	89
Discussion	122
Conclusion et perspectives	135
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

A : adénine

AAC (6')-Ib-cr : N-acétyltransférases Ib résistante au ciprofloxacine

ADN : acide désoxyribonucléique

AMC : Amoxicilline + acide clavulanique

Amp C : céphalosporinase de type AmpC

ARG-ANNOT: Antibiotic Resistance Gene-Annotation

arm: aminoglycoside resistance methylase

ARN r 16S: acide ribonucléique ribosomal petite sous unite 16S

Bla: gène de β -lactamase

BLASTN: basic local alignment search tool nucleotide

BLLS : β -lactamases à large spectre

BLSE : β -lactamases à spectre élargi

C : cytosine

CLSI: clinical and laboratory standards institute

CMI: concentration minimale inhibitrice

CTX-M : Céfotaximase –Munich

dNTP: désoxynucléotide triphosphates

EGM : éléments génétiques mobiles

FQ : fluoroquinolones

G: guanine

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases

LPS: lipopolysaccharide

MBL : Metallo- β -Lactamase

MH: Mueller Hinton

mgrB: PhoP/PhoQ regulator transmembrane protein MgrB

NDM: New Delhi β -lactamases

NCBI : national center for biotechnology information

OXA : oxacillinase

PCR : polymerase chain reaction

PLP : Protéines Liant la Pénicilline

pmr A/B: two-component system sensor histidine kinase PmrA/B

phoP: Transcriptional regulatory protein PhoP

pho Q: Sensor protein PhoQ

Qnr: quinolone resistance

Rmt: méthyltransférases de l'ARN ribosomiques 16S

SHV : Sulphydryl variable

T : thymine

TEM : Temoneira

THG : transfert horizontal de gènes

TRI : TEM Résistantes aux Inhibiteurs

VIM : Verona integron-encoded metallo- β -lactamase

Code international des acides aminés :

G - Glycine (Gly)

P - Proline (Pro)

A - Alanine (Ala)

V - Valine (Val)

L - Leucine (Leu)

I - Isoleucine (Ile)

M - Methionine (Met)

C - Cysteine (Cys)

F - Phenylalanine (Phe)

Y - Tyrosine (Tyr)

W - Tryptophan (Trp)

H - Histidine (His)

K - Lysine (Lys)

R - Arginine (Arg)

Q - Glutamine (Gln)

N - Asparagine (Asn)

E - Glutamic Acid (Glu)

D - Aspartic Acid (Asp)

S - Serine (Ser)

T - Threonine (Thr)

Liste des figures

Figure 1. Sites d'action des principales classes d'antibiotiques.....	6
Figure 2. Structure chimique des principales classes de β -lactamines.....	7
Figure 3. Structure chimique des principaux β -lactamines et inhibiteurs de β -lactamase.....	8
Figure 4. Ressemblance de la structure des bêta-lactamines et le D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala).....	9
Figure 5. Représentation schématique de la biosynthèse des peptidoglycanes et le mécanisme d'action des β -lactamines.....	10
Figure 6. Structures de quelques représentatifs d'aminoglycosides.....	11
Figure 7. Mécanisme d'action des aminoglycosides.....	12
Figure 8. Structures chimiques de plusieurs fluoroquinolones importantes.....	13
Figure 9. Mécanisme d'action des fluoroquinolones.....	14
Figure 10. La structure générale de la polymyxine E (colistine).....	15
Figure 11. Mécanisme d'action de la colistine.....	15
Figure 12. Structure de la fosfomycine.....	16
Figure 13. Mécanisme d'action de la fosfomycine.....	17
Figure 14. Mécanisme d'action des sulfamides sur la voie de biosynthèse de l'acide folique.....	18
Figure 15. Chronologie du déploiement des antibiotiques et de l'apparition des résistances.....	20
Figure 16. Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries.....	22
Figure 17. Représentation des principaux genres d'entérobactéries associés à divers écosystèmes.....	24
Figure 18. Réaction d'hydrolyse du cycle β -lactame de la pénicilline par une enzyme β -lactamase.....	26
Figure 19. La classification des β -lactamases. Classification structurelle selon Ambler et classification fonctionnelle selon Bush-Jacoby-Medeiros.....	27
Figure 20. Substitution d'acides aminés dans la β -lactamase TEM-1 non BLSE pour donner la BLSE TEM-52.....	29
Figure 21. Les enzymes de type TEM.....	30
Figure 22. Les enzymes de la famille SHV.....	31
Figure 23. Diagramme d'un arbre phylogenetique montrant les groupes de CTX-M.....	32
Figure 24. Présentation schématique des mécanismes de résistance aux aminoglycosides.....	35
Figure 25. Sites de modification sur la kanamycine B par divers enzymes modifiant les aminoglycosides.....	36
Figure 26. Mécanismes de résistance aux quinolones.....	38
Figure 27. Mutations dans les genes de l'ADN gyrase (GyrA et GyrB) et de la topoisomérase IV (ParC et ParE) chez <i>Salmonella Typhi</i>	38
Figure 28. Mode d'action et de résistance de la colistine.....	40
Figure 29. Structure et architecture des éléments transposables.....	46
Figure 30. Structure et fonction de l'intégron.....	48
Figure 31. Principales caractéristiques des îlots génomiques et leurs fonctions possibles.....	50
Figure 32. Exemples d'éléments génétiques mobiles (EGM) et des processus impliqués dans la mobilité intracellulaire ou intercellulaire de gènes de résistance aux antibiotiques.....	51
Figure 33. Les composants et le principe de fonctionnement d'un MALDI-TOF-MS.....	67

Figure 34. Les étapes du protocole de l'identification des microorganismes par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS.....	68
Figure 35. Un exemple de test de synergie positif.....	71
Figure 36. Un exemple de recherche de céphalosporinase par test d'inhibition à la cloxacilline.....	72
Figure 37. Un exemple de test Hodge modifié réalisé sur une gélose MH avec un disque d'ertapénem (10 µg).....	73
Figure 38. Test carba NP.....	74
Figure 39. Schéma de la configuration d'une plaque de microdilution.....	76
Figure 40. Les étapes de la méthode de séquençage de Sanger.....	85
Figure 41. MSP dendrogramme de classification des isolats d' <i>E. coli</i> par le logiciel Biotyper.....	91
Figure 42. MSP dendrogramme de classification des isolats de <i>K. pneumoniae</i> par le logiciel Biotyper.....	92
Figure 43. Fréquences des phénotypes de résistance aux β-lactamines chez les isolats d' <i>E. coli</i> et <i>K. pneumoniae</i>	95
Figure 44. Résultat d'un test de synergie montrant un phénotype positif pour la BLSE de l'isolat de <i>K. pneumoniae</i> K26.....	96
Figure 45. Résultat d'un test à la cloxacilline chez l'isolat d' <i>E. coli</i> E39.....	98
Figure 46. Résultat de test de CARBA NP modifié sur trois isolats de <i>K. pneumoniae</i>	98
Figure 47. Résultat négatif d'un test de Hodge modifié.....	99
Figure 48. Détermination de la CMI de la colistine par la méthode de microdilution sur milieu liquide.	100
Figure 49. Détection du gène <i>bla</i> - _{TEM} par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.	104
Figure 50. Détection du gène <i>bla</i> - _{SHV} par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.	104
Figure 51. Détection du gène <i>bla</i> - _{CTX-M-1} par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.	104
Figure 52. Détection du gène <i>aac6Ib</i> par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.....	112
Figure 53. Détection du gène <i>qnrB</i> par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.	112
Figure 54. Détection du gène <i>mgrB</i> par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.....	113
Figure 55. Détection du gène <i>phoP</i> par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.....	113
Figure 56. Détection du gène <i>phoQ</i> par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.	114
Figure 57. Détection du gène <i>pmrA</i> par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.....	114
Figure 58. Détection du gène <i>pmrB</i> par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.....	114

Figure 59. Alignement multiple des séquences des protéines MgrB des isolats de <i>K. pneumoniae</i> K9 et K12 et de la souche NH53 de <i>K. pneumoniae</i> (numéro d'accèsion AIT16084) en utilisant ClustalW.	116
Figure 60. Alignement multiple des séquences des protéines PhoP des isolats de <i>K. pneumoniae</i> K6, K9, K12 et K31 et de la souche MGH78578 de <i>K. pneumoniae</i> (numéro d'accèsion ABR76569) à l'aide de ClustalW.	116
Figure 61. Alignement multiple des séquences des protéines PhoQ des isolats de <i>K. pneumoniae</i> K6, K9, k12 et K31 et de la souche MGH78578 de <i>K. pneumoniae</i> (Numéro d'accèsion ABR76568) à l'aide de ClustalW.....	118
Figure 62. Alignement multiple des séquences des protéines PmrA des isolats de <i>K. pneumoniae</i> K6, K9, k12 et K31 et de la souche MGH78578 de <i>K. pneumoniae</i> (numéro d'accèsion WP_002895659.1) à l'aide de ClustalW.	119
Figure 63. Alignement multiple des séquences des protéines PmrB des isolats de <i>K. pneumoniae</i> K6, K9, k12 et K31 et de la souche MGH78578 de <i>K. pneumoniae</i> (numéro d'accèsion WP_004147680.1) à l'aide de ClustalW.....	120

Liste des tableaux

Tableau 1. Principales carbapénémases chez les <i>Enterobacteriaceae</i>	34
Tableau 2. Exemples de quelques enzymes modifiant les aminoglycosides.....	36
Tableau 3. Déterminants génétiques de la résistance à la tétracycline.....	42
Tableau 4. Principaux types et variantes de β -lactamases chez les <i>Enterobacteriaceae</i>	53
Tableau 5. Caractères descriptifs de l'identification classique des souches <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> et <i>Enterobacter</i> spp.....	65
Tableau 6. Tableau de correspondance des scores (Manuel Bruker®).....	68
Tableau 7. Phénotypes de résistances acquises vis-à-vis des β -lactamines chez les entérobactéries.....	70
Tableau 8. Amorces et sondes fluorescentes utilisées pour la PCR en temps réel.....	79
Tableau 9. Amorces utilisées dans la PCR standard.....	81
Tableau 10. Taux d'isolement et répartitions des entérobactéries isolées dans cette étude....	90
Tableau 11. Taux de résistance aux β -lactamines chez les isolats d'entérobactéries étudiés..	93
Tableau 12. Répartition des phénotypes de résistances aux β -lactamines chez les isolats d'entérobactéries étudiées.	94
Tableau 13. Répartition des taux de BLSE.	97
Tableau 14. Valeurs des CMI de la colistine obtenue par la méthode de microdilution en milieu liquide.	100
Tableau 15. Taux de résistances des isolats des entérobactéries à différentes classes d'antibiotiques	102
Tableau 16. Taux de multirésistances.	102
Tableau 17. Profils phénotypiques et génotypiques de résistance des isolats d'entérobactéries étudiés.	105
Tableau 18. Fréquences des gènes <i>bla</i> -TEM, <i>bla</i> -SHV et <i>bla</i> CTX-M.....	110
Tableau 19. Fréquences des gènes de résistance <i>aadA</i> , <i>aac-6-Ib</i> , <i>aac-6-Ib-cr</i> et <i>qnr B</i> chez les isolats d' <i>E. coli</i> et de <i>K. pneumoniae</i>	112

Introduction

générale

La résistance aux antibiotiques est l'un des défis majeurs de santé publique d'ampleur mondiale, causant des taux élevés de morbidité et de mortalité, prolongeant la durée d'hospitalisation et imposant des coûts de soins supplémentaires et excessifs (**Maragakis et al., 2008 ; Barrasa-Villar et al., 2017**).

Il est bien établi que les bactéries ont une capacité extraordinaire de développer des mécanismes de résistance pour un antibiotique rapidement et peu après son introduction en pratiques cliniques. Cependant, la résistance bactérienne n'a cessé d'augmenter au fil du temps pour atteindre des prévalences alarmantes, au point où on assiste à l'émergence de bactéries multirésistantes, contre lesquelles, les options thérapeutiques sont très limitées, parfois inexistantes (**Kariuki & Hart, 2001**).

Les antibiotiques β -lactamines font partie du plus grand groupe d'antibiotiques et sont les plus couramment utilisés dans le monde dans le traitement des infections causées par des bactéries Gram-négatif, en raison de leurs effets secondaires limités et de leurs fortes propriétés bactéricides (**Bush & Bradford, 2016**). Les β -lactamines bloquent la transpeptidation du peptidoglycane, le principal composant de la paroi cellulaire bactérienne, par l'inhibition des protéines de liaison à la pénicilline, et causent la mort cellulaire (**Zango et al., 2019**).

Les bactéries Gram-négatif ont développé plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques du groupe β -lactamines, dont les plus importants sont la modification structurelle de ces antibiotiques ou par la production d'enzymes, appelées β -lactamases, qui ont la capacité d'hydrolyser le cycle β -lactamine, le principal composant de la structure des β -lactamines (**Wilke et al., 2005**).

Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE) est un groupe important de β -lactamases produites par des bactéries, qui ont la capacité d'hydrolyser les céphalosporines de troisième génération (ainsi que les pénicillines), et sont inhibés par les inhibiteurs de β -lactamases tels que l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam (**Castanheira et al., 2021**). Les BLSE sont regroupés selon la similarité de leurs séquences d'acides aminés ou selon leurs propriétés fonctionnelles en plusieurs types, tels que CTX-M, TEM, SHV et OXA (**Castanheira et al., 2021**).

Depuis leur première description en 1983, les BLSE sont devenues répandues dans le monde, en particulier, celles du type CTX-M, sont devenues le groupe le plus important et le plus répandu ces dernières années, suivies par SHV- et TEM (**Ruppé, 2010 ; Bevan et al., 2017; Castanheira et al., 2021**).

La production de BLSE est codée par des gènes chromosomiques ou plasmidiques. Les gènes de BLSE plasmidiques (qui sont généralement associés à d'autres éléments génétiques mobiles comme les transposons et les intégrons) présentent un intérêt particulier en raison de leur capacité à se transférer facilement entre souches ou espèces bactériennes, favorisant leur dissémination au sein des populations bactériennes ou d'une région à une autre (**Alekshun & Levy, 2007**). De plus, ces plasmides peuvent porter également des déterminants de résistance à d'autres antibiotiques, entraînant non seulement la propagation des BLSE mais également la dissémination d'autres gènes de résistance (**Alekshun & Levy, 2007**).

Parmi les bactéries qui représentent la plus grande menace pour la santé humaine en raison de leur résistance croissante aux antibiotiques figurent les membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, en particulier *Escherichia coli* et *Klebsiella* spp. Ce groupe de bactéries font partie du microbiote normal de l'intestin de l'homme et des animaux, mais peuvent être rencontré également dans l'environnement (**Janda & Abbott, 2021**).

Les entérobactéries comprennent des espèces d'importance médicale, qui sont parmi les causes les plus fréquentes d'une gamme d'infections, à la fois dans les milieux hospitaliers et communautaires, le plus souvent des infections intestinales telles que l'entérite et la diarrhée, les infections des voies urinaires, la pneumonie, les infections du sang et du système nerveux (**Denton, 2007 ; Peleg & Hooper, 2010**). Les infections causées par les entérobactéries sont parmi les principales causes d'hospitalisation, de morbidité et de mortalité, en particulier dans les pays à faible revenus. Ce problème s'est aggravé davantage suite à l'émergence de différents types de résistances, et des multirésistances, chez les *Enterobacteriaceae*. Ces dernières années, de nombreuses études à travers le monde ont démontré que les entérobactéries sont la principale famille bactérienne associée à la production de BLSE (**El Salabi et al., 2013 ; De Angelis et al., 2020**).

Ces dernières années, les entérobactéries productrices de BLSE sont en train de se propager et provoquer des infections graves à l'échelle mondiale, et soulevant des inquiétudes en

milieu clinique, en raison des options thérapeutiques limitées pour le traitement des infections qu'elles causent (**Pitout, 2008**). Les carbapénèmes comptent parmi les rares molécules encore actives en cas d'infections aux entérobactéries BLSE (**Vardakas et al., 2012 ; Nordmann & Poirel, 2014**). Cependant, des souches d'entérobactéries productrices de carbapénémase ont également émergé et sont devenues endémiques dans certaines régions du globe (**Nordmann, 2014**).

En raison de la pénurie causée par les résistances, les polymyxines (colistine et polymyxine B) ont été réintroduites dans l'arsenal thérapeutique comme médicaments de dernier recours. Mais l'augmentation de leur utilisation ces dernières années a abouti à l'émergence de résistance bactérienne à la colistine (**Torres et al., 2021**).

L'émergence et la distribution géographique de la résistance antibactérienne chez les entérobactéries, ou d'autres bactéries, est multifactorielle, mais elle a été généralement associée à des facteurs liés, entre autres, à la génétique des bactéries, aux types d'antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire, aux niveaux de consommation des antibiotiques et aux pratiques d'hygiène (**Levy, 2005 ; Hawkey & Jones, 2009 ; Schechner et al., 2013**).

En Algérie, les BLSE sont de plus en plus signalées et leur prévalence parmi les agents pathogènes est extrêmement élevée (**Messai et al., 2006; Iabadene et al., 2009; Yahiaoui et al., 2015; Medboua-Benbalagh et al., 2017**), les données issues de nombreuses études en milieu hospitaliers et communautaires dans plusieurs régions du pays, suggèrent que le CTX-M-15 est prédominant parmi les isolats cliniques des entérobactéries productrices de BLSE (**Nedjai et al., 2012; Nedjai et al., 2013; Souna et al., 2016**).

Les études épidémiologiques des entérobactéries productrices de BLSE sont très importantes, car elles permettent d'estimer la prévalence des différents clones bactériens résistants en circulation au niveau local, régional ou nationale, et de déterminer leurs mécanismes de résistances, y inclut les nouveaux clones, donnant ainsi une perspective plus large sur l'ampleur du phénomène de résistances dans le pays. Ces données peuvent également apporter des informations précieuses aux autorités nationales de la santé publique pour définir des programmes locaux de control et de prévention des infections causées par des organismes résistants, ainsi qu'aux praticiens traitant, pour adapter au mieux la thérapeutique chez les patients infectés (**Diallo et al., 2020**).

Introduction générale

C'est dans ce contexte qu'on a effectué cette étude sur des isolats cliniques d'entérobactéries, isolés de différents échantillons prélevés de patients à l'hôpital Rabah Bitat de Boumerdès, et dont les objectifs principaux étaient : (i) d'estimer la prévalence des entérobactéries productrices de BLSE, ainsi que leurs profils de résistances aux antibiotiques non β -lactamines ; et (ii) de caractériser les mécanismes moléculaires de résistances chez ces entérobactéries.

*Synthèse
bibliographique*

1. Les antibiotiques

Un antibiotique est une substance d'origine naturelle ou synthétique ayant une activité antibactérienne, bactéricide ou bactériostatique. Les antibiotiques exercent leurs actions au niveau de cibles bactériennes spécifiques telles que la paroi et la membrane cellulaire, ainsi que des processus tels que la synthèse des acides nucléiques et des protéines (**Muylaert & Mainil, 2013**).

Il existe plusieurs familles d'antibiotiques. Les principales sont les β -lactamines, les aminoglycosides, les macrolides, les cyclines, les polymyxines et les quinolones. Ces familles sont différenciées par leur structure, cible cellulaire, mode d'action, origine (naturelle ou synthétique) et leur spectre d'activité (**Brown, 2015**).

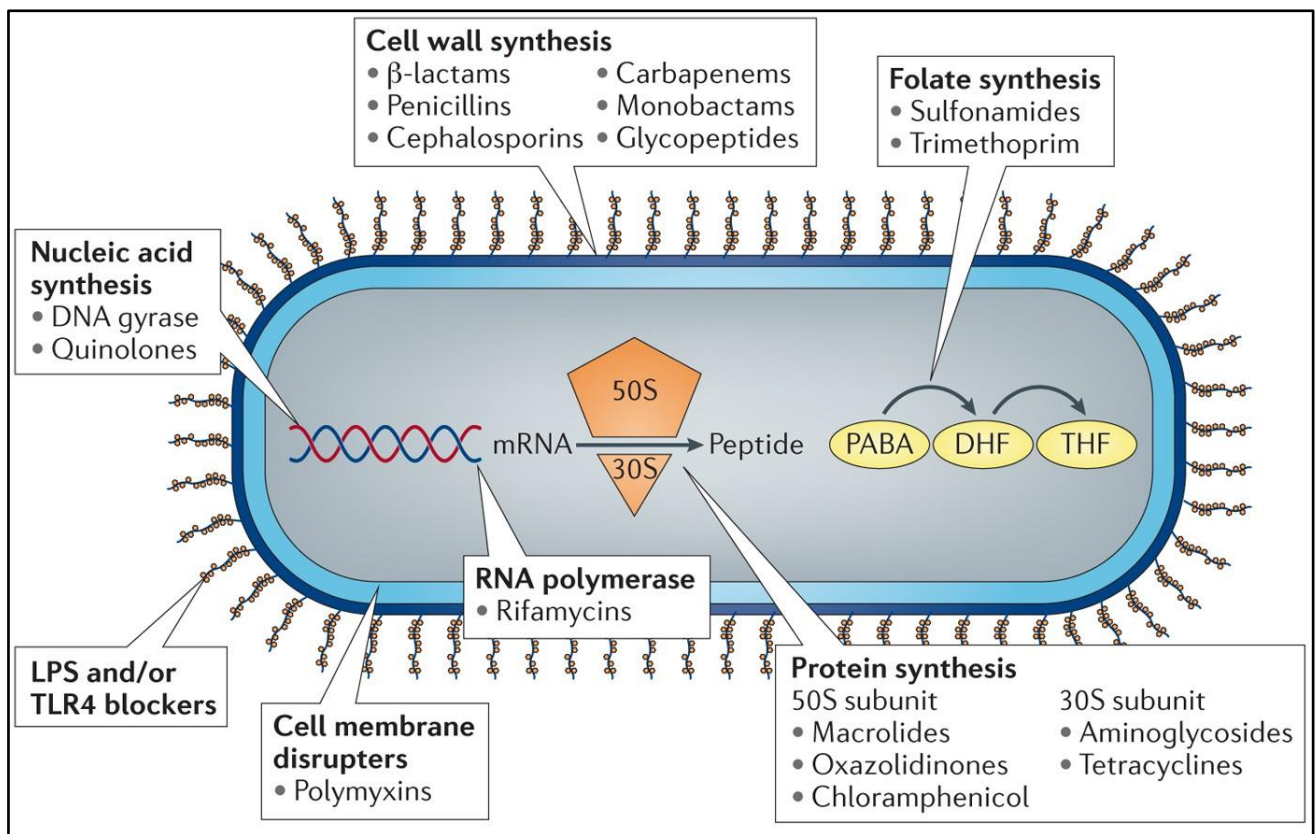


Figure 1. Sites d'action des principales classes d'antibiotiques (**Brown, 2015**).

1.1. Les β -lactamines

Les antibiotiques β -lactamines sont les agents antibactériens les plus populaires et les plus largement utilisés pour le traitement des infections bactériennes, en raison de leur efficacité, de leur large spectre d'activité et de leur moindre toxicité (**Bush & Bradford, 2016**).

Les β -lactamines constituent une famille d'antibiotiques très complexe, comprenant un grand nombre de molécules, dont la caractéristique commune est la présence d'un cycle β -lactame (**Figure 2**).

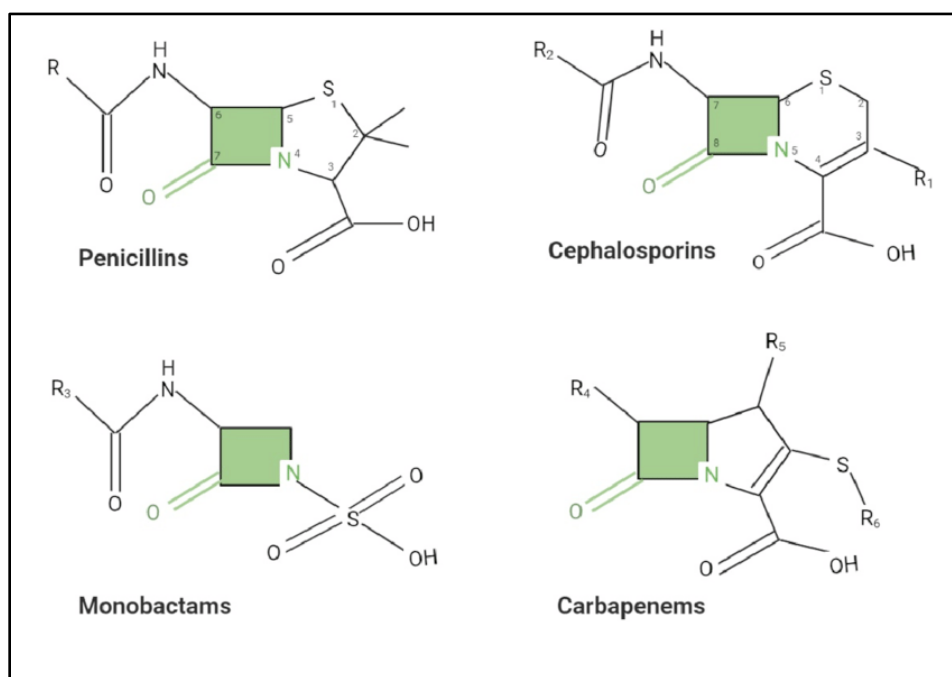


Figure 2. Structure chimique des principales classes de β -lactamines. Le cycle β -lactame est coloré en vert (**Vrancianu et al., 2020**).

1.1.1 Les principaux groupes de β -lactamines

Selon la structure des molécules associées au cycle β -lactame et leurs dérivés ; il existe plusieurs groupes au sein de cette famille (**Figure 3**) (**Pandey & Cascella, 2021**) :

a. Les pénicillines (pénames) : contiennent un cycle β -lactame associé à un cycle thiazolidine. Ce groupe d'antibiotiques comprend les pénicillines naturelles, les agents résistants aux bêta-lactamases, les aminopénicillines, les carboxypénicillines et les uréidopénicillines (**Figure 3**).

b. Les céphalosporines : contiennent un cycle β -lactame associé à un cycle dihydrothiazine (noyau céphème). Les céphalosporines sont traditionnellement divisées en cinq classes ou générations, bien que l'acceptation de cette terminologie ne soit pas universelle.

c. Les monobactames : contiennent uniquement un cycle β -lactame.

d. Les carbapénèmes (pénèmes) : sont très similaires aux pénicillines, mais l'atome de soufre en position 1 de la structure a été remplacé par un atome de carbone, et une double liaison entre C-2 et C-3 a été introduite. Cette classe de β -lactamines comprend le méropénème, l'imipénème, l'ertapénème et le doripénème.

e. Les inhibiteurs de β -lactamase : contiennent un cycle β -lactame qui leur confère une similitude avec les β -lactamines et permet donc leur reconnaissance par les β -lactamases à sérine. Ces agents comprennent les inhibiteurs de bêta-lactamase de première génération (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam) et les nouveaux avibactam et vaborbactam qui sont actifs contre les carbapénémases (**Figure 3**).

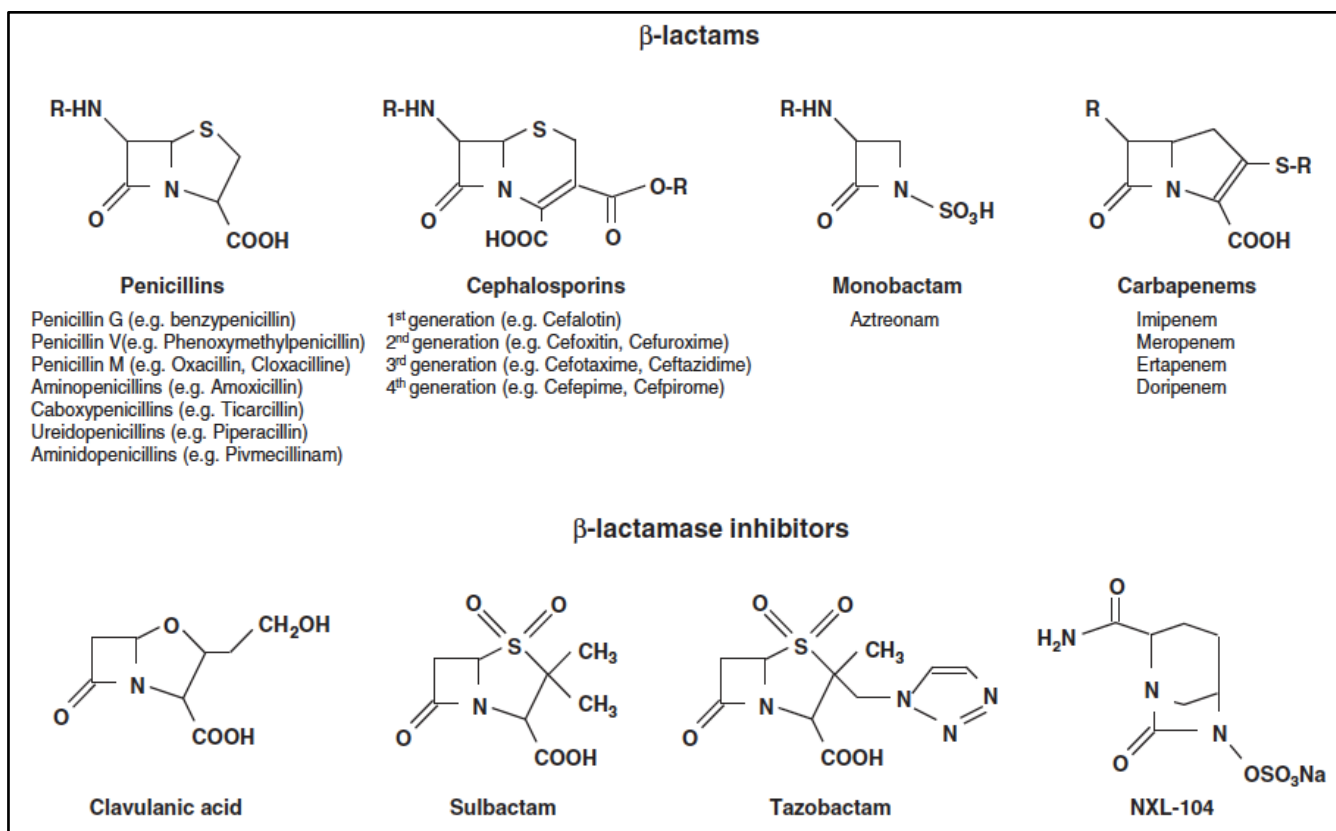


Figure 3. Structure chimique des principaux β -lactamines et inhibiteurs de β -lactamase (Nordmann *et al.*, 2012).

Mode d'action

Les β -lactamines sont des antibiotiques bactéricides qui bloquent la synthèse du peptidoglycane, polymère majeur de la paroi bactérienne. Les β -lactamines, dont la structure ressemble le substrat naturel des enzymes transpeptidases (protéines de liaison à la pénicilline (PLP)), le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala du pentapeptide constitutif du peptidoglycane (**Figure 4**), se fixent de façon covalente sur le site actif. Cette liaison interrompe le processus de transpeptidation durant la dernière étape de la synthèse des peptidoglycanes, causant ainsi la perte de l'intégrité de la paroi cellulaire et par conséquent, la lyse cellulaire (**Figure 5**) (**Zango et al., 2019**).

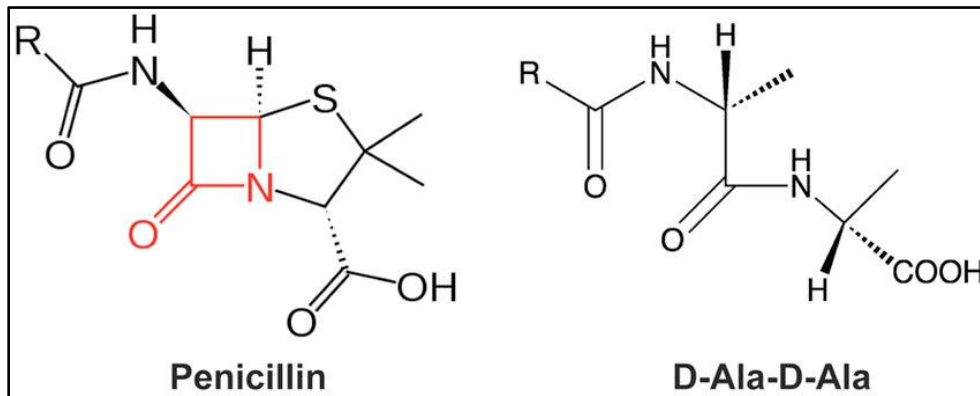


Figure 4. Ressemblance de la structure des bêta-lactamines et le D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) (**Zeng & Lin, 2013**).

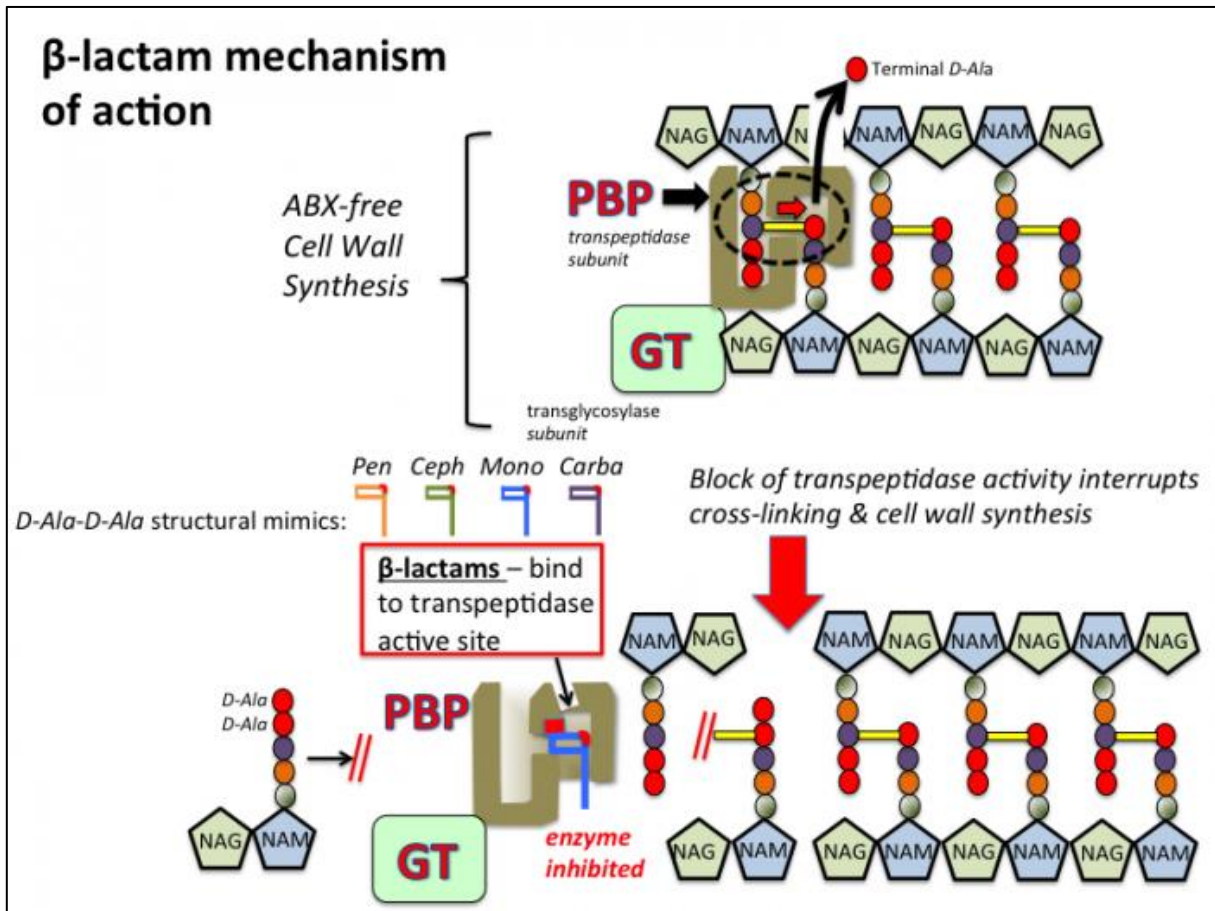


Figure 5. Représentation schématique de la biosynthèse des peptidoglycanes et le mécanisme d'action des β -lactamines (Zango *et al.*, 2019).

En haut : durant la biosynthèse des peptidoglycanes, les enzymes transpeptidases (PLP) catalysent les liaisons croisées entre les chaînes de glycanes adjacentes, et la libération d'un résidu D-alanine. **En bas :** La β -lactamine se fixe sur le site actif des PLP. Cette liaison interrompt la synthèse des peptidoglycanes. NAG : N-acétylglucosamine ; NAM : acide N-acétylmuramique.

1.2. Les aminoglycosides

La structure des aminoglycosides ou aminosides consiste en un cycle 2-déoxystreptamine (2-DOS) auquel deux ou plusieurs sucres amino-modifiés sont attachés via des liaisons glycosidiques (Krause *et al.*, 2016) (Figure 6).

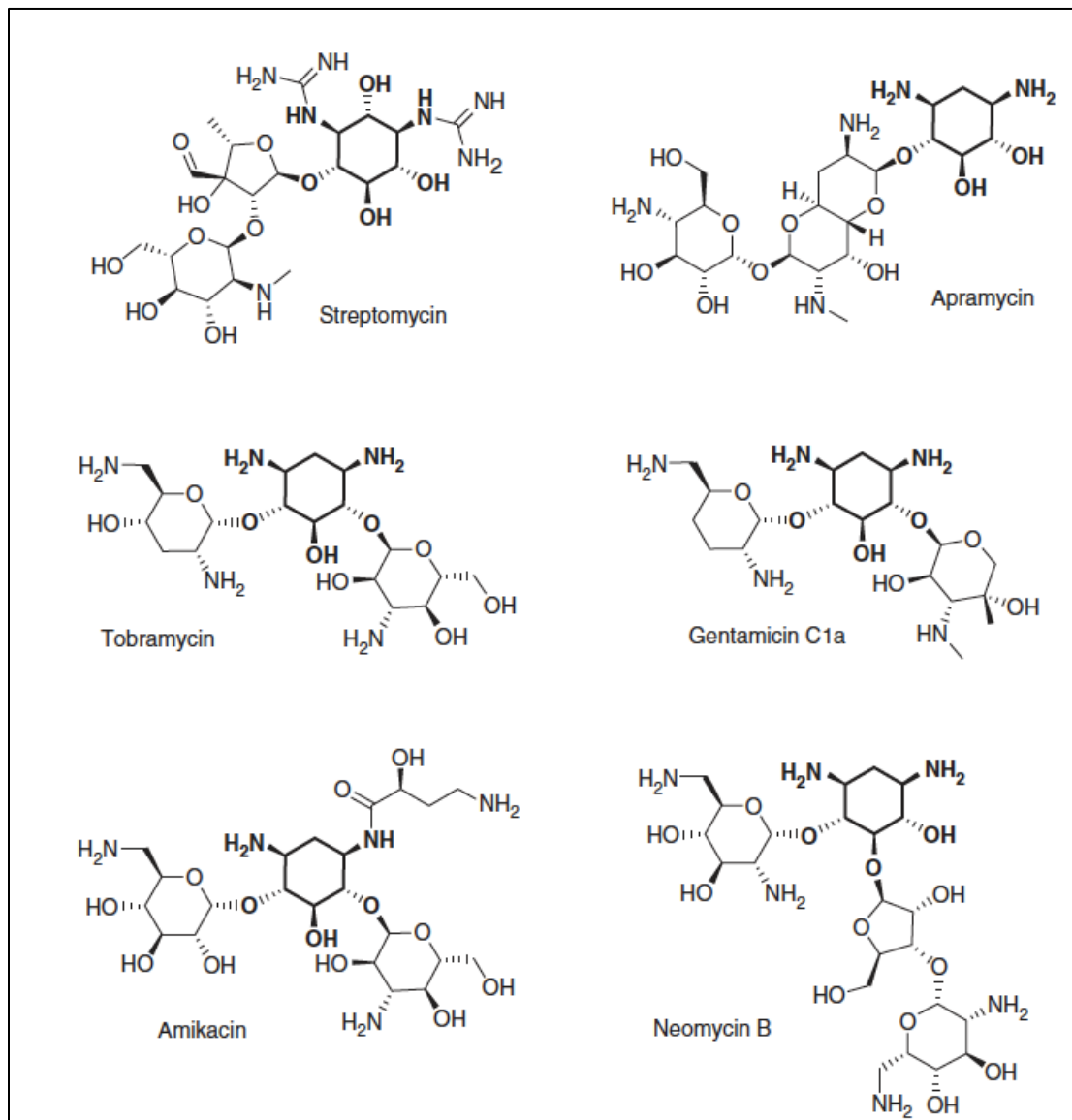


Figure 6. Structures de quelques représentatifs d'aminoglycosides (Krause *et al.*, 2016).

Mode d'action

Les aminoglycosides sont bactéricides, ils exercent leur action en se liant au ribosome bactérien et en interférant avec la traduction des protéines bactériennes (**Figure 7**).

Les aminoglycosides sont des antibiotiques à large spectre, efficaces contre les bactéries Gram-négatives et certaines bactéries Gram-positives (**Durante-Mangoni *et al.*, 2009**).

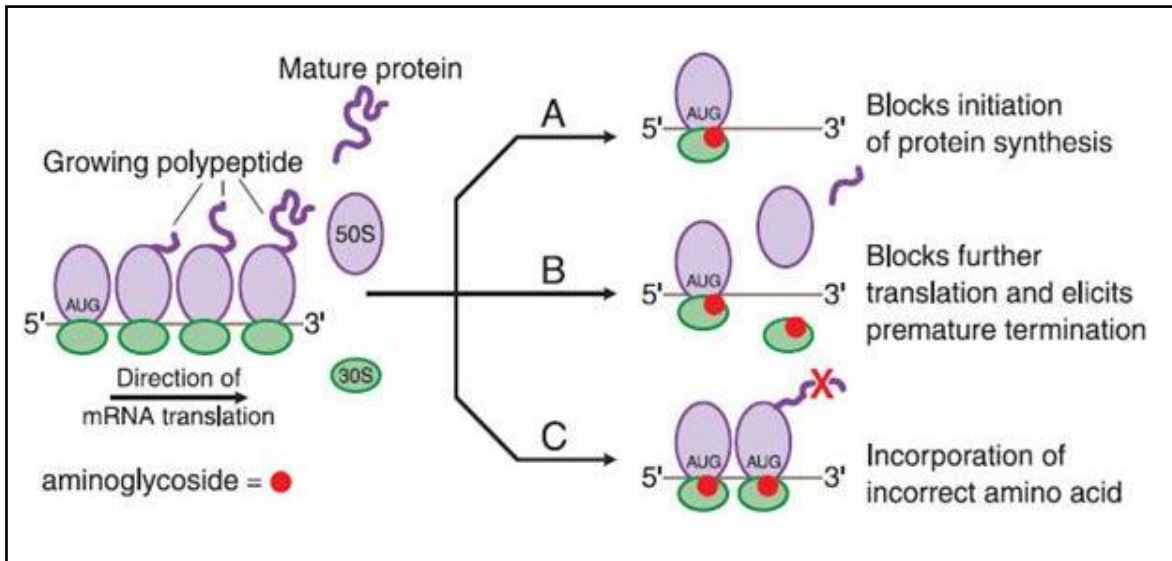


Figure 7. Mécanisme d'action des aminoglycosides.

La liaison des aminoglycosides à la sous-unité ribosomique 30S provoque trois effets, **(A)** le blocage de l'initiation de la traduction ; **(B)** l'interruption prématurée de la traduction ; ou **(C)** l'incorporation d'acides aminés incorrects (indiqués par le X rouge), entraînant la production de protéines anormales ou non fonctionnelles.

(<https://basicmedicalkey.com/aminoglycosides/>)

1.3. Les quinolones

Les quinolones sont une classe d'antibiotiques synthétiques, largement utilisé en médecine (**Sharma et al., 2009**). Le premier membre de cette classe, l'acide nalidaxique, a été identifié comme un sous-produit de la synthèse de la chloroquine en 1962, et avait une utilisation clinique limitée, car il n'était efficace que pour le traitement des infections des voies urinaires (**Leshner et al., 1962**).

Une modification clé d'un substituant fluor en position 8 a conduit au développement de nombreux membres de ce qui est devenu connu sous le nom de la classe des fluoroquinolones (**Figure 8**), avec l'introduction de la norfloxacine en 1986 et de la ciprofloxacine en 1987, qui ont présenté une forte efficacité contre les bactéries Gram-négatif.

En raison de leur large spectre d'activité et leur bon profil d'efficacité et d'innocuité, les fluoroquinolones ont été largement utilisées pour de multiples indications cliniques à travers le monde (**Sharma et al., 2009**).

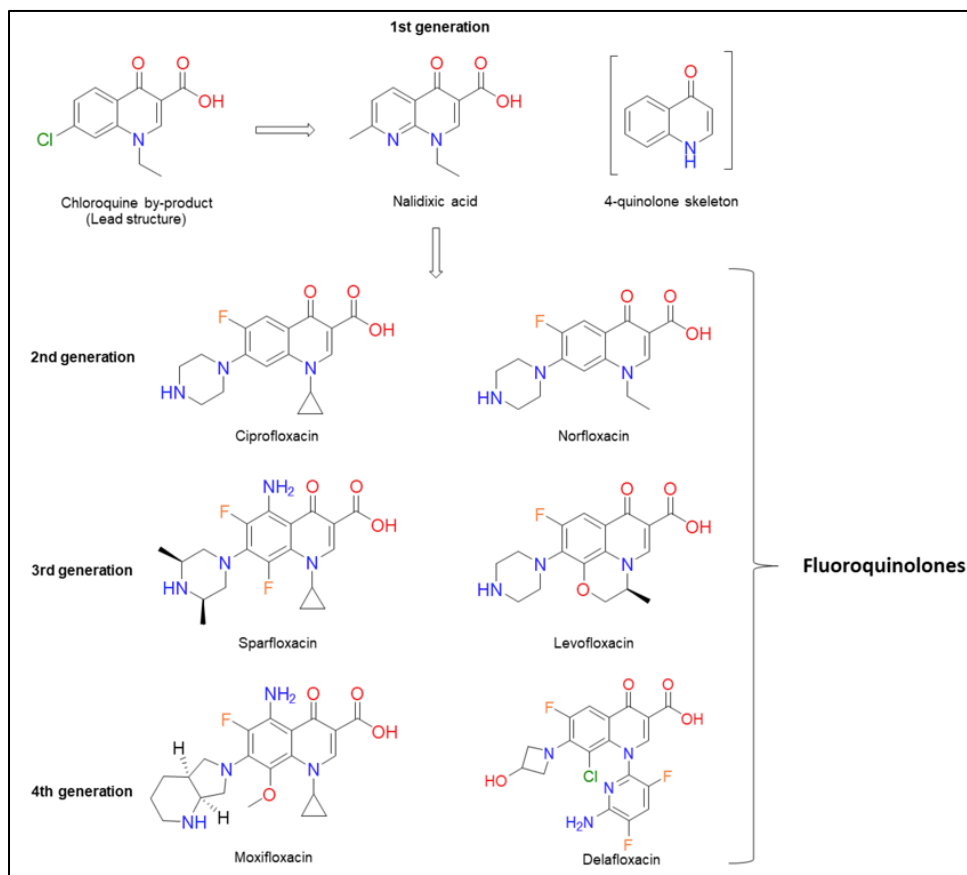


Figure 8. Structures chimiques de plusieurs fluoroquinolones importantes. L'acide nalidixique (la première "quinolone") est montré, ainsi que le sous-produit de la chloroquine inspirant sa synthèse (**Bush *et al.*, 2020**).

Mode d'action

Les principales cibles des fluoroquinolones sont les enzymes ADN gyrase et ADN topoisomérase IV. Les fluoroquinolones agissent par formation d'un complexe ternaire avec l'ADN et l'ADN gyrase ou la topoisomérase IV, inhibant ainsi l'activité enzymatique et bloquant le mouvement de la fourche de réplication de l'ADN (**Figure 9**) (**Bush *et al.*, 2020**).

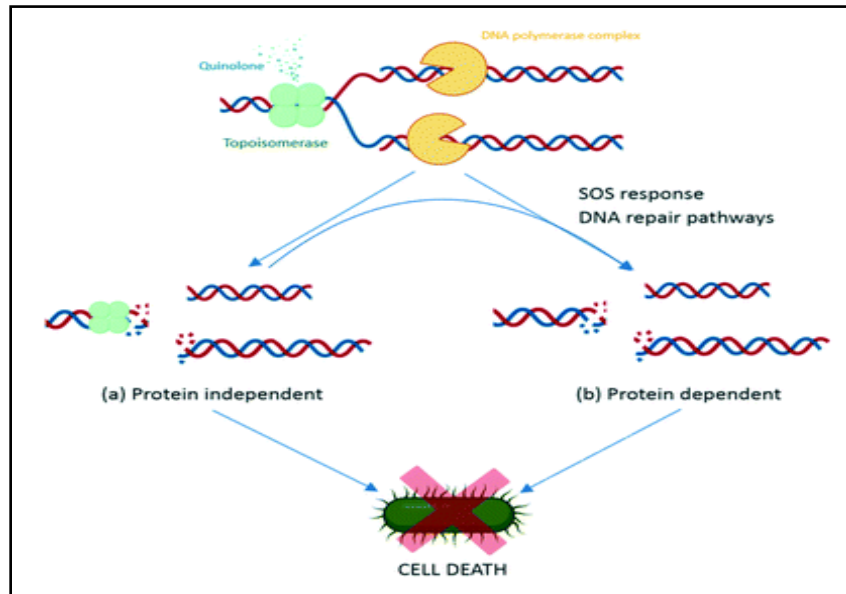


Figure 9. Mécanisme d'action des fluoroquinolones.

Les fluoroquinolones se lient au complexe de clivage ADN-enzyme. Cette liaison perturbe le processus de réplication, conduisant à des cassures chromosomiques (a). En réponse à ces dommages, la réponse SOS et d'autres voies de réparation de l'ADN sont activées, entraînant une action ultérieure du système SOS(b) puis la mort cellulaire (**Pham et al., 2019**).

1.4. Les polymyxines

Les polymyxines sont des oligopeptides cycliques non ribosomiques, qui sont constitués d'un heptapeptide cyclique et d'une chaîne latérale tripeptidique sur laquelle est lié de façon covalente un acide gras (**Figure 10**). Plusieurs groupes distincts de polymyxines ont été isolés, A, B, C, D, E, F, K, M, P, S et T ; chaque groupe étant défini structurellement par les résidus d'acides aminés uniques présents dans leurs séquences. Les principaux représentants des polymyxines qui sont couramment utilisés dans la pratique clinique sont la polymyxine B et la polymyxine E (colistine) (**Cai et al., 2015**).

Mode d'action

Les polymyxines sont des antibiotiques bactéricides, qui exercent leur action par interaction directe avec le composant lipide A du lipopolysaccharide (LPS) (**figure 11**). L'interaction électrostatique entre les polymyxines cationiques et les LPS anioniques déstabilise la membrane cytoplasmique, entraînant une perturbation de la couche LPS et la perte du contenu cellulaire interne, d'où la mort de la bactérie (**Gogry et al., 2021**).

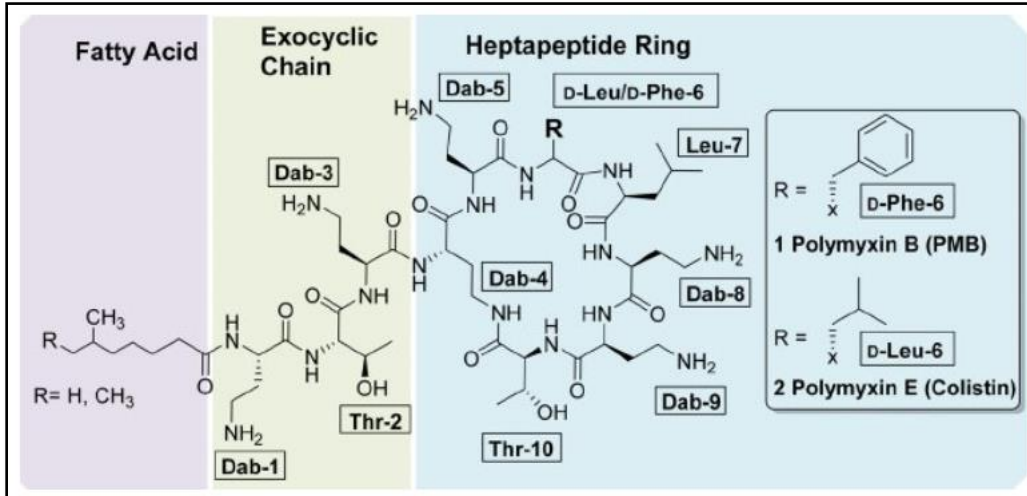


Figure 10. La structure générale de la polymyxine E (colistine) et la polymyxine B. Le phénylalanine (d-Phe) dans la polymyxine B est remplacée par une leucine dans la colistine (Gallardo-Godoy *et al.*, 2016).

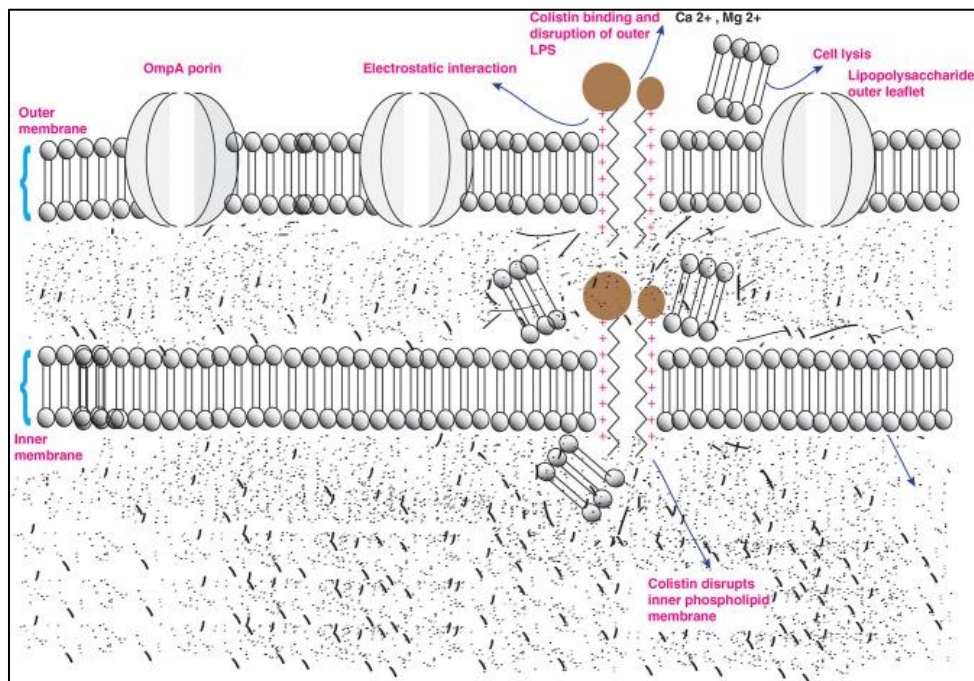


Figure 11. Mécanisme d'action de la colistine. La colistine cationique se lie aux molécules anioniques du LPS en déplaçant le calcium et le magnésium de la membrane cellulaire externe des bactéries Gram-négatif, entraînant des changements de perméabilité dans l'enveloppe cellulaire et une fuite du contenu cellulaire (Gogry *et al.*, 2021).

1.5. Autres antibiotiques

1.5.1 Fosfomycine

La fosfomycine est un acide phosphonique, antibiotique à large spectre (**Figure 12**), découvert en Espagne dans un bouillon de fermentation de *Streptomyces fradiae* (ATCC 21096) (**Silver, 2017**). La fosfomycine est également produite par plusieurs autres espèces des genres *Streptomyces* et *Pseudomonas*.

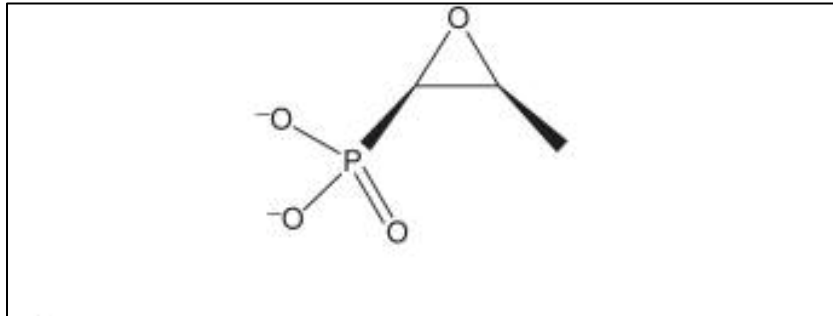


Figure 12. Structure de la fosfomycine.

La fosfomycine est un inhibiteur de l'enzyme MurA, une UDP-N-acétylglucosamine-énolpyruvyltransférase, qui catalyse la première étape dans la synthèse des peptidoglycanes de la paroi cellulaire bactérienne, entraînant ainsi la lyse et la mort des cellules bactériennes (**figure 13**) (**Castañeda-García et al., 2013**).

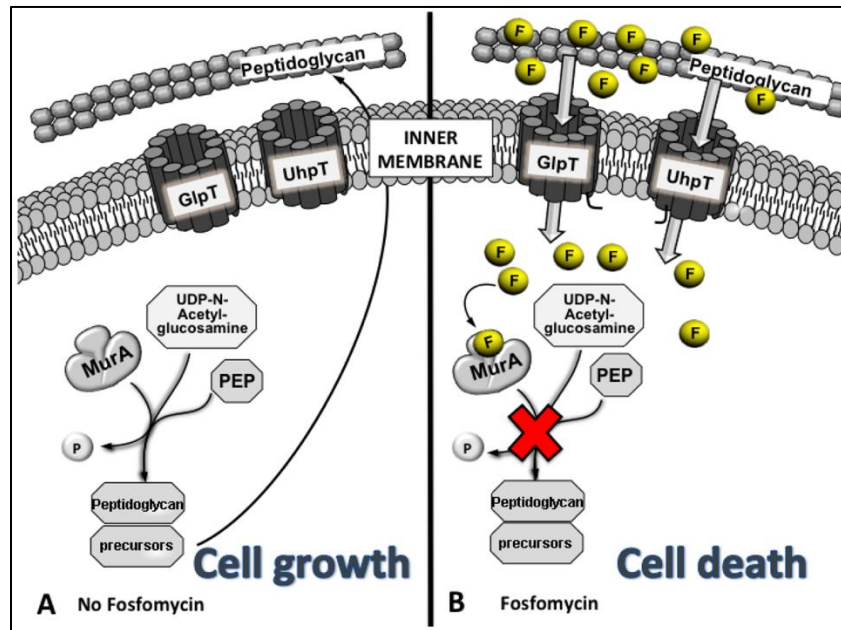


Figure 13. Mécanisme d'action de la fosfomycine. (A) MurA catalyse la formation d'UDP-GlcNAc-3-O-énolpyruvate, un précurseur de peptidoglycane, à partir d'UDP-GlcNAc et de PEP lors de la première étape de la biosynthèse du peptidoglycane, permettant la croissance cellulaire. (B) En revanche, lorsque la fosfomycine (F) est présente, elle est transportée à l'intérieur de la cellule par GlpT et UhpT, où elle bloque la synthèse d'UDP-GlcNAc-3-O-énolpyruvate en imitant le substrat de MurA, PEP, inhibant ainsi la synthèse de la paroi cellulaire, ce qui conduit à la mort cellulaire (Castañeda-García *et al.*, 2013).

1.5.2 Nitrofurantoïne

La nitrofurantoïne est un antibiotique synthétique dérivé du furane par l'ajout d'un groupe nitro et d'une chaîne latérale contenant de l'hydantoïne. Il a été introduit dans la pratique clinique en 1952 (Squadrito & del Portal, 2019).

Le mode d'action exact de la nitrofurantoïne n'est pas complètement élucidé, bien qu'il soit principalement connu pour inhiber un certain nombre d'enzymes bactériennes qui participent au métabolisme des glucides et à la synthèse de la paroi cellulaire (Munoz-Davila, 2014).

1.5.3 Sulfamides

Les sulfamides sont des antibiotiques synthétiques, à effet bactériostatique et à large spectre, et sont les plus utilisés en médecine vétérinaires en Chine, dans l'Union Européenne et dans certains pays en voie de développement, en raison de leur faible coût.

Les sulfamides sont des composés organo-soufrés contenant un groupe $-SO_2NH_2$ et/ou $-SO_2NH-$ et un groupe hétérocycle distinct de 5 ou 6 chaînons.

Mode d'action

La cible des sulfamides est l'enzyme dihydroptéroate synthase qui catalyse l'avant-dernière étape dans la voie de biosynthèse de l'acide folique, qui est la condensation de l'acide p-aminobenzoïque (PABA) et du 7,8-dihydro-6-hydroxyméthylptérine-pyrophosphate (DHPPP) pour former le dihydrofolate (Ovung & Bhattacharyya, 2021). Les sulfamides agissent comme des compétiteurs du substrat normal de l'enzyme, PABA (Figure 14).

L'émergence de la résistance aux sulfamides et la démonstration de l'effet synergétique des sulfamides et le triméthoprime dans l'inhibition du métabolisme de l'acide folique chez les bactéries, ont conduit à l'utilisation de ces deux molécules en association, triméthoprime/sulfaméthoxazole, connue sous le nom de cotrimoxazole (Kemnic & Coleman, 2019). L'association du triméthoprime et d'un sulfamide entraîne le blocage séquentiel de la synthèse de l'acide folique.

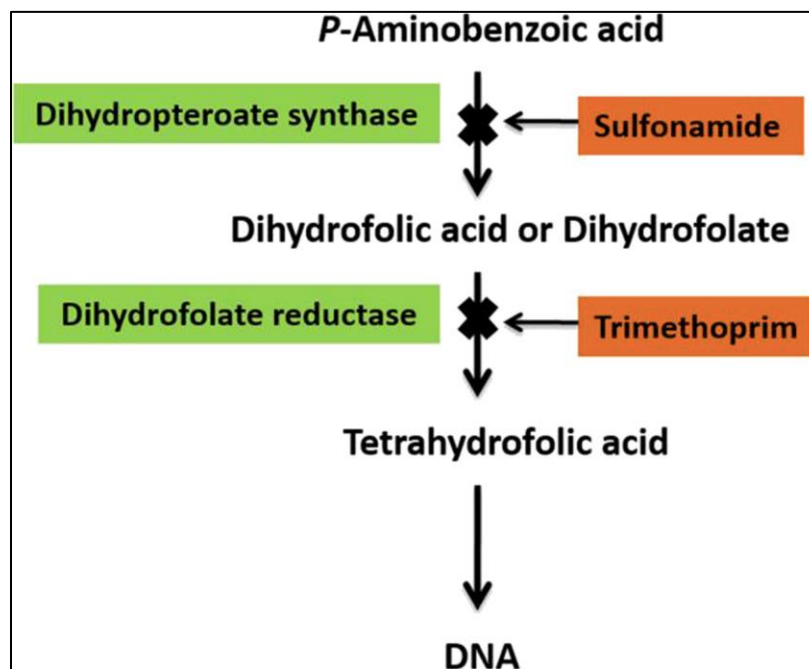


Figure 14. Mécanisme d'action des sulfamides sur la voie de biosynthèse de l'acide folique (Ovung & Bhattacharyya, 2021).

1.5.4 Chloramphénicol

Le chloramphénicol, un antibiotique à large spectre, est un inhibiteur spécifique de la synthèse des protéines bactériennes en se liant au centre de la peptidyl transférase au niveau de la sous-unité ribosomale 50S des ribosomes 70S (**Balbi, 2004**).

1.5.5 Tétracyclines

Les premières tétracyclines étaient des produits naturels issus des fermentations des actinomycètes ; les autres tétracyclines qui ont suivi, naturelles ou dérivés semi-synthétiques, sont plus efficaces et à large spectre. Les tétracyclines sont généralement considérées comme des antibiotiques bactériostatiques (**Chopra & Roberts, 2001**).

Mode d'action

Les tétracyclines se lient préférentiellement aux ribosomes bactériens et interagissent spécifiquement avec l'ARN ribosomal (ARNr) 16S au niveau de la sous-unité ribosomique 30S, inhibant ainsi la synthèse des protéines durant le processus de traduction (**Shutter & Akhondi, 2019**).

2. La résistance aux antibiotiques

2.1. Aperçu général sur la résistance aux antibiotiques

Depuis la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming à la fin des années 1920, les antibiotiques ont révolutionné le domaine de la médecine. Ils ont été utilisés pour le traitement des maladies infectieuses et ont sauvé des millions de vies. Cependant l'utilisation incontrôlée et abusive des antibiotiques chez l'homme et l'animal a favorisé l'émergence de bactéries résistantes, au point où nous avons maintenant atteint une crise où de nombreux antibiotiques ne sont plus efficaces, avec comme conséquences des échecs thérapeutiques. Malheureusement, la résistance aux antibiotiques survient toujours quelques années après l'introduction d'un nouvel antibiotique. La chronologie du déploiement des antibiotiques et du développement de la résistance est illustrée dans la **Figure 15**.

Aujourd'hui la résistance aux antibiotiques, particulièrement la multirésistance, constitue un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale, avec de lourdes conséquences humaines et socioéconomiques.

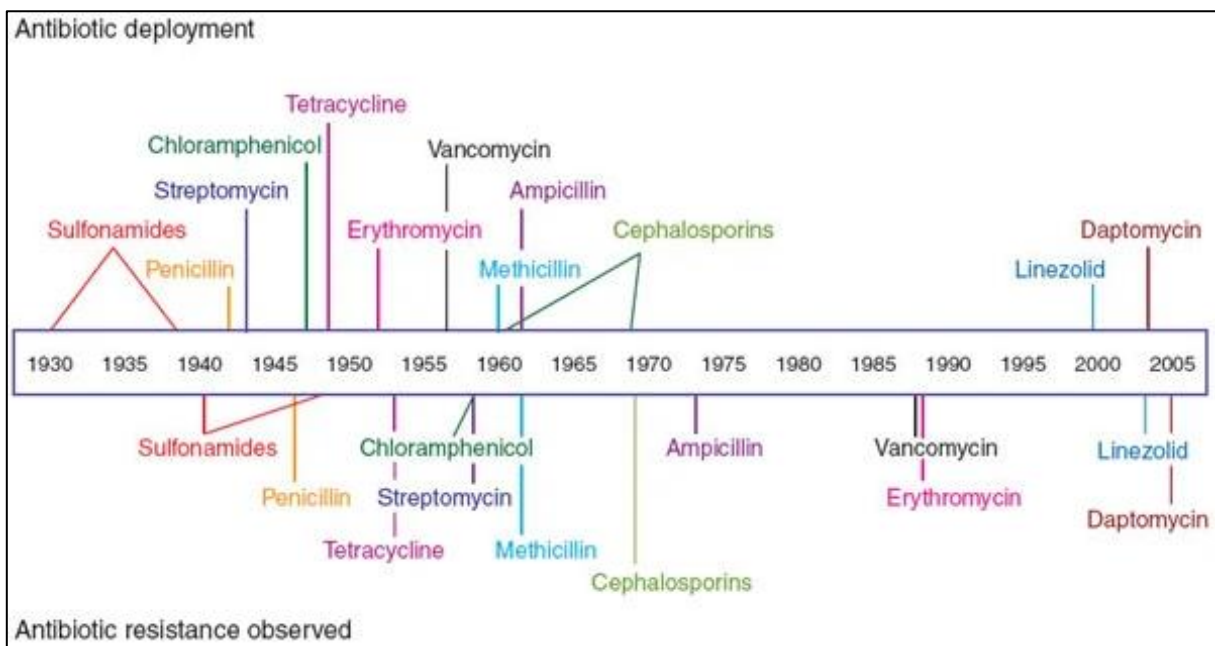


Figure 15. Chronologie du déploiement des antibiotiques (en bas) et de l'apparition des résistances (en haut) (Clatworthy *et al.*, 2007).

2.1.1 Définition de la résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques est définie comme l'incapacité ou la capacité réduite d'un agent antimicrobien à inhiber la croissance d'une bactérie.

La désignation d'une bactérie comme sensible ou résistante aux antibiotiques est faite principalement en définissant la concentration minimale inhibitrice (CMI) à laquelle la croissance bactérienne est inhibée dans des conditions standardisées *in vitro*. Les « concentrations critiques » définissent si la bactérie est sensible, résistante ou (parfois) intermédiaires (EMA & EFSA, 2017)

2.1.2. Types de résistance aux antibiotiques

Les résistances bactériennes aux antibiotiques sont divisées en deux grands types, la résistance intrinsèque et la résistance acquise.

2.1.2.1 La résistance intrinsèque

La résistance intrinsèque est une résistance qui est naturellement présente chez tous les membres d'un genre bactérien ou d'une espèce bactérienne. Ce type de résistance est normalement codé par les chromosomes et comprennent des pompes à efflux non spécifiques, des enzymes inactivant les antibiotiques ou des mécanismes qui servent de barrières de perméabilité (Fajardo *et al.*, 2008).

2.1.2.2 La résistance acquise

La résistance acquise est présente chez quelques souches bactériennes au sein d'un genre ou d'une espèce particulière. Elle est obtenue par des mutations spontanées rares ou le plus souvent par transfert horizontal de gènes de résistance entre des espèces de bactéries similaires ou différentes, par des mécanismes d'échange d'éléments génétiques mobiles, comme la transformation par acquisition de l'ADN libre, la conjugaison par des plasmides et les transposons conjugatives, ou la transduction par des bactériophages (van Hoek *et al.*, 2011).

2.1.3. Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les bactéries utilisent plusieurs stratégies pour résister aux antibiotiques, dont les principaux sont : l'inactivation de l'antibiotique, la modification de la cible, les pompes à efflux et la prévention de l'entrée de l'antibiotique (**Figure 16**).

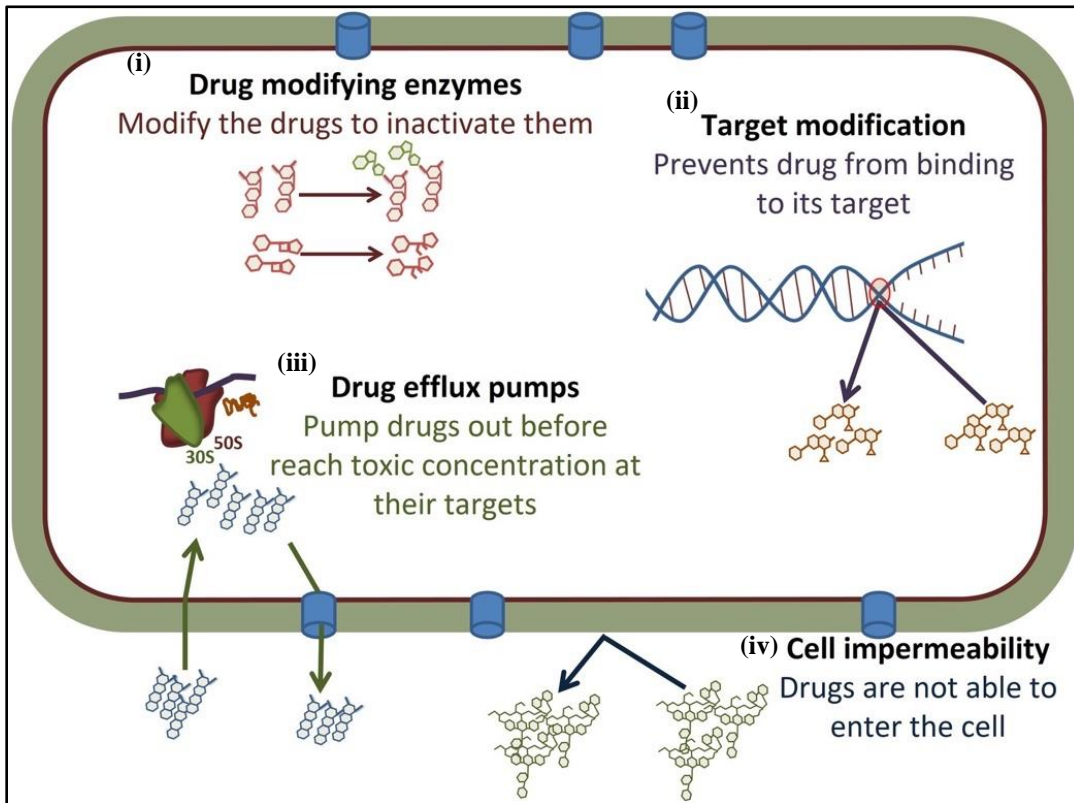


Figure 16. Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. (i) Inactivation de l'antibiotique ; (ii) Modification de la cible ; (iii) les pompes à efflux ; et (iv) la prévention de l'entrée de l'antibiotique (Algarni *et al.*, 2022).

2.1.3.1 Inactivation de l'antibiotique

Ce mécanisme consiste en la production d'enzymes capables d'inactiver l'antibiotique par hydrolyse ou par transfert de groupes (Iredell *et al.*, 2016).

A titre d'exemples, les enzymes β -lactamases hydrolysent le cycle β -lactame provoquant ainsi la dégradation et l'inactivation complète des antibiotiques β -lactamines. Tandis que, les enzymes transférases sont capables de transférer des groupes adényle, phosphoryle ou acétyle aux molécules d'antibiotiques tels que les aminoglycosides, les macrolides, le chloramphénicol et autres. De cette façon, les bactéries obtiennent une résistance car l'antibiotique modifié est inactivé, et donc incapable de se lier à la cible (Iredell *et al.*, 2016).

2.1.3.2 Modification de la cible

La modification de la cible est un mécanisme de résistance aux antibiotiques très efficace chez les bactéries qui se produit par mutations qui provoquent des changements significatifs dans les sites de liaison et empêchent l'affinité entre l'antibiotique et la cible.

C'est le cas des mutations du domaine actif des enzymes PLP (la cible des β -lactamines), des mutations dans les sous-unités (30S et 50S) du ribosome (la cible des tétracyclines, aminoglycosides et des macrolides) et des mutations dans l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (la cible des quinolones) (**Irfan et al., 2022**).

2.1.3.3 Les pompes à efflux

Les pompes à efflux sont des protéines membranaires utilisées par les bactéries pour expulser à l'extérieur différents types de molécules telles que les composés toxiques et les antibiotiques. Différentes familles de pompes à efflux ont été identifiées chez les bactéries, certaines sont spécifiques à un substrat, tandis que d'autres peuvent transporter une gamme de molécules structurellement différentes (**Webber & Piddock, 2003**).

2.1.3.4 Prévention de l'entrée de l'antibiotique

La majorité des antibiotiques doivent pénétrer l'enveloppe cellulaire bactérienne, en utilisant différentes voies, pour atteindre leurs cibles intracellulaires. Plusieurs études ont démontré que des mutations qui affectent la composition lipidique ou protéique de l'enveloppe cellulaire, comme les LPS ou les porines, diminuent la perméabilité des antibiotiques (**Delcour, 2008 ; Ghai & Ghai, 2018**).

3. La résistance aux antibiotiques chez les *Enterobacteriaceae*

3.1 Généralités sur les *Enterobacteriaceae*

La famille des *Enterobacteriaceae* constitue un groupe hétérogène d'un grand nombre d'espèces et sous-espèces bactériennes, appartenant à plus de 50 genres, qui partagent les propriétés suivantes : ce sont des bactéries à Gram-négatif, en forme de bâtonnets, anaérobies facultatifs, non sporulant, ont des métabolismes respiratoires et fermentaires, sont mobiles grâce à des flagelles péritriches ou non mobiles, réduisent le nitrate en nitrite, et produisent de la catalase mais ne produisent pas d'oxydase (Octavia & Lan, 2014).

Le principal habitat de la plupart de ces organismes est le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux, ils sont aussi détectés dans l'environnement, y compris les eaux, les sols et les plantes (Figure 17) (Janda & Abbott, 2021).

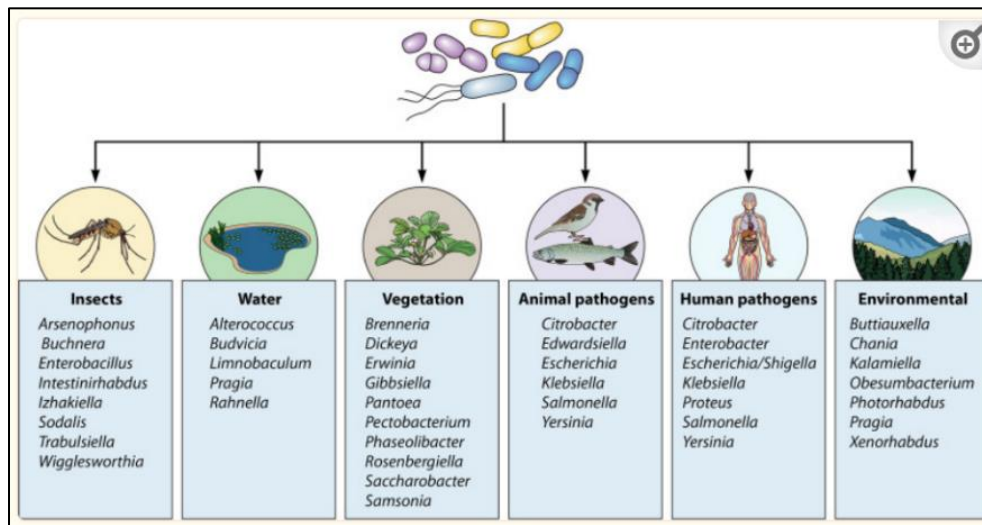


Figure 17. Représentation des principaux genres d'entérobactéries associés à divers écosystèmes (Janda & Abbott, 2021).

En plus d'être commensaux, ces bactéries causent diverses maladies intra-intestinales et extra-intestinales chez les humains et les animaux, dont le spectre varie entre mineurs, telles que les maladies diarrhéiques, aux sévères telles que les infections des voies urinaires, les bactériémies, la méningite, la pneumonie et la septicémie, avec des taux élevés de morbidité et de mortalité (Denton, 2007 ; Peleg & Hooper, 2010). Cette variabilité du potentiel de pathogénicité est le reflet de la présence, ou l'absence, d'un grand nombre de facteurs de

virulence spécifiques qui jouent un rôle dans les différents processus pathologiques (**Yu et al., 2021 ; Kim et al., 2022**).

Les entérobactéries sont aussi la première cause de maladies d'origine alimentaire dans le monde et sont également responsable de plusieurs maladies zoonotiques (**Mao et al., 2003 ; Abebe et al., 2020**). De plus, elles sont parmi les plus importantes causes d'infections nosocomiales, particulièrement chez les patients âgés et ceux qui sont immunodéprimés.

En milieu hospitalier, les principales voies de transmission de ces bactéries sont les surfaces, les équipements médicaux contaminés et les mains du personnel hospitalier (**Mayer & Zinner, 1985 ; Weinstein et al., 2005**).

Les genres de cette famille d'importance médicale, et qui sont fréquemment associés à des infections, sont *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* et *Yersinia* (**Forsythe et al., 2015**).

En raison de leur résistance croissante aux antibiotiques, les membres de la famille des *Enterobacteriaceae* figurent parmi les bactéries qui représentent la plus grande menace pour la santé humaine. L'émergence et la propagation rapide de la résistance acquise aux antibiotiques chez les *Enterobacteriaceae*, qui est en constante augmentation, est multifactorielle, dont les contributeurs clé sont (i) l'utilisation abusive et inappropriée des antibiotiques, (ii) la capacité des *Enterobacteriaceae* à coloniser différents environnements, y compris l'intestin des humains et des animaux, ainsi que d'être facilement transmis via la voie féco-orale, a fourni à ces organismes l'avantage sélectif de facilement acquérir des déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques à partir d'autres bactéries et de son environnement, via des plasmides, des transposons, des bacteriophages ou d'autres éléments de génétiques mobiles (**Muylaert & Mainil, 2013; Wyres & Holt, 2018**).

Actuellement, les infections causées par les *Enterobacteriaceae* résistantes aux antibiotiques sont considérées comme un problème majeur de santé publique dans le monde (**Iredell et al., 2016**).

3.2. Résistance des *Enterobacteriaceae* aux β -lactamines

Les *Enterobacteriaceae* développent une résistance aux β -lactamines en utilisant un, ou plus, des quatre mécanismes majeurs, les pompes à efflux, la perméabilité réduite, la modification de la cible (les enzymes transpeptidases, PLP) ou par l'inactivation de l'antibiotique par des β -lactamases. Ces mécanismes peuvent agir seuls ou en combinaison pour produire une résistance à un antibiotique particulier (Wilke *et al.* 2005). En général, les modifications des PLP et les pompes à efflux jouent des rôles mineurs dans la résistance des *Enterobacteriaceae* aux β -lactamines. Par contre, l'inactivation enzymatique des β -lactamines par des β -lactamases est le mécanisme de résistance le plus prédominant chez les *Enterobacteriaceae*.

3.2.1 Les β -lactamases

Les enzymes β -lactamases, qui hydrolysent le cycle β -lactame commun à la famille des β -lactamines (Figure 18), constituent le mécanisme de résistance le plus important chez les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* (Tooke *et al.*, 2019).

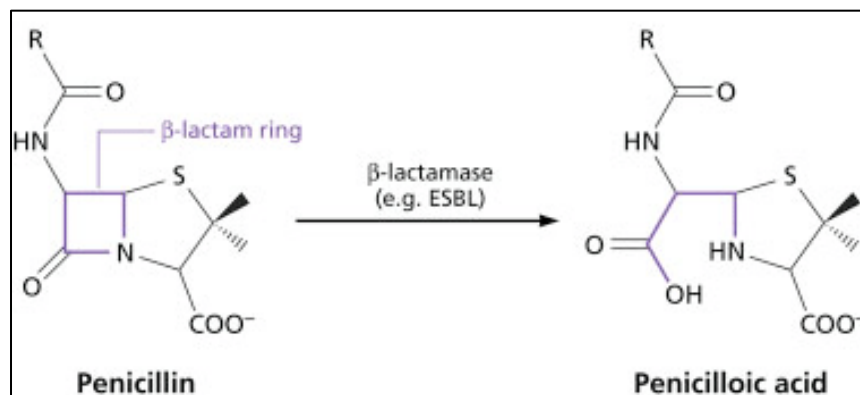


Figure 18. Réaction d'hydrolyse du cycle β -lactame de la pénicilline par une enzyme β -lactamase (Harris, 2015).

Il existe une grande variété d'enzymes β -lactamases chez les *Enterobacteriaceae*, qui diffèrent par leur composition en acides aminés, par le nombre et les types de β -lactames qu'ils peuvent inactiver. Selon la dernière mise à jour du 26 Décembre 2021, de la base de données sur les β -lactamases (www.bldb.eu, Naas *et al.*, 2017), il existe 7371 enzymes de ce type qui ont subi divers degrés de caractérisation.

Les β -lactamases ont été classées de deux manières, la première classification est la classification d'Ambler, basée sur la structure moléculaire des β -lactamases (Ambler, 1980), tandis que la classification de Bush-Jacoby-Medeiros est basée sur les caractéristiques fonctionnelles des β -lactamases (Figure 19) (Bush *et al.*, 1995).

Dans la classification d'Ambler, les β -lactamases sont regroupées en quatre classes A, B, C et D. Les β -lactamases des classes A, C et D utilisent une sérine comme le site actif de l'enzyme, tandis que les β -lactamases de la classe B utilisent le métal zinc (Sawa *et al.*, 2020).

Dans la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros, les β -lactamases sont classées en groupes 1 à 3 en fonction de la dégradation des substrats de β -lactame et des effets des inhibiteurs. Le groupe 1 comprend les céphalosporinases qui sont classées dans la classe C sur la base de la classification structurelle. Le groupe 2 comprend les β -lactamases autres que celles du groupe 1 ayant une sérine dans le centre actif et comprend à la fois les classes A et D selon la classification structurelle. Le groupe 3 comprend les métallo- β -lactamases et correspond à la classe B de la classification structurelle (Figure 19) (Sawa *et al.*, 2020).

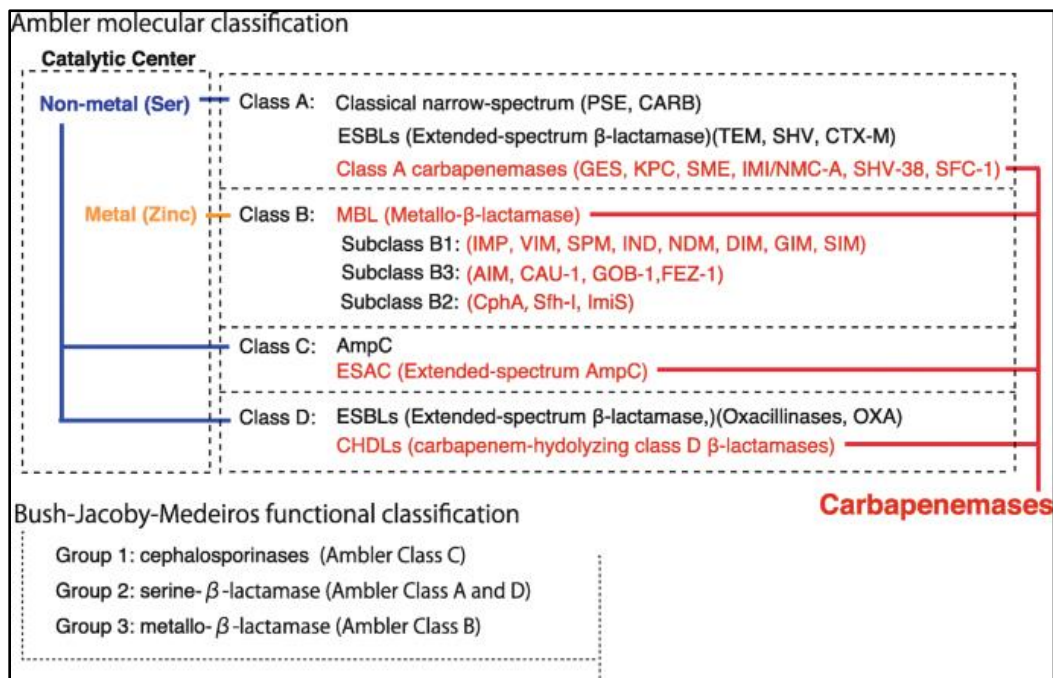


Figure 19. La classification des β -lactamases. Classification structurelle selon Ambler et classification fonctionnelle selon Bush-Jacoby-Medeiros (Sawa *et al.*, 2020).

Quatre grands types d'activités β -lactamases peuvent être distingués sur la base des caractéristiques moléculaires et fonctionnelles : les β -lactamases à spectre élargi (BLSE), les céphalosporinases de classe C (AmpC), les carbapénémases et les pénicillinases (**Bush, 2010**).

3.2.1.1 Les BLSE

Les BLSE sont définies comme des β -lactamases qui inactivent, par hydrolyse, la pénicilline, les céphalosporines de première, deuxième, troisième génération et les monobactames, mais sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases tels que l'acide clavulanique, le sulbactame et le tazobactame (**Castanheira et al., 2021**).

Les BLSE, avec leur potentiel croissant d'associations avec des éléments génétiques mobiles d'origine plasmidique, constituent la cause la plus répandue de résistance aux β -lactamines parmi les entérobactéries (**Ghafourian et al., 2015**).

Les BLSE ont été détectées pour la première fois en 1983 chez *Klebsiella pneumoniae*, et depuis lors, ont été observés dans le monde entier. Actuellement, environ 200 BLSE ont été décrites (**Ghafourian et al., 2015**). Elles sont regroupées en différentes classes : classe A (ex :TEM, SHV, CTX-M), classe C (ex :ADC) et classe D (ex :OXA) (**Castanheira et al., 2021; Mlynarcik et al., 2021**). Les groupes de BLSE les plus importants, sont de loin les enzymes CTX-M, suivit par les SHV et les TEM (**Ghafourian et al., 2015**).

La grande majorité des BLSE sont des enzymes d'origine plasmidique, acquises par transfert horizontal, et sont plus fréquemment rencontrées chez *E. coli* et *K. pneumoniae*. La prévalence des BLSE, qui est en augmentation, dépend de plusieurs facteurs, notamment l'espèce bactérienne, la localité géographique, l'hôpital/le service, le groupe de patients et le type d'infection, et de grandes variations ont été rapportées dans différentes études (**Ghafourian et al., 2015**).

Les BLSE de type TEM

Les BLSE de type TEM (du nom d'un patient Grec, Temoneira, d'où elle a été isolée) sont des dérivés, par mutations de la première β -lactamase plasmidique connue, TEM-1, qui a été décrite au début des années 1960 (**Medeiros., 1984**) (**Figure 20**), qui se sont propagés à l'échelle mondiale chez plusieurs espèces bactériennes.

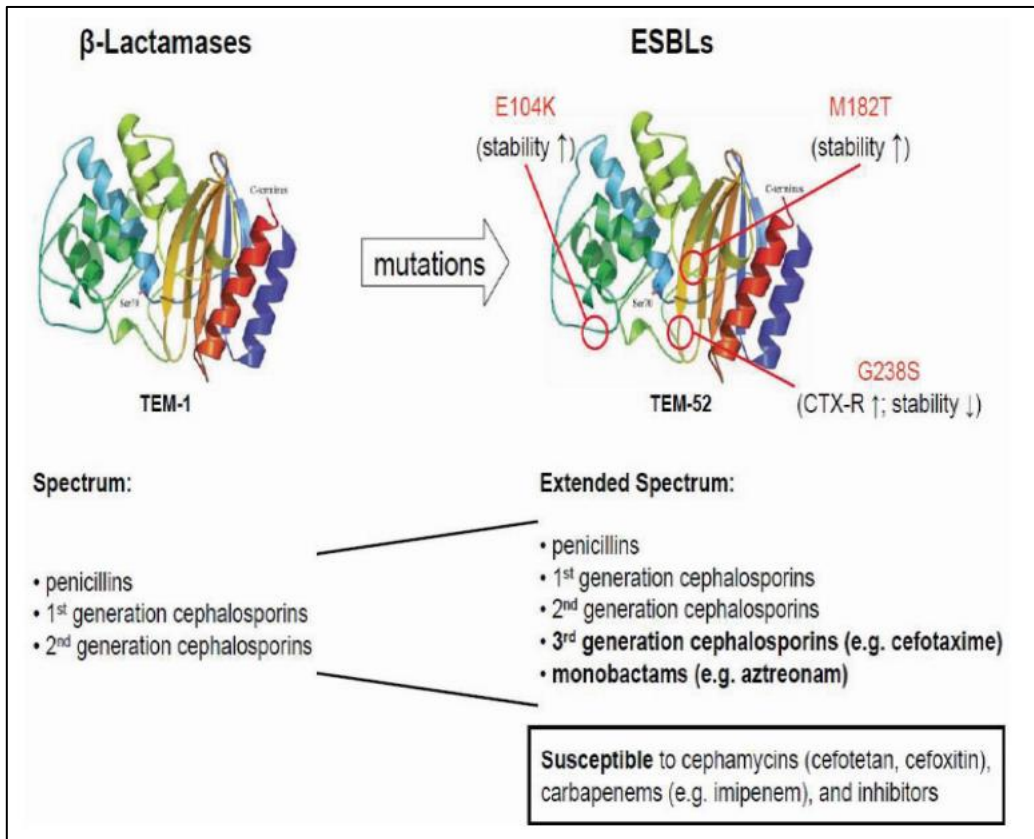


Figure 20. Substitution d'acides aminés dans la β-lactamase TEM-1 non BLSE pour donner la BLSE TEM-52 (Ghafourian *et al.*, 2015).

Le premier dérivé de TEM, TEM-2, diffère de TEM-1 par substitution d'un seul acide aminé (Gln39Lys). TEM-2 a ensuite servi comme le progéniteur pour de nombreuses BLSE de type TEM. La première variante de type TEM qui a montré le phénotype BLSE était TEM-3, qui a été signalée en 1989 (Figure 21). A ce jour, il existe de nombreux dérivés de TEM (environ 243), bien que tous ne soient pas des BLSE (Castanheira *et al.*, 2021).

A noter que certains dérivés de TEM (environ 24), qui ne sont pas des BLSE, présentent une diminution de sensibilité aux inhibiteurs de β-lactamases, et sont désignées TRI (pour TEM Résistantes aux Inhibiteurs) (Ghafourian *et al.*, 2015).

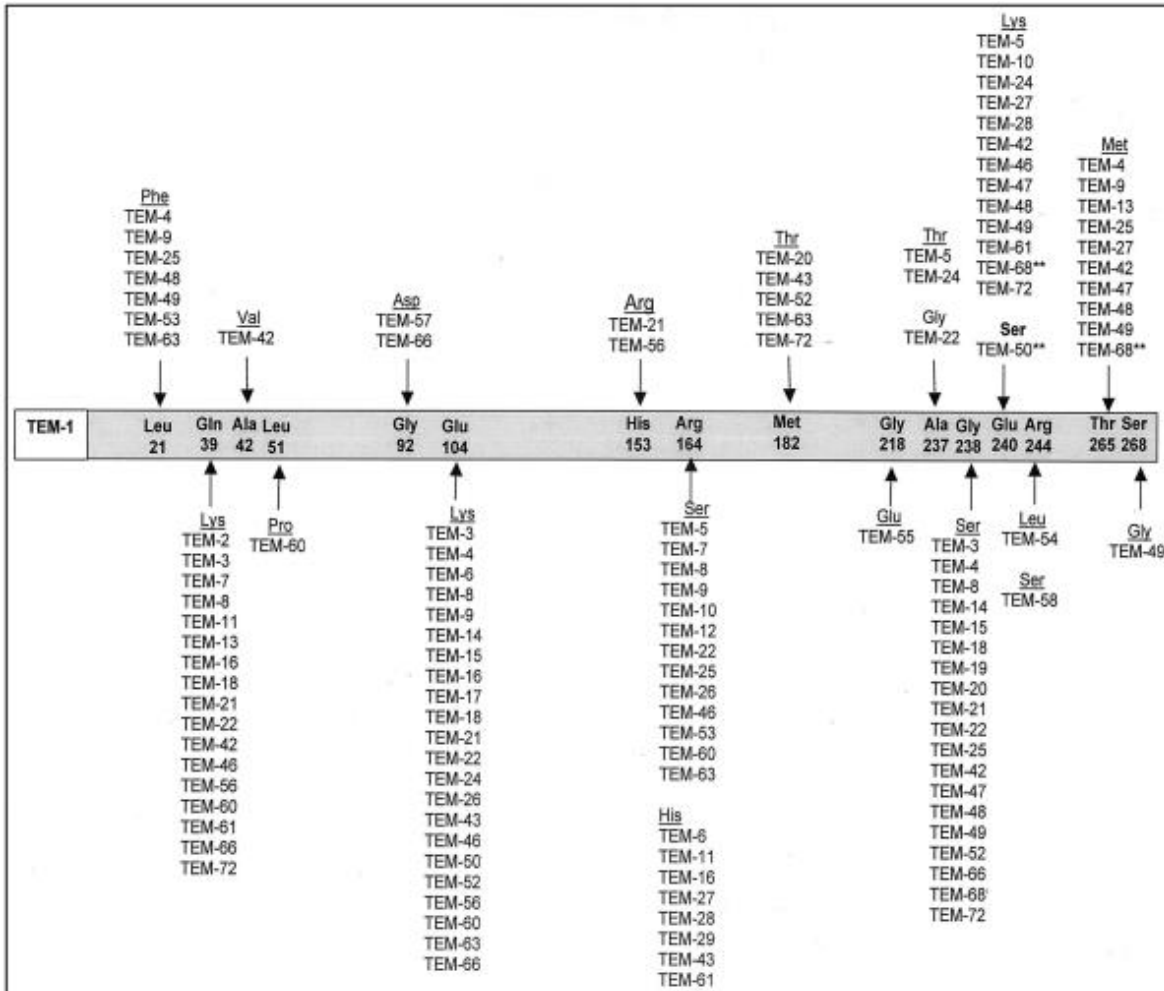


Figure 21. Les enzymes de type TEM. Les acides aminés répertoriés dans la barre grise sont ceux trouvés dans le gène de structure de TEM-1. Les substitutions trouvées dans les dérivés BLSE de type TEM sont indiquées sous les acides aminés de TEM-1. Les variantes de type TEM peuvent contenir plus d'une substitution d'acides aminés. La majorité des TEM représentée sont des BLSE (Bradford, 2001).

Les BLSE de type SHV

La première BLSE (SHV-2, ainsi nommé pour Sulfhydryle Variable) a été décrite en 1985 chez une seule souche de *Klebsiella ozaenae* isolée en Allemagne, qui différait de SHV-1 par une seule substitution d'un acide aminé, de Gly à Ser en position 238 (Kliebe *et al.*, 1985).

À ce jour, 228 SHV variantes ont été détectés, bien que tous n'aient pas été caractérisés fonctionnellement pour déterminer s'ils possédaient le phénotype BLSE (Castanheira *et al.*, 2021) (Figure 22).

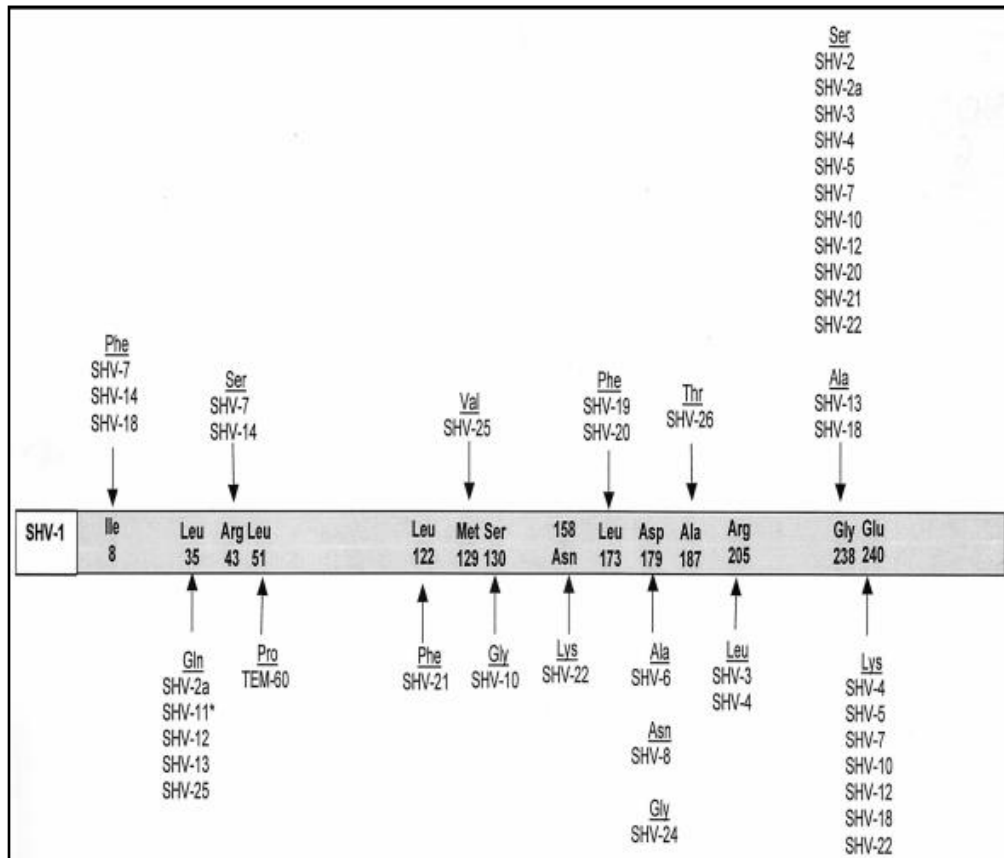


Figure 22. Les enzymes de la famille SHV. Les acides aminés répertoriés dans la barre grise sont ceux trouvés dans SHV-1. Les substitutions trouvées dans les dérivés BLSE de type SHV sont indiquées sous les acides aminés de SHV-1. Les SHV variantes peuvent contenir plus d'une substitution d'acides aminés. La majorité des SHV représentée sont des BLSE (Bradford, 2001).

Les BLSE de type CTX-M

Les BLSE de type CTX-M ont été initialement signalées au début de l'année 1989, simultanément dans plusieurs endroits. La nomenclature CTX-M (céfotaximase de Munich) a été initialement utilisée dans la première publication d'une étude à Munich, Allemagne (Bauernfeind *et al.*, 1990). Depuis l'an 2000, ils se sont propagés dans le monde entier, et chez plusieurs membres des *Enterobacteriaceae*, et sont maintenant devenues le type de BLSE le plus dominant (Castanheira *et al.*, 2021). Il a été suggéré que différents éléments

génétiques peuvent être impliqués dans la mobilisation des gènes de *bla* CTX-M entre les membres des entérobactéries (Cantón & Coque, 2006).

Les CTX-M hydrolysent préférentiellement la céfotaxime par rapport à la ceftazidime (céphalosporines de troisième génération), mais sont inhibées par tous les inhibiteurs de β -lactamase disponibles, y compris les plus récents l'avibactame et le vaborbactame (Drawz et al., 2014).

Contrairement aux autres BLSE, la famille CTX-M constitue un groupe d'enzymes complexe et non homogène. Un alignement des séquences d'acides aminés des différents variantes CTX-M a permis de classer ces enzymes en cinq clusters, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25, dans lesquels les membres du groupe partagent > 94% d'identité (Figure 23) (Bonnet, 2004).

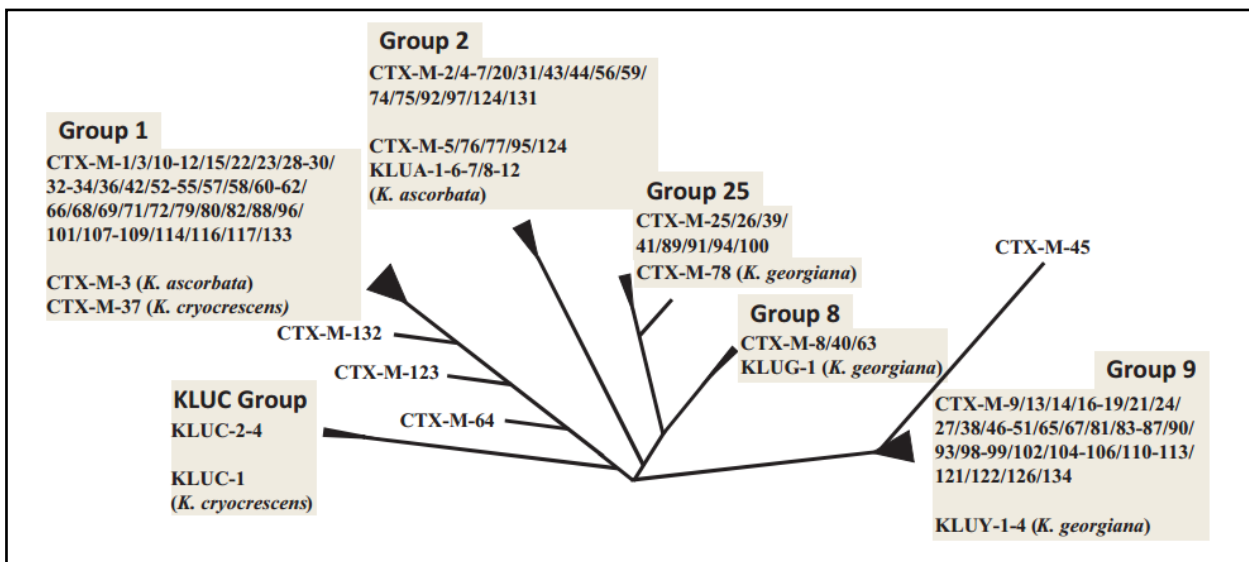


Figure 23. Diagramme d'un arbre phylogénétique montrant les groupes de CTX-M. Les membres des grands groupes, ainsi que les précurseurs putatifs de *Kluyvera spp.* sont indiqués. Les triangles pleins à l'extrémité de certaines branches indiquent la présence de variantes alléliques mineures au sein du groupe correspondant. Quatre variantes de CTX-M présentent une structure hybride, à savoir CTX-M-45 qui est un hybride de CTX-M-14 avec une protéine d'origine inconnue, et CTX-M-64, CTX-M-123 et CTX-M-132 qui sont des hybrides de CTX-M-15 avec différents segments de CTX-M-14 (D'Andrea et al., 2013).

3.2.1.2 Les céphalosporinases de classe C

Les β -lactamases de type AmpC appartiennent à la classe C d'Ambler et au groupe fonctionnel 1 de Bush-Jacoby-Medeiros. Ces enzymes provoquent l'hydrolyse et l'inactivation des céphalosporines, céphamaycines (comme la céfoxitine) et les monobactames (comme l'aztréonam). Ils sont également peu inhibés par le sulbactame et l'acide clavulanique (**Etemadi et al., 2020**).

Le premier variant AmpC, codé par un plasmide, a été identifié chez *K. pneumoniae* isolée en Corée du Sud à partir d'un patient présentant une infection de plaie. Au cours de la décennie suivante, plusieurs variantes AmpC ont été signalées, en particulier chez des isolats cliniques de *K. pneumoniae* et *E. coli* (**Zamorano et al., 2015**). Les gènes codant pour ces β -lactamases sont généralement localisés sur les chromosomes de certaines *Enterobacteriaceae* telles qu'*Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Providencia* spp., *Morganella morganii*, et peuvent être transmis aux plasmides (**Etemadi et al., 2020**).

Les données de plusieurs études de surveillance ont montré que le taux d'isolats d'entérobactéries cliniques producteurs de céphalosporinases est en augmentation (**ECDC, 2020**).

3.2.1.3 Les carbapénémases

Les carbapénèmes sont les antibiotiques les plus puissants et à large spectre, qui sont généralement utilisés pour le traitement des infections bactériennes causées par des bactéries multirésistantes. La résistance aux carbapénèmes est due à la production des enzymes carbapénémases qui hydrolysent les carbapénèmes, les céphalosporines et les monobactames. Les carbapénémases sont une source de préoccupation car elles confèrent une résistance à pratiquement toutes les β -lactamines (**Cui et al., 2019**).

Les carbapénémases appartiennent à trois classes de la classification d'Ambler; classe A, B et D. Les classes A et D sont connues sous le nom de sérine carbapénémases et la classe B sont des métallo β -lactamases (MBL) (**Tableau 1**) (**Nordmann et al., 2012**).

Les premières carbapénémases identifiées chez les *Enterobacteriaceae* étaient SME-1 à Londres en 1982 (**Yang, 1990**) et IMI-1 aux USA en 1984 (**Yang et al., 1990**). Depuis, des *Enterobacteriaceae* productrices de carbapénémases ont été signalées dans le monde entier, principalement suite de l'acquisition généralisée, par transfert horizontale, de gènes de carbapénémase portés sur des plasmides (**Queenan & Bush, 2007**).

Le taux des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes a rapidement augmenté dans le monde, et sont devenues une menace sérieuse pour la santé publique.

Actuellement, l'une des carbapénémases les plus importantes sur le plan clinique est la NDM-1 (New Delhi métallob β -lactamase), récemment décrite. Cette carbapénémase appartient à la classe B de la classification des β -lactamases d'Ambler. En effet, cette enzyme compromet l'efficacité de la quasi-totalité des β -lactamines (sauf l'aztréonam), y compris les carbapénèmes de dernier recours (Nordmann *et al.*, 2012).

Tableau 1. Principales carbapénémases chez les *Enterobacteriaceae* (Nordmann *et al.*, 2012).

Classe d'Ambler	Nom de l'enzyme	Plasmide/ chromosome	Spectre	d'activité					Inhibiteur
				pénicilline	C1G	C2G	C3G	aztreonam	
A	SME 1 à 3	chromosome	++	++	-	+	+	+	Clavulanate,
	NMC-A	chromosome	++	++	-	+	-	++	Tazobactam,
	IMI-2	Plasmide	++	++	-	+	-	++	Sulbactam,
	GES-4,-5,-6	Plasmide	++	++	+	+	-	+	NXL-104
	KPC-2 à -12	Plasmide	++	++	-	++	+	++	Clavulanate, Tazobactam, Sulbactam, NXL-104
B	IMP-1à -33	Plasmide	++	++	++	++	-	++	EDTA
	VIM-1à -33	Plasmide	++	++	++	++	-	++	
	NDM-1à -6	Plasmide	++	++	++	++	-	+	
	KHM-1	Plasmide	++	++	++	++	-	++	
D	OXA-48	Plasmide	++	++	+L	+L	-	+	NaCL
	OXA-181	Plasmide	++	++	+L	+L	-	+	

3.3 La résistance des *Enterobacteriaceae* aux aminoglycosides

Les aminoglycosides se lient au site de reconnaissance de l'aminoacyl-ARNt (site A) de l'ARNr 16S qui constitue la sous-unité ribosomale 30S, entraînant une inhibition de la synthèse des protéines.

La résistance aux aminoglycosides fait intervenir plusieurs mécanismes (**Figure 23**) : (1) modification et inactivation des aminoglycosides par des enzymes modifiant les

aminoglycosides (EMA), y compris des aminoglycosides acétyltransférases (AAC), des aminoglycosides nucléotidyltransférases (ANT) et des aminoglycosides phosphotransférases (APH); (2) pompe à efflux; (3) perméabilité réduite; et (4) modifications par méthylation post-transcriptionnelle de l'ARNr 16S par diverses ARNr 16S méthyltransférases (16S-RMTases), ou par mutations ponctuelles du gène *rpsL* codant pour la protéine ribosomique S12 (**Figure 24**) (**Garneau-Tsodikova & Labby, 2016**).

Parmi ces mécanismes, l'inactivation des aminoglycosides par les EMA, est le plus commun. Chaque enzyme EMA modifie l'aminoglycoside à une position bien précise. La nomenclature des AME est composée d'un code de trois lettres pour identifier l'activité (AAC, APH, ANT), suivi d'un nombre entre parenthèses qui spécifie le site de modification (par exemple, 3, 6', 3') et d'un chiffre romain qui décrit, si elle est présente, l'isoforme (par exemple, I, IIa) (**Figure 25 et Tableau 2**) (**Kotra *et al.*, 2000 ; Garneau-Tsodikova & Labby, 2016**).

Les EMA sont souvent portés sur des plasmides, qui portent aussi d'autres gènes de résistance, dont les BLSE (**Garneau-Tsodikova & Labby, 2016**).

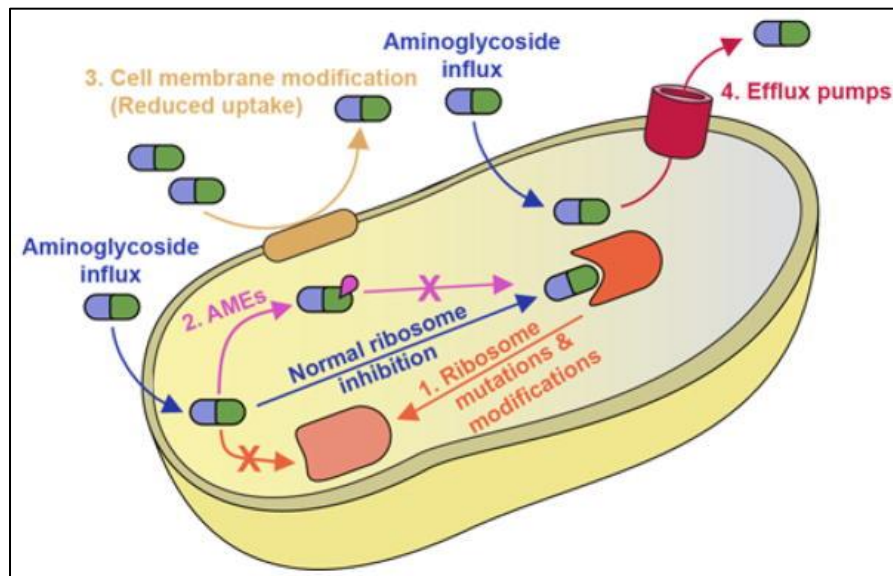


Figure 24. Présentation schématique des mécanismes de résistance aux aminoglycosides (**Garneau-Tsodikova & Labby, 2016**).

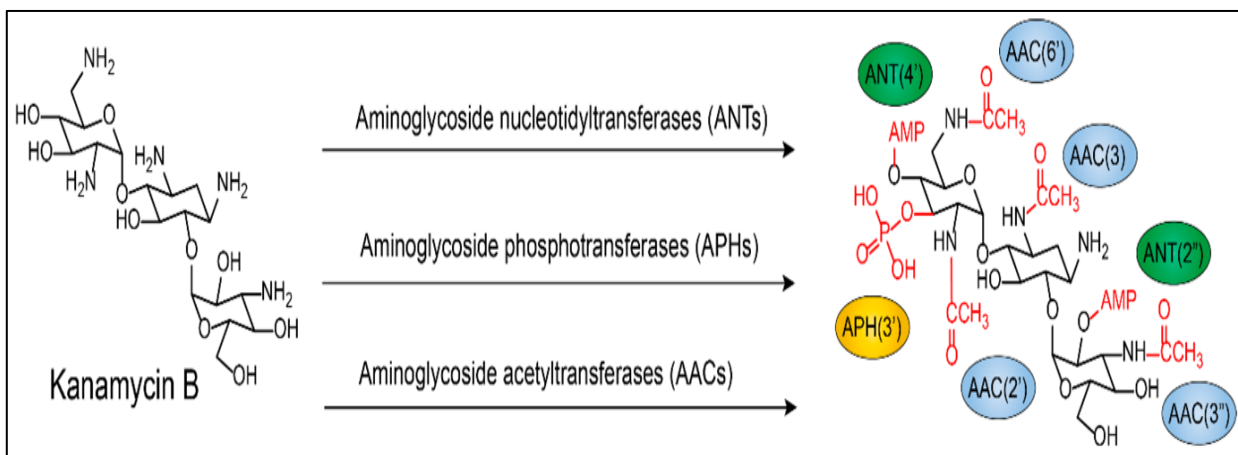


Figure 25. Sites de modification sur la kanamycine B par divers enzymes modifiant les aminoglycosides. Les flèches indiquent les sites de modification par les enzymes spécifiques, à savoir les acétyltransférases (AAC), les nucléotidyltransférases (ANT) et les phosphotransférases (APH) (Liu *et al.*, 2018).

Tableau 2. Exemples de quelques enzymes modifiant les aminoglycosides (adapté de Shaw *et al.*, 1993).

Enzymes	Gènes	Antibiotique modifié
Acétyltransférases		
AAC(3)-I	<i>aac(3)-Ia</i> <i>aac(3)-Ib</i>	Gentamicine
AAC (3)-IV	<i>aac(3)-IVa</i>	Gentamicine, tobramycine
AAC (6')-I	<i>aac(6')-Ia</i> <i>aac(6')-Ib</i> <i>aac(6')-Ic</i>	tobramycine, amycacine
Nucléotidyltransférases		
ANT (2'')-I	<i>ant (2'')-Ia</i> <i>ant (2'')-Ib</i> <i>ant (2'')-Ic</i>	Gentamicine, tobramycine, kanamycine
Phosphotransférases		
APH (2'')-I	<i>aph(2'')-Ia</i>	Gentamicine, tobramycine, amycacine

La modification post-transcriptionnelle par méthylation de l'ARNr 16S par les enzymes 16S-RMTases est un autre important mécanisme de résistance aux aminoglycosides.

La première 16S-RMTases, ArmA, qui méthyle la position N7 du nucléotide G1405 dans l'ARNr 16S, a été signalée relativement récemment (au début des années 2000) chez *K. pneumoniae* (Galimand *et al.*, 2003).

Depuis, un certain nombre d'enzymes, toutes effectuant la même modification de G1405, ont été signalées dans diverses espèces à Gram négatif, notamment ArmA, RmtA, RmtB, RmtC,

RmtD, RmtE, RmtF, RmtG et RmtH (Galimand *et al.*, 2003). De nombreuses études ont signalé que les RMTases sont fréquemment associées aux carbapénémases et aux BLSE de type CTX-M (Garneau-Tsodikova & Labby, 2016).

3.4 La résistance des *Enterobacteriaceae* aux fluoroquinolones

Les cibles des fluoroquinolones sont l'ADN gyrase (topoisomérase II) et la topoisomérase IV bactériennes, qui sont des enzymes essentielles impliquées dans des processus cellulaires clés, notamment la réplication de l'ADN.

La résistance aux FQ fait intervenir plusieurs mécanismes codés sur le chromosome ou les plasmides (Figure 26) (Aldred *et al.*, 2014).

En termes de mécanismes chromosomiques, des mutations dans les protéines cibles GyrA (la gyrase) ou ParC (la topoisomérase IV) ou dans les transporteurs à efflux, peuvent conférer une résistance aux quinolones (Figure 26) (Aldred *et al.*, 2014).

La figure 27 montre les différents acides aminés de l'ADN gyrase (GyrA et GyrB) et de la topoisomérase IV (ParC et ParE) qui subissent une substitution conférant une résistance aux fluoroquinolones chez *Salmonella* Typhi (Shaheen *et al.*, 2021).

Les déterminants de la résistance aux quinolones d'origine plasmidique fonctionnent selon trois mécanismes distincts, (1) production des protéines Qnr (QnrA, QnrB, QnrC, Qnr D, QnrS et QnrCV), une famille de protéines à pentapeptides répétées, interfèrent avec la liaison des FQ avec la gyrase et la topoisomérase, protégeant ainsi les complexes enzyme-ADN des quinolones (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2007); (2) production de l'aminoglycoside-(6)-N-acétyltransférase codée par le gène *aac(6)-Ib-cr*, qui inactive les quinolones par acétylation (Quiroga *et al.*, 2015); (3) production de transporteurs d'efflux, tels que OqxAB, QepA1, QepA2 et QepA3, contribuent à la résistance aux quinolones en expulsant les antibiotiques des bactéries (Tran & Jacoby, 2002, Xiong *et al.*, 2011).

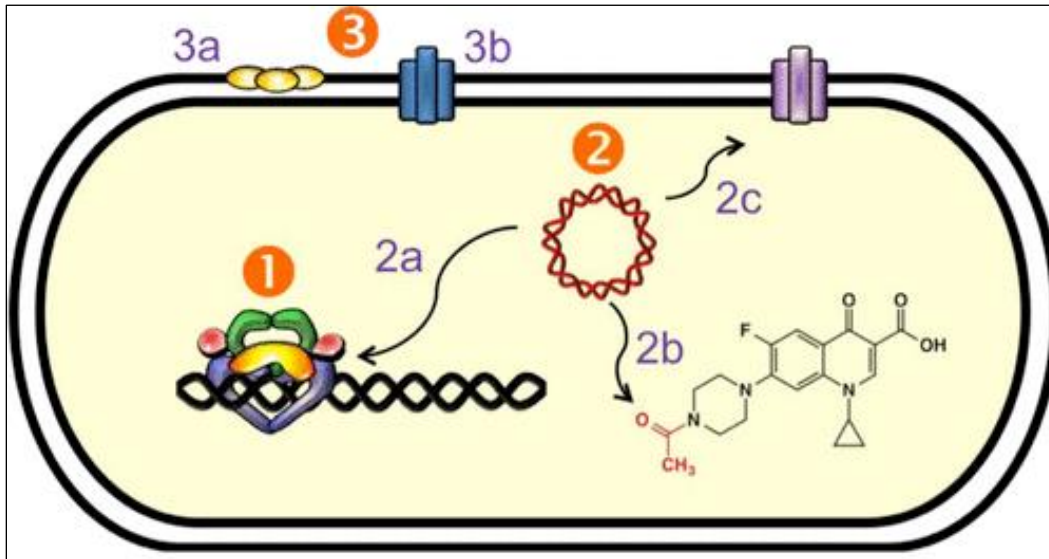


Figure 26. Mécanismes de résistance aux quinolones. (1) **Résistance chromosomique** : par modifications (mutations) des protéines cibles, la gyrase et de la topoisomérase IV, diminuant les interactions quinolone-enzyme. (2) **Résistance plasmidique** : (2a) Les protéines Qnr (jaunes) protègent le complexe enzyme-ADN des quinolones. (2b) Aac(6')-Ib-cr est une aminoglycoside acétyltransférase qui acétyle les fluoroquinolones, diminuant ainsi leur efficacité. (2c) Les pompes à efflux codées par le plasmide diminuent la concentration de l'antibiotique dans la cellule. (3) **Résistance chromosomique** : (3a) La sous-expression des porines chez les espèces à Gram négatif diminue l'entrée des fluoroquinolones. (3b) La surexpression des pompes à efflux codées par les chromosomes expulsant les antibiotiques de la cellule (Aldred *et al.*, 2014).

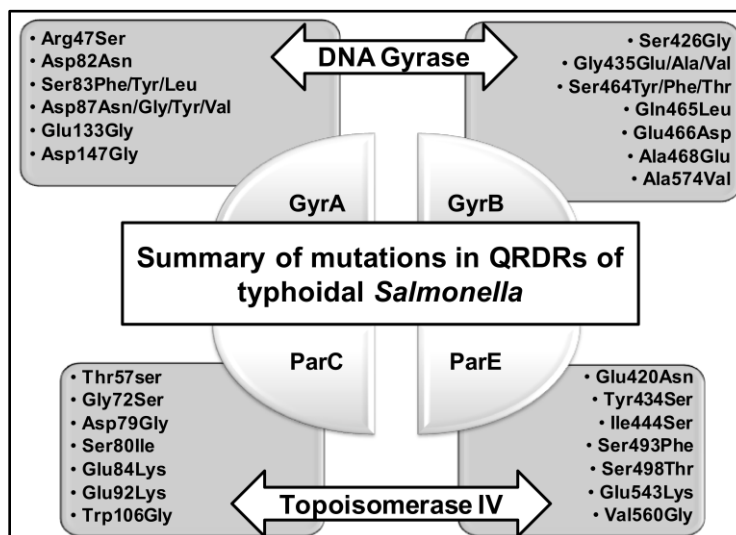


Figure 27. Mutations dans les genes de l'ADN gyrase (GyrA et GyrB) et de la topoisomérase IV (ParC et ParE) chez *Salmonella Typhi* (Shaheen *et al.*, 2021).

3.5 La résistance des *Enterobacteriaceae* aux polymyxines

Les polymyxines sont des peptides cycliques qui interagissent sélectivement avec les groupes phosphate de la partie lipide A des LPS, ce qui entraîne la perturbation de l'intégrité de la membrane et cause la lyse et à la mort cellulaire (**Gogry *et al.*, 2021**).

La résistance des *Enterobacteriaceae* aux polymyxines peut être chromosomique ou plasmidique (**Figure 28**). La résistance chromosomique est due à des mutations, particulièrement dans les gènes *pmrAB* et *phoPQ*, codant pour deux systèmes à deux composants, responsables de la régulation des gènes impliquées dans la modification chimique du LPS via l'ajout du phosphoéthanolamine (pEtN) et le 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) au LPS ; ou dans le gène *mgrB*, un répresseur du gène *phoQ*. Les mutations qui inactivent un ou plus de ces gènes conduisent à l'ajout de groupements cationiques au lipide A, qui affaiblissent la liaison des polymyxines à leur cible principale.

La résistance plasmidique est codée par les gènes *mcr*, qui codent pour l'enzyme pEtN transférase (MCR), impliquée dans la modification du LPS (la cible des polymyxines), par l'addition de pEtN sur le lipide A, diminuant ainsi l'interaction électrostatique entre la colistine polycationique et le LPS anionique (**Liu *et al.*, 2016**).

Le premier gène *mcr-1* a été identifié en 2015 sur un plasmide d'une souche d'*E. coli* (**Liu *et al.*, 2016**). L'année suivante, un deuxième gène, *mcr-2*, a été identifié également sur un plasmide d'*E. coli* (**Xavier *et al.*, 2016**). Jusqu'à présent, neuf variants du gène *mcr* ont été identifiés, *mcr-1* à *mcr-9* (**García-Meniño *et al.*, 2019**).

D'autres stratégies de résistance contre les polymyxines, bien que non spécifiques, sont la surexpression des systèmes de pompe à efflux et la synthèse d'une capsule (**Campos *et al.*, 2004, Padilla *et al.*, 2010**).

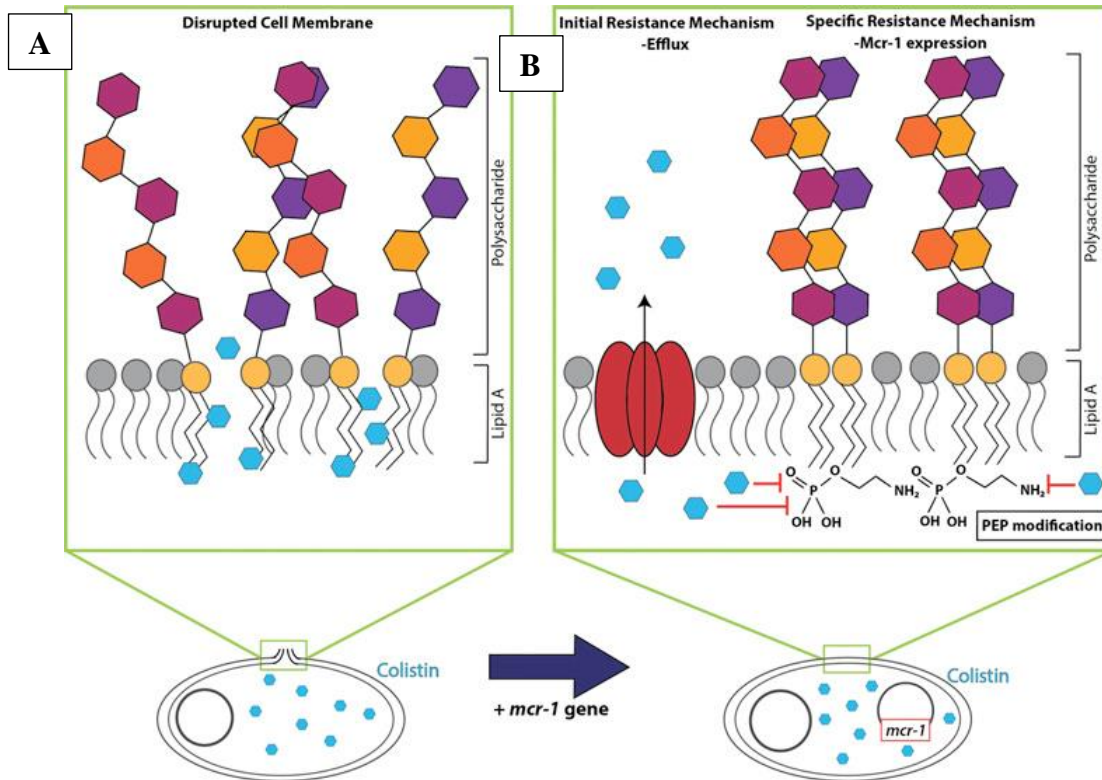


Figure 28. Mode d'action et de résistance de la colistine. (A) L'activité bactéricide de la colistine repose sur la perturbation de la membrane cellulaire bactérienne, initiée par une interaction électrostatique entre la colistine et la partie lipidique A du LPS bactérien. (B) La résistance non spécifique à la colistine est médiée par la régulation transcriptionnelle à la hausse des pompes à efflux. La résistance spécifique à la colistine est facilitée par le gène plasmidique *mcr-1*, codant pour une phosphoéthanolamine transférase, qui modifie le lipide A avec un groupe phosphoéthanolamine (PEP), empêchant l'interaction entre la colistine et le lipide A (Venter *et al.*, 2017).

3.6 La résistance des *Enterobacteriaceae* aux sulfamides et le triméthoprime

La cible des sulfamides, qui est à la base de leur sélectivité, est l'enzyme dihydroptéroate synthase (DHPS) qui catalyse la condensation de l'acide p-aminobenzoïque (PABA) et du 7,8-dihydro-6-hydroxyméthylptérine-pyrophosphate (DHPPP) pour former l'acide dihydroptéroïque, qui est l'avant-dernière étape de la formation de l'acide dihydrofolique (Ovung & Bhattacharyya, 2021).

La résistance bactérienne aux sulfamides est principalement due à des mutations dans le gène *folP* codant pour l'enzyme DHPS, ou par l'acquisition, par transfert horizontal, de gènes plasmidiques de DHPS alternatifs (*sul1*, *sul2*, *sul3* et *sul4*), dont les produits ont une faible affinité pour les sulfamides (Yun *et al.*, 2012 ; Razavi *et al.*, 2017). Ainsi, les gènes

plasmidiques *sul* sont le mécanisme le plus courant de résistance aux sulfamides, ils ont été détectés dans un grand nombre d'espèces bactériennes provenant d'environnements différents (**Phuong Hoa et al., 2008 ; Byrne-Bailey et al., 2009**). Les gènes *sul* sont situés dans les intégrons de classe 1, souvent avec d'autres gènes de résistance (**Urban-Chmiel et al., 2022**).

Les sulfamides sont généralement utilisés seuls, ou en combinaison avec le triméthoprim, un autre antibiotique qui affecte la synthèse de l'acide folique. Cette association sulfamides-triméthoprim présente un effet fortement synergique vis à vis de la plupart des bactéries.

Cependant, les bactéries ont développé aussi une résistance contre le triméthoprim. Cette résistance est déterminée par la présence du gène *dfr* codant pour la dihydrofolate réductase, une enzyme qui n'est pas sensible au triméthoprim (**Ahmed et al., 2010**).

Les gènes *dfr* ont été identifiés fréquemment chez diverses bactéries Gram-négatif, dont *E. coli*. Deux types de gènes *dfr* existent, *dfrA* et *dfrB*. Les deux gènes sont situés dans des intégrons de classe I ou II. Dans le cas d'*E. coli*, la grande majorité des gènes identifiés sont des gènes *dfrA* (**Ahmed et al., 2010**).

3.7 La résistance des *Enterobacteriaceae* aux chloramphénicoles

Le mécanisme le plus commun de résistance au chloramphénicol est l'inactivation enzymatique de l'antibiotique par acétylation, une réaction catalysée principalement par les chloramphénicols acétyltransférases (CATs), codées par les gènes *cat*, qui sont généralement portés sur un plasmide ou un transposon (**Schwarz et al., 2004**).

La résistance au chloramphénicol peut également être due à une mutation dans la cible (l'ARNr 23S), à une modification de la cible par 23S rRNA méthylase, à une diminution de la perméabilité de la membrane externe et à la présence de pompes à efflux (**Schwarz et al., 2004**).

3.8 La résistance des *Enterobacteriaceae* aux tétracyclines

Les tétracyclines sont des antibiotiques à large spectre qui inhibent la synthèse des protéines en empêchant la fixation de l'aminoacyl-ARNt au site accepteur ribosomique (A).

En raison des nombreux avantages des tétracyclines, tels que le faible coût et peu d'effets secondaires, l'utilisation de ces types d'antibiotiques pour le traitement des infections

animales et humaines a beaucoup augmenté. Cela a conduit à l'émergence de bactéries résistantes aux tétracyclines, ce qui a limité leur utilisation (**Grossman, 2016**).

La résistance aux tétracyclines est généralement acquise par quatre principaux mécanismes : les pompes à efflux, inactivation de l'antibiotique par modification, mutation et protection de la cible (**Nguyen et al., 2014**).

Le mécanisme de résistance aux tétracyclines le plus commun est l'expulsion des molécules de tétracyclines de l'intérieur des cellules par un grand nombre de pompes à efflux spécifiques codées par les gènes *tet*, *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, etc, ... (**Tableau 3**). Tet(A) et Tet(B) sont les pompes les plus couramment identifiées chez les isolats cliniques Gram-négatif (**Chopra & Roberts, 2001**).

Tableau 3. Déterminants génétiques de la résistance à la tétracycline (**Nguyen et al., 2014**).

Efflux		Protection ribosomal	Dégradation	Mutations de l'ARNr
<i>tetA</i>	<i>tet31</i>	<i>tetM</i>	<i>tetX</i>	G1058C
<i>tetB</i>	<i>tet33</i>	<i>tetO</i>	<i>tet37</i>	A926T
<i>tetC</i>	<i>tet35</i>	<i>tetQ</i>		G927T
<i>tetD</i>	<i>tet38</i>	<i>tetS</i>		A928C
<i>tetE</i>	<i>tet39</i>	<i>tetT</i>		ΔG942
<i>tetG</i>	<i>tet40</i>	<i>tetW</i>		
<i>tetH</i>	<i>tet41</i>	<i>tetB(P)</i>		
<i>tetJ</i>	<i>tet42</i>	<i>tet32</i>		
<i>tetK</i>	<i>tet45</i>	<i>tet36</i>		
<i>tetL</i>	<i>tetAB(46)</i>	<i>tet44</i>		
<i>tetA(P)</i>	<i>trc3</i>	<i>otrA</i>		
<i>tetV</i>	<i>otrC</i>	<i>tet</i>		
<i>tetY</i>	<i>otrB</i>			
<i>tetZ</i>				
<i>tet30</i>				

Le mécanisme de résistance par inactivation enzymatique de l'antibiotique dépend du gène *tet(X)* et *tet (37)* qui code pour une mono-oxygénase dépendante de la flavine (FMO) qui ajoute un groupe hydroxyle en position C-11a de la tétracycline (**Chopra & Roberts, 2001 ; Diaz-Torres et al., 2003**). En 2019, deux variantes de *tet(X)* codés par plasmide, nommés *tet(X3)* et *tet(X4)*, ont été découvertes chez les *Enterobacteriaceae*. Les plasmides contenant *tet(X3)* et *tet(X4)*, étaient largement dispersés, transférables et stables chez les pathogènes

humains, et conféraient des niveaux de résistance très élevés contre tous les tétracyclines (Sun *et al.*, 2019).

Le mécanisme de résistance à la tétracycline par protection de la cible fait intervenir des protéines de protection du ribosome de la tétracycline (PPR), qui sont des GTPases présentant une similarité de séquence avec les facteurs d'élongation EF-G et EF-Tu. Les protéines PPR catalysent la libération de tétracycline du ribosome. Les PPR les plus courants et les mieux caractérisés sont Tet(O) et Tet(M) (Tableau 3).

Le deuxième mécanisme de résistance à la tétracycline par protection de la cible se produit par des mutations du gène de l'ARNr 16S, qui réduisent l'affinité de liaison de la tétracycline pour le ribosome.

4. Les éléments génétiques mobiles et leurs rôles dans la dissémination des gènes de résistance chez les *Enterobacteriaceae*

4.1 Le transfert horizontal de gènes et les éléments génétiques mobiles

Les pathogènes bactériens peuvent devenir résistants aux antibiotiques soit par mutations dans des gènes préexistants, ou par l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) à partir d'autres bactéries par transfert horizontal de gènes (THG). Les trois mécanismes de THG sont la transformation, la conjugaison et la transduction. Le processus de transfert horizontal de gènes est effectué par l'intermédiaire de différents types d'éléments génétiques mobiles (EGM), y compris les plasmides, les bactériophages, les éléments transposables (les séquences d'insertion (IS) et les transposons) et les intégrons. Le THG est considéré comme le principal mécanisme d'émergence et de propagation des GRA parmi les bactéries pathogènes (Algarni *et al.*, 2022).

4.1.1 Les plasmides

D'une manière générale les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires, double brin et capables de répllication autonome, indépendamment du chromosome.

Plus de 1 000 types de plasmides ont été identifiés dans la famille des *Enterobacteriaceae*. Selon leur mode de transmissibilité, les plasmides sont différenciés en deux classes : (1) les plasmides conjugatifs, qui contiennent tous les gènes nécessaires pour la conjugaison, et donc peuvent être transférés entre les bactéries ; et (2) les plasmides mobilisables, qui ne portent

pas de gènes de conjugaison, mais peuvent être mobilisés (transféré) par conjugaison lorsqu'ils coexistent dans la même cellule avec un plasmide conjugatif.

Les plasmides sont également classés en fonction de l'incompatibilité, défini comme « l'incapacité de deux plasmides appartenant au même groupe Inc à coexister de manière stable sur plusieurs générations dans la même lignée cellulaire bactérienne », de sorte que les plasmides incompatibles entre eux se voient attribuer le même groupe (**Thomas, 2014**). Ce mécanisme a été décrit pour la première fois au début des années 1970 par Datta et Hedges, environ 30 groupes d'incompatibilité de plasmides ont jusqu'à présent été reconnus dans la famille des *Enterobacteriaceae* ; les plus courants sont IncA/C, HI2, HI1, II- γ , X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, T, K, B/O, FI1, U, R, ColE et Q.

Les plasmides jouent un rôle important dans la propagation rapide des gènes de résistances parmi les espèces d'*Enterobacteriaceae*. Une préoccupation particulière, est le rôle que ces plasmides continuent de jouer dans l'émergence et la dissémination des gènes de β -lactamases, en particulier les BLSE.

4.1.2 Les bactériophages

Les bactériophages, virus qui infectent les cellules bactériennes, sont capables de transférer du matériel génétique d'une bactérie à une autre par le processus de transduction.

La transduction se produit au moyen de bactériophages lytiques (virulents) et tempérés. Il existe deux types de transductions, généralisée et spécialisée (**Schneider, 2021**).

La transduction généralisée se produit par un bactériophage lytique qui parfois, lors de l'assemblage des composants viraux, au lieu d'encapsider son propre génome, il encapside par erreur et de façon aléatoire n'importe quelle partie du génome de la bactérie hôte. Le bactériophage peut alors infecter une autre cellule bactérienne et lui transférer le matériel génétique bactérien qu'il a incorporé par erreur, et qui sera ensuite intégré dans le génome bactérien par recombinaison homologue (**Colavecchio et al., 2017**).

La transduction spécialisée n'est réalisée que par un bactériophage tempéré qui subit un cycle lysogénique. Suite à l'induction du cycle lytique, le prophage s'excise du génome bactérien d'une manière inappropriée, emportant avec lui son ADN attaché à un segment du matériel génétique bactérien, avoisinant son site d'insertion. Après l'encapsidation et la lyse, le

bactériophage transfère le segment d'ADN bactérien de la bactérie donneuse à une autre receveuse (**Schneider, 2021**).

4.1.3 Les éléments transposables

Les éléments transposables (ET) sont un groupe d'éléments génétiques mobiles, qui comprend les séquences d'insertion (IS, insertion sequences) et les transposons. Les ET sont capable de s'auto exciser d'un endroit du génome (le chromosome ou le plasmide) et de s'intégrer dans un autre site du même génome. Les ET contiennent au moins un gène qui code pour une transposase (Tnp), qui est nécessaire à leur intégration et à leur excision.

Les ET (Tn et IS) sont généralement transmis entre les espèces bactériennes par plasmides et bactériophages (**Kidwell & Lisch, 2000**).

Les IS

Les ET les plus simples sont les IS, qui sont de petits éléments mobiles (typiquement, < 3 kb), qui portent uniquement le gène qui code pour une transposase (Tnp). Ils sont délimités par des répétitions inversées (IR, inverted repeat), de courtes séquences identiques dans une orientation opposée, désignés IRL (left, gauche) and IRR (right, droite), qui flanquent le gène de la transposase (*tnpA*) (**Figure 29**).

En fonction des similarités entre leur séquences, les IS sont classées en environ 40 familles, telles que IS1, IS2, IS3, IS4, IS5, IS6, IS21, .. (**Ross et al., 2021**).

Traditionnellement, les IS ne portent pas de gènes de résistance, mais ils peuvent le faire quand ils se trouvent comme parties intégrantes de transposons composites, dans lesquels les deux IS flanquent une région d'ADN qui peut porter des gènes de résistance aux antibiotiques (voir ci-dessous).

Les transposons

Les transposons (Tn) ont une structure similaire aux IS, mais portent des gènes supplémentaires, qui peuvent inclure des gènes de résistance aux antibiotiques (**Figure 29**).

Il existe deux principaux types de Tn : les Tn composites (classe I) et les Tn complexes (classe II). Les Tn composites contiennent deux IS, agissant comme des répétitions aux extrémités du Tn, et flanquant une région centrale contenant des gènes supplémentaires, tels que les gènes de résistance (**Figure 29**).

Les Tn complexes (classe II), appelés aussi Tn non-composites, sont constitués d'un gène de transposase (*tnpA*), un gène de resolvase (*tnpR*) et des gènes supplémentaires (fréquemment de résistance), flanqués par de courtes séquences répétées inversées à leurs extrémités (**Figure 29**).

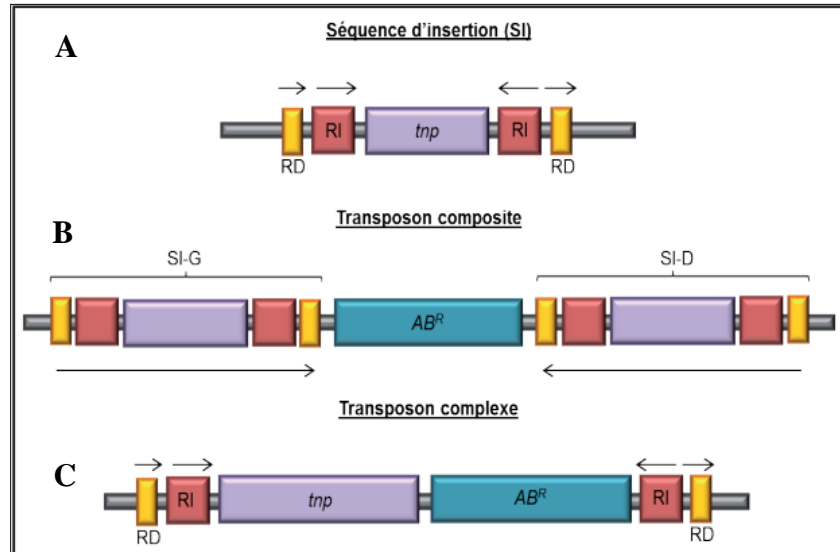


Figure 29. Structure et architecture des éléments transposables (ET). (A) Une séquence d'insertion (IS) ; (B) Un transposon composite ; (C) Un transposon complexe. *tnp* : gène codant pour la transposase, *AB^R* : gène codant pour une résistance à un antibiotique, RI : séquence répétée inversée, RD : séquence répétée directe, SI-G : séquence d'insertion copie gauche, SI-D : séquence d'insertion copie droite (Muylaert & Mainil, 2013).

Une grande diversité de Tn composites (classe I) portant une variété de différents gènes de résistance sont connus chez les *Enterobacteriaceae*, par exemple Tn9 (IS1 ; résistance au chloramphénicol), Tn10 (IS10 ; résistance à la tétracycline), Tn5 (IS50 ; résistance aux aminoglycosides) et Tn6330 (ISAp11), qui est responsable de la mobilisation du gène de résistance à la colistine *mcr-1* (Algarni *et al.*, 2022).

D'autre part, les Tn complexes impliquées dans le mouvement des gènes de résistance, appartiennent généralement à la famille Tn3. Cette famille contient des sous-familles telles que Tn1, Tn2, Tn7, Tn21, Tn501, etc ... (Algarni *et al.*, 2022).

Les transposons peuvent être classés également en transposons conjugatifs (TnC) ou transposons mobilisables (TnM), en fonction s'ils sont capables d'assurer leur propre transfère, par conjugaison, vers d'autres cellules bactériennes (Tansirichaiya *et al.*, 2019).

Les transposons conjugatifs

Les transposons conjugatifs (TnC), également appelés éléments intégratifs et conjugatifs (EIC), sont une classe de transposons qui sont capable de se déplacer non seulement dans l'ADN à l'intérieur d'une cellule, mais aussi entre deux cellules par transfert conjugatif, de la même façon que les plasmides conjugatifs. Contrairement aux plasmides conjugatifs, qui sont autonomes et se répliquent indépendamment du chromosome, les TnC résident dans le génome de cellule bactérienne hôte ; cependant, ils peuvent s'exciser du génome bactérien sous forme d'un élément extrachromosomique circulaire, incapable de se répliquer, mais capable de transfert conjugatif et intégration dans le génome d'une autre cellule hôte (**Partridge et al., 2018**).

Les transposons mobilisables

Les transposons mobilisables (TnM), également connus sous le nom d'éléments mobilisables et intégratifs (EMI), sont des transposons semblables aux TnC, mais sont incapables d'assurer leur propre transfère vers une autre cellule, car ils sont dépourvus de la machinerie de conjugaison. Cependant, ils peuvent être mobilisés (transférés) à une autre cellule, en utilisant la machinerie de conjugaison d'un autre élément conjugatif (plasmide ou TnC) qui réside dans la même cellule (**Guedon et al., 2017**).

4.1.4 Les intégrons

Les intégrons sont des systèmes génétiques de capture et d'expression de gènes exogènes. Ils sont souvent associés à des transposons et peuvent être portés par des plasmides conjugatifs (**Kaushik et al., 2018**).

Les intégrons sont composés de trois éléments essentiels : le gène de l'intégrase (*intI*), un site de recombinaison (*attI*) et un promoteur (Pc). Le gène *intI* code pour une tyrosine recombinase site-spécifique, qui effectue l'intégration et l'excision d'éléments génétiques, appelés cassettes de gènes, au site de recombinaison, *attI*. Ensuite, le ou les gènes intégrés sont exprimés par le promoteur Pc. Les cassettes de gènes sont les parties variables et mobiles d'un intégron. Les caractéristiques générales d'un intégron sont représentées dans la **figure 30** (**Gillings et al., 2015**).

Ce mécanisme d'intégration et d'excision de nouveaux modules (gènes) fonctionnels permet aux bactéries de s'adapter rapidement aux pressions de sélection, y compris l'acquisition de phénotypes de résistance (Gillings *et al.*, 2015).

Actuellement, cinq classes d'intégrons (Class 1, 2, 3, 4 et 5) ont été identifiées sur la base de la structure du gène codant pour l'intégrase. Les intégrons de classe 1 sont les plus dominants, ainsi que la principale source de gènes de résistance, chez les *Enterobacteriaceae* (Tsafnat *et al.*, 2011).

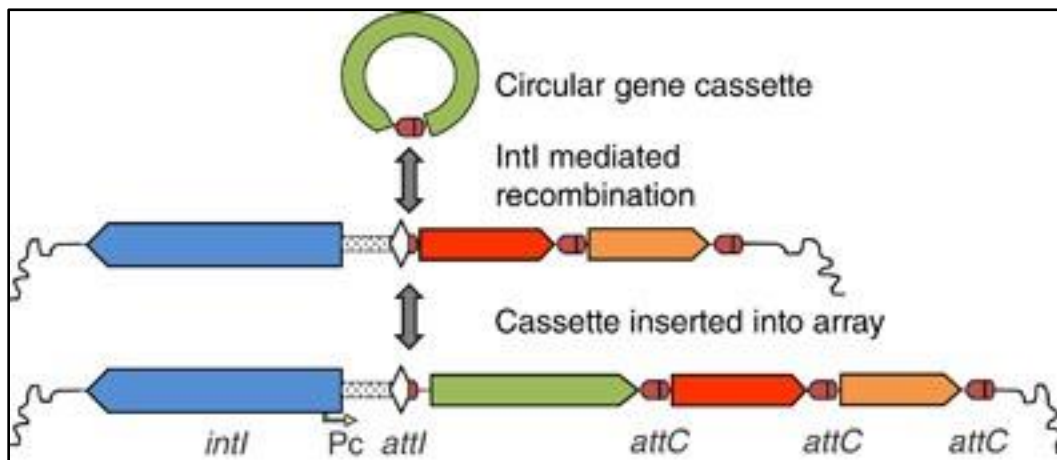


Figure 30. Structure et fonction de l'intégron. Un intégron consiste en un gène d'intégrase (intI), qui catalyse l'intégration des cassettes de gènes circulaires entre le site attC et le site de recombinaison, attI. Cette activité se traduit par l'insertion séquentielle de plusieurs cassettes différentes pour former un ensemble de cassettes en tandem. Les gènes insérés sont exprimés par le promoteur Pc (Gillings *et al.*, 2015).

Les intégrons jouent un rôle important dans l'acquisition et la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques, en raison de leur capacité à incorporer ou à exciser une ou plusieurs cassettes de gènes de résistance. Le recrutement de nouveaux gènes de résistance dans les intégrons est donc une préoccupation majeure. Au cours des deux dernières décennies, l'incidence des intégrons dans les bactéries entériques a considérablement augmenté avec l'évolution de plusieurs cassettes de gènes, de nouveaux arrangements de gènes et d'intégrons chromosomiques complexes (Stalder *et al.*, 2012).

4.1.5 Les îlots génomiques

Les îlots génomiques (IG) sont des régions chromosomiques de grandes tailles (>10 kb), acquis par transfert horizontal, et dont le contenu en G+C est différent par rapport au reste

du chromosome (**Figure 31**) (**Dobrindt et al., 2004; da Silva Filho et al., 2018**). Certains IG peuvent s'exciser spontanément du chromosome et peuvent être transférés à d'autres cellules. En général, les IG ont une structure en mosaïque, contenant des gènes d'éléments génétiques mobiles (de type plasmides, phages, Tn, IS et intégrons) et des gènes accessoires, originaires d'autres bactéries, qui codent pour des protéines aux fonctions diverses, qui confèrent un avantage sélectif aux bactéries, leur permettant de s'adapter à différents environnements (**Juhas et al., 2009**).

Les IG sont largement distribués dans les bactéries pathogènes, non pathogènes et environnementales, et jouent un rôle important dans l'évolution, l'adaptation et la diversification des génomes bactériens, portant des gènes.

Les IG peuvent être divisés en différentes classes selon les fonctions des gènes qu'ils portent : les îlots de pathogénicité (IP), qui contiennent des gènes de virulence ; les îlots de résistance (IR), qui contiennent les gènes qui codent les protéines associées à la résistance aux antibiotiques; les îlots métaboliques (IM), qui portent des gènes codant pour diverses voies métaboliques, et les îlots symbiotiques (IS), qui permettent à une bactérie de former une association mutuellement bénéfique avec un hôte eucaryote (**Figure 31**) (**da Silva Filho et al., 2018**).

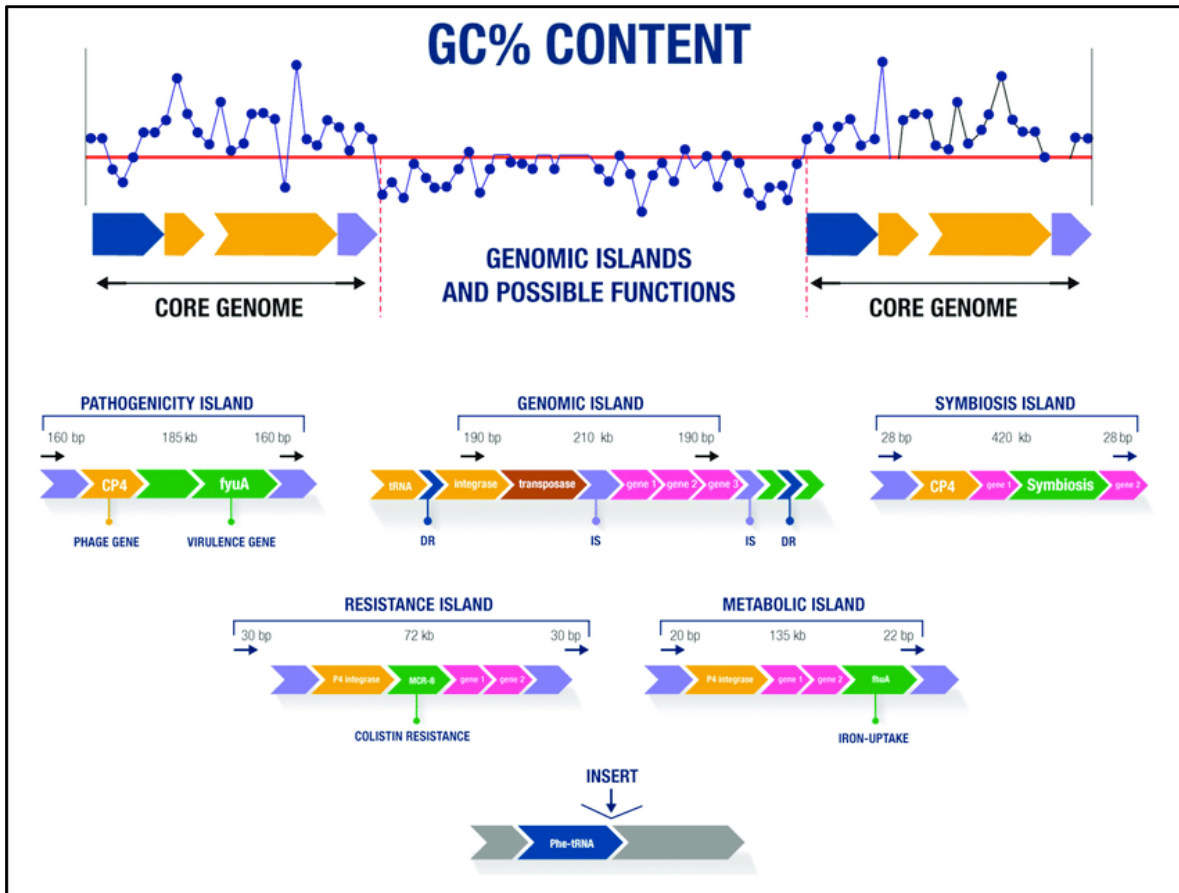


Figure 31. Principales caractéristiques des îlots génomiques et leurs fonctions possibles (da Silva Filho *et al.*, 2018).

L'un des îlots génomiques les plus connus actuellement est l'îlot génomique mobilisable, qui a été identifié en 2000 chez la souche épidémique multirésistante de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium DT104, nommé *Salmonella* îlot génomique 1 (SGI1). Le SGI1, d'une taille de 43 kb, porte à son extrémité 3' un intégron complexe de classe 1 nommé In104, qui confère une résistance à plusieurs antibiotiques (Boyd *et al.*, 2001).

L'îlot génomique SGI1 et ses variants ont été identifiés aussi chez plusieurs espèces (Ahmed *et al.*, 2007 ; Hamidian *et al.*, 2015).

La **Figure 32** illustre les différents mécanismes de transfert horizontal des éléments génétiques mobiles.

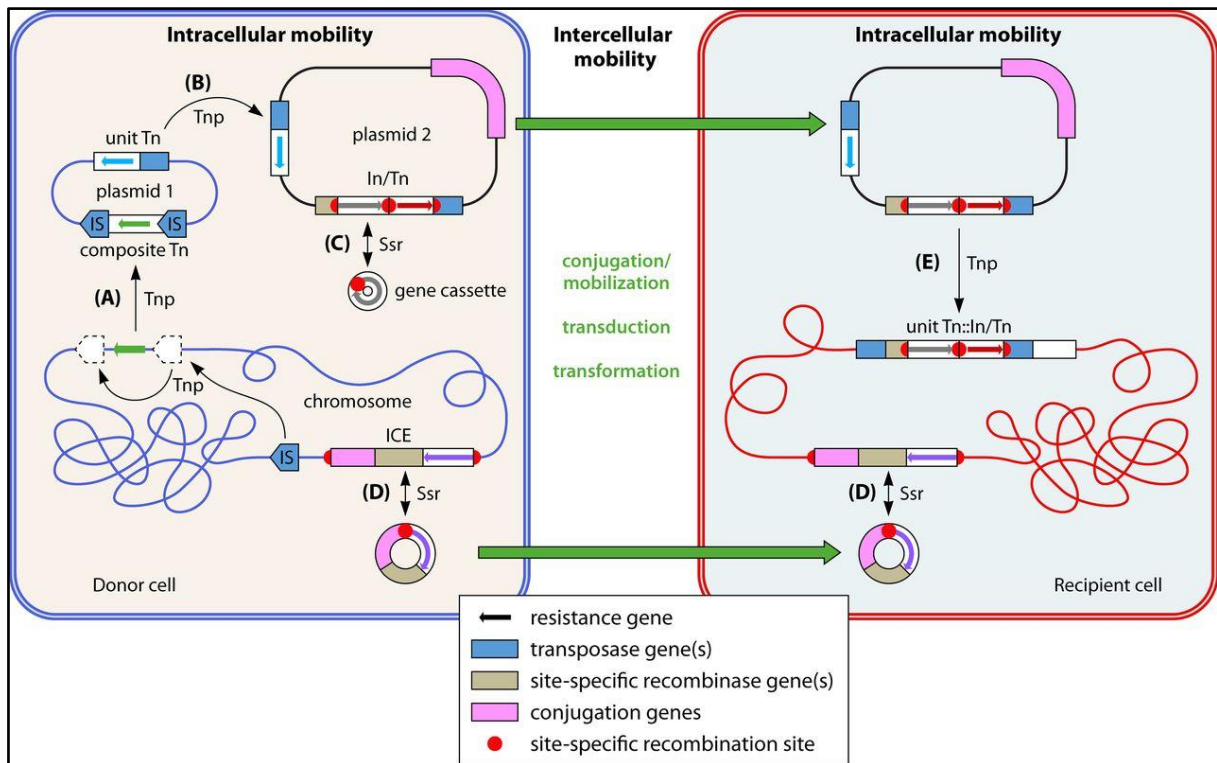


Figure 32. Exemples d'éléments génétiques mobiles (EGM) et des processus impliqués dans la mobilité intracellulaire ou intercellulaire de gènes de résistance aux antibiotiques. Deux cellules bactériennes différentes sont représentées, l'une jouant le rôle de donneur (en bleu) et l'autre de receveur (en rouge). Divers EGM sont présentés, avec les fonctions des gènes qu'ils portent codés par différentes couleurs comme indiqué dans la clé. Différents gènes de résistance associés à différents EGM sont représentés par de petites flèches de différentes couleurs. Les flèches vertes épaisses représentent le transfert horizontal (intercellulaire). **(A)** L'insertion d'un même IS des deux côtés d'un gène de résistance peut aboutir à la formation d'un Tn composite, qui peut se déplacer vers une autre molécule d'ADN (par exemple, du chromosome au plasmide ou vice versa). **(B)** Un Tn portant un gène de résistance peut se transposer entre plasmides, ou du plasmide vers le chromosome ou vice versa. **(C)** Une cassette de gène (forme circulaire) peut s'insérer dans un intégron. **(D)** Un ICE peut s'intégrer dans le chromosome ou s'exciser, sous forme d'un élément circulaire, se transférer par conjugaison vers une cellule réceptrice, et ensuite s'intégrer dans le chromosome. **(E)** Un plasmide est capable d'être soit transféré par lui-même horizontalement par conjugaison ou, s'il lui manque les gènes de conjugaison, peut être mobilisé par un autre plasmide ; comme il est aussi possible qu'il soit transféré horizontalement par transduction ou par transformation. Les Tn, IS et les gènes de résistance portés sur le plasmide peuvent se déplacer dans le chromosome ou dans d'autre(s) plasmide(s) dans la cellule réceptrice (Partridge *et al.*, 2018).

4.2 Les éléments génétiques mobiles associés aux résistances aux antibiotiques chez les *Enterobacteriaceae*

Les mécanismes de transfert horizontal des éléments génétiques mobiles ont joué un rôle important dans la dissémination et la transmission des gènes de résistance aux antibiotiques parmi les populations bactériennes, en général, et parmi les entérobactéries, en particulier. Ces bactéries colonisent le tube digestif des humains et des animaux, qui sert de réservoir important de gènes de résistances, où ils peuvent être facilement transféré entre bactéries par les mécanismes de THG (Ott & Mellata, 2022).

Le rôle spécifique et la contribution des différents éléments génétiques mobiles dans la dissémination et la transmission des gènes de résistance aux antibiotiques parmi les *Enterobacteriaceae* sont détaillés dans les sections qui suivent.

4.2.1 La résistance aux β -lactamines

Le mécanisme le plus courant et le plus important par lequel les *Enterobacteriaceae* peuvent devenir résistantes aux β -lactamines est l'expression des β -lactamases. De nombreuses études ont démontré que la plupart des déterminants génétiques des β -lactamases chez les *Enterobacteriaceae*, en particulier les BLSE de types TEM, CTX-M et SHV, les céphalosporinases de type AmpC et les carbapénémases de type OXA sont fréquemment portés sur des plasmides conjugatifs, transposons ou intégrons (Carattoli, 2009 ; Carattoli, 2011 ; Zhao & Hu, 2013 ; Brolund, 2014 ; Clasen *et al.*, 2019).

D'une manière générale, la plupart des gènes plasmidiques codant pour les β -lactamases sont portés par des plasmides conjugatifs du groupe d'incompatibilité IncF, et sont généralement associés aux intégrons de classe 1 (IntI1), aux transposons de type Tn3 et à différentes IS (IS91, IS5075, IS30, IS3000, IS3, IS19, ISKpn19, IS5075) (Carattoli, 2011 ; Partridge, 2015).

Cependant, d'autres éléments génétiques mobiles sont aussi impliqués dans le portage de gènes de résistance aux β -lactamines. Le gène *bla*_{OXA-48}, par exemple, est associé à différentes variantes du transposon Tn1999, situés sur un plasmide conjugatif IncL (Carattoli *et al.*, 2015 ; Carrer *et al.*, 2010).

Les gènes de la métallo- β -lactamase de New Delhi (*bla*_{NDM}), qui confèrent une résistance à la plupart des β -lactamines, y compris les carbapénèmes, sont associés à des plasmides

appartenant à plusieurs groupes d'incompatibilité, les plus répandus étant IncF, IncFIA, IncFIA/B, IncFIB, IncFI, IncFK et IncX3 (Chowdhury *et al.*, 2022).

Des exemples d'association des gènes codant pour les principaux types et variantes de β -lactamases chez les *Enterobacteriaceae* avec les EGM sont montrés dans le **tableau 4**.

Tableau 4. Principaux types et variantes de β -lactamases chez les *Enterobacteriaceae* (Partridge, 2015).

	Associés à la résistance aux :					
	APP*	C3G	CPM	Variants mineurs	Eléments mobiles	Source
Classe A						
<i>bla</i> TEM	Quelques-uns	Quelques-uns	Non	>200	Tn3-like	Non connue
<i>bla</i> SHV	Quelques-uns	Quelques-uns	Non	>150	IS26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>bla</i> CTX-M-1 group	Non	Oui	Non	53	ISEcp1	<i>Kluyvera ascorbata</i>
<i>bla</i> CTX-M-9 group	Non	Oui	Non	47	ISEcp1, ISCR1	<i>Kluyvera georgiana</i>
<i>bla</i> CTX-M-2 group	Non	Oui	Non	23	ISCR1	<i>Kluyvera ascorbata</i>
<i>bla</i> CTX-M-8 group	Non	Oui	Non	3	ISEcp1	<i>Kluyvera georgiana</i>
<i>bla</i> CTX-M-25 group	Non	Oui	Non	10	ISEcp1	<i>Kluyvera georgiana</i>
<i>bla</i> KLUC	Non	Oui	Non	4	ISEcp1	<i>Kluyvera cryocresens</i>
<i>bla</i> KPC	Non	Oui	(Oui)	21	Tn4401	Non connue
<i>bla</i> GES	Non	Oui	Quelques-uns	26	Gène cassette	Non connue
Classe B						
<i>bla</i> MP-1-like	Oui	Oui	(Oui)	7	Gène cassette	Non connue
<i>bla</i> MP-2-like	Oui	Oui	(Oui)	5	Gène cassette	Non connue
<i>bla</i> MP-4-like	Oui	Oui	(Oui)	3	Gène cassette	Non connue
<i>bla</i> VIM-1-like	Oui	Oui	(Oui)	14	Gène cassette	Non connue
<i>bla</i> NDM	Oui	Oui	Oui	15	ISAba125	Non connue
Classe C						
<i>bla</i> CMY-2-like	Oui	Oui	Non	101	ISEcp1	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>bla</i> DHA	Oui	Oui	Non	23	ISCR1	<i>Morganella morganii</i>
<i>bla</i> CMY-1like/MOX	Oui	Oui	Non	17	ISCR1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>bla</i> ACC	Oui	Oui	Non	5	ISEcp1	<i>Hafnia alvei</i>
<i>bla</i> ACT	Oui	Oui	Non	36	?	<i>Enterobacter asburiae</i>
<i>bla</i> MIR	Oui	Oui	Non	18	ISCR	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>bla</i> FOX	Oui	Oui	Non	12	ISAPu2	<i>Aeromonas caviae</i>
Classe D						
<i>bla</i> OXA-10-like	Oui	Quelques-uns	Non	11	Gène cassette	Non connue
<i>bla</i> OXA-30-like	Oui	Non	Non		Gène cassette	Non connue
<i>bla</i> OXA-48-like	Oui	Non	(Oui)	9	Tn1999	<i>Shewanella</i>
<i>bla</i> OXA-181-like	Oui	Non	(Oui)	2	ISEcp1	<i>Shewanella xiamenensis</i>

* APP : pénicillines anti-pseudomonal (β -lactamine+ inhibiteur de β -lactamase); C3G : céphalosporines de troisième génération; Quelques-uns : résistant aux inhibiteurs ou variants à spectre élargi. CPM : carbapénèmes.

4.2.2 La résistance aux fluoroquinolones

La résistance aux quinolones à médiation plasmidique (PMQR) est conférée par trois principales classes de gènes de résistance ; (i) les gènes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* et *qnrVC1*), qui codent pour des protéines qui protègent l'ADN gyrase et la topoisomérase de type IV contre les fluoroquinolones; (ii) un variant du gène de résistance aux aminoglycosides *aac(6')-Ib*, désigné *aac(6')-Ib-cr*, qui acétyle certaines fluoroquinolones ; et (iii) les systèmes d'efflux *oqxAB* et *qepA*, qui codent pour des transporteurs capables

d'exporter activement des molécules de fluoroquinolones hors de la cellule (**Jacoby et al., 2014**)

4.2.3 La résistance aux aminoglycosides

Les gènes responsables de la production d'enzymes modifiant les aminoglycosides, AAC, ANT et APH, sont localisé soit sur le chromosome, ou le plus souvent sur des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les transposons ou les intégrons. Par exemple, *APH(3')-la* est codé par transposons ; *ant(2)-la* par plasmides ou intégrons et *AAC(3)-la* par plasmides, transposons ou intégrons (**Ramirez & Tolmasky, 2010**).

Les gènes, *armA* et *rmtB*, codant les enzymes 16S RMTase, qui méthylent les aminoglycosides, ont été trouvés associés aux plasmides IncL/M et IncFII, respectivement (**Galimand et al., 2003 ; Galimand et al., 2005 ; Zhou et al., 2022**).

4.2.4 La résistance aux sulfamides

Quatre gènes de résistance aux sulfamides (*sul1*, *sul2*, *sul3* et *sul4*) ont été identifiés sur les plasmides IncFII et IncI1. Le gène *sul1* se trouve comme cassette de gène dans la partie variable des intégrons de classe 1 et coexiste souvent avec d'autres gènes de résistance (**Li et al., 2022**).

Les gènes de résistance au triméthoprime de type A (*dfrA*) et de type B (*dfrB*), codant pour l'enzyme dihydrofolate réductase insensible au triméthoprime, sont localisés sur des intégrons de classe I (**Grape et al., 2005 ; Alonso & Gready, 2006**).

4.2.5 La résistance aux chloramphénicol

Le gène *floR* qui code les pompes d'efflux pour le chloramphénicol et le florfenicol, a été détecté soit sur le chromosome, les plasmides, transposons, les intégrons ou les îlots génomiques chez diverses espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (**Cloekaert et al., 2000 ; Doublet et al., 2005 ; Arcangioli et al., 1999 ; Boyd et al., 2002**).

4.2.6 La résistance à la colistine

Les gènes de résistance à la colistine (*mcr-1* à *mcr-10*), codant pour la phosphoéthanolamine transférase, ont été trouvés sur différents types de plasmides chez les entérobactéries (**Zhang et al., 2019**).

4.2.7 La résistance aux tétracyclines

La plupart des gènes de résistance aux tétracyclines (*tet*) sont généralement associés à des plasmides et/ou des transposons (**Chopra & Roberts, 2001 ; Roberts, 2005**).

4.2.8 Les multirésistances

Il est bien établi que l'accumulation de différents gènes de résistance dans des éléments génétiques mobiles (Tn ou intégrons) qui sont portés par un même plasmide est la cause principale de l'apparition des multi-résistances (**Fluit & Schmitz, 2004 ; Partridge *et al.*, 2018**).

Les plasmides des groupes Inc de types F, I, H (HI1 et HI2), L, C et N sont le plus souvent associés aux multi-résistances (**Partridge *et al.*, 2018**). Parmi les éléments génétiques mobiles, les intégrons de classe 1 (IntI1) sont le type d'intégrons les plus impliqués dans la dissémination des gènes de multirésistance chez les *Enterobacteriaceae*. Les gènes codant pour la résistance à presque toutes les familles d'antibiotiques ont été identifiés dans les intégrons de classe 1 (**Stalder *et al.*, 2012**).

Un grand nombre d'études a révélé les gènes de BLSE se trouvent souvent portés sur des plasmides en association avec des gènes qui confèrent des résistances à d'autres antibiotiques tels que les aminoglycosides, les fluoroquinolones et les sulfamides (**Doi *et al.*, 2016 ; Ruiz *et al.*, 2012**).

Par exemple, le gène de la métallo- β -lactamase de New Delhi (*bla_{NDM}*) coexiste souvent sur les mêmes plasmides avec le gène *armA* ou d'autres gènes codant pour les enzymes 16S-RMTase, notamment *rmtB*, *rmtC* et *rmtF*, qui confère la résistance aux aminoglycosides, (**Doi *et al.*, 2016**). De plus, le gène *bla_{CTX-M-3}* se trouve toujours associé au gène *armA*, sur un plasmide IncL/M. En outre, le gène *bla_{KPC-2}* est co-localisé avec le gène de résistance aux aminoglycosides, *rmtB*, sur un plasmide IncFII. (**Galimand *et al.*, 2005 ; Zhou *et al.*, 2022**).

L'îlot génomique 1 de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium (SGI1) porte un intégron de classe 1, qui a accumulé plusieurs gènes de résistance, conférant une multirésistance aux β -lactamines, au chloramphénicol, à la tétracycline, à la streptomycine et au sulfaméthoxazole (**Beutlich *et al.*, 2011 ; Boyd *et al.*, 2012**).

Le gène de la résistance à la colistine, *mcr*, est souvent co-localisé avec plusieurs gènes de résistance (carbapénémases, BLSE ou PMQR) (Dalmolin *et al.*, 2017; Anyanwu *et al.*, 2020).

5. Méthodes de détection de la résistance aux antibiotiques

La détermination rapide et précise de la résistance ou susceptibilité aux antibiotiques des bactéries est une étape cruciale pour une thérapie antimicrobienne optimale des patients infectés, et qui fournit aussi des informations importantes pour guider les interventions de contrôle des infections et pour les systèmes de surveillance antimicrobienne. La résistance aux antibiotiques peut être détectée par plusieurs méthodes qui peuvent être catégorisées en deux types, les méthodes phénotypiques et les méthodes génotypiques.

5.1 Méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques sont généralement basées sur l'observation de la réponse des bactéries (cultivées en milieu solide ou liquide) en présence d'un agent antimicrobien. Plusieurs méthodes phénotypiques sont disponibles, telles que la méthode de diffusion sur disque, le E-test et les méthodes de dilution en milieu liquide ou solide.

5.1.1. Méthode de diffusion sur disque

La méthode de diffusion sur disque (DD) ou technique de Bauer-Kirby (Bauer *et al.*, 1966) consiste à placer un disque imprégné d'un antibiotique sur une gélose préalablement inoculée avec une suspension bactérienne. L'antibiotique diffuse radialement vers l'extérieur à travers le milieu gélosé, produisant un gradient de concentration d'antibiotique. Après 18-24h d'incubation, le diamètre de la zone d'inhibition formé autour du disque d'antibiotique testé est mesuré. Le résultat obtenu est interprété selon la norme utilisée (CLSI ou EUCAST), et la bactérie est classée comme résistante, intermédiaire ou sensible.

Depuis son développement en 1940, le test de DD demeure le test de routine le plus largement utilisé dans les laboratoires de microbiologie, en raison de son faible coût, de sa facilité d'exécution et de son applicabilité sur de nombreuses espèces bactériennes et d'antibiotiques.

Néanmoins, cette méthode possède certaines limites, particulièrement dans le cas de certains antibiotiques qui ont une mauvaise diffusion dans la gélose, ou des bactéries qui ont une croissance lente, comme les bactéries exigeantes ou anaérobies ; rendant les interprétations des résultats difficile ou erronées (**Galhano *et al.*, 2021**).

5.1.2. Méthode de détermination de la CMI

Ces méthodes permettent de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un antibiotique (c'est-à-dire la concentration la plus faible à laquelle l'agent inhibe la croissance des microorganismes). Les méthodes les plus largement utilisées comprennent la microdilution et la macrodilution en bouillon et la dilution en gélose (**Balows, 1972 ; Wiegand *et al.*, 2008**).

5.1.2.1. La méthode de dilution en milieu liquide

La méthode de dilution en milieu liquide est basée sur la culture de la bactérie en milieu Mueller-Hinton liquide contenant différentes concentrations (obtenues par dilution en série) de l'agent antimicrobien. Après incubation, la CMI est déterminée par inspection visuelle de la turbidité du milieu (**Balows, 1972 ; Wiegand *et al.*, 2008**).

La méthode est appelée macrodilution si le volume minimum est de 2 ml, ou microdilution, si le volume est $\leq 500 \mu\text{l}$ (dans un puit d'une microplaque).

5.1.2.2. La méthode de dilution en milieu solide

La méthode de dilution en gélose consiste à additionner un milieu non sélectif (gélose nutritive ou gélose Mueller-Hinton), avant sa solidification, avec différentes concentrations de l'agent antimicrobien. Ensuite, l'inoculum bactérien standardisé est étalé uniformément sur la surface de la gélose. Après d'incubation, la présence de colonies bactériennes est inspectée visuellement. La plus faible concentration d'antibiotiques qui empêchent la croissance bactérienne est considérée comme la CMI (**Wiegand *et al.*, 2008**).

5.1.2.3. Le E-test

Le E-test ou Epsilometer test est une approche développée à la fin des années 1980 par Bolmström et Eriksson (1988), qui consiste à placer une bandelette imprégnée d'un gradient

continu et prédéfini de concentrations d'antibiotiques sur une gélose ensemencée avec une suspension bactérienne. La CMI de l'antibiotique testé est lue sur la bandelette (marquée par les différentes concentrations) au niveau du point d'intersection entre la zone d'inhibition et la bandelette (**Brown & Brown, 1991**).

5.1.2.4. Méthodes phénotypiques de détection de la production de BLSE

Les tests phénotypiques de détection des BLSE sont basés sur les principales caractéristiques de ces enzymes, à savoir, qu'elles sont capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} (ex. céfotaxime, ceftazidime) et de 4^{ème} génération (ex. céfépime) et les monobactames (aztréonam) ; mais elles sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases, comme l'acide clavulanique (**Drieux et al., 2008**).

Les tests de détection des BLSE disponibles sont le test de synergie en double disque, le test de disque combiné et le E-test BLSE.

Test de synergie en double disque

Le test de synergie, développé par **Jarlier et al. (1988)**, est réalisé en plaçant un disque qui contient une céphalosporine (céfotaxime ou céftriaxone, céftazidime, céfépime), ou un monobactame (aztréonam), et un disque qui contient l'amoxicilline et l'acide clavulanique (un inhibiteur de β -lactamases), positionnés à une distance de 30 mm (centre à centre), sur une gélose ensemencée avec la suspension bactérienne.

Le test est considéré comme positif lorsqu'on constate une augmentation de la zone d'inhibition autour du disque contenant la céphalosporine, en direction du disque d'acide clavulanique, entraînant la formation d'une zone caractéristique en forme de « bouchon de champagne ».

Méthode de disque combiné

Le principe de cette méthode est de mesurer la zone d'inhibition autour d'un disque de céphalosporine (céfotaxime, céftazidime, céfépime) et autour d'un disque de la même céphalosporine plus l'acide clavulanique. Le test est considéré comme positif si le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque avec l'acide clavulanique est ≥ 5 mm plus grand que celui contenant la céphalosporine seule (**Carter et al., 2000**).

E-test BLSE

Les E-tests pour la détection phénotypique de la production de BLSE chez les entérobactéries disponibles sont des bandelettes contenant des gradients de céfotaxime, ou de céftazidime ou de céfépime, seuls (à une extrémité de la bandelette), ou associé l'acide clavulanique (à l'autre extrémité). Le test est considéré comme positif lorsque la valeur de la CMI de l'antibiotique testé est réduite de plus de trois fois en présence de l'acide clavulanique (**Paul et al., 2017**).

5.2. Méthodes moléculaires

Les tests de sensibilité antimicrobienne conventionnels nécessitent une étape de mise en culture de la bactérie, qui peut généralement durer au moins 24 à 48 heures, avant d'obtenir un résultat. De plus, ces tests dépendent fortement des conditions expérimentales, et pour cela, plus d'une méthode sont nécessaires pour obtenir un profil d'antibiorésistance fiable (**Tan, 2003**).

Par contre, les tests moléculaires, qui permettent la détection des gènes de résistance, ainsi que les mutations dans ces gènes, sont comparativement plus rapides que les tests phénotypiques.

La majorité des méthodes moléculaires de détection des gènes de résistance sont basées soit sur l'amplification, l'hybridation ou le séquençage. Dans les méthodes basées sur l'amplification, le gène cible est amplifiée par PCR ; dans les techniques basées sur l'hybridation, les gènes cibles sont détectés par hybridation avec des sondes d'acide nucléique complémentaires ; et dans les approches basées sur le séquençage, les séquences du génome sont analysées pour détecter tous les gènes ou les mutations conférant les résistances.

5.2.1 Détection de la résistance aux antibiotiques par PCR

La PCR (conventionnelle et en temps réel) est largement utilisée dans les laboratoires de diagnostic médical pour la détection rapide des déterminants génétiques de résistance. La PCR est basée sur l'amplification de l'ADN cible (gène codant le phénotype le résistance) en utilisant des amorces spécifiques (**Tan, 2003**). En plus de sa rapidité, la PCR permet la détection de plusieurs déterminants génétiques simultanément chez plusieurs espèces bactériennes (PCR multiplex).

5.2.2 Détection de la résistance aux antibiotiques par les puces à ADN

Les puces à ADN sont utilisées pour identifier la présence de séquences d'acides nucléiques spécifiques à l'aide de sondes oligonucléotides complémentaires immobilisés sur une surface solide. Cette méthode pourrait détecter de nombreuses séquences en un seul test, ce qui permettrait la détection simultanée et en parallèle d'un grand nombre de gènes de résistance différents et de différents agents microbiens (**Dally et al., 2013**).

L'utilisation des puces à ADN a par ailleurs été remplacée ces dernières années par des techniques de séquençage de nouvelle génération.

5.2.3 Détection de la résistance aux antibiotiques par séquençage

Durant la dernière décennie, les technologies de séquençage de nouvelle génération (dites NGS pour *Next Generation Sequencing*), qui permettent le séquençage massivement parallèle de millions de fragments d'ADN rapidement et simultanément, ont beaucoup transformé la recherche dans les domaines de biologie, et sont de plus en plus utilisés dans les laboratoires de diagnostic clinique (**Deurenberg et al., 2017 ; Hartman et al., 2019**).

Aujourd'hui, les NGS sont devenus également un outil idéal pour la surveillance de la résistance aux antimicrobiens. La disponibilité de la séquence complète d'un génome, y compris les plasmides, permet d'identifier tous les déterminants génétiques de la résistance bactérienne simultanément. L'approche de détection de la résistance antimicrobienne basée sur le séquençage dépend en grande partie d'une variété d'outils bioinformatiques et bases de données, qui ont été développés récemment (**Otto, 2017 ; Hendriksen et al., 2019**).

La prédiction des déterminants génétiques de la résistance est effectuée par un alignement entre la séquence nucléotidique/protéique requête et les séquences nucléotidiques/protéiques présentes dans des bases de données, à l'aide des outils bioinformatiques tels que BLAST (**Altschul et al., 1990**), ARIBA (**Hunt et al., 2017**), BOWTIE2 (**Langmead & Salzberg, 2012**) et SRST2 (**Inouye et al., 2014**).

Les plus importantes bases de données répertorient les séquences de gènes de résistance aux antibiotiques sont AMRFinder (**Feldgarden et al., 2019**), ARDB (*Antibiotic Resistance Genes Database*) (**Liu & Pop, 2009**), ARG-ANNOT (*Antibiotic Resistance Gene Annotation*) (**Gupta et al., 2014**), CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*)

(McArthur *et al.*, 2013), NDARO (National Database of Antibiotic Resistant Organisms) (Feldgarden *et al.*, 2021) et ResFinder (Florensa *et al.*, 2022).

L'avantage important de l'utilisation des NGS dans la détection et le suivi de la résistance aux antibiotiques est la mise en évidence du profil de résistance complet et détaillé d'un grand nombre de bactéries en un seul test. Cependant, cette approche n'est pas encore devenue de routine dans les laboratoires de diagnostic microbiologique, particulièrement dans les pays en voie de développement, à cause des coûts élevés des équipements nécessaires et le manque de personnel qualifié.

5.3. Détection de la résistance aux antibiotiques par spectrométrie de masse MALDI-TOF

MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) est une méthode récente, rapide, sensible et spécifique, pour la détection de la résistance aux antibiotiques. Le principe de cette technique est basé soit sur le suivi de la modification d'un antibiotique par une culture bactérienne (hydrolyse des β -lactamines, acétylation des quinolones) ou la détection directe des protéines bactériennes impliquées dans la résistance. Dans les deux cas, les spectres de masse générées par MALDI-TOF MS sont comparés, et les différences indiquent si la bactérie est sensible ou résistante (Gajic *et al.*, 2022). Les résultats sont obtenus en moins de 24 h, ce qui réduit considérablement le délai d'exécution par rapport aux 24 à 48 h nécessaires avec les méthodes conventionnelles.

Matériel

et

méthodes

1. Echantillonnage

Les prélèvements des échantillons cliniques ont été réalisés entre Septembre 2012 et Mai 2017 au laboratoire de Microbiologie de l'hôpital Rabah Bitat, Wilaya de Boumerdès ; un hôpital de 230 lits, répartis sur six services, médecine interne, pédiatrie, chirurgie générale, néphrologie-hémodialyse, gynécologie-obstétrique et d'ophtalmologie. Les échantillons provenaient d'urines, selles, pus, sang, crachats, liquide ascétique, sécrétions vaginales et cathéter, prélevés de patients externes et hospitalisés dans les différents services.

2. Isolement et identification des bactéries par culture et tests biochimiques

Les bactéries ont été cultivées sur gélose MacConkey et incubées 24h à $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Les colonies roses, formées par des bactéries fermenteurs du lactose, suspectées être membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, ont été sélectionnées pour subir des tests d'identification biochimiques, par ensemencement sur des milieux de culture solides ou liquides.

2.1 Test de fermentation des sucres

Ce milieu permet de mettre en évidence la fermentation de trois sucres glucose, lactose, saccharose, avec ou sans dégagement gazeux ; et de noter la production ou non d'hydrogène sulfuré (H_2S). La technique consiste à ensemencer la gélose du milieu triple sucres (TSI, Triple Sugar Iron) par piqûre et par stries serrées sur la pente. La lecture est faite après 18-24 h d'incubation à 37°C (**Hajna, 1945**).

2.2 Test de l'utilisation du citrate

Ce test permet de différencier les entérobactéries sur la base de leur métabolisme du citrate comme seule source de carbone.

Les bactéries sont ensemencées en zigzag sur la surface de la pente du milieu citrate de Simmons gélosé en tube, puis incubées à 37°C pendant 18-24 h. Si la réaction est positive, le milieu de culture devient bleu (dû à l'augmentation du pH) ; si la réaction est négative, la couleur naturelle du milieu ne change pas (**Koser, 1923 ; Simmons, 1926**).

2.3 Test de l'uréase

Ce test permet de rechercher les enzymes uréase et tryptophane désaminase (TDA), ainsi que la production de l'indole. Quelques colonies bactériennes sont ensemencées dans un milieu

liquide urée-indole puis incubées à 37°C pendant 18-24 h. La révélation est effectuée par addition des réactifs KOVACS et TDA pour révéler la production de l'indole et la présence du TDA, respectivement.

L'hydrolyse de l'urée par l'uréase produit du carbonate d'ammonium, qui va alcaliniser le milieu, augmenter le pH, et révéler un virage de couleur du jaune orangé au rose (**Rustigian & Stuart, 1941**).

2.4 Test du type fermentaire

Ce test permet de différencier les entérobactéries sur la base de leurs types de fermentations. Le test est réalisé par la réaction de rouge de méthyle (RM) et de Voges-Proskauer (VP).

Un inoculum d'une culture bactérienne est ajouté dans le bouillon Clark et Lubs (également appelé milieu RM-VP). Après incubation à 37°C pendant 24h, la culture est divisée en deux tubes.

Quelques gouttes d'une solution de RM à 0,5% sont ajoutées dans le tube 1, et deux gouttes de réactifs VP1 et VP2 dans le tube 2, puis sont bien mélangés.

Une coloration rouge dans le tube 1, indique une réaction RM positive, qui signifie présence de la fermentation, qui a causé la réduction du pH (pH < 4.0).

De même, une coloration rouge dans le tube 2, indique une réaction VP positive, due à la production de l'acétoïne (acétylméthylcarbinol) par fermentation (**Voges & Proskauer, 1898**).

L'ensemble des résultats des tests biochimiques cités ci-dessus sont interprétés selon le **Tableau 5**.

Tableau 5. Caractères descriptifs de l'identification classique des souches *K. pneumoniae*, *E. coli* et *Enterobacter* spp. (**Zimbro, 2009**).

	TSI	Citrate	Uréase	Indole	TDA	VP	RM
<i>E. coli</i>	Sucres+ Gaz+ H ₂ S-	-	-	+	-	-	+
<i>K. pneumoniae</i>	Sucres+ Gaz+ H ₂ S-	+	+	-	-	+	-
<i>Enterobacter</i> spp.	Sucres+ Gaz+ H ₂ S-	+	-	-	-	+	-

3. Confirmation de l'identification des bactéries par MALDI-TOF-MS

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) est une technique de détection et d'identification rapide et fiable des espèces bactériennes (**Luzzatto-Knaan *et al.*, 2015**).

Etant donné que le MALDI-TOF-MS peut détecter un grand nombre de protéines simultanément, la technique est capable de différencier entre des bactéries étroitement apparentées et de les classer au niveau de l'espèce.

Principe :

Un spectromètre de masse est constitué de trois unités fonctionnelles (**Figure 33**) : **une chambre d'ionisation**, pour ioniser l'échantillon par laser, et les ions produits sont accélérés dans un champ électrostatique, ensuite transférés dans la phase gazeuse ; **un analyseur de masse**, pour séparer les ions par leur rapport masse sur charge (m/z); et un **détecteur des ions** (**Torres-Sangiao *et al.*, 2021**).

Le principe de cette technique réside dans le fait que le temps de vol TOF (*time of flight*), qui est le temps nécessaire aux ions pour atteindre le détecteur, est *proportionnel* à leurs rapports masse/charge (m/z). La somme des ions analysés forme un spectre, qui sera interprété par un logiciel d'identification (**Figure 33**) (**Luzzatto-Knaan *et al.*, 2015**).

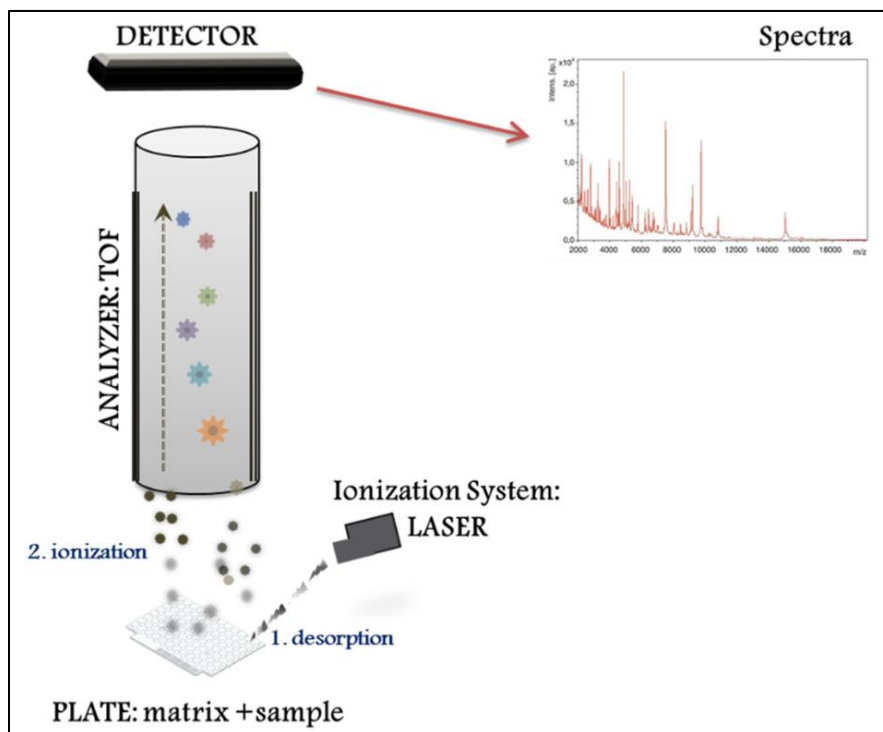


Figure 33. Les composants et le principe de fonctionnement d'un MALDI-TOF-MS (Torres-Sangiao *et al.*, 2021).

Protocole :

1. Transférer une seule colonie bactérienne, cultivée sur milieu MacConkey gélosé en boîte de Pétri, sur un spot de la plaque cible (**Figure 34A et 34B**).
2. Laisser sécher à température ambiante pendant environ 2-3 min.
3. Recouvrir le spot avec 1,5 µl de solution de matrice préalablement préparée, contenant 50 mg/ml de CHCA (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique) dans un solvant organique (50 % acétonitrile, 2,5 % acide trifluoroacétique, 47,5 % H₂O) (**Figure 34C**).
4. Laisser sécher à température ambiante pendant environ 5 min.
5. Introduire la plaque cible dans le spectromètre de masse microflex LT (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) et exécuter l'analyse MALDI-TOF-MS (**Figure 34D**).
6. Afficher le résultat de l'identification avec le programme de l'identification "Bruker Daltonics MALDI Biotyper Classification Results" (**Figure 34E**).

Le résultat n'est exploitable que si le témoin positif et négatif (analysés en même temps avec l'échantillon test) sont valides. Le résultat est accompagné d'un score entre 0 à 3. L'identification est considérée comme hautement probable lorsque le score est supérieur à

1.9, tandis que l'identification est considérée comme non fiable lorsque le score est inférieur à 1.7 (Tableau 6).

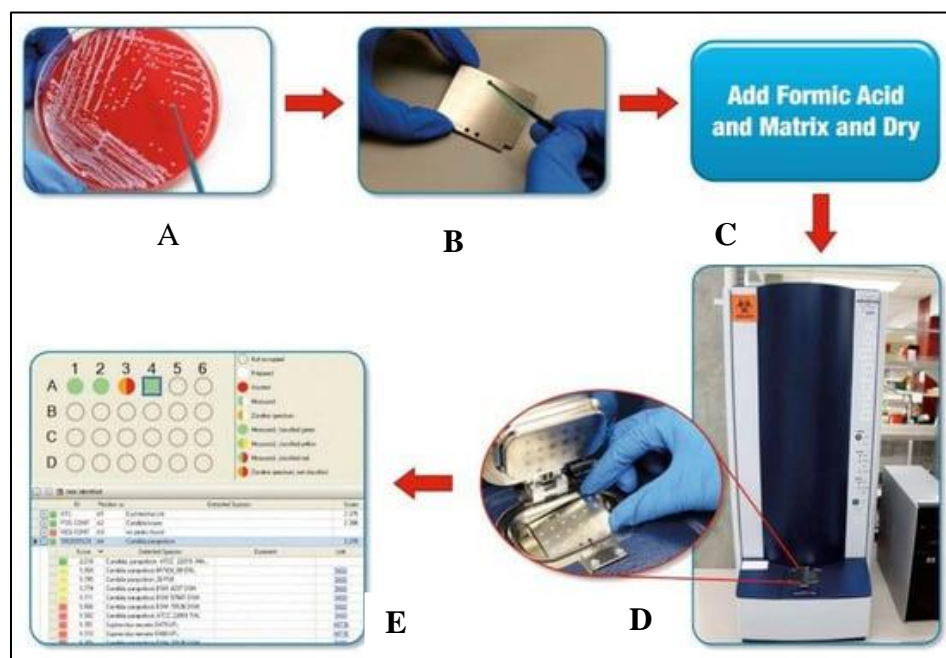


Figure 34. Les étapes du protocole de l'identification des microorganismes par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS. Une colonie, prélevée d'une boîte de pétri (A), est déposée sur un spot de la plaque cible (B). Le spot bactérien est recouvert de 1 à 2 µL d'une matrice préalablement préparée, puis laisser sécher pour quelques minutes (C). La plaque cible est placée dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse (D). Après exécution de l'analyse, un spectre de masse est produit puis comparé à une base de données de spectres de masse par un logiciel, enfin le résultat de l'identification est donné avec un score entre 0 à 3 (E) (Patel & Moldy *et al.*, 2019).

Tableau 6. Tableau de correspondance des scores (Manuel Bruker®).

Intervalles du score	Interpretation	Symbols	Couleur
2.000-3.000	Très bonne identification	(+++)	Vert
1.700-1.999	Faible identification	(+)	Jaune
0.000-1.699	Pas d'identification	(-)	Rouge

4. Etude de la résistance aux antibiotiques

La détermination des résistances aux antibiotiques a été réalisée par des méthodes phénotypiques (le test de diffusion de disque, de synergie, de micro-dilution en bouillon, test à la cloxacilline, test de carba NP et test de Hodge modifié) et des méthodes moléculaires

basées sur la mise en évidence des déterminants génétiques des résistances par PCR et séquençage de l'ADN.

4.1 Tests d'antibiogramme par la méthode de diffusion de disque

La méthode de diffusion de disque a été réalisée sur milieu gélosé Muller-Hinton (MH ; BioMerieux SA Mary l'Etoile France) selon les recommandations du Comité de la Société Française de Microbiologie (**CA-SFM, 2013**). Un panel de seize disques d'antibiotiques a été testé (BioRad France), à savoir :

Amoxicilline (AMX25), Amoxicilline + acide clavulanique (AMC30), Piperacilline + Tazobactame (TZP 85), Céfalotine (KF30), Céftriaxone (CRO30), Céfépime (FEP 30), Ertapeneme (ERT10), Imipeneme (IPM10), Fosfomycine (FF50), Nitrofurantoïne (F300), Trimethoprim + Sulfamethoxazole (SXT25), Doxycycline (DO30), Colistine (CS50), Amikacine (AK30), Gentamicine (CN15) et Ciprofloxacine (CIP5).

Une solution bactérienne équivalente à 0.5 McFarland et diluée au 1/10^{ème} est étalée sur la surface de la gélose Muller-Hinton à l'aide d'un écouvillon stérile, puis laisser sécher à température ambiante, ensuite le disque d'antibiotique est déposé sur la surface avec une pince stérile. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24h.

La lecture a été effectuée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition. Les bactéries ont été classées en sensibles (**S**) ou résistantes (**R**) ou une réaction intermédiaire (**I**), selon les valeurs interprétatives de l'antibiogramme.

Selon les résultats de l'antibiogramme, nous avons identifié les phénotypes de résistances acquises aux β -lactamines des souches étudiées, en se référant au **Tableau 7**.

Tableau7. Phénotypes de résistances acquises vis-à-vis des β -lactamines chez les entérobactéries (**Robin et al., 2012**).

Antibiotique s marqueurs	Pase bas niveau	Pase haut niveau	Pase TRI	Case bas niveau	Case haut niveau	BLSE	Carbase
AMX	R	R	R	R	R	R	R
AMC	S	I/R	R	R	R	R	R
TIC	R	R	R	S	R	R	R
CF	S	R	S	R	R	R	R
CTX	S	S	S	S	R	R	R
IMP	S	S	S	S	S	S	R

Pase : pénicillinase, TRI : TEM Résistante aux inhibiteurs, Case : céphalosporinase, BLSE : β -lactamaes à spectre élargi, Carbase : carbapénémae.
TIC: ticarcilline, CF: céfalotine, CTX: céfotaxime

4.1.1 Recherche de la production de BLSE par test de synergie

Les bactéries suspectées d'être productrices de BLSE ont été soumises au test de synergie.

Le test a été réalisé sur gélose MH avec un disque d'AMC, qui contient un inhibiteur de β -lactamases (acide clavulanique) et un disque de céphalosporine de 3^e/4^e génération, Céftriaxone (CRO) et Céfépime (FEP), positionnés à une distance de 3 cm (centre à centre) (**Jarlier et al., 1988**).

Une nette extension du bord de la zone d'inhibition autour du disque de la céphalosporine vers le disque contenant l'acide clavulanique, qui se manifeste par une forme caractéristique appelée « bouchon de champagne », est interprétée comme positive pour la production de BLSE (**Figure 35**)

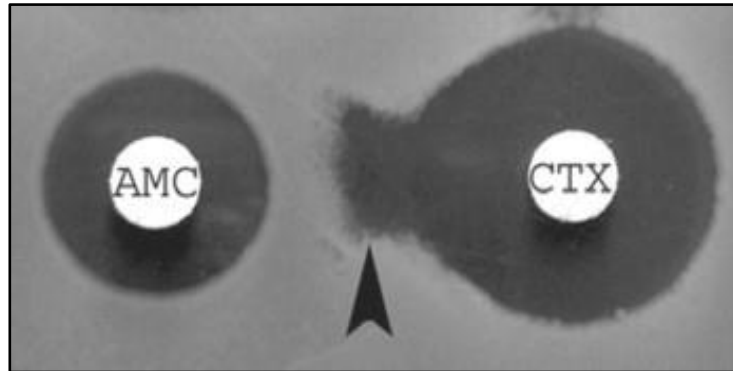


Figure 35. Un exemple de test de synergie positif. Les disques de céfotaxime (CTX) et d'amoxicilline-acide clavulanique (AMC) sont placés à une distance de 30 mm l'un de l'autre. La zone d'inhibition augmente entre ces deux disques, indiquant une synergie entre le céfotaxime et l'acide clavulanique (**Drieux *et al.*, 2008**).

4.1.2 Recherche de la production des céphalosporinases par test d'inhibition à la cloxacilline

Les bactéries catégorisées comme « intermédiaires » ou qui ont présenté une résistance à la ceftriaxone, et en absence de synergie avec l'acide clavulanique, étaient considérés comme hyperproductrices de céphalosporinase chromosomique (*Enterobacteriaceae* du groupe III et *E. coli*) ou d'une céphalosporinase plasmidique (toutes espèces d'*Enterobacteriaceae*) (**Rahal *et al.*, 2011**).

Ces bactéries seront testées sur une gélose MH additionnée de 250 mg/L de cloxacilline (Orbénine®), un inhibiteur de la céphalosporinase, afin de déterminer si le phénotype affiché était la conséquence d'une hyperproduction d'AmpC et/ou de la production d'une BLSE (**Garrec *et al.*, 2011**).

Une suspension bactérienne de 0.5 McFarland est étalée uniformément sur deux boîtes de MH gélosés, l'une additionnée de cloxacilline à 250 mg/L et l'autre non additionnée. Des disques de : Amoxicilline+ Acide clavulanique (AMC), Amoxicilline (AMX), Céfoxitine (FOX) Céfotaxime (CAZ) et Céfotaxime (CTX) sont appliqués sur la surface des deux géloses. Après incubation à 37°C pendant 18 à 24h, le diamètre des zones d'inhibition autour des disques est enregistré et comparé. S'il y a une augmentation du diamètre de la zone d'inhibition d'au moins 8 mm autour des disques sur la gélose MH additionnée de cloxacilline, par rapport au non additionnée, le résultat est positif, et est indicatif d'une hyperproduction d'AmpC (**figure 36**) (**Polsfuss *et al.*, 2011**).

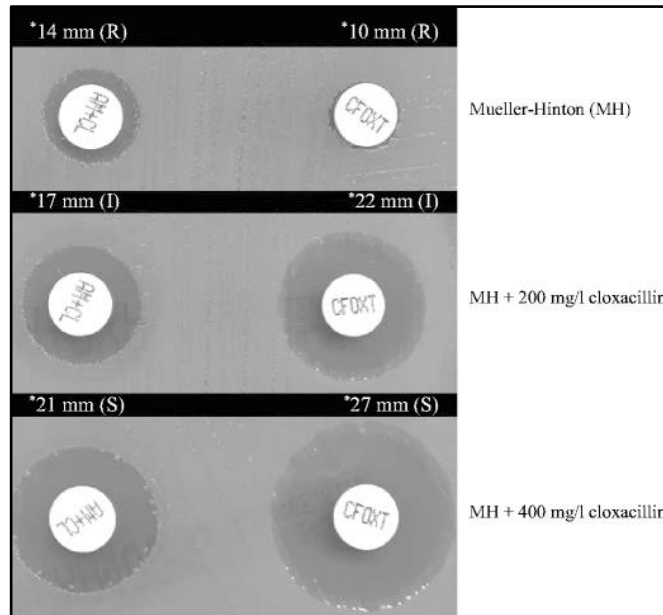


Figure 36. Un exemple de recherche de céphalosporinase par test d'inhibition par la cloxacilline. La figure montre une augmentation de la zone d'inhibition autour des disques sur les géloses MH en fonction de la concentration de la cloxacilline additionnée dans la gélose, indiquant la production de l'AmpC et son inhibition par la cloxacilline. R, résistant ; I, intermédiaire sensible ; S, sensible ; AM+CL, amoxicilline-acide clavulanique ; CFOXT, céfoxitine (Al Naiemi *et al.*, 2009).

4.1.3 Recherche de la production de carbapénémases

Suite à la détection d'une sensibilité réduite aux carbapénèmes, et/ou la présence de colonies discrètes dans la zone d'inhibition, dans les tests de sensibilité de routine, des tests phénotypiques de détection des carbapénémases doivent être réalisés. Les méthodes phénotypiques couramment utilisées par les laboratoires comprennent le test de Hodge modifié (THM) et le test Carba NP (Tamma & Simner, 2018).

4.1.3.1 Le test de Hodge modifié

Le THM est un test facile, pour la détection de la production de carbapénémase par les bactéries. Le test est basé sur l'inactivation du carbapénème par les carbapénémases produites par les bactéries (Hodge *et al.*, 1978 ; Lee *et al.*, 2001).

En bref, une suspension de 0,5 McFarland de la souche sensible aux carbapénèmes, *E. coli* ATCC 25922, a été diluée au 1/10^{ème}, puis étalée uniformément par écouvillonnage sur une gélose MH. La boîte est laissée sécher pendant 3 à 5 min à température ambiante. Un disque d'ertapénème (10 µg) est placé au centre.

L'isolat à tester avec un contrôle positif (*K. pneumoniae* ATCC1705) et un contrôle négatif (*K. pneumoniae* ATCC1706) ont été striés en lignes droites du bord du disque vers la périphérie de la boîte de Pétri, puis incubée à 37°C pendant 16 à 24h. Le test est considéré comme positif lorsqu'une forme de feuille de trèfle est observée, qui s'explique par le fait que si la souche test produit une carbapénémase, le carbapénème sera inactivé, ainsi la souche d'*E. coli* ATCC 25922 qui est sensible peut pousser proche du disque du côté de la souche positive, ceci se manifeste par des indentations de la zone d'inhibition autour du disque carbapénème, d'où la forme semblable à une feuille de trèfle (**Figure 37**).

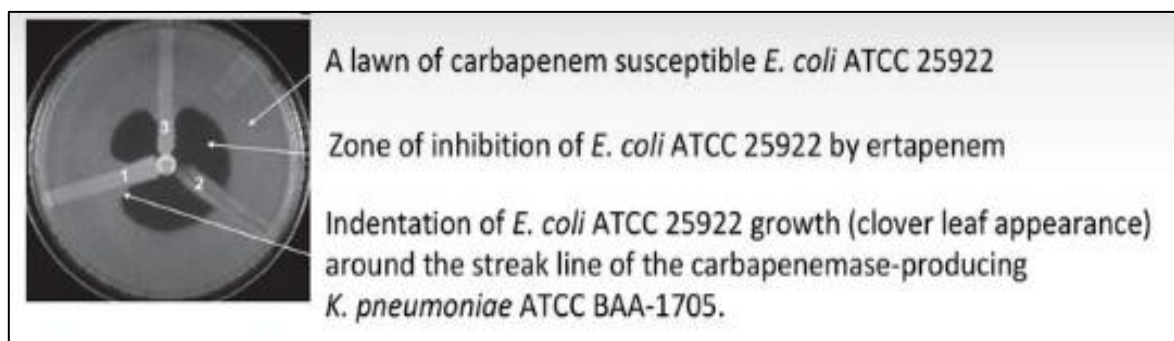


Figure 37. Un exemple de test Hodge modifié réalisé sur une gélose MH avec un disque d'ertapénem (10 µg). **1.** *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705, contrôle positif ; **2.** *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706, contrôle négatif ; **3.** une souche clinique produisant la carbapénémase, résultat positif (**Tamma & Simner, 2018**).

4.1.3.2 Le test carba NP modifié

Le test Carba NP (Carbapenemase Nordmann-Poirel) est un test biochimique de détection rapide de la production de carbapénémase par les bactéries à Gram négatif (**Nordmann et al., 2012**). Le test est basé sur l'hydrolyse *in vitro* du carbapénème (imipénème) par un lysat bactérien, qui entraîne un changement de pH (acidification) du milieu, qui se traduit par un changement de couleur de l'indicateur rouge de phénol, du rouge au jaune (**Figure 38**).

Dans le test modifié, le tampon de lyse utilisé est le cetyl triméthyl ammonium bromide (CTAB) à 0.02% et le pH est ajusté à 7.5 au lieu de 7.8. L'indicateur de pH, le rouge de phénol, change de couleur (du rouge au jaune) lorsque le milieu devient acide, traduisant la présence d'une carbapénémase (**Bakour et al., 2015(a)**).

Le test Carba NP modifié a été réalisé comme suit :

- Prélever une colonie de la souche à tester de la gélose MacConkey, et mettre en suspension dans 200 μL de tampon de lyse, cetyltriméthylammonium bromide (CTAB) à 0,02 %. Bien vortexer pendant 2 minutes.
- Préparer 2 tubes eppendorfs, et mettre 100 μL de la suspension bactérienne dans chaque tube.
- Tube 1 (Contrôle négatif): Ajouter 100 μL d'une solution de rouge de phénol (2 mL de solution de rouge de phénol à 0,5 % (p/vol) avec 16,6 mL d'eau distillée) contenant 0,1 mM de ZnSO_4 , ajustée à pH 7.5.
- Tube 2 (Test): Ajouter 100 μL d'une solution de rouge de phénol contenant 0,1 mM de ZnSO_4 (pH 7,5) et additionnée de 6 mg/mL d'imipénème.
- Vortexer les deux tubes, puis incubés à 37°C pendant 2 heures maximum.

Deux souches, une productrice de carbapénémase et une carbapénémae négative ont été incluses dans le test comme témoins positif et négatif.

Si la bactérie est productrice de carbapénémase, la couleur de la solution dans le tube 2 devient jaune. Par contre, si elle ne produit pas de carbapénémase la solution reste rouge comme celle du contrôle négatif.

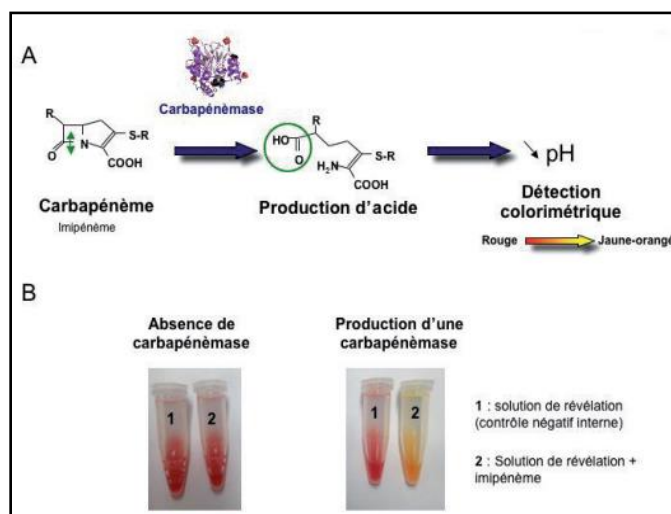


Figure 38. Test carba NP. (A) Principe du test Carba NP. (B) Résultats du test avec une souche productrice et une souche non productrice de carbapénémase. Les deux tubes contiennent la souche en absence (tube 1) ou en présence de l'imipénème (tube 2) (Dorlet *et al.*, 2013).

4.2 Test de sensibilité à la colistine

L'évaluation de la sensibilité à la colistine est problématique pour deux principales raisons, liées principalement aux propriétés inhérentes à la molécule, (i) la grande taille de la colistine ne permet pas sa bonne diffusion dans la gélose, ce qui compromet les performances des méthodes de diffusion sur disque et de diffusion par gradient de concentration ; (ii) sa tendance à se lier à la surface de plastique ; par exemple, aux tubes eppendorfs ou aux puits des microplaques en plastiques, utilisés dans les tests de dilution en bouillon pour la détermination des concentration minimale inhibitrice (CMI) (**Gales *et al.*, 2001**).

Néanmoins, le CLSI, le EUCAST et le CA-SFM ont recommandé la méthode de microdilution en bouillon comme la seule méthode acceptable pour la détermination de la sensibilité à la colistine (**EUCAST, 2017**).

Malgré que la méthode par diffusion de disque ne soit pas recommandée pour évaluer la résistance à la colistine, les souches qui ont montrés des zones d'inhibition avec des diamètres strictement inférieurs à 15 mm étaient considérées comme résistantes selon le CA-SFM 2013, et ont été sélectionnées pour subir le test de micro-dilution en bouillon pour la détermination de la CMI. La CMI est définie comme la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien qui inhibe la croissance visible de la bactérie, généralement exprimée en µg/ml.

La détermination de la CMI de la colistine vis-à-vis de nos isolats a été réalisée par la méthode de micro-dilution en bouillon, conformément aux recommandations du CA-SFM/EUCAST (**EUCAST, 2017**), comme suit :

- A partir d'une solution mère de colistine à une concentration de 285 µg/ml, préparer des dilutions en série de 1/2 de l'antibiotique dans un bouillon MH ajusté en cations, afin d'obtenir un gradient de concentrations, allant de 1 à 256 µg/ml.
- Un volume de 180 µl de chaque dilution a été déposée en double dans des puits d'une microplaque en plastique comme montré dans la **Figure 39**.
- Un volume de 20 µl d'une suspension bactérienne a été inoculé dans chaque puit, après dilution au 1 : 10^{eme} dans du MH de la suspension à 0.5 Mc de la souche à tester.

Les dépôts ont été effectués dans les puits du No 3 au No11, le premier et le dernier puits étant réservés au témoin négatif (contenant le milieu de culture seul) alors que le deuxième est réservé au témoin positif (contenant la suspension bactérienne seule sans antibiotique) (**Figure 39**).

- Les plaques sont ensuite couvertes à l'aide d'un couvercle et sont incubées à 37°C pendant 18-24h.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	CP	01	02	04	08	16	32	64	128	256	CN
B	CN	CP	01	02	04	08	16	32	64	128	256	CN
C	CN	CP	01	02	04	08	16	32	64	128	256	CN
D	CN	CP	01	02	04	08	16	32	64	128	256	CN
E	CN	CP	01	02	04	08	16	32	64	128	256	CN
F	CN	CP	01	02	04	08	16	32	64	128	256	CN
G	CN	CP	01	02	04	08	16	32	64	128	256	CN
H	CN	CP	01	02	04	08	16	32	64	128	256	CN

Figure 39. Schéma de la configuration d'une plaque de microdilution.

CN : contrôle négatif, contenant du MH seul. CP : contrôle positif, la suspension bactérienne seule.

Du 3 au 11 les différentes concentrations de l'antibiotiques en µg/ml.

Chaque souche est testée en deux lignes de cupules et une souche connue résistante à la colistine est déposée comme un témoin positif.

Les CMI ont été déterminé en se référant à la valeur critique de > 2 µg/ml, fixée par le CA-SFM et le EUCAST (**CA-SFM/EUCAST 2017**).

4.3 Identification des déterminants génétiques des résistances

Les méthodes phénotypiques conventionnelles de détermination des résistances aux antibiotiques sont lentes et laborieuses, nécessitant une étape de culture bactérienne d'une durée d'au moins 18 h, leurs résultats sont parfois subjectifs et variables, en fonction de plusieurs paramètres tels que la taille de l'inoculum et les conditions de culture, qui peuvent avoir une influence sur l'expression des gènes de résistance.

Par contre, la mise en évidence des gènes de résistance par les méthodes moléculaires telles que la PCR sont plus rapides, sensibles, spécifiques et indépendantes des conditions de croissance bactériennes.

Pour cette étude, la présence des déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques a été effectuée par PCR classique ou par PCR en temps réel, suivie par séquençage des amplicons.

Le principe de la PCR classique est basé sur l'amplification spécifique et exponentielle d'un fragment d'ADN *in vitro* par une ADN polymérase thermostable (Taq polymérase), à l'aide de deux amorces qui encadrent l'ADN à amplifier. Une réaction de PCR comporte trois étapes, qui constituent un cycle de PCR ; (i) la dénaturation de l'ADN à une température très élevée (94°C) ; (ii) l'hybridation des amorces complémentaires à l'ADN à amplifier (à une température qui dépend de la longueur et le contenu en GC de l'ADN) ; (iii) l'élongation, qui constitue l'étape de synthèse de nouveaux brins d'ADN, complémentaires à l'ADN cible, par l'ADN polymérase, généralement à 72°C (la température optimale de l'enzyme).

La durée de chaque étape varie entre quelques secondes et une minute. Ces trois étapes (1 cycle) sont généralement répétées une trentaine de fois, afin d'obtenir des grandes quantités d'ADN.

Typiquement un mélange réactionnel d'une PCR contient l'ADN matrice, deux amorces, les dNTPs, la Taq polymérase et un tampon.

La présence des produits de la PCR classique est déterminée par électrophorèse sur gel.

La PCR en temps réel, ou quantitative (qPCR), fonctionne avec le même principe que la PCR classique, sauf que l'amplification de l'ADN peut être suivie et détectée au cours des cycles de la PCR, de plus la quantité d'ADN amplifié peut être mesurée d'une manière quantitative. En plus de tous les ingrédients nécessaires pour une PCR classique, la qPCR fait intervenir une sonde oligonucléotidique, marquée par un *reporter* fluorescent lié à l'extrémité 5' et un *quencher* lié à l'extrémité 3' est ajouté au mélange réactionnel. Cette sonde s'hybride par complémentarité à une région interne de l'ADN cible (entre les régions d'hybridation des deux amorces).

Lorsque la sonde est intacte, l'émission de la fluorescence par le *reporter* est inhibée par le *quencher*. Cependant, durant l'étape de l'élongation, la sonde est clivée par l'activité 5' nucléase de la polymérase, séparant ainsi le *reporter* du *quencher* ; et par conséquent, la

fluorescence est émise, puis détectée par le détecteur du thermocycleur et analysée par un logiciel. L'intensité de cette fluorescence augmente d'une manière proportionnelle en fonction de la quantité de l'ADN amplifié.

4.3.1 Extraction de l'ADN bactérien

L'extraction de l'ADN génomique des bactéries a été réalisée à l'aide du système automatisé Extracteur Biorobot EZ1 (Qiagen) en utilisant le kit d'extraction EZ1 (Qiagen). Ce kit contient tous les réactifs nécessaires pour l'extraction et la purification de l'ADN à partir de cultures bactériennes en 4 étapes, la lyse cellulaire, la fixation de l'ADN sur des particules magnétiques, le lavage et puis l'élution de l'ADN.

Le principe de ce kit est basé sur la liaison de l'ADN à la surface de particules magnétiques recouvertes de silice en présence d'un sel chaotropique. Les particules sont séparées des lysats cellulaires à l'aide d'un aimant, ensuite l'ADN est lavé puis récupéré.

Cette procédure a été réalisée selon le protocole du fabricant, comme suit :

- Mettre en suspension deux à trois colonies de chaque isolat dans 200 µl du tampon d'extraction G2 dans un tube Eppendorf.
- Ajouter 20 µl de la protéinase K, mélanger puis incuber à 60°C pendant 10 min.
- Placer les tubes dans l'extracteur automatisé Biorobot EZ1 (Qiagen) et exécuter les étapes de la fixation, de lavage et d'élution de l'ADN.

4.3.2 Amplification de l'ADN par PCR en temps réel

La présence des gènes de β -lactamases *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} et *bla*_{OXA48}, a été déterminée par PCR en temps réel en utilisant les amorces montrées dans le **Tableau 8**.

Tableau 8. Amorces et sondes fluorescentes utilisées pour la PCR en temps réel.

Gene name	Positive control	Genbank Accession number	Type of PCR	Primer name	Primer sequence (5'->3')	Amplicon size (bp)	Reference
<i>bla</i> _{TEM}	Kpnasey	KJ939560.1	Real-time PCR	ALLTEMRTF	TTCTGCTATGTGGTGCGGTA	213	Yousfi <i>et al.</i> , 2019(a)
				ALLTEMRTR	GTCCTCCGATCGTTGTCAGA		
				ALLTEMRTProbe	AACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGA		
<i>bla</i> _{CTX-M}	Kpnasey	JQ397665.1	Real-time PCR	CTX-MgroupARTF	CGGGCRATGGCGCARAC	105	Roschanski <i>et al.</i> , 2014
				CTX-MgroupARTR	TGCRCCGGTSGTATTGCC		
				CTX-M groupART Probe	CCARCGGGCGCAGYTGGTGAC		
<i>bla</i> _{SHV}	Kpnasey	AF124984.1	Real-time PCR	SHVRTF	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA	105	Roschanski <i>et al.</i> , 2014
				SHVRTR	TCCTGCTGGCGATAGTGGAT		
				SHVRTProbe	TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG		
<i>bla</i> _{OXA48}	<i>E.coli</i> CMUL64	AY236073	Real-time PCR	OXA48RTF	TCTTAAACGGGCGAACCAAG	125	Yousfi <i>et al.</i> , 2019(a)
				OXA48RTR	GCGTCTGTCCATCCCCTTA		
				OXA48RTProbe	6-FAM-AGCTTGATCGCCCTCGATTTGG-TAMRA		

Les mélanges réactionnels de la qPCR contenaient 10 µl de Quantitect Probe PCR Master Mix de Qiagen (contenant la HotStarTaq® ADN Polymérase, le tampon, les dNTP et le colorant de référence passive ROX), 2 µl d'ADN matrice, 1 µl de chaque amorce, 1 µl de la sonde et 5 µl d'eau pour compléter à un volume final de 20 µl.

Tous les tests PCR contenaient des témoins positifs et négatifs. Comme témoin positif, l'ADN d'une souche témoin positif a été utilisé pour chaque gène ciblé. Comme contrôle négatif, l'ADN cible a été remplacé par de l'eau (**Tableau 8**).

Les tubes contenant les mélanges réactionnels de la PCR ont été placés dans un thermocycleur en temps réel (CFX96™ Real-Time System C1000 Touch BIO-RAD) qui a été programmé comme suit :

- Un cycle : 2min à 50°C, 5 min à 95°C.
- Suivi par 35 cycles de : 1 sec à 95°C, 35 sec à 45°C et 30 sec à 60°C

4.3.3 La PCR standard

La PCR standard a été réalisée pour confirmer les résultats de la qPCR effectuée sur les gènes de β-lactamases (**Tableau 8**), et aussi pour la mise en évidence des déterminants génétiques de résistances aux aminoglycosides, *aac(3)-II*, *aac(6')-Ib*, *aadA*, *ant(2')*, *aph(3')-VI* et *armA*; aux fluoroquinolones, *qnrA* et *qnrB*, et à la colistine, *mgrB*, *mcr-1/2*, *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB*, en utilisant les amorces présentées dans le **Tableau 9**.

Les réactions d'amplification par PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 µl contenant 12.5 µl Quantitect Probe PCR Master Mix de Qiagen (qui contient la HotStarTaq® ADN Polymérase, le tampon, les dNTP), 0.5 µl de chaque amorce, 5 µl de l'ADN matrice et 6.5 µl d'H₂O.

Tableau 9. Amorces utilisées dans la PCR standard.

Gene name	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)	References
<i>bla</i> _{TEM}	TEMSTDF	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	861	Kruger <i>et al.</i> , 2004
	TEMSTDR	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG		
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-Mgroup1STDF	CCCATGGTTAAAAAATCACTGC	944	Roschanski <i>et al.</i> , 2014
	CTX-Mgroup1STDR	CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG		
	CTX-MALLSTDF	TTTGCATGTGCAGTACCAGTA	544	Edelstein, <i>et al.</i> , 2003
	CTX-MALLSTDR	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		
<i>bla</i> _{SHV}	SHVSTDF	ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC	1051	Yagi <i>et al.</i> , 2000
	SHVSTDR	TTTATGGCGTTACCTTTGACC		
<i>bla</i> _{OXA48}	OXA48STDF	TTGGTGGCATCGATTATCGG	744	Poirel <i>et al.</i> , 2010
	OXA48STDR	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC		
<i>aac</i> (3)-II	aac(3)-	GACATAAGCCTGTTCGGTT	372	
	aac(3)-	CTCCGAACCTCACGCCGA		
<i>aac</i> (6')-Ib	aac(6')-Ib	TATGAGTGGCTAAATCGAT	395	
	aac(6')-Ib	CCCGCTTCTCGTAGCA		
<i>aadA</i>	aadA F	CCCAATTTGTGTAGGGCTTA	812	Kim <i>et al.</i> , 2008
	aadA R	TTGTACGGCTCCGCAGTG		
<i>ant</i> (2')	ant(2'')-I	GACACAACGCAGGTCACATT	524	
	ant(2'')-I	CGCATATCGCGACCTGAAAGC		
<i>aph</i> (3')-VI	aph(3')-VI	CGGAAACAGCGTTTTAGA	716	
	aph(3')-VI	TTCCTTTTGTGTCAGGTC		
<i>armA</i>	armA F	AGGTTGTTTCCATTTCTGAG	590	
	armA R	TCTCTTCCATTCCCTTCTCC		
<i>qnrA</i>	qnrA F	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG	543	Touati <i>et al.</i> , 2008

	qnrA R	ATCCAGATCGGCAAAGGTTA		
<i>qnrB</i>	qnrB F	GACAGAAACAGGTTACCCGGT	469	
	qnrB R	CAAGACGTTCCAGGAGCAACG		
<i>mgrB</i>	MgrBF	ATTCTGCCGCTTTTGCTG	499	Olaitan <i>et al.</i> , 2014
	MgrBR	CGTTTTGAAACAAGTCGATGA		
<i>mcr-1/2</i>	Mcr-1/2F	GCAGCATACTTCTGTGTGGTAC		
	Mcr-1/2R	TATGCACGCGAAAGAAACTGGC		
<i>phoP</i>	phoPF	CGATGGTTGATGAGCTGAAA	768	
	phoPR	TGCTGAGCCGGTAATGCTGGA		
<i>phoQ</i>	phoQF	GACGTCCCATCAGTACATCAAT GG	1585	Yousfi <i>et al.</i> , 2019(a)
	phoQR	GCAGCATACTTCTGTGTGGTAC		
<i>pmrA</i>	pmrAF	CATAGCCAGAAGACGCTGAT	952	
	pmrAR	CAATCTGACGCTGAACATGG		
<i>pmrB</i>	pmrBF	GTGCCACTAACGGTGGTACA	1386	
	pmrBR	GTCTGGAGAGATCGGGTCAA		

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (AB Applied biosystems 2720 thermal cycler).

Le programme de la PCR consistait en une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 15 min ; suivi par 35 cycles de : 1 min à 94°C pour la dénaturation, 50 sec à 55°C pour l'hybridation et 2 min à 72°C pour l'élongation ; puis une élongation finale à 72°C pendant 7 min.

Electrophorèse de l'ADN

Pour vérifier la présence d'amplicons, les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% (poids/volume), à un voltage de 135V pendant 20 min, dans un tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) à 0,5% contenant 15µL de *SYBR™ Safe* (Invitrogen, Leek, the Netherlands). Les ADN ont été visualisés sur un Trans illuminateur (life technologies E-GEL Imager) sous ultraviolet (UV) et leurs tailles ont été déterminées par comparaison aux marqueurs de taille [100 Base-Paire Ladder (Gibco- BRL, 15 628- 019)] qui ont été migrée en même temps que les échantillons sur le même gel.

Les tailles du marqueur sont : 65/75, 126, 179, 222, 350, 396, 460, 517,676, 1198, 1605, 2645 pb.

Purification des produits de la PCR

Avant l'étape de séquençage, les produits de PCR ont été purifiés en utilisant le kit Montage SEQ96 Cleanup Kit (MILLIPORE) sur une plaque de filtration à 96 puits (SEQ96 plate), incluse dans le système. Ce système permet la purification de l'ADN par filtration à travers une membrane à base de silice qui ne retient que les brins d'ADN ; tandis que l'excès de sels, des nucléotides et des amorces non incorporées sont éliminés ; l'ADN pure et prêt pour séquençage sera ensuite récupéré.

La purification des produits de PCR a été réalisée selon le protocole du fabricant, comme suit:

1. Ajouter 175µl d'eau ultra pure aux tubes contenant les produits de la PCR et mélanger par agitation.
2. Transférer les mélanges dans les puits de la plaque de filtration, et filtrer à l'aide d'une pompe à vide pendant 10 minutes à 22 nanomètres. A cet étape, L'ADN est retenu à la surface de la membrane tandis que les sels et les nucléotides sont éliminés.

3. Ajouter 50 μ l d'eau ultra pure dans les puits de la plaque et mélanger par agitation pendant 20 minutes pour laver l'ADN.
4. Récupérer 4 μ l du contenu de l'ADN dans une nouvelle plaque de PCR.

4.3.4 Le séquençage de l'ADN

Les produits de la PCR purifiés dans l'étape précédente ont été séquencés par la méthode de Sanger à l'aide du kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem®), en utilisant le séquenceur capillaire ABI3730 (Applied Biosystems).

La méthode de séquençage de Sanger est basée sur l'utilisation de didésoxynucléotides (ddNTP) dépourvus de groupe OH 3' nécessaires à la formation d'une liaison phosphodiester lors de la synthèse d'un nouveau brin d'ADN par l'ADN polymérase. L'incorporation d'un ddNTP dans un brin d'ADN en cours de synthèse empêche l'incorporation du désoxynucléotides (dNTP) suivant, et par conséquent la synthèse de l'ADN se termine prématurément, d'où l'autre appellation de cette technique « méthode de terminaison de chaîne ».

Le mélange d'une réaction de séquençage contient les dNTPs et une faible concentration de ddNTP marqués par un fluorophore, l'ADN matrice, l'amorce et l'ADN polymérase.

Les étapes de la méthode de séquençage de Sanger sont illustrées dans la **Figure 40**, et sont comme suit :

1. La polymérase catalyse l'extension de la chaîne d'ADN par incorporation aléatoire de dNTPs ou ddNTP.
2. L'incorporation d'un ddNTP marqué par un fluorophore conduit à la fin de l'extension de l'ADN en cours de synthèse.
- 3- Étant donné que cela peut se produire à diverses positions de la chaîne de l'ADN, des fragments d'ADN de différentes longueurs et marqués avec différents fluorophores sont générés.
- 4- Les fragments d'ADN marqués sont séparés en fonction de leurs tailles par électrophorèse sur gel capillaire, et leur fluorescence associée est détectée (**Figure 40**).

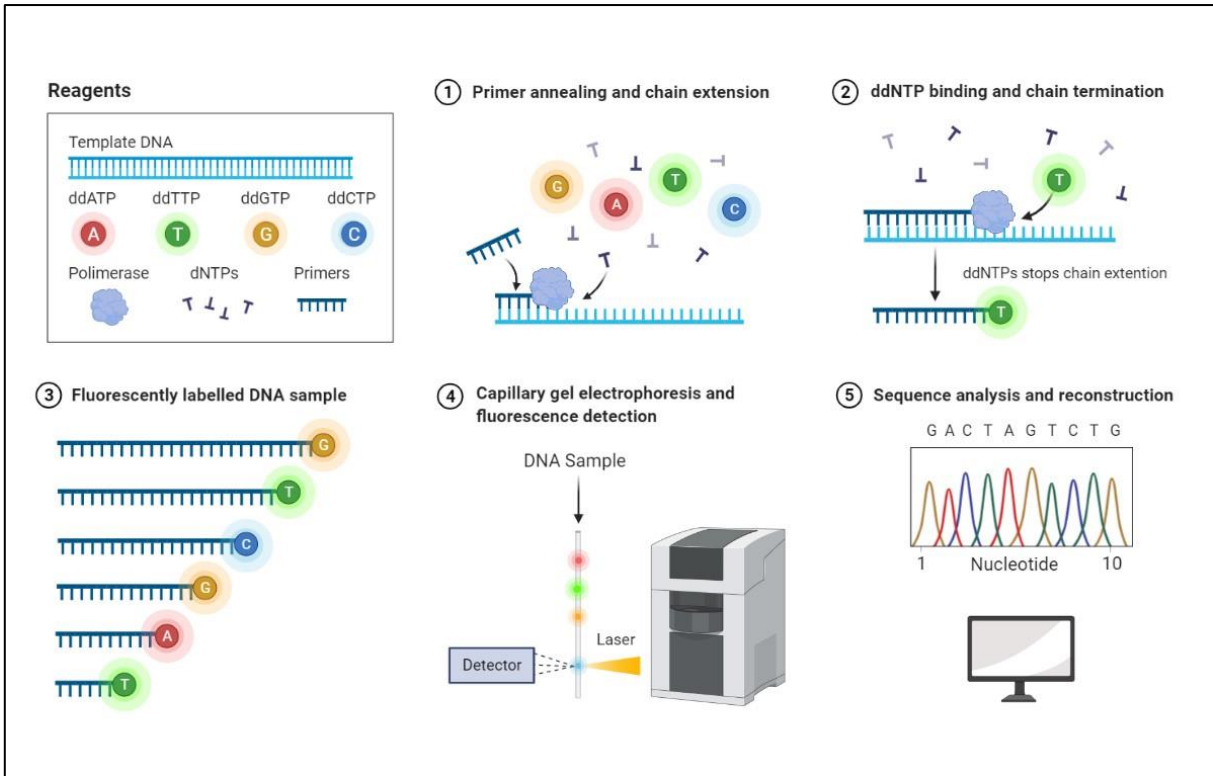


Figure 40. Les étapes de la méthode de séquençage de Sanger (<https://app.biorender.com/biorender-templates>)

Nous avons séquencé les produits de PCR dans les deux sens. Pour cela, deux réactions de séquençage ont été effectuées pour chaque produit de PCR, une avec l'amorce 1 et l'autre avec l'amorce 2.

Chaque réaction de séquençage contient le mélange réactionnel suivant dans un volume total de 20 µl :

Produit de PCR purifié 4 µl

Tampon 3 µl

Big Dye Terminator 2 µl

Amorce 1 µl

H₂O 10 µl

Les tubes sont placés dans un thermocycleur (Labnet International Multigene Gradient Optimax Thermal Cyclers).

Les réactions de séquençage ont été réalisées en utilisant le programme suivant :

Une dénaturation initiale à 96°C pendant 1 min;

puis 25 cycles de :

Dénaturation : 10s à 96°C

Hybridation: 5 sec à 50°C

Elongation: 3 min à 60°C

Purification des produits de séquençage

Les produits de réactions de séquençage sont ensuite purifiés par chromatographie d'exclusion sur une colonne de résine Sephadex, avant leur injection dans le séquenceur capillaire.

La résine Sephadex permet d'éliminer les sels, ainsi que les nucléotides (dNTP et ddNTP) et les amorces non incorporées.

La préparation de la colonne et la purification des produits de réactions de séquençage ont été réalisées selon le protocole suivant :

Préparation de la colonne

- Mettre la résine de Sephadex dans les puits d'une plaque de filtration.
- Ajouter 300 µl d'eau ultra sur la résine et laisser 3 heures à température ambiante pour gonfler la résine.
- Mettre une autre plaque à puits en dessous de la plaque de filtration, puis centrifuger les 2 plaques pendant 2 min à 2600 rpm à 10°C. L'excès d'eau recueillie dans la plaque en dessous est éliminé.

Purification des produits de réactions de séquençage

- Transférer les produits de réactions de séquençage sur la résine dans les puits de la plaque de filtration.
- Placer la plaque de filtration contenant les puits de résine sur une plaque de séquençage et centrifuger 5 min à 2600 rpm. L'ADN purifié est recueillie dans la plaque de séquençage.

Séquençage

Ajouter 10 µl d'un tampon de charge (EDS) à l'ADN purifié puis placer la plaque de séquençage dans le séquenceur capillaire ABI 3730.

4.3.5 Analyses bioinformatiques

Les séquences d'ADN obtenues ont été assemblées, alignées et corrigées à l'aide du logiciel CodonCode Aligner (<https://www.codoncode.com/index.htm>), puis comparées avec les séquences déposées dans les bases de données GenBank du NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) et ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation), pour détecter les gènes de résistance aux antibiotiques (**Gupta et al., 2014**), en utilisant le programme BLAST.

La recherche des mutations des gènes chromosomiques qui pourraient être liées à la résistance à la colistine a été réalisée après ; traduction des séquences nucléotidiques en Proteines sur «ExPASy-translate tool». Ensuite, L'alignement des séquences traduites en protéines avec la séquence de référence téléchargée en utilisant «NPS @, ClustalW multiple alignment ».

5. Analyses statistiques

L'association entre la prévalence des BLSE, les isolats bactériens, les types d'échantillons, les sexes et les services hospitaliers ont été testés par le test Chi-Square ou le test exact de Fisher. La relation entre les BLSE et les covariables étudiées était considérée comme significative à une valeur $P < 0,05$. L'analyse des données statistiques a été effectuée à l'aide du logiciel R (**R Core Team, 2020**).

Résultats

1. Identification des bactéries

Un total de 84 entérobactéries ont été isolées et confirmées par les tests biochimiques et par MALDI-TOF-MS avec des valeurs de score ≥ 2 (des exemples de résultats d'identification des isolats par MALDI-TOF-MS avec leurs scores sont montrés dans l'**Annexe I**).

Les espèces prédominantes étaient *E. coli* (n=49, 58.3 %) et *K. pneumoniae* (n=30, 35.7 %), suivies par *Enterobacter cloacae* (n=3, 3.6 %), *K. oxytoca* (n=1, 1.19 %) et *Enterobacter aerogenes* (n=1, 1.19%). La liste complète des isolats et leurs caractéristiques figure dans l'**Annexe II**.

La majorité de ces entérobactéries provenait de l'urine (n=66, 78.5%), suivie du pus (n=7, 8.3 %), des selles (n=4, 4.7%), du sang (n=3, 3.6 %) et d'autres prélèvements (n=4, 4.7%, vaginale, liquide ascétique, crachat et cathéter) (**Tableau 10**). Au total, 54 isolats provenaient de patients hospitalisés (64.2%) et 30 de patients externes (35.7%) ; 51 (60.7%) provenaient de femmes et 32 (38%) d'hommes (**Tableau 10 et Annexe II**).

Tableau 10. Taux d'isolement et répartitions des entérobactéries isolées dans cette étude.

Isolat	n(%)
<i>E. coli</i>	49(58.3%)
<i>Klebsiella</i> spp.	31(36.9%)
<i>Enterobacter</i> spp.	04(4.8%)
Type d'échantillon	
Urine	66(78.5%)
Pus	7(8.3%)
Selles	4(4.7%)
Sang	3(3.6%)
Autres	4(4.7%)
Sexe du patient	
Male	32(38%)
Femelle	51(60.7%)
Patients admis	
- Urgence pédiatrique	18(33.3%)
- Pédiatrie	19(35.1%)
- Médecine Interne	10(18.5%)
- Chirurgie	4(7.4%)
- Obstétrique	3(5.5%)
Patients externes	30(35.7%)

2. Biotypage des isolats d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* par MALDI-TOF MS

Le classement des 49 isolats d'*E. coli* par le logiciel Biotyper, avec une distance arbitraire de 700, a permis de les séparer en 5 différents groupes (**Figure 41**). Le dendrogramme n'a pas révélé une association entre les groupes et les caractéristiques des différents isolats (origines, dates d'isolement et types de prélèvement) ni aux phénotypes de résistance.

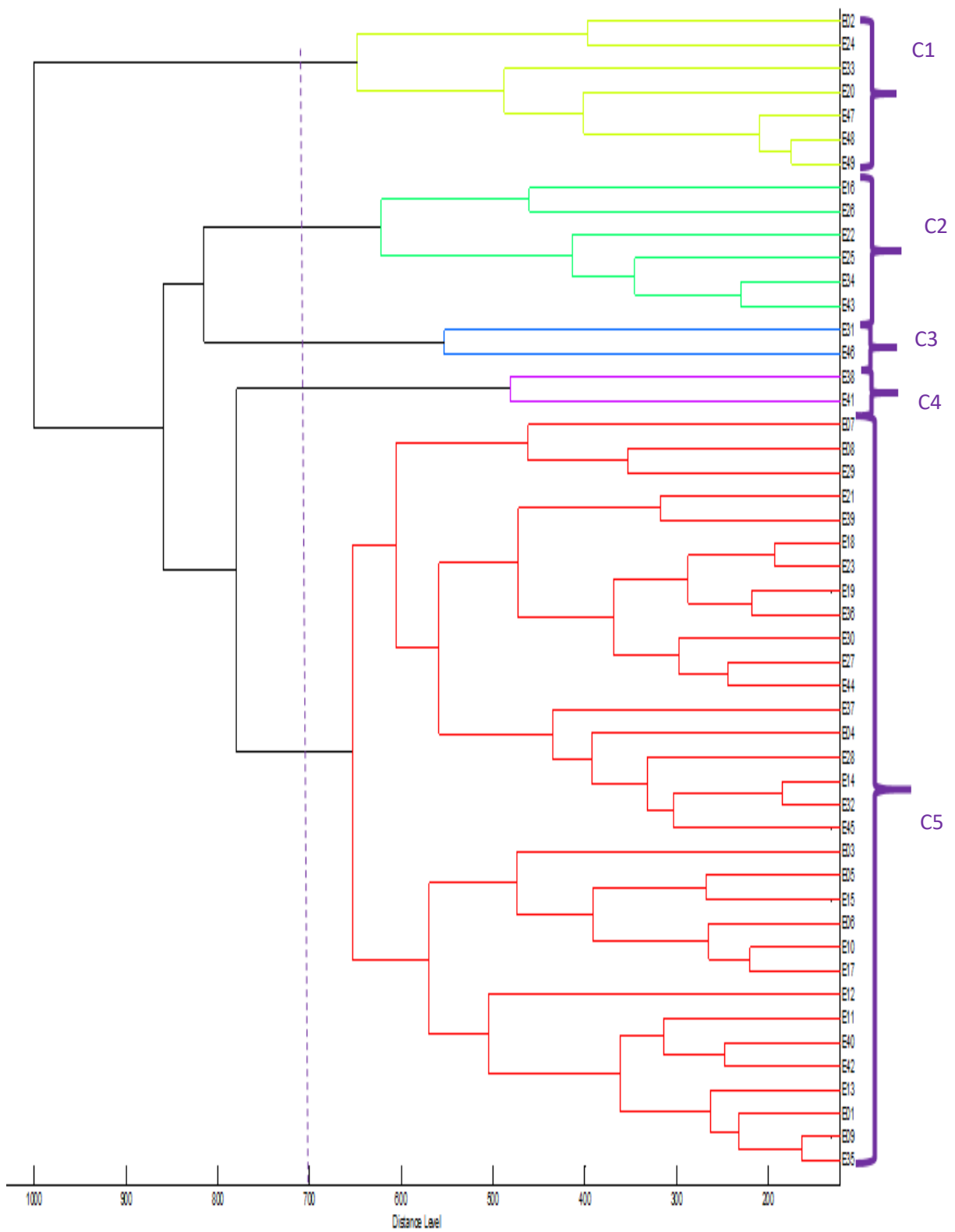


Figure 41. MSP dendrogramme de classification des isolats d'*E. coli* par le logiciel Biotyper.

Les 30 isolats de *K. pneumoniae* sont moins diversifiés, appartenant seulement à deux groupes (Figure 42). De même que les isolats d'*E. coli*, il n'existe aucuns liens évidents entre l'origine des isolats et les deux groupes.

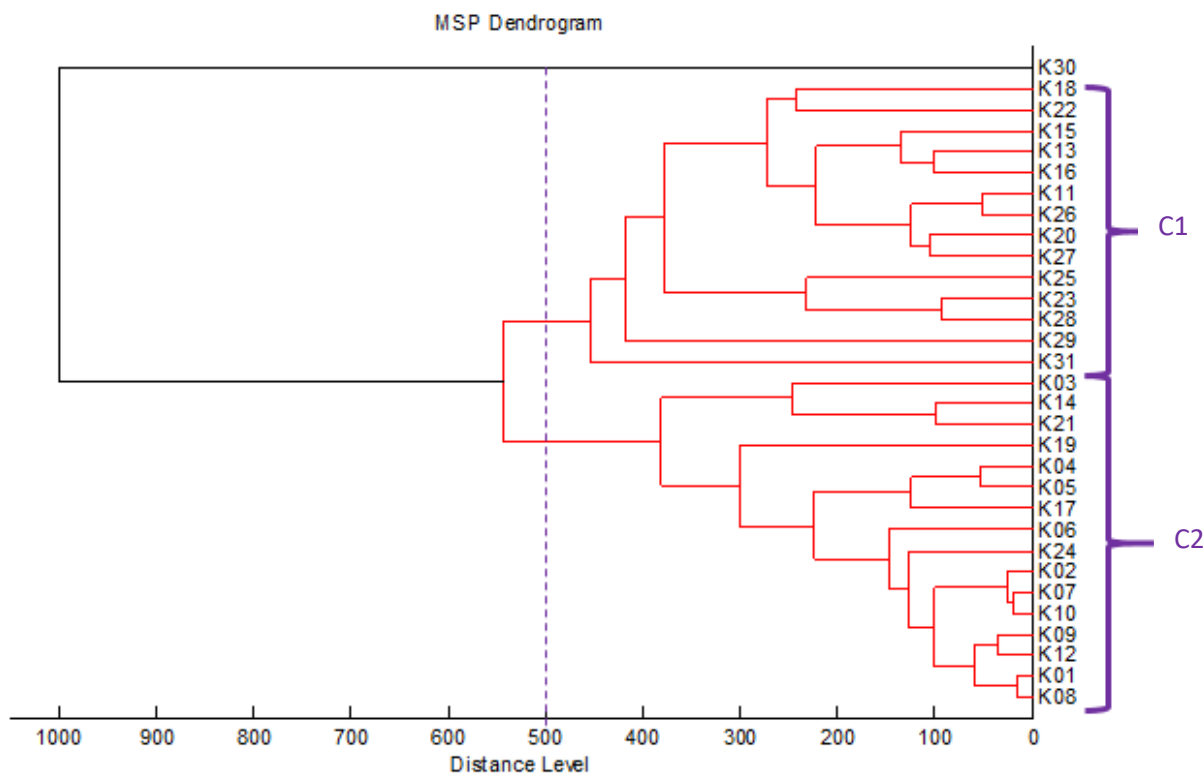


Figure42. MSP dendrogramme de classification des isolats de *K. pneumoniae* par le logiciel Biotyper.

3. Détection phénotypique des résistances aux antibiotiques

Tous les isolats ont été testés pour leur résistance, par la méthode de diffusion sur disque sur gélose MH, contre 16 antibiotiques, Amoxicilline (AMX25), Amoxicilline+acide clavulanique (AMC30), Piperacilline+Tazobactame (TZP 85), Céfalotine (KF30), Céftriaxone (CRO30), Céfépime (FEP 30), Ertapénème (ERT10), Imipénème (IPM10), Fosfomycine (FF50), Nitrofurantoin (F300), Triméthoprime+Sulfaméthoxazole (SXT25), Doxycycline (DO30), Colistine (CS50), Amikacine (AK30), Gentamicine (CN15) et Ciprofloxacine (CIP5).

3.1 Résistance aux β -lactamines

Le profil de sensibilité aux β -lactamines a été réalisée par la méthode de diffusion sur disque sur gélose MH, en utilisant 8 disques d'antibiotiques (AMX, AMC, TZP, CF, CRO, FEP, ERT et IPM) selon les recommandations du CA-SFM 2013. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 11**.

Les résultats ont montré des taux de résistances très élevés, avec la majorité des isolats résistants à la plupart des β -lactamines testés. Par contre, les carbapénèmes (ERT et IPM) sont les antibiotiques les plus actifs contre les isolats étudiés. L'IPM était efficace contre tous les isolats (**Tableau 11**).

Enterobacter spp. ont montré les taux de résistances les plus élevés aux AMX (100%), AMC (100%), CF (100%), CRO (100%), ERT (75%) et SXT (75%).

Tableau 11. Taux de résistance aux β -lactamines chez les isolats d'entérobactéries étudiés.

Antibiotiques	Taux de Résistance (%)			
	<i>E. coli</i> (n=49)	<i>Klebsiella</i> spp. (n=31)	<i>Enterobacter</i> spp. (n=04)	Total (n= 84)
AMX	49 (100%)	31 (100%)	4 (100%)	84 (100%)
AMC	49 (100%)	27 (87.1%)	4 (100%)	80 (95.24%)
TZP	05(10.2%)	08 (26%)	2 (50%)	15 (17.86%)
CF	25(51.0%)	22 (71%)	4 (100%)	51 (60.71%)
CRO	21(42.8%)	23 (74.1%)	04 (100%)	48 (57.14%)
FEP	18(36.7%)	23 (74.1%)	02 (50%)	43 (51.19%)
ERT	00 (0%)	04 (12.9%)	03 (75%)	07 (8.33%)
IPM	00 (0%)	00 (0%)	00 (0%)	00 (0%)

Amoxicilline (AMX), Amoxicilline + acide clavulanique (AMC), Pipéracilline + Tazobactam (TZP), Céfaloine (CF), Ceftriaxone (CRO), Cefépime (FEP), Ertapénèm (ERT), Imipénèm (IPM).

Classification phénotypique des résistances aux β -lactamines

Sur la base de leurs profils de résistance aux différents β -lactamines, les entérobactéries isolées dans cette étude ont été classées en productrices de BLSE, de TEM résistante aux inhibiteurs (TRI), de pénicillinase haut niveau (PHN), ou de céphalosporinase (CASE).

Au total, 48 (57%), 25 (29.7%), 9 (10.7%) et 3 (3.5%) des 84 isolats avaient les phénotypes BLSE, TRI, PHN et CASE, respectivement (**Tableau 12, Figure 43**).

Au sein des espèces individuelles, les fréquences du phénotype de BLSE étaient de 100%, 80% et 40% chez les *Enterobacter* spp., les *K. pneumoniae* et les *E. coli*, respectivement.

Les phénotypes TRI et PHN étaient présents uniquement chez les *E. coli*, 44% et 12%, et les *K. pneumoniae* 10% et 10%, respectivement. Le phénotype CASE n'a été présenté que par les *E. coli*, avec une faible fréquence de 6% (**Tableau 12, Figure 43**).

Tableau 12. Répartition des phénotypes de résistances aux β -lactamines chez les isolats d'entérobactéries étudiées.

	<i>E. coli</i> (n=49) n(%)	<i>K. pneumoniae</i> (n=30) n(%)	<i>Enterobacter</i> spp. (n=4) n(%)	Total n(%)
BLSE	20(40.8%)	24(80%)	4(100%)	48(57%)
CASE	3(6%)	0(0%)	0(0%)	3(3.5%)
TRI	22(44%)	3(10%)	0(0%)	25(29.7%)
PHN	6(12%)	3(10%)	0(0%)	9(10.7%)

PHN : pénicillinase haut niveau, **TRI** : TEM Résistant aux Inhibiteurs, **CASE** : céphalosporinase, **BLSE** : β -lactamases à spectre élargi.

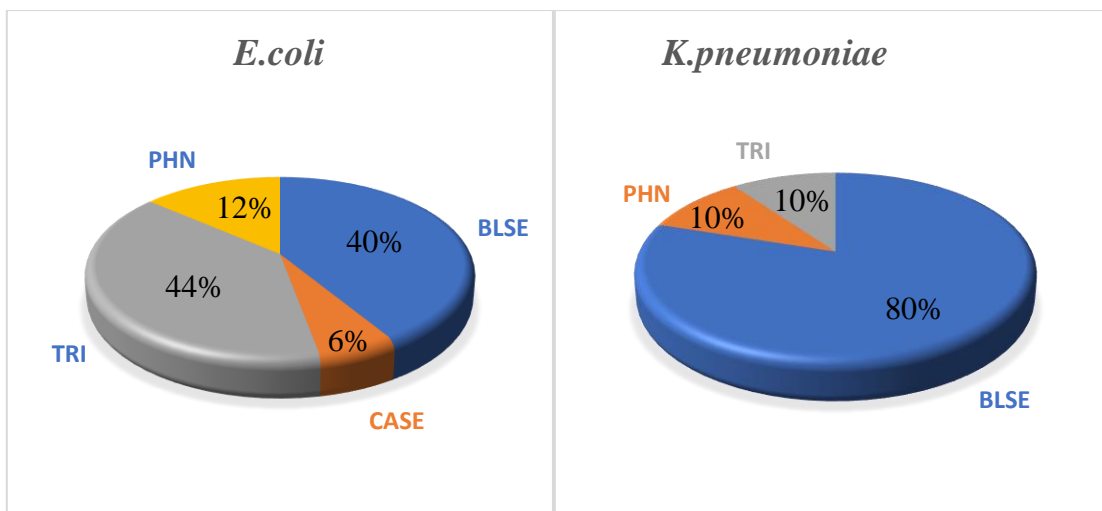


Figure 43. Fréquences des phénotypes de résistance aux β -lactamines chez les isolats d'*E. coli* et *K. pneumoniae*.

Test de confirmation de la présence des BLSE

Un total de 51 isolats (24 *E. coli*, 23 *Klebsiella* spp. et 4 (100%) *Enterobacter* spp., qui ont montré des profils de résistances aux céphalosporines, et donc suspectées d'être productrices de BLSE, ont été soumises au test de synergie entre deux disques (AMC et CRO) pour confirmer la production de BLSE (**Figure 44**) ont confirmé que 48 isolats produisaient des BLSE. Les *Enterobacter* spp. sont les prédominantes productrices de BLSE (100%, n= 4) suivi de *K. pneumoniae* (80%, n= 24) et d'*E. coli* (40%, n=20) (**Tableau 12**).

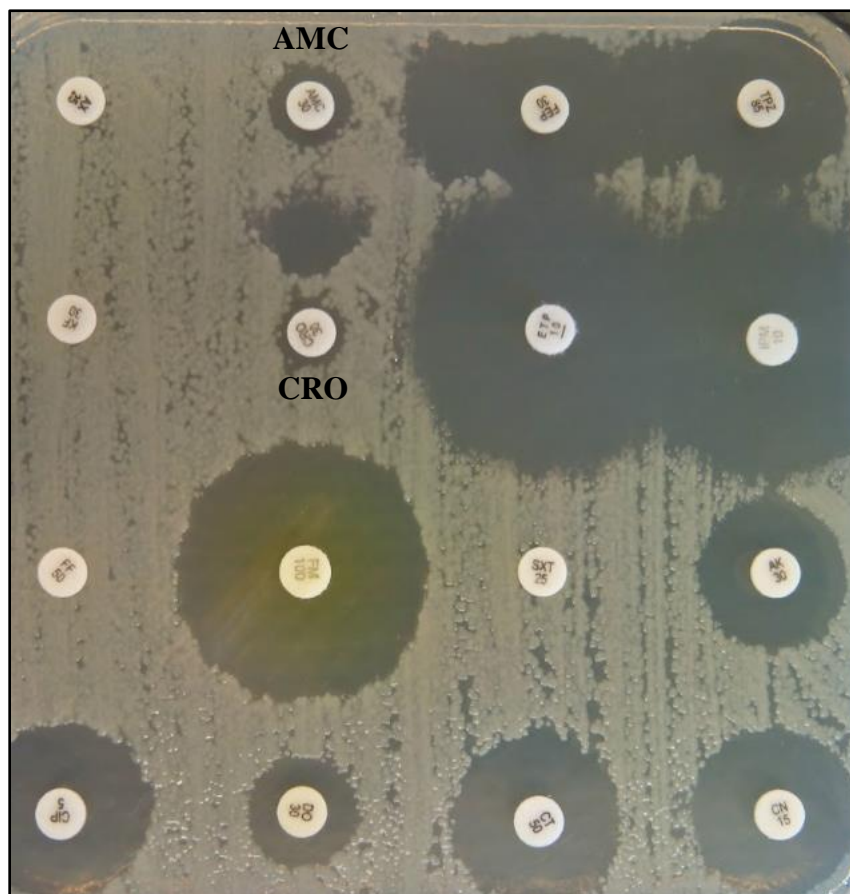


Figure 44. Résultat d'un test de synergie montrant un phénotype positif pour la BLSE de l'isolat de *K. pneumoniae* K26.

La répartition des BLSE selon les bactéries, les prélèvements, le sexe, le type de patients et les services hospitaliers sont présentées dans le **tableau 13**. Les entérobactéries productrices de BLSE étaient plus dominantes dans les selles (100 %, n = 04), chez les patients de sexe masculin (71,9 %, n=23), chez les patients hospitalisés (64.8 %, n=35) et en service de pédiatrie (67,5 %, n = 25). Cependant, ces différences de prévalences des BLSE n'étaient statistiquement significative qu'entre les sexes (valeur $P < 0,05$) et les espèces bactériennes (valeur $P < 0,01$) (**Tableau 13**).

Tableau 13. Répartition des taux de BLSE.

	ESBL (%)	Non ESBL (%)	P value
Isolat			
<i>E. coli</i>	20 (40.8%)	29 (59.1%)	0.0002
<i>K. pneumoniae</i>	24 (80%)	6 (20 %)	
<i>K. oxytoca</i>	0 (0%)	1 (100%)	
<i>Enterobacter spp.</i>	4 (100%)	0 (0%)	
Type d'échantillon			
Urine	36 (54.5%)	30 (45.4%)	0.26
Selles	04 (100%)	00 (00.0%)	
Autres	08 (57.1%)	6 (42.8%)	
Sexe			
Male	23 (71.9%)	09 (28.1%)	0.04
Femelle	25 (48.1%)	27 (51.9%)	
Type de patient			
Admis	35 (64.8%)	19 (35.1%)	0.09
Externe	13 (43.3%)	17(56.6%)	
Service hospitalier			
Pédiatrie	25 (67.5%)	12 (32.4%)	0.55
Autres	10 (58.82%)	07(41.17%)	

Test de confirmation de la présence des céphalosporinases

La confirmation d'une hyperproduction de céphalosporinases chez 14 isolats d'entérobactéries, (4 *E. coli* et 10 *K. pneumoniae*), qui ont présenté un phénotype de résistance à la céphalosporine de 2^{ème} (Céfoxitine FOX) et 3^{ème} (Céfotaxime CTX ou Céftriaxone CRO) génération (un antibiogramme autre que celui de l'antibiogramme à seize antibiotiques), a été réalisée par le test de la cloxacilline. Le test a montré qu'aucun isolat de *K. pneumoniae* n'a produit la céphalosporinase. Par contre, 3 isolats d'*E. coli* (E7, E16, E39) ont montré une augmentation du diamètre de la zone d'inhibition d'au moins 8 mm autour des disques d'antibiotiques de céphalosporines, FOX, CAZ et CTX, indiquant l'hyperproduction d'une céphalosporinase (**Figure 45**). Au total, 3

(3.5%) des 84 isolats, exclusivement des *E. coli* (6% de tous les *E. coli*), avaient un phénotype de céphalosporinase.

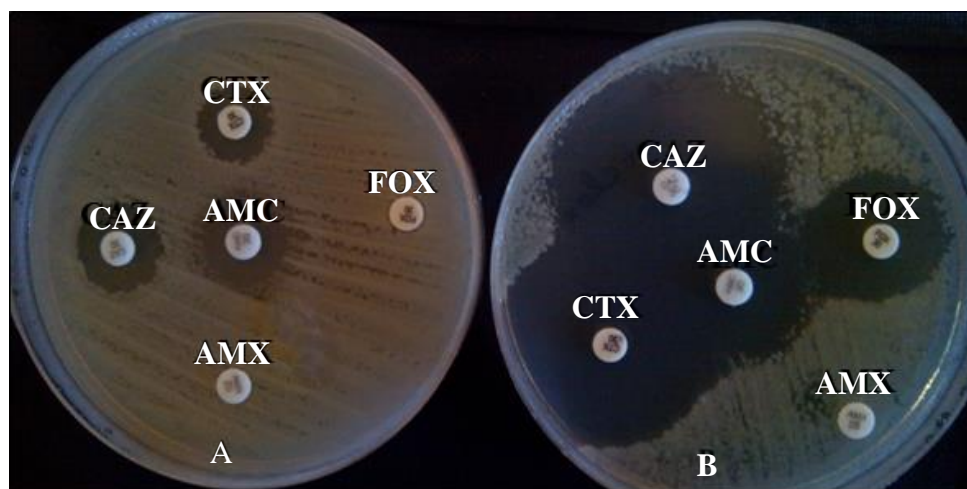


Figure 45. Résultat d'un test à la cloxacilline chez l'isolat d'*E. coli* E39.
A : Milieu MH gélosé sans cloxacilline ; **B :** Milieu MH gélosé additionné avec 250 mg/l de cloxacilline, montrant une augmentation du diamètre de la zone d'inhibition d'au moins 8 mm autour des disques CAZ et CTX, indicatif d'une production de céphalosporine.

Tests de confirmation de la présence des carbapénémases

Bien que tous les isolats soient sensibles aux carbapénèmes, néanmoins 7 (3 *Enterobacter* et 4 *K. pneumoniae*) ont montré une faible résistance. Ces isolats ont fait l'objet des tests CARBA NP modifié et de Hodge modifié afin de confirmer s'il y a présence de carbapénémases. Les deux tests ont indiqué l'absence de production de carbapénémase chez les isolats testés (**Figure 46 et 47**).

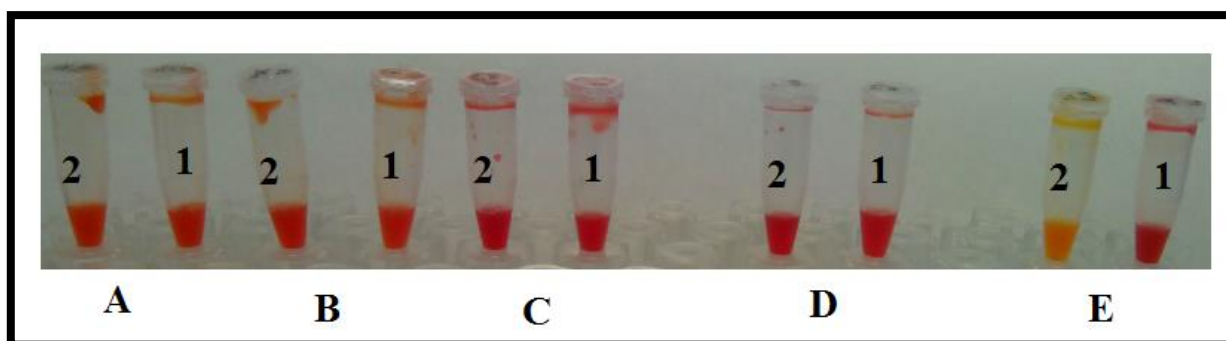


Figure 46. Résultat de test de CARBA NP modifié sur trois isolats de *K. pneumoniae*. A: Isolat *K. pneumoniae* K06 ; B: Isolat *K. pneumoniae* K8 ; C : Isolat *K. pneumoniae* K24.
 D : contrôle négatif. E : contrôle positif.
 1 : tube sans imipenème. 2 : tube avec imipenème.

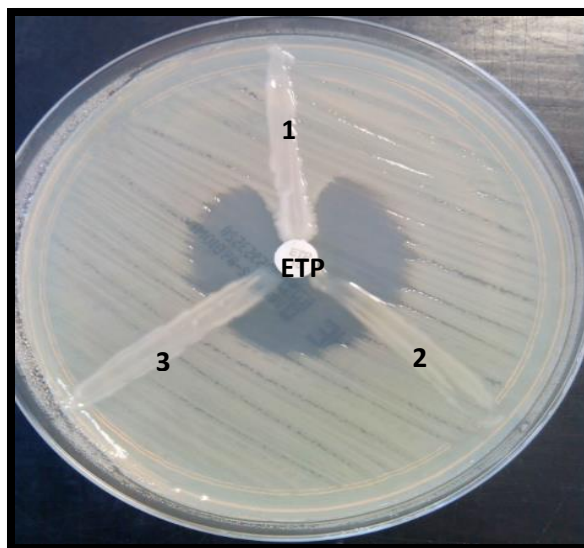


Figure 47. Résultat négatif d'un test de Hodge modifié. (1) *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 (contrôle positif), (2) *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706 (contrôle négatif) et (3) l'isolat *K. pneumoniae* K2.

3.2 Résistance à la colistine

La colistine était parmi les antibiotiques les plus actifs contre les entérobactéries étudiées, car la majorité des isolats (94%) étaient sensibles à cet antibiotique, mis à part 5 isolats (6%, une *E. coli* et 4 *K.pneumoniae*) qui ont montré une résistance à la colistine; tandis que 4 autres avaient des diamètres de zones d'inhibitions réduits.

Etant donné que la méthode de diffusion de disque sur milieu MH gélosé n'est pas fiable et n'est pas recommandée pour la colistine, un test de CMI, par la méthode de microdilution en milieu liquide, a été réalisé (**Figure 48**), les résultats ont été interprétés selon les recommandations de la CA-SFM, et les valeurs des CMI obtenues sont montrées dans le **Tableau 14**.

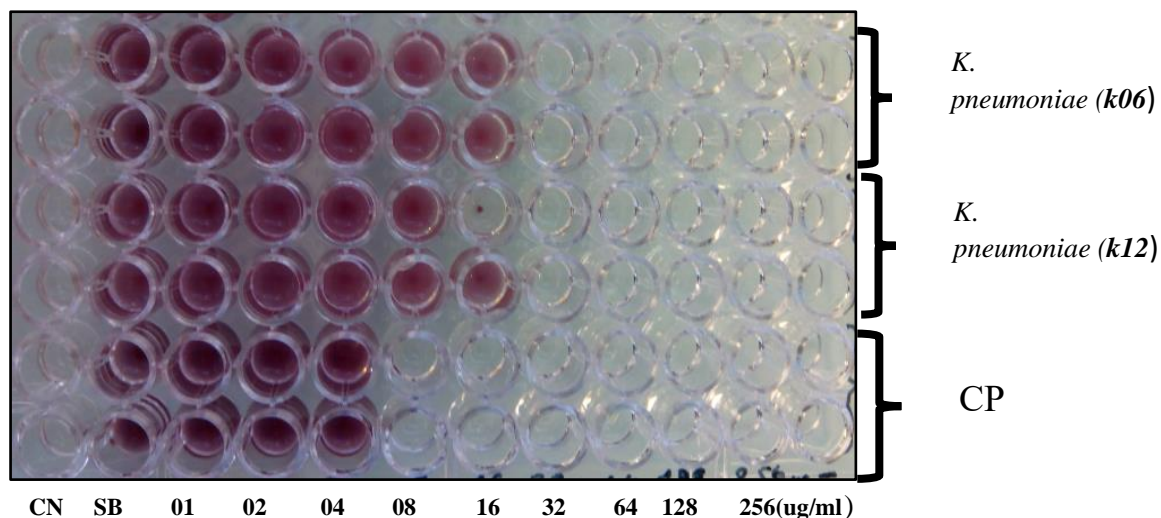


Figure 48. Détermination de la CMI de la colistine par la méthode de microdilution sur milieu liquide. SB : suspension bactérienne, CP : contrôle positif, CN : contrôle négatif.

Comme indiqué dans le **Tableau 14**, seulement 4 isolats de *K. pneumoniae* (K6, K9, K12 et K31) étaient résistants à la colistine.

Tableau 14. Valeurs des CMI de la colistine obtenues par la méthode de microdilution en milieu liquide.

Isolat	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Interprétation
<i>Escherichia coli</i> E42	≤ 2	sensible
<i>K. pneumoniae</i> K6	32	résistante
<i>K. pneumoniae</i> K9	4	résistante
<i>K. pneumoniae</i> K12	32	résistante
<i>K. pneumoniae</i> K17	< 1	sensible
<i>K. pneumoniae</i> K19	2	sensible
<i>K. pneumoniae</i> K25	2	sensible
<i>K. pneumoniae</i> K27	2	sensible
<i>K. pneumoniae</i> K31	128	résistante

3.3 Résistance aux aminosides

Les isolats d'entérobactéries étudiées ont présenté un taux de résistance global à l'amikacine (AK) et à la gentamicine (CN) de 40% (34/84), avec des taux différents pour la gentamicine et l'amikacine, 32% (27/84) et 8% (7/84), respectivement (**Tableau 15**).

La résistance à ces deux molécules d'aminosides testées était plus fréquente chez les isolats de *Klebsiella* spp 24% (20/84) que ceux d'*E. coli* 14.3% (12/84). Les taux de résistance au CN étaient de 48% (15/31) et 20.4% (11/49) parmi les isolats de *Klebsiella* spp et d'*E. coli*, respectivement ; tandis que ceux contre AK étaient de 16% (5/31) et 2% (1/49), respectivement (**Tableau 15**).

3.4 Résistance aux quinolones

Au total, 43% des isolats des entérobactéries étaient résistants aux quinolones de 2^{ème} génération, CIP. Les isolats de *Klebsiella* spp. et d'*E. coli* ont montré des taux de résistance de 45% et 43%, respectivement, suivit par *Enterobacter* spp. avec 25% (**Tableau 15**).

3.5 Résistance aux autres classes d'antibiotiques (fosfomycines, nitrofuranes, cyclines et Sulfamides)

La fosfomycine est parmi les antibiotiques les plus actifs contre les isolats étudiés, 95% de l'ensemble des entérobactéries étaient sensibles à cet antibiotique, incluant tous les *E. coli* et les *Enterobacter* spp (100%) et 87% des *Klebsiella* spp. (**Tableau 15**).

En revanche, la Nitrofurantoin était moins active contre les *Enterobacter* spp. et les *Klebsiella* spp., dont 100% et 64.5% étaient résistants, mais plus active contre les *E. coli*, puisque la majorité (88%) était sensible à cet antibiotique.

La résistance contre les cyclines et les sulfamides, variait entre 49% et 64.5% contre le DO, et entre 61% et 75% contre le SXT.

Tableau 15. Taux de résistances des isolats des entérobactéries à différentes classes d'antibiotiques

	Classe de l'antibiotique							
	Aminosides		Quinolones	Fosfomycine	Nitrofurane	Cycline	Sulfamide	Polymyxine
	Antibiotique							
	CN	AK	CIP	FF	F	DO	SXT	CS
Entérobactéries	Taux de Résistance n(%)							
<i>E. coli</i> (n=49)	11 (20.4%)	1 (2%)	21 (43%)	0 (0%)	6 (12%)	24 (49%)	32 (65%)	1 (2%)
<i>Klebsiella spp.</i> (n=31)	15 (48%)	5 (16%)	14 (45%)	4 (13%)	20 (64.5%)	20(64.5%)	19 (61%)	4 (13%)
<i>Enterobacter spp.</i> (n=04)	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)	0 (0%)	4 (100%)	2 (50%)	3 (75%)	0 (0%)

Fosfomycine (FF), Nitrofurantoin (F), Triméthoprim + Sulfaméthoxazole (SXT) Doxycycline (DO), Colistin (CS), Amikacin (AK), Gentamicin (CN), Ciprofloxacine (CIP).

3.6 Prévalence des multirésistances

La multirésistance est défini comme la résistance à au moins trois antibiotiques de classes différentes à la fois. Dans notre étude, un total de 63 (75%) entérobactéries se sont avérées multirésistantes (**Tableau 16**), avec des taux de 86.6% (n=26), 75% (n=3) et de 69% (n=34) chez les isolats de *K. pneumoniae*, d'*Enterobacter spp.* et d'*E. coli*, respectivement.

Tableau 16. Taux de multirésistances.

Entérobactérie	Chez chaque entérobactérie	Chez les EP-BLSE	Nombre de classes d'antibiotiques			
			3	4	5	6
			n(%)			
<i>E. coli</i> (n=49)	34/49 (69%)	16/20 (80%)	14/49 (28.6%)	12/49 (24.5%)	7/49 (14.3%)	1/49 (2%)
<i>Klebsiella spp.</i> (n=31)	26/31 (84%)	23/24 (95.8%)	6/31 (19.3%)	6/31 (19.3%)	4/31 (13%)	10/31 (32%)
<i>Enterobacter spp.</i> (n=4)	3/4 (75%)	3/4 (75%)	1/4 (25%)	2/4 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	63/84 (75%)	42/48 (87.5%)	21/84 (25%)	20/84 (24%)	11/84 (13%)	11/84 (13%)

EP-BLSE : entérobactéries productrices de BLSE

Les multirésistances étaient plus fréquemment associées aux BLSE, avec une fréquence globale de (87.5%), et avec des fréquences de 95.8% et 80% et 75% chez les *K. Pneumoniae*, les *E. coli* et les *Enterobacter spp.* productrices de BLSE, respectivement (**Tableau 16**).

Parmi les 63 isolats multirésistants, le phénotype de multirésistance a été exprimé avec une résistance à trois (33%, n=21), quatre (31.7%, n=20), cinq (17.5%, n=11) ou six (17.5%, n=11) classes d'antibiotiques. En termes de multirésistance à six classes d'antibiotiques, les *K. pneumoniae* étaient majoritaires (32%, n=10), suivit de loin par les *E. coli* (2%), tandis que les *Enterobacter* spp. n'ont pas présenté ce phénotype (0%) (**Tableau 16**).

4. Identification des gènes de résistances aux antibiotiques

4.1 Identification des gènes de β -lactamases

4.1.1 Identification des gènes de β -lactamases par PCR

Pour confirmer la présence des gènes codant les β -lactamases TEM, SHV, CTX (du groupe A, CTX-M1 et CTX-M9) et OXA-48, des tests PCR (qPCR et PCR classique) ont été effectués sur l'ensemble des 84 isolats d'entérobactéries, en utilisant des paires d'amorces spécifique à chaque gène, présentés dans les tableaux 8 et 9.

Les courbes d'amplifications produites par la qPCR sont montrés dans l'**Annexe III**. Les résultats des tests de la PCR classique sont montrés dans les **Figures 49, 50 et 51 et le tableau 17**. Différents profils de présence/absence de gènes ont été observés.

Un total de 59 gènes *bla*_{TEM} ont été identifiés, dont la majorité été présente chez les *E. coli* (71%, n=42), suivit par les *K. pneumoniae* (25.4%, n=15) et les *Enterobacter* spp. (3.3%, n=2) (**Figures 49 et Tableau 17**).

Nous avons détecté la présence de 29 gènes *bla*_{SHV}, la grande majorité (96.5%, n=28) chez *K. pneumoniae*, alors qu'une seule *E. coli* (3.5%, n=1) portait ce gène (**Figure 50 et Tableau 17**).

Un total de 24 gènes *bla*_{CTX-M} ont été identifiés chez 23 isolats, 14 (58.3%) chez les *E. coli* et 10 (41.6%) chez les *K. pneumoniae* (**Figure 51 et Tableau 17**).

Aucun des isolats testés n'a montré la présence du gène de carbapénémases OXA-48.

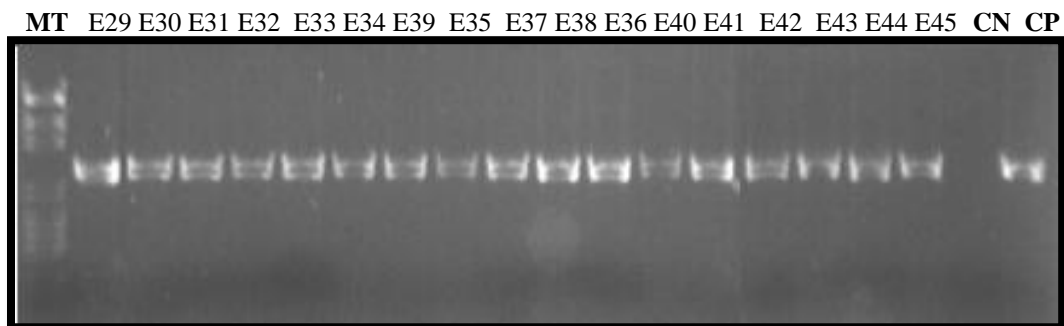


Figure 49. Détection du gène *bla*-_{TEM} par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% sous 135volt pendant 20min. **MT**: marqueur de taille, **CN**: contrôle négatif, **CP**: contrôle positif.

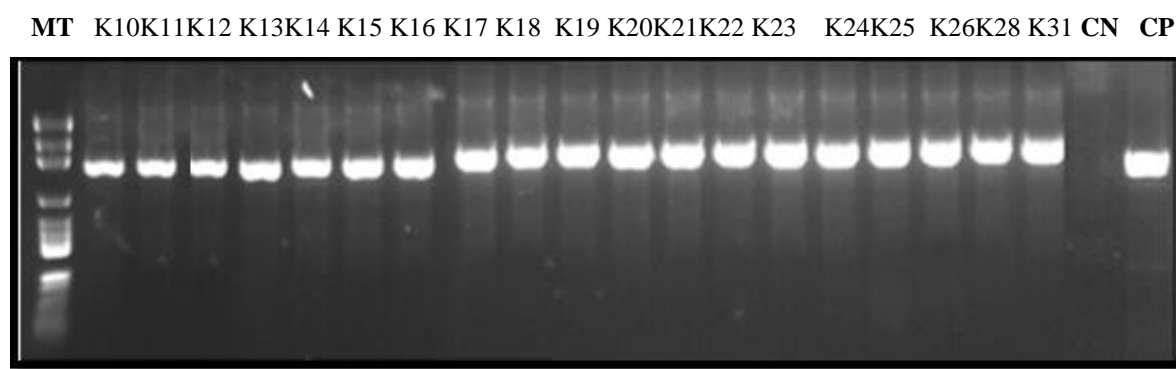


Figure 50. Détection du gène *bla*-_{SHV} par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% sous 135volt pendant 20min.. **MT**: marqueur de taille, **CN**: contrôle négatif, **CP**: contrôle positif.

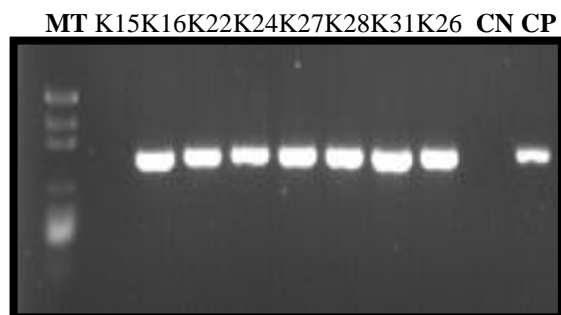


Figure 51. Détection du gène *bla*-_{CTX-M1} par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% sous 135volt pendant 20min. **MT**: marqueur de taille, **CN**: contrôle négatif, **CP**: contrôle positif.

4.1.2 Identification des gènes de β -lactamases par séquençage

La présence des gènes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} et *bla*_{HV} chez les entérobactéries isolées, a été déterminée par séquençage par la méthode de Sanger. Les séquences obtenues ont été

comparées aux séquences des gènes de résistances aux antibiotiques présentes dans les bases de données (ARG-ANNOT et GenBank), en utilisant l’outil BLAST.

Quelques exemples de pourcentages de similarités entre les séquences des gènes de β -lactamases de nos isolats avec celles présentes dans les bases de données sont présentés dans l’Annexe IV.

Le **Tableau 17** montre les profils phénotypiques et génotypiques de résistance des isolats d’entérobactéries étudiés.

Tableau 17. Profils phénotypiques et génotypiques de résistance des isolats d’entérobactéries étudiés.

Isolat	Phénotype β -lactamase	Profil phénotypique de résistance	Profil génotypique de résistance
<i>E. coli</i>			
E1	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CN CIP F DO SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac(6')-Ib-cr</i>
E2	BLSE*	AMX AMC CF CRO FEP DO SXT	<i>bla</i> _{TEM}
E3	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CN CIP DO SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac(6')-Ib-cr</i>
E4	BLSE*	AMX AMC CF CRO FEP CIP DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-104}
E5	BLSE	AMX AMC(I) CF CRO DO	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
E6	TRI	AMX AMC DO SXT	<i>bla</i> _{TEM}
E7	BLSE+CASE	AMX AMC CF CRO CIP F DO SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
E8	TRI	AMX AMC SXT	<i>bla</i> _{TEM}
E9	TRI	AMX AMC CN DO SXT	<i>bla</i> _{TEM}
E10	PHN	AMX AMC CF CIP DO	<i>bla</i> _{TEM}
E11	BLSE*	AMX AMC CF CRO FEP CIP DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-104}
E12	PHN	AMX AMC CN	<i>bla</i> _{TEM}
E13	TRI**	AMX AMC	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-55}
E14	TRI	AMX AMC CN CIP DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-98}
E15	PHN	AMX AMC CF CN DO SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>aadA1</i>
E16	BLSE+CASE	AMX AMC CF CRO FEP F DO	<i>bla</i> _{CTX-M-27}
E17	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CN	<i>bla</i> _{TEM}
E18	TRI	AMX AMC DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-33}
E19	TRI	AMX AMC	<i>bla</i> _{TEM}
E20	TRI	AMX AMC CIP SXT	<i>bla</i> _{TEM}
E21	TRI	AMX AMC DO SXT	<i>bla</i> _{TEM}
E22	TRI	AMX AMC F DO SXT	<i>bla</i> _{TEM}

Suite du tableau

E23	BLSE	AMX AMC TZP CF CRO FEP	<i>bla</i> _{TEM-33}
E24	PHN	AMX AMC DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-198}
E25	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CIP DO SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
E26	TRI	AMX AMC	<i>bla</i> _{TEM-192}
E27	TRI	AMX AMC DO SXT	<i>bla</i> _{TEM}
E28	TRI	AMX AMC	<i>bla</i> _{TEM}
E29	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CIP DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-104}
E30	TRI	AMX AMC CIP SXT	<i>bla</i> _{TEM-104}
E31	TRI	AMX AMC DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-104}
E32	TRI	AMX AMC SXT	<i>bla</i> _{TEM}
E33	PHN	AMX AMC CF CN DO	<i>bla</i> _{TEM}
E34	TRI	AMX AMC CIP DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-104}
E35	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP SXT	<i>bla</i> _{TEM}
E36	TRI	AMX AMC DO	<i>bla</i> _{TEM-1D}
E37	TRI	AMX AMC TZP	<i>bla</i> _{TEM}
E38	PHN	AMX AMC CF	<i>bla</i> _{TEM}
E39	CASE	AMX AMC CF CRO CIP DO	<i>bla</i> _{TEM}
E40	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CN CIP DO SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
E41	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CN CIP SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-1}
E42	BLSE	AMX AMC TZP CF CRO FEP CIP DO SXT CS	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-55}
E43	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP AK CN CIP DO SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV-148} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac(6')-Ib</i>
E44	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CIP DO SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
E45	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CIP DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-117} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
E46	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CIP DO SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
E47	TRI	AMX AMC DO SXT	<i>bla</i> _{TEM}
E48	TRI	AMX AMC	<i>bla</i> _{TEM}
E49	TRI	AMX AMC DO	<i>bla</i> _{TEM}
<i>K. pneumoniae</i>			
K1	BLSE	AMX AMC TZP CF CRO FEP AK CN CIP DO SXT	<i>bla</i> _{SHV-16} , <i>aac6</i> , <i>qnrB</i>
K2	BLSE	AMX AMC TZP CF CRO FEP AK CN CIP F DO SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV-16} , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>qnrB</i>
K3	TRI	AMX AMC (I) F	<i>bla</i> _{SHV-75}

Suite du tableau

K4	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP F SXT	<i>bla</i> _{SHV-11}
K5	BLSE	AMX AMC CF CRO CN CIP F DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-104} , <i>bla</i> _{SHV-76} , <i>aac(6')</i> , <i>qnrB</i>
K6	BLSE	AMX AMC TZP CF CRO FEP ERT CN CIP FF F CS	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>aac(6')-Ib-cr</i>
K7	PHN**	AMX AMC(I) CF(I) F DO SXT	<i>bla</i> _{SHV-148}
K8	BLSE	AMX AMC TZP CF CRO FEP ERT FF F DO	<i>bla</i> _{SHV-148}
K9	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP DO SXT	<i>bla</i> _{SHV-148}
K10	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CN F	<i>bla</i> _{TEM-104} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>aac6</i> , <i>aadA2</i>
K11	PHN	AMX AMC DO	<i>bla</i> _{SHV-1}
K12	BLSE	AMX AMC TZP F DO SXT CS (CAZ R)	<i>bla</i> _{SHV-16}
K13	PHN**	AMX AMC(I) CF(I) F DO SXT	<i>bla</i> _{SHV-148}
K14	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP ERT CN CIP F DO SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV-100} , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrB</i>
K15	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CN F	<i>bla</i> _{SHV-187} , <i>bla</i> _{CTX-M-3}
K16	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CN F	<i>bla</i> _{SHV-99} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
K17	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CN CIP F DO CS	<i>bla</i> _{SHV-99} , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrB</i>
K18	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP AK CN F SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV-85} , <i>aac(6')-Ib</i>
K19	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CN F CIP DO SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV-76} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrB</i>
K20	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CN CIP F DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-84} , <i>bla</i> _{SHV-100} , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrB</i>
K21	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CN	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV-100}
K22	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CIP F DO SXT	<i>bla</i> _{SHV-16} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrB</i>
K23	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CN F DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-104} , <i>bla</i> _{SHV-100} , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>qnrB</i>
K24	BLSE	AMX AMC TZP CRO FEP ERT CN CIP FF F SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV-71} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>aac6</i>
K25	TRI**	AMX AMC TZP F DO	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV-148}
K26	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP FF DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-104} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
K27	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP CIP DO SXT	<i>bla</i> _{TEM-104} , <i>bla</i> _{CTX-M-55}

Suite du tableau

K28	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP AK CN CIP F DO SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV-100} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac6</i> , <i>qnrB</i>
K29	TRI	AMX AMC	-
K31	BLSE	AMX AMC TZP CF CRO FEP ERT AK CN CIP DO SXT CS	<i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrB</i>
<i>K. oxytoca</i>			
K30	sensible	AMX F SXT	-
<i>Enterobacter spp.</i>			
Et01	BLSE	AMX AMC TZP CF CRO FEP ERT AK CN CIP F DO SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>aac(6')-Ib-cr</i>
Et02	BLSE	AMX AMC CF CRO ERT F SXT	-
Et03	BLSE	AMX AMC CF CRO ERT F	-
Et04	BLSE	AMX AMC CF CRO FEP F DO SXT	<i>bla</i> _{TEM}

Amoxicilline (AMX), Amoxicilline+acide clavulanique (AMC), Pipéracilline+Tazobactame (TZP), Céfaloine (CF), Céftriaxone (CRO), Céfépime (FEP), Ertapénème (ERT), Fosfomycine (FF), Nitrofurantoine (F), Triméthoprim+Sulfaméthoxazole (SXT), Doxycycline (DO), Colistine (CS), Amikacine(AK), Gentamicine(CN), Ciprofloxacine (CIP).

BLSE: β-lactamases à spectre élargi, TRI: TEM Résistant aux Inhibiteurs, PHN: Pénicillinase à Haut Niveau.
CASE : céphalosporinase

*Nous remarquons un phénotype BLSE mais absence de gène codant la BLSE.

** Nous remarquons un phénotype TRI ou PHN mais présence de gène codant une BLSE.

Un total de 112 gènes (59 *bla*_{TEM}, 29 *bla*_{SHV} et 24 *bla*_{CTX-M}) codant des β-lactamases ont été identifiés, 61 appartenait à 25 différents variants (12 *bla*_{SHV}, 8 *bla*_{TEM} et 5 *bla*_{CTX-M}) et 51 étaient des *bla*_{TEM}, dont on n'a pas pu déterminer précisément leurs variants. Le **Tableau 18** montre la distribution des 112 gènes de β-lactamases identifiés dans cette étude.

Avec 12 variants, le gène *bla*_{SHV} a présenté la plus grande diversité, suivit par *bla*_{TEM} (8 variants) et *bla*_{CTX-M} (5 variants) (**Tableau 18**).

Les gènes codant les TEM étaient les plus prédominants (52.6%, 59/112) par rapport à ceux des SHV (25.8%, 29/112) et des CTX-M (21.4%, 24/112). Les taux des *bla*_{TEM} (71%, 42/59) et *bla*_{CTX-M} (58.3%, 14/24) étaient plus élevés chez les *E. coli*, tandis que les *bla*_{SHV} étaient dominants chez *K. pneumoniae* (96.5%, 28/29) (**Tableau 18**).

La comparaison des séquences a permis de déterminer que 22 des 24 *bla*_{CTX-M} gènes appartenait au groupe 1 (*bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-55}) et 2 au groupe 9 (*bla*_{CTX-M-27}).

A signaler, que 9 des variants dans cette étude sont identifiés pour la première fois en Algérie, 5 *bla*_{TEM} (*bla*_{TEM-84}, *bla*_{TEM-98}, *bla*_{TEM-104}, *bla*_{TEM-192} et *bla*_{TEM-117}), 3 *bla*_{SHV} (*bla*_{SHV-16}, *bla*_{SHV-71} et *bla*_{SHV-76}) et 2 *bla*_{CTX-M} (*bla*_{CTX-M-27} et *bla*_{CTX-M-55}) (**Tableau 18**).

Parmi les 112 gènes de β-lactamases, 36 codaient pour des BLSE, 24/36 (66.7%) de type CTX-M (15 CTX-M-15, 3 CTX-M-1, 3 CTX-M-55, 2 CTX-M-27 et 1 CTX-M-3), 12/36 (33.3%) de type SHV (4 SHV-16, 2 SHV-99 et 6 SHV-148), avec 13 TEM non identifiées. Le variant BLSE CTX-M-15 était le prédominant 15/36 (41.6%, n=15) (**Tableau 18**).

Tableau 18. Fréquences des gènes *bla*-TEM, *bla*-SHV et *bla*CTX-M

Gène variant	Type	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Enterobacter spp.</i>
<i>bla</i> -CTX-M				
<i>bla</i> CTX-M-1	BLSE	3 (12.5%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>bla</i> CTX-M-3	BLSE	0 (0%)	1 (4%)	0 (0%)
<i>bla</i> CTX-M-15	BLSE	8 (33%)	7 (29%)	0 (0%)
<i>bla</i> CTX-M-55*	BLSE	2 (8%)	1 (4%)	0 (0%)
<i>bla</i> CTX-M-27*	BLSE	1 (4%)	1 (4%)	0 (0%)
Total=24		14 (58.3%)	10 (41.6%)	0 (0%)
<i>bla</i> -TEM				
<i>bla</i> TEM	/	29 (49%)	9 (15.2%)	2 (3.4%)
<i>bla</i> TEM-1D	No data	1 (1.7%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>bla</i> TEM-33	BLLS (TRI)	2 (3.4%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>bla</i> TEM-84*	BLLS	0 (0%)	1 (1.7%)	0 (0%)
<i>bla</i> TEM-98*	No data	1 (1.7%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>bla</i> TEM-104*	No data	6 (10%)	5 (8.5%)	0 (0%)
<i>bla</i> TEM-117*	No data	1 (1.7%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>bla</i> TEM-192*	No data	1 (1.7%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>bla</i> TEM-198	No data	1 (1.7%)	0 (0%)	0 (0%)
Total=59		42 (71%)	15 (25.4%)	2 (3.4%)
<i>bla</i> -SHV				
<i>bla</i> SHV-1	BLLS	0 (0%)	2 (6.9%)	0 (0%)
<i>bla</i> SHV-11	BLLS	0 (0%)	3 (10.3%)	0 (0%)
<i>bla</i> SHV-16*	BLSE	0 (0%)	4 (13.8%)	0 (0%)
<i>bla</i> SHV-28	No data	0 (0%)	1 (3.5%)	0 (0%)
<i>bla</i> SHV-71*	BLLS	0 (0%)	1 (3.5%)	0 (0%)
<i>bla</i> SHV-75	BLLS	0 (0%)	1 (3.5%)	0 (0%)
<i>bla</i> SHV-76*	BLLS	0 (0%)	2 (6.9%)	0 (0%)
<i>bla</i> SHV-85	BLLS	0 (0%)	1 (3.5%)	0 (0%)
<i>bla</i> SHV-99	BLSE	0 (0%)	2 (6.9%)	0 (0%)
<i>bla</i> SHV-100	No data	0 (0%)	5 (17.2%)	0 (0%)
<i>bla</i> SHV-148	BLSE	1 (3.5%)	5 (17.2%)	0 (0%)
<i>bla</i> SHV-187	No data	0 (0%)	1 (3.5%)	0 (0%)
Total=29		1 (3.5%)	28 (96.5%)	0 (0%)

BLLS: β -lactamases à large spectre ; BLSE: β -lactamases à spectre élargi ;

TRI : TEM résistant aux inhibiteurs.

*Variant détecté pour la première fois en Algérie.

4.1.3 Coexistence des gènes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} et *bla*_{TEM}

La coexistence de différentes combinaisons des gènes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} et *bla*_{CTX-M} au sein d'un même isolat a été détectée chez 26 (31%) du total des isolats (n=84) ; la majorité 73% (19/26) étaient au sein des *K. pneumoniae* et 27% (7/26) parmi les *E. coli*. La coexistence des deux gènes *bla*_{TEM} et *bla*_{CTX-M} est la combinaison la plus fréquente 23% (6/26) chez les *E. coli*, par rapport à 3.8% (1/26) chez les *K. pneumoniae*. Par contre, la coexistence des gènes *bla*_{TEM}/*bla*_{SHV} et *bla*_{CTX-M}/*bla*_{SHV} étaient présentes uniquement chez les *K. pneumoniae* avec des taux de 38.4% (10/26) et 15.3% (4/26), respectivement. La présence simultanée de 3 variants des gènes *bla*_{TEM} et *bla*_{CTX-M} et *bla*_{SHV} a été détectée chez 4 (15.3%) isolats de *K. pneumoniae* et chez 1 seul isolat d'*E. coli* (3.8%) (**Tableau 17**).

4.2 Identification des gènes de résistances aux aminosides et aux quinolones

La recherche des gènes codant pour la résistance aux aminoglycosides par PCR standard a révélé la présence des gènes *aac(6')-Ib* et *aadA* parmi les isolats de *K. pneumoniae* et d'*E. coli* qui ont présenté des résistances aux aminosides et/ou des quinolones (**Figure 52 et 53, Tableau 17 et 19**). 19 isolats avaient le gène *aac(6')-Ib*, dont 10 portaient le variant *aac(6')-Ib-cr*, 2 isolats avaient les variants du gène *aadA*, *aadA1* (*E. coli*) et *aadA2* (*K. pneumoniae*), et 11 souches ont été positives pour le gène *qnr B* (**Tableau 19**).



Figure 52. Détection du gène *aac6Ib* par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% sous 135v pendant 20min. **MT** : marqueur de taille, **CN** : contrôle négatif, **CP** : contrôle positif.

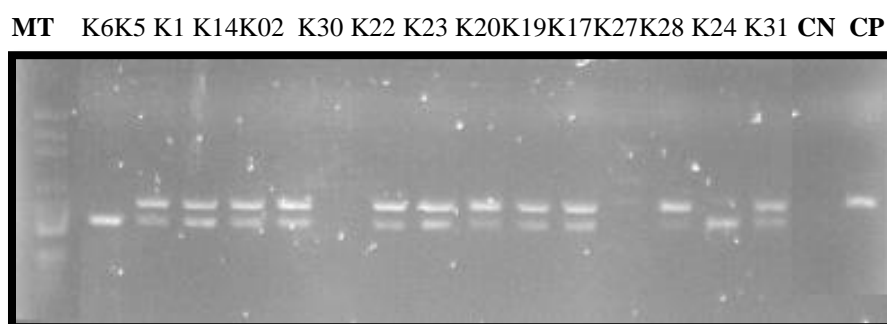


Figure 53. Détection du gène *qnrB* par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% sous 135v pendant 20min. **MT** : marqueur de taille, **CN** : contrôle négatif, **CP** : contrôle positif.

Tableau 19. Fréquences des gènes de résistance *aadA*, *aac-6-Ib*, *aac-6-Ib-cr* et *qnr B* chez les isolats d'*E. coli* et de *K. pneumoniae*.

	<i>aadA</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>
<i>E. coli</i>	2% (1/49) <i>aadA1</i>	2% (1/49)	4.1% (2/49)	-
<i>K. pneumoniae</i>	3.3% (1/30) <i>aadA2</i>	26.7% (8/30)	23.3% (7/30)	36.7% (11/30)
Total	2.5% (2/79)	11.4% (9/79)	11.4% (9/79)	12% (11/79)

4.3 Identification des gènes de résistances à la colistine

La recherche des gènes plasmidiques conférant une résistance à la colistine, *mcr-1* et *mcr-2*, a été réalisée par RT-PCR chez 08 isolats qui ont présenté des valeurs de CMI $\geq 2\mu\text{g/ml}$. Les résultats de la PCR étaient négatifs pour tous les isolats. Par conséquent, une recherche d'éventuelles mutations chromosomiques dans les gènes de régulation *mgrB*, *phoP/phoQ*, *pmrA/pmrB*, été réalisée par PCR standard suivit de séquençage.

Les résultats des différents tests de PCR sont montrés dans les **Figure 54,55, 56 , 57 et 58.**

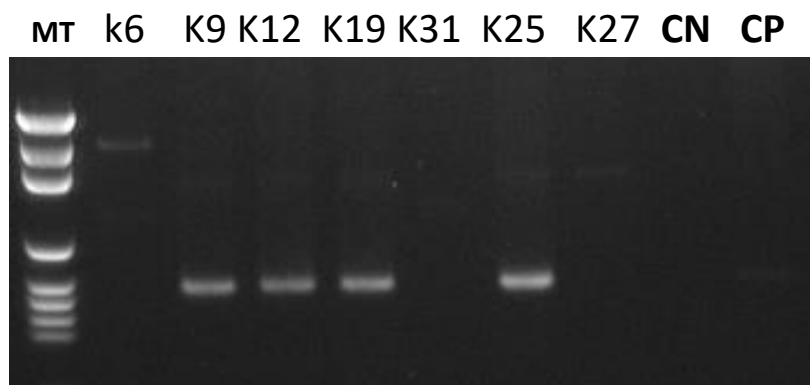


Figure 54. Détection du gène *mgrB* par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% sous 135v pendant 20min. **MT**: marqueur de taille, **CN**: contrôle négatif, **CP** : contrôle positif.

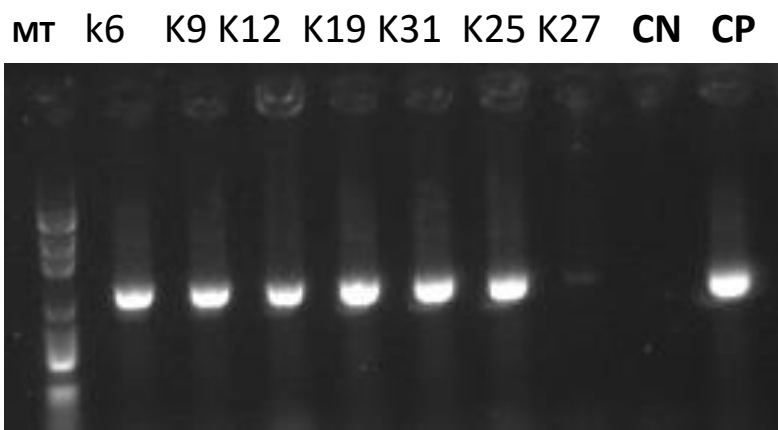


Figure 55. Détection du gène *phoP* par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% sous 135v pendant 20min. **MT**: marqueur de taille, **CN** : contrôle négatif, **CP**: contrôle positif.

MT k6 K9 K12 K19 K31 K25 K27 CP CP

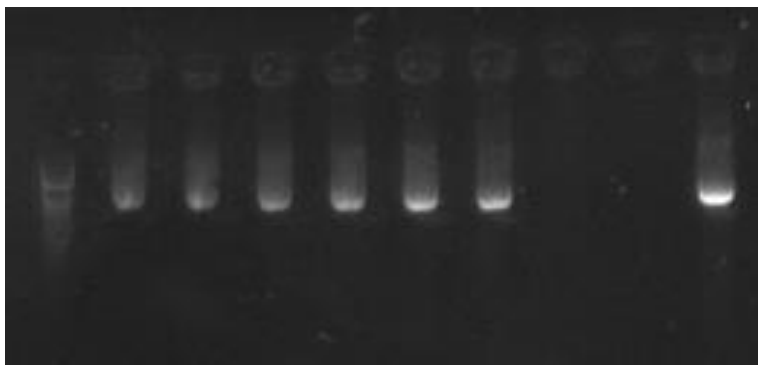


Figure 56. Détection du gène *phoQ* par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% sous 135v pendant 20min. **MT**: marqueur de taille, **CN**: contrôle négatif, **CP**: contrôle positif.

mw k6 K9 K12 K19 K31 K25 K27 NC PC

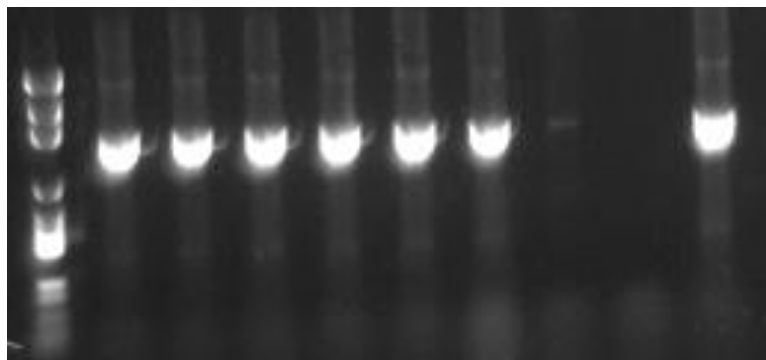


Figure 57. Détection du gène *pmrA* par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% sous 135v pendant 20min. **MT**: marqueur de taille, **CN**: contrôle négatif, **CP**: contrôle positif.

MT k6 K9 K12 K19 K31 K25 K27 CT CP

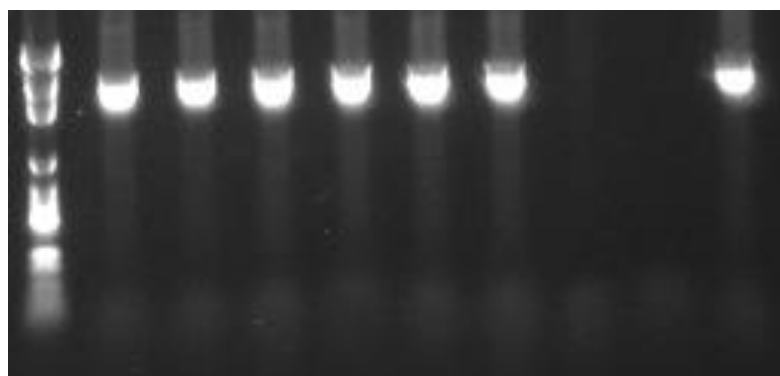


Figure 58. Détection du gène *pmrB* par PCR, visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% sous 135v pendant 20min. **MT**: marqueur de taille, **CN**: contrôle négatif, **CP**: contrôle positif.

Après séquençage des amplicons, les séquences d'ADN obtenues ont été traduites en protéines, puis les séquences protéiques ont été comparées par alignement multiple, à l'aide du logiciel, à la séquence de la protéine homologue MgrB (numéro d'accèsion : AIT16084) de *K. pneumoniae* NH53 (une souche sensible à la colistine, KF852760), et des séquences de PhoQ (numéro accèsion : ABR76568), PhoP (numéro accèsion : ABR76569), PmrA (numéro accèsion : WP_002895659.1) et PmrB (numéro accèsion : WP_004147680.1) de *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* souche MGH78578 (CP000647).

Les séquences protéiques sont présentées dans l'**Annexe V**. Les alignements multiples des séquences protéiques codées par les gènes *mgrB*, *phoQ/phoP* et *pmrA/pmrB* sont montrés dans les **Figure 59, 60, 61,62 et 63**.

Les séquences des protéines MgrB des isolats K6 et K31 n'étaient pas inclus dans l'alignement à cause de l'absence d'amplification durant l'étape de PCR. De plus, les séquences des protéines MgrB des isolats K9 et K12 étaient tronquées de 22 acides aminés dans leurs régions N-terminal. L'alignement multiple de ces courtes séquences avec celle de la souche de référence n'a montré aucune différence (**Figure 59**).

Les différents alignements ont montré que les protéines PhoP et phoQ et PmrA de nos isolats sont intactes et ne contiennent aucune mutation (**Figures 60,61 et 62**).

De même, les séquences de la protéine PmrB des isolats K12 et K31 sont identiques à celle de la souche de référence (**Figure 63**) ; Par contre, celle de l'isolat K6 contient une substitution de l'acide aminé arginine par glycine en position 256 (R256G). Il est à noter que la séquence de la protéine PmrB de l'isolat K9 était très courte, tronquée de 285 acides aminés de la région N-terminale, et par conséquent son alignement est ininterprétable (**Figure 63**).

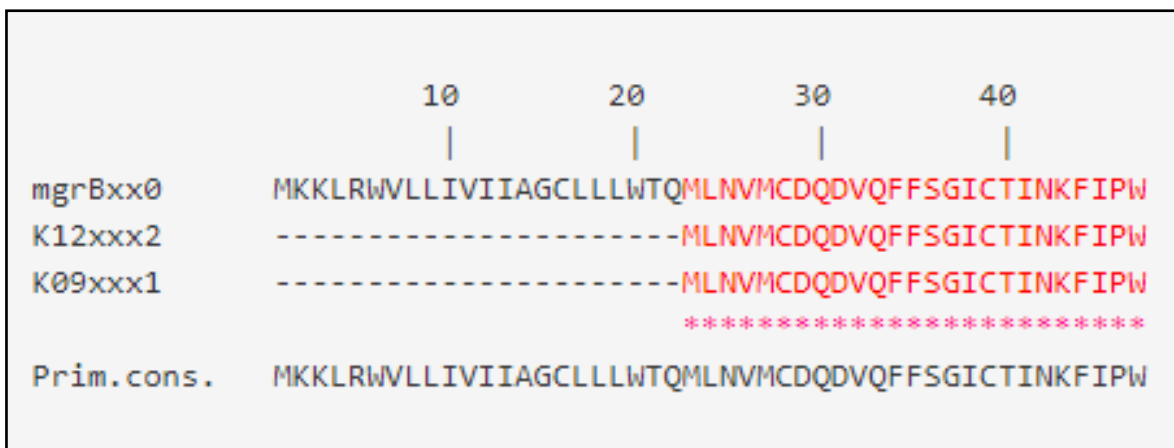


Figure 59. Alignement multiple des séquences des protéines MgrB des isolats de *K. pneumoniae* K9 et K12 et de la souche NH53 de *K. pneumoniae* (numéro d'accension AIT16084) en utilisant ClustalW.

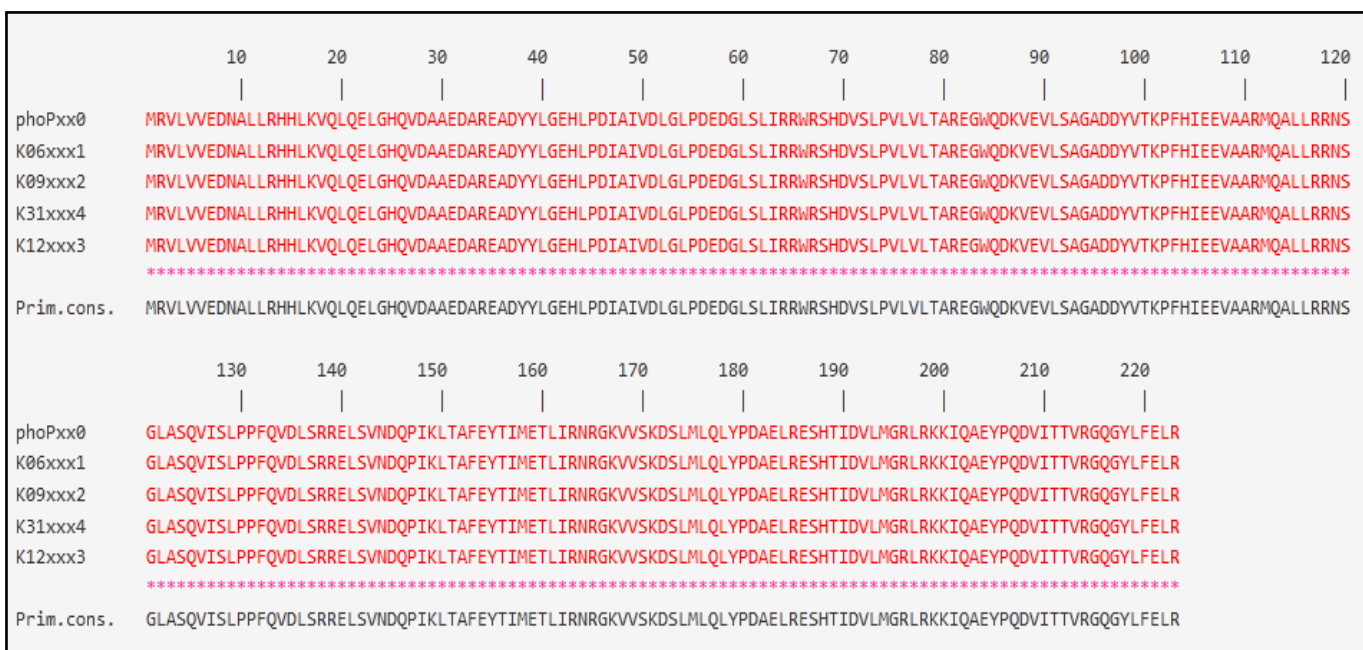


Figure 60. Alignement multiple des séquences des protéines PhoP des isolats de *K. pneumoniae* K6, K9, K12 et K31 et de la souche MGH78578 de *K. pneumoniae* (numéro d'accension ABR76569) à l'aide de ClustalW.

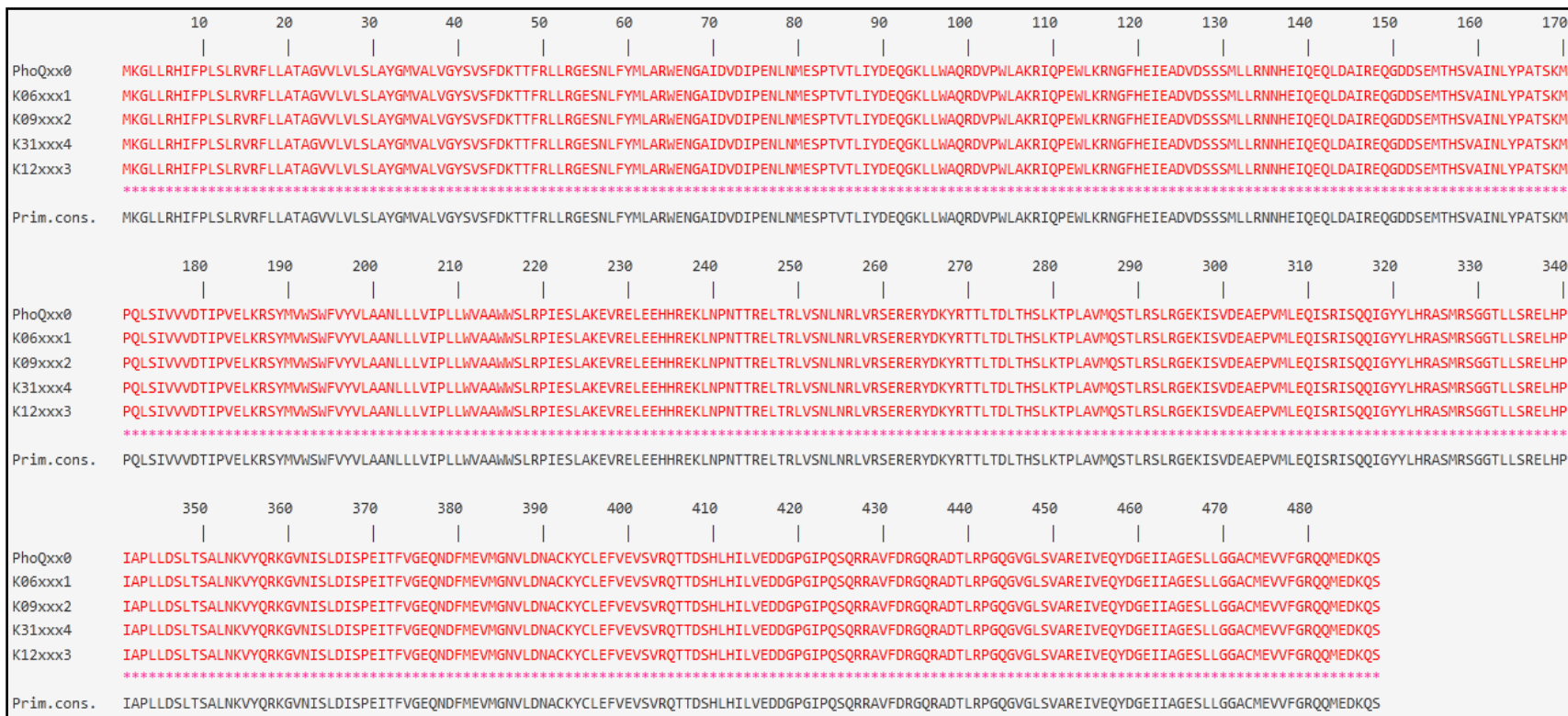


Figure 61. Alignement multiple des séquences des protéines PhoQ des isolats de *K. pneumoniae* K6, K9, k12 et K31 et de la souche MGH78578 de *K. pneumoniae* (Numéro d'accèsion ABR76568) à l'aide de ClustalW.

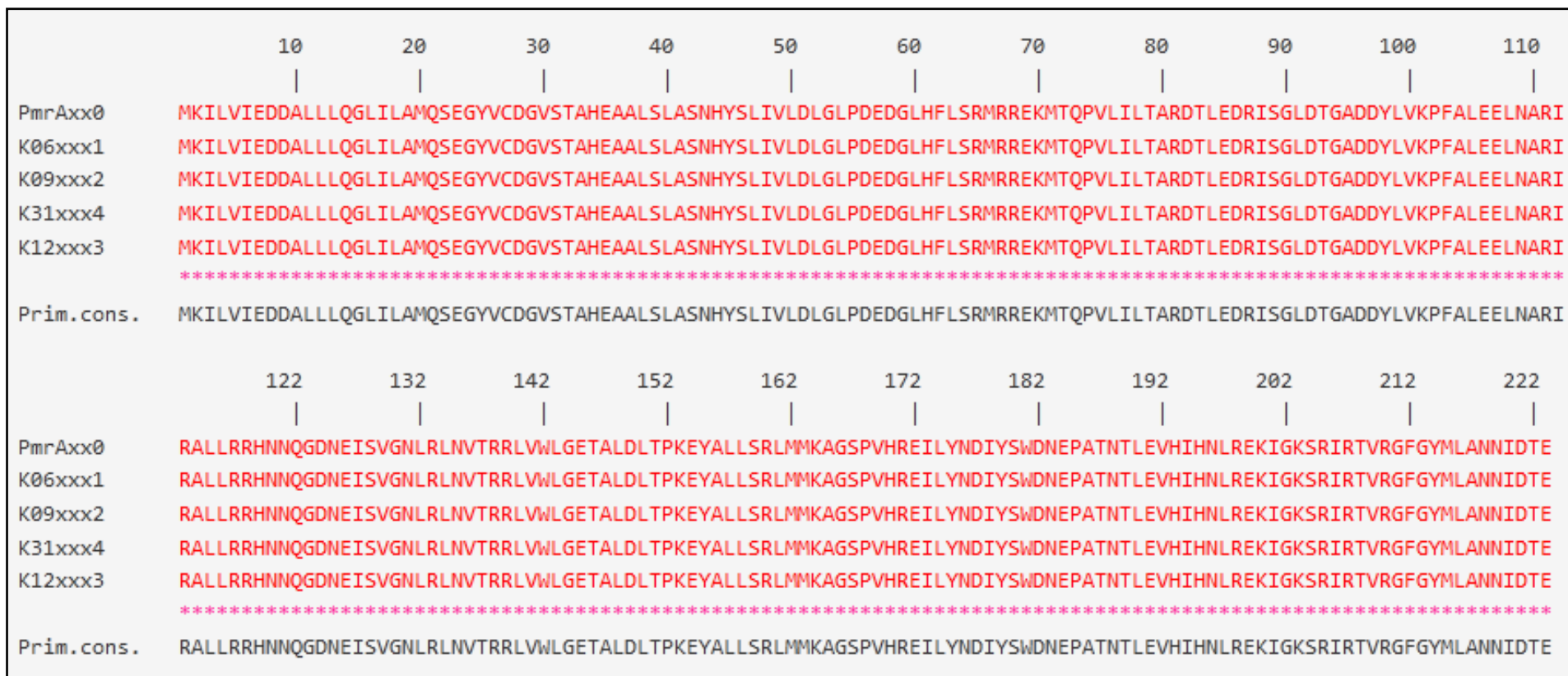


Figure 62. Aligement multiple des séquences des protéines PmrA des isolats de *K. pneumoniae* K6, K9, k12 et K31 et de la souche MGH78578 de *K. pneumoniae* (numéro d'accèsion WP_002895659.1) à l'aide de ClustalW.

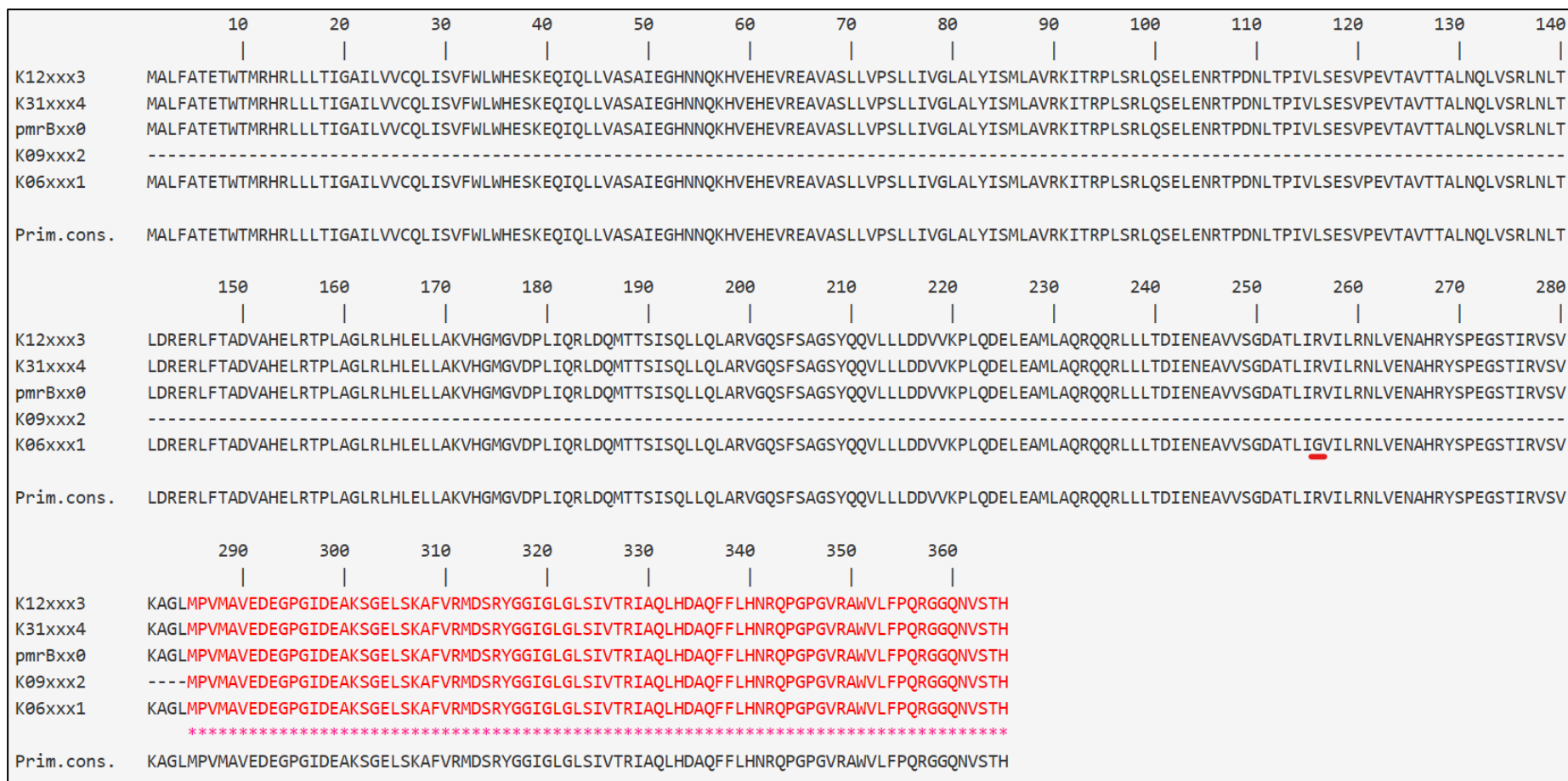


Figure 63. Alignement multiple des séquences des protéines PmrB des isolats de *K. pneumoniae* K6, K9, k12 et K31 et de la souche MGH78578 de *K. pneumoniae* (numéro d'accension WP_004147680.1) à l'aide de ClustalW.

Discussion

La présente étude a été menée pour caractériser les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez 84 isolats cliniques d'entérobactéries (58.3% des *E. coli*, 35.7% des *K. pneumoniae* et 4.7% des *Enterobacter* spp.), isolés de patients (admis et externes) durant une période de quatre ans, au niveau de l'hôpital Rabah Bitat de la Wilaya de Boumerdès.

L'analyse des résultats de cette étude a montré que la majorité des isolats (78.5%) provenaient d'urines, y inclut 46.4% (39/84 *E. coli*), 28.5% (24/84) *Klebsiella* spp et 3.5% (3/84) *Enterobacter* spp.

Ceci est consistant avec plusieurs études qui ont reportés que les infections urinaires, dues aux entérobactéries, plus fréquemment les *E. coli*, est une des causes majeures d'hospitalisation à travers le monde (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

L'émergence et la dissémination de la résistance aux antibiotiques sont à la hausse chez les entérobactéries, et sont responsables de taux de morbidité et de mortalité élevés, de la prolongation de la durée d'hospitalisation et l'augmentation des coûts de soins, constituant ainsi un problème majeur de santé publique dans le monde. Ce problème est principalement dû à l'utilisation intensive et non contrôlée des antibiotiques (Kariuki & Hart, 2001).

Dans cette étude, les profils phénotypiques de résistance aux β -lactamines des entérobactéries ont montré des taux variables, allant de 10% à 100%, au AMX, AMC, CF, CRO, ERT, FEP et TZP. Les taux les plus élevés (100%) ont été enregistrés pour AMX et AMC chez les *E. coli* et les *Enterobacter* spp., sachant que cette espèce est naturellement résistante à ces antibiotiques, tandis que les taux les plus faibles (0% à 26%) ont été observés pour ERT et TZP contre les *E. coli* et les *Klebsiella* spp.

En revanche, la totalité des isolats testées (100%) se sont avérés sensibles à l'IPM, ce qui suggère l'efficacité de cet antibiotique dans le traitement des infections dues aux entérobactéries productrices de BLSE. Ce résultat confirme ceux des études qui ont démontré que la résistance aux carbapénèmes chez les *Enterobacteriaceae* en Algérie est rare, et que cette résistance a été principalement rapportée chez *A. baumannii* et *P. aeruginosa* (Berrazeg, 2013 ; Bakour *et al.*, 2015(b) ; Aouf *et al.*, 2018 ; Bourafa *et al.*, 2018 ; Benamrouche *et al.*, 2020).

Le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines chez les *Entrobacteriaceae* est la production des β -lactamases, des enzymes très diversifiées qui hydrolysent les β -lactamines.

Les β -lactamases les plus fréquemment responsables de la résistance aux β -lactamines au sein des espèces d'entérobactéries sont les BLSE. Les bactéries productrices de BLSE sont parmi

les plus problématiques en milieu clinique à travers le monde, en raison de leur émergence croissante, leur diffusion rapide et de leur association avec les multirésistances aux antibiotiques, limitant ainsi les options thérapeutiques.

Les BLSE sont souvent plasmidiques ; bien qu'elles soient principalement produites par les espèces *E. coli* et *Klebsiella*, elles sont également présentes chez d'autres genres d'*Enterobacteriaceae* tels que *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp. et *Salmonella* spp. (Shah *et al.*, 2004).

La prévalence globale des *Enterobacteriaceae* qui ont montré des phénotypes positifs pour les BLSE dans cette étude était de 57%. Au sein des différentes espèces, *Enterobacter* avait la prévalence la plus élevée (100%), par rapport à celles des *K. pneumoniae* (80%) et de *E. coli* (40.8%).

Le taux de BLSE estimé dans cette étude chez les *Enterobacteriaceae* est beaucoup plus élevé que ceux rapportés dans des études menées en Europe (de 5 à 12%) (Leistner *et al.*, 2015; Flokas *et al.*, 2016) et dans 10 pays de la région de l'Asie-Pacifique 28.2% (Lu *et al.*, 2012), supérieur à ceux estimés au Pakistan (40%) (Abrar *et al.*, 2018), en Afrique de l'Est (42%) (Sonda *et al.*, 2016), en Chine (46%) (Zhang *et al.*, 2014) et en Ethiopie (49%) (Diriba *et al.*, 2021); cependant, il est comparable à celui estimé dans une revue systématique et méta-analyse effectuée en Afrique (76%) (Flokas *et al.*, 2016).

Les données d'autres études en Algérie ont indiqué que la prévalence des entérobactéries productrices de BLSE variait entre 54 et 66.5% (Medboua-Benbalagh *et al.*, 2017 ; Iabadene *et al.*, 2009 ; Messai *et al.*, 2006).

Le taux de prévalence élevé de BLSE chez les *Enterobacter* (100%) et les *K. pneumoniae*. (80%) est consistant avec ceux rapportés en Algérie (Messai *et al.*, 2008 ; Ramdani-Bouguessa *et al.*, 2006 ; Nedjai *et al.*, 2012; Nedjai *et al.*, 2013), ainsi que dans plusieurs pays du monde; par exemple une étude multicentrique dans 9 pays d'Afrique subsaharienne, effectuée entre 2010 et 2014, a estimé que 45.5% de *Klebsiella* spp. et 5.7% des *E. coli* ont montré un phénotype BLSE (Toy *et al.*, 2019). Une revue systématique et une méta-analyse, réalisée entre 2016-2020, a estimé une prévalence cumulée du portage intestinal d'*E. coli* productrices de BLSE en milieux hospitaliers et communautaires à l'échelle mondiale de 26% (Bezabih *et al.*, 2022). En effet, *K. pneumoniae* est considérée parmi les majeurs espèces bactériennes productrices de BLSE dans le monde entier (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

Il ressort des résultats de nombreuses études que la distribution géographique et la prévalence des BLSE variaient fortement en fonction de plusieurs facteurs, tels que le niveau de

consommation des antibiotiques, le type de l'étude, le type de population étudiée et les méthodes de laboratoire utilisées ; rendant les comparaisons entre les études difficiles.

Bien que tous les BLSE partagent une propriété enzymatique commune, qui est l'hydrolyse des antibiotiques β -lactamines à spectre élargi et leur inhibition par l'acide clavulanique, ces enzymes sont diverses et peuvent être regroupés en plusieurs familles, dont les plus importantes sont les TEM et SHV (qui sont très proches, ne différant que par quelques substitutions d'acides aminés) et CTX-M (qui est beaucoup plus diversifiée génétiquement). Chacune de ces familles comprend de nombreux variants (**Castanheira et al., 2021**).

La recherche des gènes qui codent pour les BLSE de type TEM, CTX-M, SHV et OXA-48 chez les isolats qui ont montré un phénotype positif pour BLSE a révélé la présence des trois premiers, tandis que celui de OXA-48 n'a pas été détecté. De plus, nos résultats ont révélé la présence de 25 variants, 8 TEM, 12 SHV et 5 CTX-M.

Les gènes codant les TEM étaient les plus prédominants (52.6%, 59/112) par rapport à ceux codant SHV (26%, 29/112) et CTX-M (21.4%, 24/112), avec un taux plus élevé parmi les *E. coli* (85.7%, 42/49) que les *K. pneumoniae* (50%, 15/30) et les *Enterobacter* spp. (50%, 2/4).

La prédominance des TEM dans cette étude est inhabituelle, car généralement c'est les CTX-M qui sont les plus fréquemment rencontrés que ce soit en Algérie, ou ailleurs dans le monde (**Ruppé, 2010 ; Nedjai et al., 2012 ; Lahlaoui et al., 2014 ; Souna et al., 2014 ; Bevan et al., 2017**).

Parmi les 70 entérobactéries productrices de TEM, on n'a pas pu déterminer précisément les variants de 51 cas (72.8%). Cinq variants, TEM-84, TEM-98, TEM-104, TEM-192 et TEM-117, qui ne sont pas des BLSE, sont détectés pour la première fois en Algérie ; parmi lesquels, trois, TEM-84, TEM-98 et TEM-117, sont peu fréquentes, chacune est représentée par 1 seule copie chez un isolat d'*E. coli* ou de *K. pneumoniae* (1.4%, n=1 chacun) ; tandis que TEM-104 était présent avec une fréquence globale plus élevée (15.7%, n=11) que les deux autres, 6 chez les *E. coli* (8.5%,) et 5 chez les *K. pneumoniae* (7.1%,). Les autres TEM, TEM-1D, TEM-33, et TEM-198 ont déjà été signalées en Algérie (**Agabou et al., 2014 ; Yousfi et al., 2015 ; Bouguenoun et al., 2016**).

Le deuxième plus dominant type de β -lactamases identifié chez les isolats d'*Enterobacteriaceae* de cette étude était SHV avec un taux global de 34.5% (29/84). La grande majorité (93%, 28/30)

a été détectée chez les isolats de *K. pneumoniae*, tandis que chez les *E. coli* il était présent chez un seul isolat (2%, 1/49), ce qui confirme l'ubiquité des SHV chez *K. pneumoniae* (**Babini & Livermore, 2000 ; Carvalho et al., 2021**).

Nos isolats de *K. pneumoniae* portaient une grande diversité de gènes *bla_{SHV}*, 3 codent des variantes BLSE (SHV-16, SHV-99 et SHV-148), 6 des variantes BLLS (SHV-1, SHV-11, SHV-71, SHV-75, SHV-76 et SHV-85) et 3 codent des variantes non classées (SHV-28, SHV-100 et SHV-187). Cette diversité des SHV est conforme aux résultats obtenus dans plusieurs pays (**Liakopoulos et al., 2016 ; Carvalho et al., 2021**). Toutes ces SHV ont été détectés auparavant en Algérie (**Ramdani-Bougoussa et al., 2011 ; Bakour et al., 2015 (b); Bourafa et al., 2018 ; Nabti et al., 2022**), sauf SHV-16, SHV-71 et SHV-76 qui sont signalées ici pour la première fois. La majorité des isolats de *K. pneumoniae* produisaient les variantes SHV-100 et SHV-148 (6%, n=5, chacun), suivi par SHV-16 (4.7%, n=4).

CTX-M est le moins prévalent type de β -lactamases dans cette étude, avec une prévalence globale de 28.6% (24/84), et avec des taux proches, 28.6% (14/49) et 33.3% (10/30), parmi les *E. coli* et les *K. pneumoniae* respectivement, et étant absent chez les *Enterobacter* spp.. Cette prévalence de CTX-M est faible en comparaison avec celles rapportées en Algérie (76%) (**Nedjai et al., 2012 ; Nedjai et al., 2013 ; Souna et al., 2014**).

Parmi les 24 isolats d'entérobactéries producteurs de CTX-M, CTX-M-15 était la principale BLSE (62.5%, n=15) suivi de CTX-M-55 (16.6%, n=4), CTX-M-1 (12.5%, n=3), de CTX-M-27 (8.3%, n=2) et de CTX-M-3 (4.1%, n=1). Toutes ces enzymes ont été couramment détectées dans les hôpitaux algériens (**Ramdani-Bougoussa et al., 2006 ; Iabadene et al., 2008 ; Messai et al., 2008 ; Ramdani-Bougoussa et al., 2011 ; Nedjai et al., 2012 ; Ahmed et al., 2012 ; Touati et al., 2012**), sauf CTX-M-27 et CTX-M-55, qui sont identifiés ici pour la première fois. De nombreuses études ont rapporté que les enzymes de type CTX-M étaient les plus prédominantes dans les infections urinaires (**Ruppé et al., 2009**). En fait, les BLSE de type CTX-M sont disséminés de manière explosive et sont actuellement reconnues comme les gènes de résistance des entérobactéries les plus répandus dans le monde, à la fois chez les humains, les animaux et dans l'environnement ; et sont devenus les plus menaçants en milieu clinique et communautaire (**Bevan et al., 2017**).

La prédominance de CTX-M-15, qui appartient au CTX-M du groupe 1, dans notre étude renforce les résultats de nombreuses études à travers le monde (**Peirano & Pitout, 2010**;

Cantón et al., 2012 ; Zhuo et al., 2013; Schmiedel et al., 2014; Carvalho et al., 2021), y inclut l'Algérie (**Touati et al., 2006; Baba Ahmed-Kazi Tani & Arlet , 2014; Agabou et al., 2014; Souna et al., 2014; Medboua-Benbalagh et al., 2017**), qui ont rapportés que CTX-M-15 est la BLSE la plus largement distribuée, particulièrement parmi les entérobactéries d'importance clinique. Cette dissémination mondiale de CTX-M-15 a été attribuée principalement au fait que le gène *bla*_{CTX-M-15} est fréquemment associé à un clone d'*E. coli* hautement virulent O25: H4-ST131; et d'autre part, à son portage par un plasmide conjugatif en association avec différents types d'éléments génétiques mobiles (séquences d'insertion, des transposons, des intégrons), ce qui facilite son transfert horizontal intra-espèces, inter-espèces et inter-genres (**Peirano & Pitout, 2010 ; Cantón et al., 2012**).

A notre meilleur connaissance, CTX-M-55 et CTX-M-27 sont détectés dans cette étude pour la première fois en Algérie, et sont présents avec des fréquences de 16.6% (n=4) et 8.3%, (n=2), respectivement. A signaler qu'une étude très récente, a également rapporté la première détection de CTX-M-55 en Algérie à partir du foie de poulet destiné pour la consommation humaine (**Chenouf et al., 2020**).

CTX-M-55 est un dérivé de CTX-M-15 et, différant par une substitution Ala77Val (**He et al., 2015**). Dans les pays asiatiques, particulièrement en Chine, CTX-M-55 est la BLSE la plus répandue chez les *Enterobacteriaceae*, en particulier chez les *E. coli* d'origine humaine et animale (**Zheng et al., 2012; Zhang et al., 2014**); cependant, d'autres isolements de ce variant à partir de diverses espèces animales ont été signalés dans plusieurs pays à travers le monde tels que la Tunisie (**Hassen et al., 2020**), la France (**Lupo et al., 2018**), le Portugal (**Clemente et al., 2021**), le Danemark (**Roer et al., 2017**), la Suisse (**Zurfluh et al., 2013**) et le Brésil (**Cunha et al., 2017**). Il a été suggéré que les *Enterobacteriaceae* productrices de CTX-M-55 trouvées chez les humains provenaient d'aliments d'origine animale (**Zhang et al., 2014**).

CTX-M-27, appartenant aux CTX-M du groupe 9, est un variant qui diffère de CTX-M-14 par une substitution d'un seul acide aminé, D240G, qui a été découverte pour la première fois en France (**Bonnet et al., 2003**). A notre connaissance, ceci est le premier signalement de CTX-M-27 en Algérie. Les études rapportant la détection du CTX-M-27 dans le monde sont peu fréquentes ; cependant, un clone d'*E. coli* ST131 responsable d'infections humaines produisant CTX-M-27 a été signalé durant la dernière décennie dans plusieurs pays, suggérant une émergence et dissémination récente de CTX-M-27 (**Adler et al., 2012 ; Nicolas-Chanoine et al., 2014 ; Ghosh et al., 2017**). En Tunisie, des isolats de *Salmonella enterica* stéréotype Livingstone productrices de CTX-M-27 ont été signalé comme responsables d'infections

nosocomiales dans le service de néonatalogie de l'hôpital de Sousse (**Bouallègue-Godet et al., 2005**).

Le variant CTX-M-1 a été décrit comme étant très répandu chez les *Enterobacteriaceae* isolées d'animaux d'élevage, principalement dans les pays méditerranéens (**Girlich et al., 2007 ; Zurfluh et al., 2014 ; Clemente et al., 2021**). En Algérie, CTX-M-1 a été détecté chez des *E. coli* isolées de poulet de chair (**Meguenni et al., 2012 ; Belmahdi et al 2022**), et également chez des patients à l'hôpital de Beni-Messous (**Medboua-Benbalagh et al., 2017**).

CTX-M-3, qui diffère de CTX-M-1 par quatre substitutions d'acides aminés, a été identifié pour la première fois en 1998 en Pologne chez des isolats de *C. freundii* et *E. coli* isolés d'urine (**Gniadkowski et al., 1998**). Peu de temps après il été signalé dans plusieurs pays chez des isolats cliniques d'*Enterobacteriaceae* (**Dutour et al., 2002 ; Bonnet, 2004 ; Winstanley et al., 2004 ; Kim et al., 2005**). En Algérie, il a été signalé en même temps que CTX-M-15 en 2006 (**Touati et al., 2006 ; Ramdani-Bouguessa et al., 2006**).

Le phénotype de céphalosporinases de type AmpC a été observé uniquement chez 3 (6%) isolats d'*E. coli*. Ce faible taux est constaté également dans des études menées en Algérie par **Messai et al. (2006)** (1%), **Iabadene et al. (2009)** (2%) et **Yahiaoui et al. (2015)** (4%).

Aucun des isolats analysés dans cette étude n'était positive pour la carbapénémase OXA-48. En effet, l'isolement des *Entrobacteriaceae* productrices de carbapénémases devient de plus en plus fréquent dans les pays méditerranéens (**Nordmann, 2014 ; Mathlouthi et al., 2017 ; Mairi et al., 2018**), mais demeure rare en Algérie. Les quelques isolats producteurs de la carbapénémase OXA-48 isolés en Algérie provenaient majoritairement des milieux hospitaliers (**Agabou et al., 2014 ; Aggoune et al., 2014 ; Bakour et al., 2015(c) ; Bouguenoun et al., 2016 ; Yousfi et al., 2019(b) ; Abderrahim et al., 2022 ; Nabti et al., 2022**).

La coexistence de différentes combinaisons de 2 ou 3 gènes des β -lactamases, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} et *bla*_{CTX-M}, au sein d'un même isolat a été détectée chez 26 (31%) du total des isolats, la majorité 73% (n=19) étaient au sein des *K. pneumoniae* et 27% (n=7) parmi les *E. coli*. La production simultanée de deux ou plusieurs types de β -lactamases par les *Enterobacteriaceae* a été largement rapporté (**Melano et al., 2003 ; Eckert et al., 2004 ; Lin et al., 2010 ; Chabou et al., 2018 ; Mirza et al., 2019**).

En effet, le portage de plusieurs gènes de β -lactamase dans la même souche est une capacité connue de *K. pneumoniae*, qui peut contribuer à l'avantage sélectif de ce pathogène. Cela est

peut-être dû à l'acquisition d'éléments génétiques mobiles contenant différents gènes *bla* sur le même plasmide (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

Les antibiotiques non β -lactamines testés dans cette étude peuvent être classés en trois groupes en fonction des taux de résistance. Le premier groupe comprenait les antibiotiques qui ont montré des taux de résistance élevés (entre 54.7% et 64%), SXT et DO. Le deuxième groupe contient 3 antibiotiques CN, AK et CIP qui avaient des taux de résistance modérés (entre 34.5% et 41%). Les antibiotiques du troisième groupe FF et CS ont montré des faibles taux de résistance (entre 4.7% et 6%).

Les antibiotiques appartenant aux familles des sulfamides et des cyclines, SXT et DO, ont montré des taux de résistance élevés, 64% et 54.7%, respectivement. Le résultat pour SXT est similaire au 66% rapporté en Algérie (Khennouchi *et al.*, 2015), 67% en Tunisie (Daoud *et al.*, 2020) et 58% en Inde (Shariff *et al.*, 2013) ; mais beaucoup plus élevé que 14% en Autriche et en Grande Bretagne, et 18% en Grèce (Kahlmeter & Poulsen, 2012).

Ces taux élevés de la résistance au SXT sont inquiétants, car cet agent est fréquemment prescrit pour le traitement des infections urinaires pédiatriques non compliquées dans de nombreux pays développés et en voie de développement ; et par conséquent, ces données devraient avertir les cliniciens contre l'utilisation irrationnelle de ce type d'antibiotiques.

Le taux de résistance à la DO (54.7%) dans la présente étude est comparable à ceux trouvées en Algérie (entre 76% et 98%, chez des *E. coli* isolées de poulets de chair) (Messaiumi *et al.*, 2013 ; Halfaoui *et al.*, 2017 ; Meguenni *et al.*, 2019), ainsi que dans de nombreuses études à travers le monde, 45%, 54%, 66.6%, 88%, au Cameroun, en Iran, au Pakistan et en Afrique du Sud, respectivement (Sabir *et al.*, 2014 ; Mouiche *et al.*, 2019 ; Fadare *et al.*, 2020 ; Kashefieh *et al.*, 2021).

La DO est un antibiotique de la famille des tétracyclines, qui a été largement utilisé pour le traitement de nombreuses infections tels que l'anaplasmose et la maladie de Lyme (Sanchez *et al.*, 2016 ; Tsai *et al.*, 2021 ; Valladales-Restrepo *et al.*, 2022), ce qui reflète probablement les taux de résistance élevés contre cet antibiotique.

Les antibiotiques qui ont montré une efficacité modérée (entre 34.5% et 41%) sont le quinolone CIP et les aminoglycosides, CN et AK.

En ce qui concerne CIP, les taux de résistances étaient similaires chez les *E. coli* et les *K. pneumoniae* (43%), et 25% chez les *Enterobacter* spp. ; avec un taux global de 41.6% chez l'ensemble de nos isolats d'*Enterobacteriaceae*. Ce taux est inférieur à ceux précédemment rapportés en Algérie, entre 75% et 85% (**Alouache et al., 2014; Barka et al., 2021; Zemmour et al., 2021; Abderrahim et al., 2022**), ainsi que dans d'autres pays comme l'Égypte (89%) et le Togo (93%) (**Hamed et al., 2018; Salah et al., 2019**) ; par contre il était supérieur à ceux estimés dans deux analyses systématiques et méta-analyses, incluant des études effectuées dans 54 et 83 pays, chez les *E. coli* responsables d'infections urinaires en milieux hospitaliers (38%) et communautaires (27%) (**Fasugba et al., 2015; Guanyu & Xiaoju, 2020**).

La recherche des gènes plasmidiques de résistance aux quinolones (PMQR) *qnrA*, *qnrB* et le gène *aac(6')-Ib-cr* (ce dernier confère une résistance simultanée aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones) a révélé la présence du gène *qnrB* chez 36.7% (n=11) isolats de *K. pneumoniae*, et du gène *aac(6')-Ib-cr* chez 10 isolats, 1 (25%) *Enterobacter* spp., 7 (23%) *K. pneumoniae* et 2 (4%) *E. coli*. Ce résultat confirme ce qui a été rapporté précédemment dans plusieurs études en Algérie que le gène *qnrB* est le plus répandu chez les isolats cliniques d'*Enterobacteriaceae*, suivi du gène *qnrS* ; tandis que le gène *qnrA* est rarement rencontré (**Touati et al., 2008 ; Iabadene et al., 2008 ; Meradi et al., 2011 ; Alouache et al., 2014 ; Anssour et al., 2014 ; Yanat et al., 2014; Gharout-Sait et al., 2015; Anssour et al., 2016; Brahmi et al., 2018; Zemmour et al., 2021; Abderrahim et al., 2022**).

Les deux aminosides testés, CN et AK, ont montré un taux global de résistance modéré de 34.5% (n=29). Pour AK, 2%, 16% et 25% des isolats d'*E. coli*, *Klebsiella* spp. et des *Enterobacter* spp. étaient résistants, respectivement ; tandis que les taux de résistance des *E. coli*, *Enterobacter* spp. et des *Klebsiella* spp. vis à vis la CN étaient de 22.4%, 25% et 55%, respectivement.

Les taux de résistance vis à vis AK et CN rapportaient en Algérie et dans d'autres pays variaient considérablement (de 0.76% à 38% pour AK et de 6.4% à 100% pour CN), en fonction du lieu de l'étude, le type d'infection et les entérobactéries en cause, rendant la comparaison de nos résultats avec les autres difficile (**Abderrahim et al., 2022 ; Aouf et al., 2018 ; Ayad et al., 2016 ; Gharout-Sait et al., 2015 ; Touati et al., 2012**).

La recherche des gènes conférant la résistance aux aminosides dans cette étude, *aac(3)-II*, *aac(6')-Ib*, *aadA*, *ant(2')*, *aph(3')-VI* et *armA*, a révélé la présence des gènes de N-acétyltransférases *aac(6')-Ib* et *aadA* seulement. Le gène *aac(6')-Ib* est porté par 19 isolats,

dont 10 (12%) portaient le variant *aac(6')-Ib-cr*, 1 (25%) *Enterobacter* spp., 7 (23%) *K. pneumoniae* et 2 (4%) *E. coli*; et 2 gènes *aadA*, 1 *aadA1* chez *E. coli* et 1 *aadA2* chez *K. pneumoniae*.

Plusieurs études en Algérie ont rapportés la présence et/ou l'absence de l'un ou l'autre des gènes de résistance aux aminosides identifiés dans notre étude, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ib-cr* et *aadA*, chez les *Enterobacteriaceae*, ainsi que d'autres déterminants qui ont été soit recherchés mais non détectés (*aac(3)-II*, *ant(2')*, *aph(3')-VI* et *armA*) ou non recherchés (*rmtA* et *rmtB*) dans cette étude (**Belbel et al., 2014; Yahiaoui et al., 2015; Ayad et al., 2016; Zenati et al., 2017; Leulmi et al., 2019; Benamrouche et al., 2020; Abderrahim et al., 2022**).

Les antibiotiques qui ont montré plus d'efficacité dans cette étude étaient la FF et la CS, avec des taux de résistance de 4.7% et 6%, respectivement. La FF était plus efficace contre les *E. coli* et les *Enterobacter* spp. (0% isolat résistant), mais relativement moins efficace contre les *Klebsiella* spp. (13%, 4 isolats résistants). Cependant, cette faible efficacité du FF est rassurante, car cet antibiotique est principalement utilisé suite aux échecs des traitements des infections urinaires chez les adultes. De plus, et compte tenu de la pénurie mondiale en nouveaux antibiotiques efficaces et moins chères, la FF a été proposé comme remplacement à d'autres molécules de β -lactamines dans le traitement des cas compliqués d'infections dues aux *E. coli* et *K. pneumoniae* productrices de BLSE et qui ont une sensibilité diminuée aux carbapénèmes (**WHO, 2011 ; Sojo-Dorado et al., 2022**).

La colistine CS a également montré une bonne efficacité, avec des taux de résistance de 0% chez les *Enterobacter* spp., 2% (n=1) chez les *E. coli* et 13% (n=4) chez les *Klebsiella* spp..

Ces taux de résistance sont similaires à ceux précédemment signalé en Algérie (14.3%) parmi les *Enterobacteriaceae*, principalement *K. pneumoniae* et *E. coli* (**Dziri et al., 2021**). Dans les pays voisins, les prévalences enregistrées variaient entre 3% en Libye, 17% au Maroc et 24% en Tunisie (**Kieffer et al., 2018 ; Nejari et al., 2022 ; Mansour et al., 2017**).

Ces faibles taux de résistances à la colistine sont plutôt rassurants, compte tenu de l'importance de cet antibiotique comme dernier recours dans le traitement des infections graves causées par les bactéries Gram-négatif, notamment celles résistantes aux carbapénèmes.

L'émergence de la résistance à la colistine peut s'expliquer par sa forte utilisation chez les animaux, non seulement dans le traitement des infections, mais aussi comme agent promoteur

de croissance et prophylactique. Par conséquent, le risque d'une augmentation éventuelle des niveaux de résistance à la colistine doit être pris en compte.

La mise en évidence des principaux déterminants génétiques de résistance à la colistine, plasmidiques (PMCR, *mcr-1/2*) et chromosomiques (*mgrB*, *phoP*, *phoQ*, *pmrA* et *pmrB*), chez les isolats qui ont montrés des phénotypes de résistance à la colistine (CMI >2 mg/L) a révélé qu'aucun de nos isolats portait les gènes *mcr-1/2*. L'absence des gènes *mcr* ne concorde pas avec plusieurs études précédentes en Algérie, qui ont rapporté la présence de ces gènes (**Berrazeg et al., 2016 ; Berrazeg et al., 2019 ; Touati et al., 2020 ; Cherak et al., 2022**)

D'autre part l'analyse des séquences des gènes chromosomiques *mgrB*, *phoP*, *phoQ*, *pmrA* et *pmrB* a révélé que les séquences de ces gènes étaient intactes et ne contenaient aucune mutation, à l'exception d'une substitution non synonyme dans le gène *pmrB* chez l'isolat *K. pneumoniae* K6. En effet, des mutations dans le gène *pmrB* ont déjà été décrites comme ayant un impact sur la résistance à la colistine ; donc il se pourrait que cette substitution est responsable de la résistance à la colistine chez cet isolat (**Phan et al., 2017 ; Torres et al., 2021**).

Vu l'absence des déterminants génétiques chromosomiques et plasmidiques de résistance à la colistine connus chez les quelques isolats de cette étude, particulièrement l'isolat *K. pneumoniae* K31 (CMI très élevée, 128 mg/L), la résistance de ces isolats peut être due à d'autres déterminants génétiques inconnus. En effet, une étude en Tunisie a révélé également l'absence de déterminants génétiques de la résistance à la colistine dans des souches de *K. pneumoniae* résistantes à la colistine (**Dziri et al., 2021**).

Le taux global de multirésistance aux antibiotiques dans notre étude était très élevé à 75% (63/84), particulièrement parmi les isolats de *K. pneumoniae* (86.6%, 26/30), alors qu'il était de 69.4% (34/49) chez les *E. coli*. Des taux élevés de multirésistance chez les *K. pneumoniae* ont été également signalés dans d'autres études en Algérie (**Bariz et al., 2019 ; Zenati et al., 2017**).

Les phénotypes de multirésistance sont exprimés avec une résistance à trois (25%, 21/84), quatre (24%, 20/84), cinq (13%, 11/84) ou six (13%, 11/84) antibiotiques. Ces multirésistances sont majoritairement associées aux isolats d'entérobactéries productrices de BLSE. Il est bien connu que les entérobactéries productrices de BLSE sont souvent résistantes à d'autres antibiotiques, en particulier les fluoroquinolones et les aminosides (**Ruppé et al., 2015**). Les

Klebsiella spp. ont montré le taux de multi-résistance à six antibiotiques le plus élevé (32%, 10/31)

Notre étude a révélé qu'en plus des β -lactamines, les antibiotiques les plus fréquemment associés aux divers profils de multirésistance étaient SXT (85.5%), suivi par DO (83.8%), CIP (54.8%), F (46.7%) et CN (42%). Les 2 profils de multirésistance les plus fréquents dans notre étude étaient « AMX AMC CF CRO FEP CIP DO SXT » (14.5%, n=9) et « AMX AMC DO SXT » (11%, n=7).

La multirésistance des entérobactéries productrices de BLSE peut s'expliquer par le fait que les gènes de ces enzymes sont portés par des plasmides, qui portent aussi des transposons et des intégrons, qui eux-mêmes portent d'autres gènes de résistance à d'autres classes d'antibiotiques, ce qui facilite leur transfert entre les bactéries par conjugaison, transduction ou transformation, et contribue à leur rapide et large dissémination chez différents hôtes et environnements à travers le monde (Alekhun & Levy, 2007).

En effet, dans cette étude, plusieurs combinaisons de gènes de BLSE en association avec d'autres gènes de résistance, ont été détectés chez les isolats d'entérobactéries productrices de BLSE. Onze isolats multirésistants (17%) hébergeaient simultanément une combinaison d'au moins un variant des gènes de β -lactamases (*bla_{CTX}*/*bla_{TEM}*/*bla_{SHV}*), un variant des gènes de l'aminoglycoside acétyltransférase (*aac(6')* / *aac(6')-Ib* / *aac(6')-Ib-cr*) et un gène plasmidique de résistance aux quinolones (*qnrB*). La coexistence de ces gènes sur un même plasmide et leur co-transfert parmi les *Enterobacteriaceae* été mis en évidence dans plusieurs études en Algérie et ailleurs (Zenati *et al.*, 2017 ; Abderrahim *et al.*, 2022 ; Jiang *et al.*, 2008 ; Pitout *et al.*, 2008 ; Eftekhari *et al.*, 2015).

Conclusion

et

perspectives

Les bactéries multirésistantes, en particulier les entérobactéries productrices de BLSE, sont devenues un problème de santé publique majeur. Cette étude décrit la prévalence et les profils d'antibiorésistance de 84 isolats cliniques d'entérobactéries (*E. coli*, *Klebsiella* spp. et *Enterobacter* spp.), la majorité provenaient d'urines, collectés entre 2012 à 2017 de patients à l'hôpital Rabah BITAT de Boumerdès.

Nos résultats ont montré des taux élevés de résistance à une variété d'antibiotiques, et un niveau élevé d'entérobactéries productrices de BLSE, de types CTX-M, SHV et TEM, dont le type CTX-M était le plus prédominant. Le sous-type CTX-M-15 était le plus fréquent parmi les BLSE de type CTX-M.

Nous avons également rapporté pour la première fois en Algérie la détection des variants des gènes codant les BLSE CTX-M-27, CTX-M-55 et SHV-16.

Notre étude a montré un taux très élevé de multirésistance, allant de 3 à 6 combinaisons d'antibiotiques, particulièrement parmi les isolats de *K. pneumoniae*.

Les isolats multirésistants portaient simultanément différentes combinaisons des gènes de β -lactamases ($bla_{CTX}/bla_{TEM}/bla_{SHV}$) et des gènes de résistance à d'autres classes d'antibiotiques, notamment les gènes de résistance aux aminoglycosides ($aac(6') / aac(6')-Ib / aac(6')-Ib-cr$) et le gène plasmidique de résistance aux quinolones ($qnrB / aac(6')-Ib-cr$).

Ainsi, le constat d'une prévalence relativement élevée des BLSE suggère que la dissémination des BLSE reste un phénomène courant dans les milieux hospitaliers et communautaires en Algérie. Ceci est particulièrement pertinent.

Cette coexistence de plusieurs gènes de résistance à différents antibiotiques dans un même isolat est inquiétante, car elle peut conférer un avantage sélectif aux bactéries, qui peut favoriser davantage la dissémination de ces organismes et, éventuellement, limiter les options thérapeutiques.

L'ensemble de nos données complémente celles des nombreuses études menées dans d'autres régions du pays, qui ont également confirmé une prévalence élevée des entérobactéries pathogènes, productrices de BLSE et multirésistantes dans différents contextes en Algérie. Ce constat démontre la nécessité et l'urgence d'une surveillance continue de ces pathogènes et la compréhension de leurs mécanismes moléculaires de résistance et de leur dissémination, ainsi que les facteurs de risques associés, afin d'aider à mettre en place des stratégies de prévention

appropriées, combinant des procédures de contrôle et de prévention des infections et des approches plus rationnelles de l'utilisation des antibiotiques.

Enfin, les données émanant de cette étude mono-centrique menée dans un hôpital fournissent un aperçu sur les niveaux et les profils d'antibiorésistance chez un nombre limité d'isolats d'entérobactéries; cependant, d'autres études multicentriques, plus élargis en termes de nombre d'hôpitaux, de zones géographiques, de types et tailles d'échantillons, sont nécessaires pour mieux estimer la prévalence des entérobactéries productrices de BLSE circulantes en Algérie et de mieux comprendre leurs caractéristiques génétiques et leur épidémiologie moléculaire.

*Références
bibliographiques*

A

Abderrahim, A., Djahmi, N., Loucif, L., Nedjai, S., Chelaghma, W., Gameci-Kirane, D., Dekhil, M., Lavigne, J.-P., Pantel, A., 2022. Dissemination of OXA-48- and NDM-1-Producing Enterobacterales Isolates in an Algerian Hospital. *Antibiotics* 11, 750. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060750>

Abebe, E., Gugsu, G., Ahmed, M., 2020. Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. *J Trop Med* 2020, 4674235. <https://doi.org/10.1155/2020/4674235>

Abrar, S., Hussain, S., Khan, R.A., Ul Ain, N., Haider, H., Riaz, S., 2018. Prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: first systematic meta-analysis report from Pakistan. *Antimicrob Resist Infect Control* 7, 26. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0309-1>

Adler, A., Gniadkowski, M., Baraniak, A., Izdebski, R., Fiett, J., Hryniewicz, W., Malhotra-Kumar, S., Goossens, H., Lammens, C., Lerman, Y., Kazma, M., Kotlovsky, T., Carmeli, Y., MOSAR WP5 and WP2 study groups, 2012. Transmission dynamics of ESBL-producing *Escherichia coli* clones in rehabilitation wards at a tertiary care centre. *Clin Microbiol Infect* 18, E497-505. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03999.x>

Adzitey, F., Huda, N., Ali, G.R.R., 2013. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech* 3, 97–107. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0074-4>

Agabou, A., Pantel, A., Ouchenane, Z., Lezzar, N., Khemissi, S., Satta, D., Sotto, A., Lavigne, J.-P., 2014. First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 1641–1646. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2122-y>

Aggoune, N., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Benamrouche, N., Naim, M., Rahal, K., 2014. Emergence of plasmid mediated carbapenemase OXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* strain in Algeria. *J Glob Antimicrob Resist* 2, 327–329. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.06.001>

Ahmed, A.M., Hussein, A.I.A., Shimamoto, T., 2007. *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of *Salmonella* genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region. *J Antimicrob Chemother* 59, 184–190. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl471>

Ahmed, M., Clegg, P., Williams, N., Baptiste, K., Bennett, M., 2010. Antimicrobial resistance in equine faecal *Escherichia coli* isolates from North West England. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 9. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-12>

Ahmed, Z.B., Ayad, A., Mesli, E., Messai, Y., Bakour, R., Drissi, M., 2012. CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in the intensive care unit of Tlemcen Hospital, Algeria. *East Mediterr Health J* 18, 382–386. <https://doi.org/10.26719/2012.18.4.382>

Aldred, K.J., Kerns, R.J., Osheroff, N., 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53, 1565–1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>

- Alekshun, M.N., Levy, S.B., 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128, 1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
- Algarni, S., Rieke, S.C., Foley, S.L., Han, J., 2022. The Dynamics of the Antimicrobial Resistance Mobilome of *Salmonella enterica* and Related Enteric Bacteria. *Front Microbiol* 13, 859854. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.859854>
- Alonso, H., Gready, J.E., 2006. Integron-sequestered dihydrofolate reductase: a recently redeployed enzyme. *Trends Microbiol* 14, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.03.003>
- Alouache, S., Estepa, V., Messai, Y., Ruiz, E., Torres, C., Bakour, R., 2014. Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microb Drug Resist* 20, 30–38. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0264>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anssour, L., Messai, Y., Derkaoui, M., Alouache, S., Estepa, V., Somalo, S., Torres, C., Bakour, R., 2014. ESBL, plasmidic AmpC, and associated quinolone resistance determinants in coliforms isolated from hospital effluent: first report of qnrB2, qnrB9, qnrB19, and blaCMY-4 in Algeria. *J Chemother* 26, 74–79. <https://doi.org/10.1179/1973947813y.0000000115>
- Anssour, L., Messai, Y., Estepa, V., Torres, C., Bakour, R., 2016. Characteristics of ciprofloxacin-resistant Enterobacteriaceae isolates recovered from wastewater of an Algerian hospital. *J Infect Dev Ctries* 10, 728–734. <https://doi.org/10.3855/jidc.6727>
- Anyanwu, M.U., Jaja, I.F., Nwobi, O.C., 2020. Occurrence and Characteristics of Mobile Colistin Resistance (mcr) Gene-Containing Isolates from the Environment: A Review. *Int J Environ Res Public Health* 17, 1028. <https://doi.org/10.3390/ijerph17031028>
- Aouf, A., Gueddi, T., Djeghout, B., Ammari, H., 2018. Frequency and susceptibility pattern of uropathogenic Enterobacteriaceae isolated from patients in Algiers, Algeria. *J Infect Dev Ctries* 12, 244–249. <https://doi.org/10.3855/jidc.10017>
- Arcangioli, M.-A., Leroy-S  trin, S., Martel, J.-L., Chaslus-Dancla, E., 1999. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. *FEMS Microbiology Letters* 174, 327–332. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13586.x>
- Ayad, A., Drissi, M., de Curraize, C., Dupont, C., Hartmann, A., Solanas, S., Siebor, E., Amoureux, L., Neuwirth, C., 2016. Occurrence of ArmA and RmtB Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methylases in Extended-Spectrum β -Lactamases Producing *Escherichia coli* in Algerian Hospitals. *Front Microbiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01409>

B

- Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., Arlet, G., 2014. [News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria]. *Pathol Biol (Paris)* 62, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.01.005>
- Babini, G.S., Livermore, D.M., 2000. Are SHV beta-lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2230. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.8.2230-2230.2000>
- Bakour, S., Garcia, V., Loucif, L., Brunel, J.-M., Gharout-Sait, A., Touati, A., Rolain, J.-M., 2015a. Rapid identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test. *New Microbes New Infect* 7, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.07.001>
- Bakour, S., Olaitan, A., Ammari, H., Touati, A., Saoudi, S., Saoudi, K., Rolain, J.-M., 2015b. Emergence of Colistin- and Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 Clinical Isolate in Algeria: First Case Report. *Microbial Drug Resistance* 21. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0214>
- Bakour, S., Sahli, F., Touati, A., Rolain, J.-M., 2015c. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 isolated from cerebrospinal fluid of a child in Algeria. *New Microbes New Infect* 3, 34–36. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2014.09.001>
- Balbi, H.J., 2004. Chloramphenicol: a review. *Pediatr Rev* 25, 284–288. <https://doi.org/10.1542/pir.25-8-284>
- Balows, A., 1972. Current techniques for antibiotic susceptibility testing. Charles C Thomas Publisher, Springfield.
- Bariz, K., De Mendonça, R., Denis, O., Nonhoff, C., Azzam, A., Houali, K., 2019. Multidrug resistance of the extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Tizi-Ouzou (Algeria). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 65, 11–17.
- Barka, M.S., Cherif-Anntar, A., Benamar, I., 2021. Antimicrobial resistance patterns and transferable traits in Enterobacteriaceae isolates from poultry in Tlemcen, Algeria. *Af J Clin Exp Micro* 22, 196–203. <https://doi.org/10.4314/ajcem.v22i2.12>
- Barrasa-Villar, J.I., Aibar-Remón, C., Prieto-Andrés, P., Mareca-Doñate, R., Moliner-Lahoz, J., 2017. Impact on Morbidity, Mortality, and Length of Stay of Hospital-Acquired Infections by Resistant Microorganisms. *Clinical Infectious Diseases* 65, 644–652. <https://doi.org/10.1093/cid/cix411>
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45, 493–496.
- Belbel, Z., Chettibi, H., Dekhil, M., Ladjama, A., Nedjai, S., Rolain, J.-M., 2014. Outbreak of an armA Methyltransferase-Producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* Clone in a Pediatric Algerian Hospital. *Microbial Drug Resistance* 20, 310–315. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0193>

Belmahdi, M., Chenouf, N.S., Ait Belkacem, A., Martinez-Alvarez, S., Pino-Hurtado, M.S., Benkhechiba, Z., Lahrech, S., Hakem, A., Torres, C., 2022. Extended Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Poultry and Wild Birds (Sparrow) in Djelfa (Algeria), with Frequent Detection of CTX-M-14 in Sparrow. *Antibiotics (Basel)* 11, 1814. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121814>

Benamrouche, N., Lafer, O., Benmahdi, L., Benslimani, A., Amhis, W., Ammari, H., Assaous, F., Azzam, A., Rahal, K., Tali Maamar, H., 2020. Phenotypic and genotypic characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in Algerian hospitals. *J Infect Dev Ctries* 14, 1395–1401. <https://doi.org/10.3855/jidc.12348>

Berrazeg, M., 2013. Développement des nouveaux outils de surveillance de l'émergence des bactéries à Gram négatif multirésistantes (These de doctorat). Aix-Marseille.

Berrazeg, M., Deriet, A., De Keersmaecker, S.C.J., Verhaegen, B., Vanneste, K., Botteldoorn, N., Roosens, N.H.C., Mouffok, F., Drali, R., 2019. Whole-Genome Sequencing of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strains Harboring the *mcr-1* Gene, Isolated from Seawater of the Algiers Coast in Algeria. *Microbiol Resour Announc* 8, e00638-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00638-19>

Berrazeg, M., Hadjadj, L., Ayad, A., Drissi, M., Rolain, J.-M., 2016. First Detected Human Case in Algeria of *mcr-1* Plasmid-Mediated Colistin Resistance in a 2011 *Escherichia coli* Isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 6996–6997. <https://doi.org/10.1128/AAC.01117-16>

Beutlich, J., Jahn, S., Malorny, B., Hauser, E., Hühn, S., Schroeter, A., Rodicio, M.R., Appel, B., Threlfall, J., Mevius, D., Helmuth, R., Guerra, B., 2011. Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in European *Salmonella* Genomic Island 1-Positive *Salmonella enterica* Isolates from Different Origins. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 5655–5664. <https://doi.org/10.1128/AEM.00425-11>

Bevan, E.R., Jones, A.M., Hawkey, P.M., 2017. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72, 2145–2155. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx146>

Bezabih, Y.M., Bezabih, A., Dion, M., Batard, E., Teka, S., Obole, A., Dessalegn, N., Enyew, A., Roujeinikova, A., Alamneh, E., Mirkazemi, C., Peterson, G.M., Bezabhe, W.M., 2022. Comparison of the global prevalence and trend of human intestinal carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* between healthcare and community settings: a systematic review and meta-analysis. *JAC Antimicrob Resist* 4, dlac048. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlac048>

Bonnet, R., 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1–14. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>

Bonnet, R., Recule, C., Baraduc, R., Chanal, C., Sirot, D., De Champs, C., Sirot, J., 2003. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 29–35. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg256>

Bouallègue-Godet, O., Salem, Y.B., Fabre, L., Demartin, M., Grimont, P.A.D., Mzoughi, R., Weill, F.-X., 2005. Nosocomial Outbreak Caused by *Salmonella enterica* Serotype Livingstone

Producing CTX-M-27 Extended-Spectrum β -Lactamase in a Neonatal Unit in Sousse, Tunisia. *J Clin Microbiol* 43, 1037–1044. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1037-1044.2005>

Bouguenoun, W., Bakour, S., Bentorki, A.A., Al Bayssari, C., Merad, T., Rolain, J.-M., 2016. Molecular epidemiology of environmental and clinical carbapenemase-producing Gram-negative bacilli from hospitals in Guelma, Algeria: Multiple genetic lineages and first report of OXA-48 in *Enterobacter cloacae*. *J Glob Antimicrob Resist* 7, 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.08.011>

Bourafa, N., Chaalal, W., Bakour, S., Lalaoui, R., Boutefnouchet, N., Diene, S.M., Rolain, J.-M., 2018. Molecular characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli clinical isolates in Algeria. *IDR Volume* 11, 735–742. <https://doi.org/10.2147/IDR.S150005>

Boyd, D., Cloeckart, A., Chaslus-Dancla, E., Mulvey, M.R., 2002. Characterization of Variant *Salmonella* Genomic Island 1 Multidrug Resistance Regions from Serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1714–1722. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1714-1722.2002>

Boyd, D., Peters, G.A., Cloeckart, A., Boumedine, K.S., Chaslus-Dancla, E., Imberechts, H., Mulvey, M.R., 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol* 183, 5725–5732. <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5725-5732.2001>

Bradford, P.A., 2001. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 933–951. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>

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. *Microb Drug Resist* 24, 290–298. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0149>

Brolund, A., 2014. Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. *Infect Ecol Epidemiol* 4. <https://doi.org/10.3402/iee.v4.24555>

Brown, D., 2015. Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? *Nat Rev Drug Discov* 14, 821–832. <https://doi.org/10.1038/nrd4675>

Brown, D.F., Brown, L., 1991. Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother* 27, 185–190. <https://doi.org/10.1093/jac/27.2.185>

Bush, K., 2010. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr Opin Microbiol* 13, 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.006>

Bush, K., Bradford, P.A., 2016. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>

Bush, N.G., Diez-Santos, I., Abbott, L.R., Maxwell, A., 2020. Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules* 25, 5662. <https://doi.org/10.3390/molecules25235662>

Byrne-Bailey, K.G., Gaze, W.H., Kay, P., Boxall, A.B.A., Hawkey, P.M., Wellington, E.M.H., 2009. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 696–702. <https://doi.org/10.1128/AAC.00652-07>

C

Cai, Y., Lee, W., Kwa, A.L., 2015. Polymyxin B versus colistin: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther* 13, 1481–1497. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1093933>

Campos, M.A., Vargas, M.A., Regueiro, V., Llompарт, C.M., Albertí, S., Bengoechea, J.A., 2004. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 72, 7107–7114. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004>

Cantón, R., Coque, T.M., 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9, 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011>

Canton, R., González-Alba, J., Galán, J., 2012. CTX-M Enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in microbiology* 3, 110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>

Carattoli, A., 2011. Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology* 301, 654–658. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.003>

Carattoli, A., 2009. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2227–2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>

Carattoli, A., Seiffert, S.N., Schwendener, S., Perreten, V., Endimiani, A., 2015. Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance. *PLoS One* 10, e0123063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123063>

Carrër, A., Poirel, L., Yilmaz, M., Akan, O.A., Feriha, C., Cuzon, G., Matar, G., Honderlick, P., Nordmann, P., 2010. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 1369–1373. <https://doi.org/10.1128/AAC.01312-09>

Carter, M.W., Oakton, K.J., Warner, M., Livermore, D.M., 2000. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in klebsiellae with the Oxoid combination disk method. *J Clin Microbiol* 38, 4228–4232. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.11.4228-4232.2000>

Carvalho, I., Carvalho, J.A., Martínez-Álvarez, S., Sadi, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Rabbi, F., Dapkevicius, M. de L.N.E., Igrejas, G., Torres, C., Poeta, P., 2021. Characterization of ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Samples in a Northern Portuguese Hospital: Predominance of CTX-M-15 and High Genetic Diversity. *Microorganisms* 9, 1914. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091914>

Castañeda-García, A., Blázquez, J., Rodríguez-Rojas, A., 2013. Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance. *Antibiotics (Basel)* 2, 217–236. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2020217>

Castanheira, M., Simner, P.J., Bradford, P.A., 2021. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance* 3, dlab092. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>

Chabou, S., Leulmi, H., Davoust, B., Aouadi, A., Rolain, J.-M., 2018. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-encoding genes in poultry faeces from Algeria and Marseille, France. *J Glob Antimicrob Resist* 13, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.11.002>

Chenouf, N.S., Carvalho, I., Messaï, C.R., Ruiz-Ripa, L., Mama, O.M., Titouche, Y., Zitouni, A., Hakem, A., Torres, C., 2021. Extended Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Broiler Liver in the Center of Algeria, with Detection of CTX-M-55 and B2/ST131-CTX-M-15 in *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist* 27, 268–276. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0024>

Cherak, Z., Loucif, L., Bendjama, E., Moussi, A., Benbouza, A., Grainat, N., Rolain, J.-M., 2022. Dissemination of Carbapenemases and MCR-1 Producing Gram-Negative Bacteria in Aquatic Environments in Batna, Algeria. *Antibiotics (Basel)* 11, 1314. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101314>

Chlebicz, A., Śliżewska, K., 2018. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *Int J Environ Res Public Health* 15, 863. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>

Chopra, I., Roberts, M., 2001a. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 232–260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>

Chowdhury, G., Ramamurthy, T., Das, B., Ghosh, D., Okamoto, K., Miyoshi, S.I., Dutta, S., Mukhopadhyay, A.K., 2022. Characterization of NDM-5 Carbapenemase-Encoding Gene (bla_{NDM-5}) – Positive Multidrug Resistant Commensal *Escherichia coli* from Diarrheal Patients. *Infection and Drug Resistance* 15, 3631–3642. <https://doi.org/10.2147/IDR.S364526>

Clasen, J., Birkegård, A.C., Græsbøll, K., Folkesson, A., 2019. The evolution of TEM-1 extended-spectrum β -lactamases in *E. coli* by cephalosporins. *Journal of global antimicrobial resistance*.

Clatworthy, A.E., Pierson, E., Hung, D.T., 2007. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol* 3, 541–548. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.24>

Clemente, L., Leão, C., Moura, L., Albuquerque, T., Amaro, A., 2021. Prevalence and Characterization of ESBL/AmpC Producing *Escherichia coli* from Fresh Meat in Portugal. *Antibiotics (Basel)* 10, 1333. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111333>

Cloeckaert, A., Baucheron, S., Flaujac, G., Schwarz, S., Kehrenberg, C., Martel, J.-L., Chaslus-Dancla, E., 2000. Plasmid-Mediated Florfenicol Resistance Encoded by the *floR* Gene

in *Escherichia coli* Isolated from Cattle. Antimicrob Agents Chemother 44, 2858–2860. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.10.2858-2860.2000>

Colavecchio, A., Cadieux, B., Lo, A., Goodridge, L.D., 2017. Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the Enterobacteriaceae Family - A Review. Front Microbiol 8, 1108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01108>

Cormican, M.G., Marshall, S.A., Jones, R.N., 1996. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. J Clin Microbiol 34, 1880–1884. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.8.1880-1884.1996>

Cui, X., Zhang, H., Du, H., 2019. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and Antimicrobial Therapy. Front Microbiol 10, 1823. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01823>

Cunha, M.P.V., Lincopan, N., Cerdeira, L., Esposito, F., Dropa, M., Franco, L.S., Moreno, A.M., Knöbl, T., 2017. Coexistence of CTX-M-2, CTX-M-55, CMY-2, FosA3, and QnrB19 in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from poultry in Brazil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC) 61, e02474. <https://doi.org/10.1128/AAC.02474-16>

D

da Silva Filho, A.C., Raittz, R.T., Guizelini, D., De Pierri, C.R., Augusto, D.W., Dos Santos-Weiss, I.C.R., Marchaukoski, J.N., 2018. Comparative Analysis of Genomic Island Prediction Tools. Front Genet 9, 619. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00619>

Dally, S., Lemuth, K., Kaase, M., Rupp, S., Knabbe, C., Weile, J., 2013. DNA Microarray for Genotyping Antibiotic Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother 57, 4761–4768. <https://doi.org/10.1128/AAC.00863-13>

Dalmolin, T.V., Castro, L., Mayer, F.Q., Zavascki, A.P., Martins, A.F., Lima-Morales, D. de, Barth, A.L., 2017. Co-occurrence of mcr-1 and blaKPC-2 in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. J Antimicrob Chemother 72, 2404–2406. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx142>

D'Andrea, M.M., Arena, F., Pallecchi, L., Rossolini, G.M., 2013. CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. International Journal of Medical Microbiology 303, 305–317. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008>

De Angelis, G., Del Giacomo, P., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Tumbarello, M., 2020. Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β -Lactam Resistance in Enterobacteriaceae. Int J Mol Sci 21, 5090. <https://doi.org/10.3390/ijms21145090>

Delcour, A., 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochimica et biophysica acta 1794. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>

Denton, M., 2007. Enterobacteriaceae. Int J Antimicrob Agents 29 Suppl 3, S9–S22. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(07\)72174-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(07)72174-X)

Deurenberg, R.H., Bathoorn, E., Chlebowicz, M.A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., Kooistra-Smid, A.M.D., Raangs, E.C., Rosema, S., Veloo, A.C.M., Zhou, K., Friedrich, A.W.,

- Rossen, J.W.A., 2017. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol* 243, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.022>
- Diallo, O.O., Baron, S.A., Abat, C., Colson, P., Chaudet, H., Rolain, J.-M., 2020. Antibiotic resistance surveillance systems: A review. *J Glob Antimicrob Resist* 23, 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.10.009>
- Diaz-Torres, M.L., McNab, R., Spratt, D.A., Villedieu, A., Hunt, N., Wilson, M., Mullany, P., 2003. Novel Tetracycline Resistance Determinant from the Oral Metagenome. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1430–1432. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1430-1432.2003>
- Diriba, K., Awulachew, E., Gemede, A., Anja, A., 2021. The magnitude of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from clinical samples in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Access Microbiol* 3, 000195. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000195>
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., Hacker, J., 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2, 414–424. <https://doi.org/10.1038/nrmicro884>
- Doi, Y., Wachino, J.-I., Arakawa, Y., 2016. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 30, 523–537. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.011>
- Dortet, L., Poirel, L., Nordmann, P., 2013. Épidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénèmes. *Feuillet de Biologie* 312.
- Doublet, B., Schwarz, S., Kehrenberg, C., Cloeckart, A., 2005. Florfenicol resistance gene floR is part of a novel transposon. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2106–2108. <https://doi.org/10.1128/aac.49.5.2106-2108.2005>
- Drawz, S.M., Papp-Wallace, K.M., Bonomo, R.A., 2014. New β -lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1835–1846. <https://doi.org/10.1128/AAC.00826-13>
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., Jarlier, V., 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 1, 90–103. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x>
- Durante-Mangoni, E., Grammatikos, A., Utili, R., Falagas, M.E., 2009. Do we still need the aminoglycosides? *Int J Antimicrob Agents* 33, 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.001>
- Dutour, C., Bonnet, R., Marchandin, H., Boyer, M., Chanal, C., Sirot, D., Sirot, J., 2002. CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 beta-lactamases from Enterobacteriaceae isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 534–537. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.534-537.2002>
- Dziri, O., Dziri, R., El Salabi, A.A., Alawami, A.A., Ksouri, R., Chouchani, C., 2021. Polymyxin E-Resistant Gram-Negative Bacteria in Tunisia and Neighboring Countries: Are There Commonalities? *Infect Drug Resist* 14, 4821–4832. <https://doi.org/10.2147/IDR.S327718>

E

ECDC, 2020. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net)—Annual Epidemiological Report 2019; European Centre for Disease Prevention and Control: Stockholm, Sweden.

Eckert, C., Gautier, V., Saladin-Allard, M., Hidri, N., Verdet, C., Ould-Hocine, Z., Barnaud, G., Delisle, F., Rossier, A., Lambert, T., Philippon, A., Arlet, G., 2004. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1249–1255. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1249-1255.2004>

Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., Stratchounski, L., 2003. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3724–3732. <https://doi.org/10.1128/aac.47.12.3724-3732.2003>

EFSA and EMA, n.d. EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA) \textbar EFSA.

Eftekhari, F., Seyedpour, S.M., 2015. Prevalence of qnr and aac(6⁺)-ib-cr genes in clinical isolates of *klebsiella pneumoniae* from Imam Hussein hospital in Tehran. *Iranian Journal of Medical Sciences* 40, 515–521.

El Salabi, A., Walsh, T.R., Chouchani, C., 2013. Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 39, 113–122. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691870>

Etemadi, S., Ebrahimzadeh Leylabadlo, H., Ghotaslou, R., 2020. AmpC β -lactamase among Enterobacteriaceae: A new insight. *Gene Reports* 19, 100673. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100673>

F

Fadare, F.T., Adefisoye, M.A., Okoh, A.I., 2020. Occurrence, identification, and antibiogram signatures of selected Enterobacteriaceae from Tsomo and Tyhume rivers in the Eastern Cape Province, Republic of South Africa. *PLoS One* 15, e0238084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238084>

Fajardo, A., Martínez-Martín, N., Mercadillo, M., Galán, J.C., Ghysels, B., Matthijs, S., Cornelis, P., Wiehlmann, L., Tümmler, B., Baquero, F., Martínez, J.L., 2008. The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens. *PLoS ONE* 3, e1619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001619>

Fasugba, O., Gardner, A., Mitchell, B.G., Mnatzaganian, G., 2015. Ciprofloxacin resistance in community- and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMC Infect Dis* 15, 545. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1282-4>

Feldgarden, M., Brover, V., Gonzalez-Escalona, N., Frye, J.G., Haendiges, J., Haft, D.H., Hoffmann, M., Pettengill, J.B., Prasad, A.B., Tillman, G.E., Tyson, G.H., Klimke, W., 2021. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci Rep* 11, 12728. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>

Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D.H., Prasad, A.B., Slotta, D.J., Tolstoy, I., Tyson, G.H., Zhao, S., Hsu, C.-H., McDermott, P.F., Tadesse, D.A., Morales, C., Simmons, M., Tillman, G., Wasilenko, J., Folster, J.P., Klimke, W., 2019. Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e00483-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00483-19>

Flokas, M.E., Detsis, M., Alevizakos, M., Mylonakis, E., 2016. Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in paediatric urinary tract infections: A systematic review and meta-analysis. *J Infect* 73, 547–557. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.07.014>

Florensa, A.F., Kaas, R.S., Clausen, P.T.L.C., Aytan-Aktug, D., Aarestrup, F.M., 2022. ResFinder - an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microb Genom* 8, 000748. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748>

Flores-Mireles, A.L., Walker, J.N., Caparon, M., Hultgren, S.J., 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* 13, 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>

Fluit, A.C., Schmitz, F.-J., 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 10, 272–288. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00858.x>

Forsythe, S.J., Abbott, S.L., Pitout, J., 2015. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Cronobacter, Serratia, Plesiomonas*, and Other *Enterobacteriaceae*, in: Jorgensen, J.H., Carroll, K.C., Funke, G., Pfaller, M.A., Landry, M.L., Richter, S.S., Warnock, D.W. (Eds.), . ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 714–737. <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch38>

Fryklund, B., Tullus, K., Burman, L.G., 1995. Survival on skin and surfaces of epidemic and non-epidemic strains of enterobacteria from neonatal special care units. *J Hosp Infect* 29, 201–208. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(95\)90329-1](https://doi.org/10.1016/0195-6701(95)90329-1)

G

Gajic, I., Kabic, J., Kekic, D., Jovicevic, M., Milenkovic, M., Mitic Culafic, D., Trudic, A., Ranin, L., Opavski, N., 2022. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics* (Basel) 11, 427. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040427>

Gales, A.C., Reis, A.O., Jones, R.N., 2001. Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. *J Clin Microbiol* 39, 183–190. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.183-190.2001>

Galhano, B.S.P., Ferrari, R.G., Panzenhagen, P., de Jesus, A.C.S., Conte-Junior, C.A., 2021. Antimicrobial Resistance Gene Detection Methods for Bacteria in Animal-Based Foods: A Brief Review of Highlights and Advantages. *Microorganisms* 9, 923. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050923>

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*. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2565-2571.2003>

Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P., Lambert, T., 2005. Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2949–2953. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2949-2953.2005>

Gallardo-Godoy, A., Muldoon, C., Becker, B., Elliott, A., Lash, L., Huang, J., Butler, M., Pelingon, R., Kavanagh, A., Ramu, S., Phetsang, W., Blaskovich, M., Cooper, M., 2016. Activity and Predicted Nephrotoxicity of Synthetic Antibiotics Based on Polymyxin B. *Journal of medicinal chemistry* 59. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01593>

García-Meniño, I., Díaz-Jiménez, D., García, V., de Toro, M., Flament-Simon, S.C., Blanco, J., Mora, A., 2019. Genomic Characterization of Prevalent mcr-1, mcr-4, and mcr-5 *Escherichia coli* Within Swine Enteric Colibacillosis in Spain. *Frontiers in Microbiology* 10.

Garneau-Tsodikova, S., Labby, K.J., 2016. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *MedChemComm* 7, 11–27. <https://doi.org/10.1039/C5MD00344J>

Garrec, H., Drieux-Rouzet, L., Golmard, J.-L., Jarlier, V., Robert, J., 2011. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum beta-lactamase production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 49, 1048–1057. <https://doi.org/10.1128/JCM.02130-10>

Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., Sekawi, Z., 2015. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol* 17, 11–21.

Ghai, I., Ghai, S., 2018. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infect Drug Resist* 11, 523–530. <https://doi.org/10.2147/IDR.S156995>

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, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.12.001>

Ghosh, H., Doijad, S., Falgenhauer, L., Fritzenwanker, M., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., 2017. blaCTX-M-27-Encoding *Escherichia coli* Sequence Type 131 Lineage C1-M27 Clone in Clinical Isolates, Germany. *Emerg Infect Dis* 23, 1754–1756. <https://doi.org/10.3201/eid2310.170938>

Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., Zhu, Y.-G., 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J* 9, 1269–1279. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>

Girlich, D., Bonnin, R.A., Dortet, L., Naas, T., 2020. Genetics of Acquired Antibiotic Resistance Genes in *Proteus* spp. *Front Microbiol* 11, 256. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00256>

Girlich, D., Poirel, L., Carattoli, A., Kempf, I., Lartigue, M.-F., Bertini, A., Nordmann, P., 2007. Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol* 73, 4681–4685. <https://doi.org/10.1128/AEM.02491-06>

Gniadkowski, M., Schneider, I., Pałucha, A., Jungwirth, R., Mikiiewicz, B., Bauernfeind, A., 1998. Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 827–832. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.4.827>

Gogry, F.A., Siddiqui, M.T., Sultan, I., Haq, Q.M.R., 2021. Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Front Med (Lausanne)* 8, 677720. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.677720>

Grape, M., Farra, A., Kronvall, G., Sundström, L., 2005. Integrons and gene cassettes in clinical isolates of co-trimoxazole-resistant Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 11, 185–192. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01059.x>

Grossman, T.H., 2016. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a025387. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>

Guédon, G., Libante, V., Coluzzi, C., Payot, S., Leblond-Bourget, N., 2017. The Obscure World of Integrative and Mobilizable Elements, Highly Widespread Elements that Pirate Bacterial Conjugative Systems. *Genes* 8, 337. <https://doi.org/10.3390/genes8110337>

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. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 212–220. <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>

H

Hajna, A.A., 1945. Triple-Sugar Iron Agar Medium for the Identification of the Intestinal Group of Bacteria. *J Bacteriol* 49, 516–517.

Halfaoui, Z., Menoueri, N.M., Bendali, L.M., 2017. Serogrouping and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken with colibacillosis in center of Algeria. *Vet World* 10, 830–835. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.830-835>

Hamed, S.M., Elkhatib, W.F., El-Mahallawy, H.A., Helmy, M.M., Ashour, M.S., Aboshanab, K.M.A., 2018. Multiple mechanisms contributing to ciprofloxacin resistance among Gram

negative bacteria causing infections to cancer patients. *Sci Rep* 8, 12268. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30756-4>

Hamidian, M., Holt, K.E., Hall, R.M., 2015. Genomic resistance island AGI1 carrying a complex class 1 integron in a multiply antibiotic-resistant ST25 *Acinetobacter baumannii* isolate. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 70, 2519–2523. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv137>

Harris, P.N.A., 2015. Clinical management of infections caused by Enterobacteriaceae that express extended-spectrum β -lactamase and AmpC enzymes. *Semin Respir Crit Care Med* 36, 56–73. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1398387>

Hartman, P., Beckman, K., Silverstein, K., Yohe, S., Schomaker, M., Henzler, C., Onsongo, G., Lam, H.C., Munro, S., Daniel, J., Billstein, B., Deshpande, A., Hauge, A., Mroz, P., Lee, W., Holle, J., Wiens, K., Karnuth, K., Kemmer, T., Leary, M., Michel, S., Pohlman, L., Thayanithy, V., Nelson, A., Bower, M., Thyagarajan, B., 2019. Next generation sequencing for clinical diagnostics: Five year experience of an academic laboratory. *Mol Genet Metab Rep* 19, 100464. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2019.100464>

Hassen, B., Abbassi, M.S., Ruiz-Ripa, L., Mama, O.M., Hassen, A., Torres, C., Hammami, S., 2020. High prevalence of mcr-1 encoding colistin resistance and first identification of blaCTX-M-55 in ESBL/CMY-2-producing *Escherichia coli* isolated from chicken faeces and retail meat in Tunisia. *Int J Food Microbiol* 318, 108478. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108478>

Hawkey, P.M., Jones, A.M., 2009. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 64 Suppl 1, i3-10. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp256>

He, D., Chiou, J., Zeng, Z., Liu, L., Chen, X., Zeng, L., Chan, E.W.C., Liu, J.-H., Chen, S., 2015. Residues Distal to the Active Site Contribute to Enhanced Catalytic Activity of Variant and Hybrid β -Lactamases Derived from CTX-M-14 and CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 5976–5983. <https://doi.org/10.1128/AAC.04920-14>

Hendriksen, R.S., Bortolaia, V., Tate, H., Tyson, G.H., Aarestrup, F.M., McDermott, P.F., 2019. Using Genomics to Track Global Antimicrobial Resistance. *Front. Public Health* 7, 242. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00242>

Hodge, W., Ciak, J., Tramont, E.C., 1978. Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 7, 102–103. <https://doi.org/10.1128/jcm.7.1.102-103.1978>

Hunt, M., Mather, A.E., Sánchez-busó, L., Page, A.J., Parkhill, J., Keane, J.A., Harris, S.R., 2017. ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microbial Genomics* 3. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000131>

I

Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., Alouache, S., Verdet, C., Bakour, R., Arlet, G., 2009. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. *IntJAntimicrobAgents* 34, 340–342. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.05.011>

Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., Ramdani-Bouguessa, N., Lounes, S., Bakour, R., Arlet, G., 2008. Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 133–136. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn145>

Inouye, M., Dashnow, H., Raven, L.-A., Schultz, M.B., Pope, B.J., Tomita, T., Zobel, J., Holt, K.E., 2014. SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Med* 6, 90. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0090-6>

Iredell, J., Brown, J., Tagg, K., 2016. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ* 352, h6420. <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>

Irfan, M., Almotiri, A., AlZeyadi, Z.A., 2022. Antimicrobial Resistance and Its Drivers-A Review. *Antibiotics (Basel)* 11, 1362. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101362>

J

Jacoby, G.A., Strahilevitz, J., Hooper, D.C., 2014. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr* 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013>

Janda, J., Abbott, S., 2021. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “Enterobacterales”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clinical microbiology reviews* 34. <https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20>

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

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

Jorgensen, J.H., 1997. Laboratory issues in the detection and reporting of antibacterial resistance. *Infect Dis Clin North Am* 11, 785–802. [https://doi.org/10.1016/s0891-5520\(05\)70390-1](https://doi.org/10.1016/s0891-5520(05)70390-1)

Jouini, A., Klibi, A., Elarbi, I., Chaabene, M.B., Hamrouni, S., Souiai, O., Hanachi, M., Ghram, A., Maaroufi, A., 2021. First Detection of Human ST131-CTX-M-15-O25-B2 Clone and High-Risk Clonal Lineages of ESBL/pAmpC-Producing *E. coli* Isolates from Diarrheic Poultry in Tunisia. *Antibiotics (Basel)* 10, 670. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060670>

Juhas, M., van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., Crook, D.W., 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* 33, 376–393. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x>

K

- Kahlmeter, G., Poulsen, H.O., 2012. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO-SENS study revisited. *Int J Antimicrob Agents* 39, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.013>
- Kariuki, S., Hart, C.A., 2001. Global aspects of antimicrobial-resistant enteric bacteria. *Current Opinion in Infectious Diseases* 14, 579.
- Kashefieh, M., Hosainzadegan, H., Baghbanijavid, S., Ghotaslou, R., 2021. The Molecular Epidemiology of Resistance to Antibiotics among *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Azerbaijan, Iran. *J Trop Med* 2021, 9195184. <https://doi.org/10.1155/2021/9195184>
- Kaushik, M., Kumar, S., Kapoor, R.K., Viridi, J.S., Gulati, P., 2018. Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 51, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004>
- Kemnic, T.R., Coleman, M., 2021. Trimethoprim Sulfamethoxazole, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Khennouchi, N.C. el H., Loucif, L., Boutefnouchet, N., Allag, H., Rolain, J.-M., 2015. MALDI-TOF MS as a Tool To Detect a Nosocomial Outbreak of Extended-Spectrum- β -Lactamase- and ArmA Methyltransferase-Producing *Enterobacter cloacae* Clinical Isolates in Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59, 6477–6483. <https://doi.org/10.1128/AAC.00615-15>
- Kidwell, M.G., Lisch, D.R., 2000. Transposable elements and host genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 15, 95–99. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01817-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01817-0)
- Kieffer, N., Ahmed, M.O., Elramalli, A.K., Daw, M.A., Poirel, L., Álvarez, R., Nordmann, P., 2018. Colistin-resistant carbapenemase-producing isolates among *Klebsiella* spp. and *Acinetobacter baumannii* in Tripoli, Libya. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 13, 37–39. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.02.020>
- Kim, B., Kim, J.-H., Lee, Y., 2022. Virulence Factors Associated With *Escherichia coli* Bacteremia and Urinary Tract Infection. *Ann Lab Med* 42, 203–212. <https://doi.org/10.3343/alm.2022.42.2.203>
- Kim, J., Lim, Y.-M., Jeong, Y.-S., Seol, S.-Y., 2005. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 Extended-Spectrum β -Lactamases in Enterobacteriaceae Clinical Isolates in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 1572–1575. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1572-1575.2005>
- 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 beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 479–483. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn244>
- Kliebe, C., Nies, B.A., Meyer, J.F., Tolxdorff-Neutzling, R.M., Wiedemann, B., 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28, 302–307. <https://doi.org/10.1128/aac.28.2.302>

Koser, S.A., 1923. Utilization of the Salts of Organic Acids by the Colon-Aerogenes Group. *J Bacteriol* 8, 493–520.

Kotra, L.P., Haddad, J., Mobashery, S., 2000. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 3249–3256. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3249-3256.2000>

Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., Connolly, L.E., 2016. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a027029. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>

Kruger, T., Szabo, D., Keddy, K.H., Deeley, K., Marsh, J.W., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., Paterson, D.L., 2004. Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4263–4270. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4263-4270.2004>

L

Lahlaoui, H., Ben Haj Khalifa, A., Ben Moussa, M., 2014. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). *Med Mal Infect* 44, 400–404. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.03.010>

Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>

Lee, K., Chong, Y., Shin, H.B., Kim, Y.A., Yong, D., Yum, J.H., 2001. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 7, 88–91. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00204.x>

Leistner, R., Schröder, C., Geffers, C., Breier, A.-C., Gastmeier, P., Behnke, M., 2015. Regional distribution of nosocomial infections due to ESBL-positive Enterobacteriaceae in Germany: data from the German National Reference Center for the Surveillance of Nosocomial Infections (KISS). *Clin Microbiol Infect* 21, 255.e1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.07.015>

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. *J Med Pharm Chem* 91, 1063–1065. <https://doi.org/10.1021/jm01240a021>

Leulmi, Z., Kandouli, C., Mihoubi, I., Benlabed, K., Lezzar, A., Rolain, J.M., 2019. First report of bla_{OXA-24} carbapenemase gene, armA methyltransferase and aac(6')-Ib-cr among multidrug-resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis* in Algeria. *J Glob Antimicrob Resist* 16,125-129. doi: 10.1016/j.jgar.2018.08.019.

Levy, S.B., 2005. Antibiotic resistance—the problem intensifies. *Advanced Drug Delivery Reviews, Mechanisms of Antimicrobial Resistance: Opportunities for New Targeted Therapies* 57, 1446–1450. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.001>

Li, Q., Li, Z., Wang, Y., Chen, Y., Sun, J., Yang, Y., Si, H., 2022. Antimicrobial Resistance and Transconjugants Characteristics of sul3 Positive Escherichia coli Isolated from Animals in Nanning, Guangxi Province. *Animals (Basel)* 12, 976. <https://doi.org/10.3390/ani12080976>

Liakopoulos, A., Mevius, D., Ceccarelli, D., 2016. A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol* 7, 1374. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01374>

Lin, C.-F., Hsu, S.-K., Chen, C.-H., Huang, J.-R., Lo, H.-H., 2010. Genotypic detection and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a regional hospital in central Taiwan. *J Med Microbiol* 59, 665–671. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.015818-0>

Liu, B., Pop, M., 2009. ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res* 37, D443-447. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn656>

Liu, Y., Li, R., Xiao, X., Wang, Z., 2018. Molecules that Inhibit Bacterial Resistance Enzymes. *Molecules* 24, 43. <https://doi.org/10.3390/molecules24010043>

Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H., Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16, 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)

Lu, P.-L., Liu, Y.-C., Toh, H.-S., Lee, Y.-L., Liu, Y.-M., Ho, C.-M., Huang, C.-C., Liu, C.-E., Ko, W.-C., Wang, J.-H., Tang, H.-J., Yu, K.-W., Chen, Y.-S., Chuang, Y.-C., Xu, Y., Ni, Y., Chen, Y.-H., Hsueh, P.-R., 2012. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: 2009-2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Int J Antimicrob Agents* 40 Suppl, S37-43. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(12\)70008-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(12)70008-0)

Lupo, A., Saras, E., Madec, J.-Y., Haenni, M., 2018. Emergence of blaCTX-M-55 associated with fosA, rmtB and mcr gene variants in Escherichia coli from various animal species in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73, 867–872. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx489>

Luzzatto Knaan, T., Melnik, A., Dorrestein, P., 2015. Mass spectrometry tools and workflows for revealing microbial chemistry. *Analyst* 140. <https://doi.org/10.1039/C5AN00171D>

M

Mairi, A., Pantel, A., Sotto, A., Lavigne, J.-P., Touati, A., 2018. OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 37, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3112-7>

Mansour, W., Haenni, M., Saras, E., Grami, R., Mani, Y., Ben Haj Khalifa, A., El Atrouss, S., Kheder, M., Fekih Hassen, M., Boujâafar, N., Bouallegue, O., Madec, J.-Y., 2017. Outbreak of colistin-resistant carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Tunisia. *J Glob Antimicrob Resist* 10, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.03.017>

Mao, Y., Zhu, C., Boedeker, E.C., 2003. Foodborne enteric infections. *Curr Opin Gastroenterol* 19, 11–22. <https://doi.org/10.1097/00001574-200301000-00003>

Maragakis, L.L., Perencevich, E.N., Cosgrove, S.E., 2008. Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6, 751–763. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.751>

Marroki, A., Bousmaha-Marroki, L., 2022. Antibiotic Resistance Diagnostic Methods for Pathogenic Bacteria, in: Rezaei, N. (Ed.), *Encyclopedia of Infection and Immunity*. Elsevier, Oxford, pp. 320–341. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00133-6>

Mathlouthi, N., Al-Bayssari, C., Bakour, S., Rolain, J.M., Chouchani, C., 2017. Prevalence and emergence of carbapenemases-producing Gram-negative bacteria in Mediterranean basin. *Crit Rev Microbiol* 43, 43–61. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2016.1160867>

Mayer, K.H., Zinner, S.H., 1985. Bacterial Pathogens of Increasing Significance in Hospital-Acquired Infections. *Clinical Infectious Diseases* 7, S371–S379. https://doi.org/10.1093/clinids/7.Supplement_3.S371

McArthur, A.G., Waglehner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M.A., Baylay, A.J., Bhullar, K., Canova, M.J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A.M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M.R., O'Brien, J.S., Pawlowski, A.C., Piddock, L.J.V., Spanogiannopoulos, P., Sutherland, A.D., Tang, I., Taylor, P.L., Thaker, M., Wang, W., Yan, M., Yu, T., Wright, G.D., 2013. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 3348–3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>

Medboua-Benbalagh, C., Touati, A., Kermas, R., Gharout-Sait, A., Brasme, L., Mezhoud, H., Touati, D., Guillard, T., de Champs, C., 2017. Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Strains Is Associated with Worse Outcome in Patients Hospitalized in the Pediatric Oncology Unit of Beni-Messous Hospital in Algiers, Algeria. *Microb Drug Resist* 23, 757–763. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0153>

Medeiros, A.A., 1984. Beta-lactamases. *Br Med Bull* 40, 18–27. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071942>

Meguenni, N., Devendec, L., Jouy, L., Bounar-Kechih, E., Bakour, R., Kempf, I., 2012. Caractérisation moléculaire de souches d'E. coli aviaires productrices de BLSE isolées de la région Centre d'Algérie. In *Proceedings of the Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti Infectieuse*, Paris, France, 22–23.

Meguenni, N., Chanteloup, N., Tourtereau, A., Ahmed, C.A., Bounar-Kechih, S., Schouler, C., 2019. Virulence and antibiotic resistance profile of avian *Escherichia coli* strains isolated from colibacillosis lesions in central of Algeria. *Vet World* 12, 1840–1848. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1840-1848>

Melano, R., Corso, A., Petroni, A., Centrón, D., Orman, B., Pereyra, A., Moreno, N., Galas, M., 2003. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother* 52, 36–42. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg281>

Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Perrier Gros Claude, J.-D., Timinouni, M., 2011. [Qnr and aac (6')-Ib-cr types quinolone resistance among Enterobacteriaceae isolated in Annaba, Algeria]. *Pathol. Biol.* 59, e73-78. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.05.003>

Messai, Y., Benhassine, T., Naim, M., Paul, G., Bakour, R., 2006. Prevalence of beta-lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. *Rev Esp Quimioter* 19, 144–151.

Messai, Y., Iabadene, H., Benhassine, T., Alouache, S., Tazir, M., Gautier, V., Arlet, G., Bakour, R., 2008. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathologie Biologie* 56, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.05.008>

MESSAIuml, C., Khelef, D., BOUKHORS, K., Radji, N., Rachid, G., Hamdi, M., 2013. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens affected by colibacillosis in Setif. *African Journal of Microbiology Research* 7, 2668–2672. <https://doi.org/10.5897/AJMR2012.2470>

Mirza, S., Jadhav, S., Misra, R.N., Das, N.K., 2019. Coexistence of β -Lactamases in Community-Acquired Infections in a Tertiary Care Hospital in India. *International Journal of Microbiology* 2019, e7019578. <https://doi.org/10.1155/2019/7019578>

Mlynarcik, P., Chudobova, H., Zdarska, V., Kolar, M., 2021. In Silico Analysis of Extended-Spectrum β -Lactamases in Bacteria. *Antibiotics (Basel)* 10, 812. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070812>

Mouiche, M.M.M., Moffo, F., Akoachere, J.-F.T.K., Okah-Nnane, N.H., Mapiefou, N.P., Ndze, V.N., Wade, A., Djuikwo-Teukeng, F.F., Toghousa, D.G.T., Zambou, H.R., Feussom, J.M.K., LeBreton, M., Awah-Ndukum, J., 2019. Antimicrobial resistance from a one health perspective in Cameroon: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 19, 1135. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7450-5>

Munoz-Davila, M.J., 2014. Role of Old Antibiotics in the Era of Antibiotic Resistance. Highlighted Nitrofurantoin for the Treatment of Lower Urinary Tract Infections. *Antibiotics (Basel)* 3, 39–48. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3010039>

Murray, C.J.L., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G.R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S.C., Browne, A.J., Chipeta, M.G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B.H.K., Kumaran, E.A.P., McManigal, B., Achalapong, S., Agarwal, R., Akech, S., Albertson, S., Amuasi, J., Andrews, J., Aravkin, A., Ashley, E., Babin, F.-X., Bailey, F., Baker, S., Basnyat, B., Bekker, A., Bender, R., Berkley, J.A., Bethou, A., Bielicki, J., Boonkasidecha, S., Bukosia, J., Carvalheiro, C., Castañeda-Orjuela, C., Chansamouth, V., Chaurasia, S., Chiurchiù, S., Chowdhury, F., Donatien, R.C., Cook, A.J., Cooper, B., Cressey, T.R., Criollo-Mora, E., Cunningham, M., Darboe, S., Day, N.P.J., Luca, M.D., Dokova, K., Dramowski, A., Dunachie, S.J., Bich, T.D., Eckmanns, T., Eibach, D., Emami, A., Feasey, N., Fisher-Pearson, N., Forrest, K., Garcia, C., Garrett, D., Gastmeier, P., Giref, A.Z., Greer, R.C., Gupta, V., Haller, S., Haselbeck, A., Hay, S.I., Holm, M., Hopkins, S., Hsia, Y., Iregebu, K.C., Jacobs, J., Jarovsky, D., Javanmardi, F., Jenney, A.W.J., Khorana, M., Khusuwan, S., Kisson, N., Kobeissi, E., Kostyanov, T., Krapp, F., Krumkamp, R., Kumar,

A., Kyu, H.H., Lim, C., Lim, K., Limmathurotsakul, D., Loftus, M.J., Lunn, M., Ma, J., Manoharan, A., Marks, F., May, J., Mayxay, M., Mturi, N., Munera-Huertas, T., Musicha, P., Musila, L.A., Mussi-Pinhata, M.M., Naidu, R.N., Nakamura, T., Nanavati, R., Nangia, S., Newton, P., Ngoun, C., Novotney, A., Nwakanma, D., Obiero, C.W., Ochoa, T.J., Olivas-Martinez, A., Olliaro, P., Ooko, E., Ortiz-Brizuela, E., Ounchanum, P., Pak, G.D., Paredes, J.L., Peleg, A.Y., Perrone, C., Phe, T., Phommason, K., Plakkal, N., Ponce-de-Leon, A., Raad, M., Ramdin, T., Rattanavong, S., Riddell, A., Roberts, T., Robotham, J.V., Roca, A., Rosenthal, V.D., Rudd, K.E., Russell, N., Sader, H.S., Saengchan, W., Schnall, J., Scott, J.A.G., Seekaew, S., Sharland, M., Shivamallappa, M., Sifuentes-Osornio, J., Simpson, A.J., Steenkeste, N., Stewardson, A.J., Stoeva, T., Tasak, N., Thaiprakong, A., Thwaites, G., Tigoi, C., Turner, C., Turner, P., Doorn, H.R. van, Velaphi, S., Vongpradith, A., Vongsouvath, M., Vu, H., Walsh, T., Walson, J.L., Waner, S., Wangrangsimakul, T., Wannapinij, P., Wozniak, T., Sharma, T.E.M.W.Y., Yu, K.C., Zheng, P., Sartorius, B., Lopez, A.D., Stergachis, A., Moore, C., Dolecek, C., Naghavi, M., 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399, 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Muylaert, A., Mainil, J., 2013. Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur “contagiosité.” *Annales de Médecine Vétérinaire* 156.

Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R.A., Dabos, M.L., Zavala, A., Dortet, L., Retailleau, P., Iorga, B.I., 2017. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 32, 917–919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>

N

Nabti, L.Z., Sahli, F., Olowo-Okere, A., Benslama, A., Harrar, A., Lupande-Mwenebitu, D., Diene, S.M., Rolain, J.-M., 2022. Molecular Characterization of Clinical Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from Sétif, Algeria. *Microb Drug Resist* 28, 274–279. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0123>

Naiemi, N.A., Murk, J.L., Savelkoul, P.H.M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J., Debets-Ossenkopp, Y.J., 2009. Extended-spectrum beta-lactamases screening agar with AmpC inhibition. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28, 989–990. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0714-8>

Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., Carattoli, A., 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 41, 252–275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>

Nedjai, S., Barguigua, A., Djahmi, N., Jamali, L., Zerouali, K., Dekhil, M., Timinouni, M., 2013. Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* strains in Algeria. *J Infect Dev Ctries* 7, 804–811. <https://doi.org/10.3855/jidc.3127>

Nedjai, S., Barguigua, A., Djahmi, N., Jamali, L., Zerouali, K., Dekhil, M., Timinouni, M., 2012. Prevalence and characterization of extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. *Médecine et Maladies Infectieuses* 42, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2011.10.001>

Nejjari, C., Youness, E.A., Benaouda, A., Abdelfattah, C., 2022. Antimicrobial resistance among GLASS pathogens in Morocco: an epidemiological scoping review. *BMC Infectious Diseases* 22. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07412-4>

Nguyen, F., Starosta, A.L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., Wilson, D.N., 2014. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem* 395, 559–575. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0292>

Nicolas-Chanoine, M.-H., Bertrand, X., Madec, J.-Y., 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 543–574. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>

Nordmann, P., 2014. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect* 44, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.11.007>

Nordmann, P., Dortet, L., Poirel, L., 2012a. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med* 18, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.003>

Nordmann, P., Poirel, L., 2014. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 20, 821–830. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>

Nordmann, P., Poirel, L., Dortet, L., 2012b. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 18, 1503–1507. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120355>

O

Octavia, S., Lan, R., 2014. The Family Enterobacteriaceae, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 225–286. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_167

Olaitan, A.O., Diene, S.M., Kempf, M., Berrazeg, M., Bakour, S., Gupta, S.K., Thongmalayvong, B., Akkhavong, K., Somphavong, S., Paboriboune, P., Chaisiri, K., Komalamisra, C., Adelowo, O.O., Fagade, O.E., Banjo, O.A., Oke, A.J., Adler, A., Assous, M.V., Morand, S., Raoult, D., Rolain, J.-M., 2014. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. *Int J Antimicrob Agents* 44, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.07.020>

Ott, L.C., Mellata, M., 2022. Models for Gut-Mediated Horizontal Gene Transfer by Bacterial Plasmid Conjugation. *Front Microbiol* 13, 891548. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.891548>

Otto, M., 2017. Next-generation sequencing to monitor the spread of antimicrobial resistance. *Genome Medicine* 9, 68. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0461-x>

Ovung, A., Bhattacharyya, J., 2021. Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophys Rev* 13, 259–272. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00795-9>

P

Padilla, E., Llobet, E., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Bengoechea, J.A., Albertí, S., 2010. Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 177–183. <https://doi.org/10.1128/AAC.00715-09>

Paduszyńska, K., Rucińska, L.G.M., Pomorski, L., 2015. Physician as an infective vector at a department of surgery. *Pol Przegl Chir* 86, 511–517. <https://doi.org/10.2478/pjs-2014-0091>
Pandey, N., Cascella, M., 2021. Beta Lactam Antibiotics, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Partridge, S.R., 2015. Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Pathology* 47, 276–284. <https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000237>

Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O., 2018. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 31, e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>

Patel, R., 2019. A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF Mass Spectrometry for Fungal Identification. *J Fungi (Basel)* 5, 4. <https://doi.org/10.3390/jof5010004>

Paul, S., Jhora, S.T., Dey, P.P., 2017. Evaluation of Phenotypic Methods to Identify Extended Spectrum Beta-lactamase (ESBL) Producing Gram negative Bacteria. *Bangladesh J Med Microbiol* 8, 21–24. <https://doi.org/10.3329/bjmm.v8i1.31072>

Peirano, G., Pitout, J.D.D., 2010. Molecular epidemiology of Escherichia coli producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents* 35, 316–321. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.003>

Peleg, A.Y., Hooper, D.C., 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 362, 1804–1813. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0904124>

Pham, T.D.M., Ziora, ZytaM., Blaskovich, M.A.T., 2019. Quinolone antibiotics. *MedChemComm* 10, 1719–1739. <https://doi.org/10.1039/C9MD00120D>

Phan, M.-D., Nhu, N.T.K., Achard, M.E.S., Forde, B.M., Hong, K.W., Chong, T.M., Yin, W.-F., Chan, K.-G., West, N.P., Walker, M.J., Paterson, D.L., Beatson, S.A., Schembri, M.A., 2017. Modifications in the pmrB gene are the primary mechanism for the development of chromosomally encoded resistance to polymyxins in uropathogenic Escherichia coli. *J Antimicrob Chemother* 72, 2729–2736. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx204>

Phuong Hoa, P.T., Nonaka, L., Hung Viet, P., Suzuki, S., 2008. Detection of the sul1, sul2, and sul3 genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam. *Science of The Total Environment* 405, 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.023>

Pitout, J.D.D., 2008. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6, 657–669. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.657>

Pitout, J.D.D., Wei, Y., Church, D.L., Gregson, D.B., 2008. Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of aac(6′)-Ib-cr. *J Antimicrob Chemother* 61, 999–1002. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn068>

Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P., 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 24–38. <https://doi.org/10.1128/AAC.01512-08>

Polsfuss, S., Bloemberg, G., Giger, J., Meyer, V., Böttger, E., Hombach, M., 2011. Practical Approach for Reliable Detection of AmpC Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* 49, 2798–803. <https://doi.org/10.1128/JCM.00404-11>

Q

Queenan, A.M., Bush, K., 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20, 440–458, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>

Quiroga, M.P., Orman, B., Errecalde, L., Kaufman, S., Centrón, D., 2015. Characterization of Tn6238 with a new allele of aac(6′)-Ib-cr. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 2893–2897. <https://doi.org/10.1128/AAC.03213-14>

R

R Core Team (2020). — European Environment Agency, n.d.

Rahal K, Benslimani A, Tali-Maamar H, Missoum M. F. K., Kechih- Bounar S, Ammari H, 2011. Standardisation de l’antibiogramme en médecine humaine à l’échelle nationale. République Algérienne démocratique et populaire ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière., 6eme édition. ed.

Ramdani-Bougoussa, N., Manageiro, V., Jones-Dias, D., Ferreira, E., Tazir, M., Caniça, M., 2011. Role of SHV β -lactamase variants in resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains to β -lactams in an Algerian hospital. *Journal of Medical Microbiology* 60, 983. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.030577-0>

Ramdani-Bougoussa, N., Mendonça, N., Leitão, J., Ferreira, E., Tazir, M., Caniça, M., 2006. CTX-M-3 and CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamases in Isolates of *Escherichia coli* from a Hospital in Algiers, Algeria. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 4584. <https://doi.org/10.1128/JCM.01445-06>

Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 13, 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>

Razavi, M., Marathe, N.P., Gillings, M.R., Flach, C.-F., Kristiansson, E., Joakim Larsson, D.G., 2017. Discovery of the fourth mobile sulfonamide resistance gene. *Microbiome* 5, 160. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0379-y>

Roberts, M.C., 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 245, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.034>

Robin, F., Gibold, L., Bonnet, R., 2012. Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries : comment les identifier en pratique quotidienne ? *Revue Francophone des Laboratoires* 2012, 47–58. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(12\)71676-3](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(12)71676-3)

Rodríguez-Martínez, J.M., Velasco, C., García, I., Cano, M.E., Martínez-Martínez, L., Pascual, A., 2007. Mutant Prevention Concentrations of Fluoroquinolones for Enterobacteriaceae Expressing the Plasmid-Carried Quinolone Resistance Determinant qnrA1. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 2236–2239. <https://doi.org/10.1128/AAC.01444-06>

Roer, L., Hansen, F., Stegger, M., Sönksen, U.W., Hasman, H., Hammerum, A.M., 2017. Novel mcr-3 variant, encoding mobile colistin resistance, in an ST131 *Escherichia coli* isolate from bloodstream infection, Denmark, 2014. *Euro Surveill* 22.

Roschanski, N., Fischer, J., Guerra, B., Roesler, U., 2014. Development of a multiplex real-time PCR for the rapid detection of the predominant beta-lactamase genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-type AmpCs in Enterobacteriaceae. *PLoS ONE* 9, e100956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100956>

Ross, K., Varani, A.M., Snesrud, E., Huang, H., Alvarenga, D.O., Zhang, J., Wu, C., McGann, P., Chandler, M., 2021. TnCentral: a Prokaryotic Transposable Element Database and Web Portal for Transposon Analysis. *mBio* 12, e02060-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.02060-21>

Ruiz, E., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Rocha-Gracia, R., Martínez-Martínez, L., Arlet, G., Torres, C., 2012. qnr, aac(6′)-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67, 886–897. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr548>

Ruppé, E., 2010. Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l’avènement des CTX-M. *Antibiotiques* 12, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.antib.2010.01.003>

Ruppé, E., Hem, S., Lath, S., Gautier, V., Arieu, F., Sarthou, J.-L., Monchy, D., Arlet, G., 2009. CTX-M beta-lactamases in *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections, Cambodia. *Emerg Infect Dis* 15, 741–748. <https://doi.org/10.3201/eid1505.071299>

Ruppé, É., Woerther, P.-L., Barbier, F., 2015. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann. Intensive Care* 5, 21. <https://doi.org/10.1186/s13613-015-0061-0>

Rustigian, R., Stuart, C.A., 1941. Decomposition of Urea by *Proteus*. *Experimental Biology and Medicine* 47, 108–112. <https://doi.org/10.3181/00379727-47-13054>

S

Sabir, S., Ahmad Anjum, A., Ijaz, T., Asad Ali, M., Ur Rehman Khan, M., Nawaz, M., 2014. Isolation and antibiotic susceptibility of *E. coli* from urinary tract infections in a tertiary care hospital. *Pak J Med Sci* 30, 389–392.

Salah, F.D., Soubeiga, S.T., Ouattara, A.K., Sadj, A.Y., Metuor-Dabire, A., Obiri-Yeboah, D., Banla-Kere, A., Karou, S., Simporé, J., 2019. Distribution of quinolone resistance gene (qnr) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. *Antimicrob Resist Infect Control* 8, 104. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0552-0>

Sanchez, E., Vannier, E., Wormser, G.P., Hu, L.T., 2016. Diagnosis, Treatment, and Prevention of Lyme Disease, Human Granulocytic Anaplasmosis, and Babesiosis: A Review. *JAMA* 315, 1767–1777. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.2884>

Sawa, T., Kooguchi, K., Moriyama, K., 2020. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care* 8, 13. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>

Schechner, V., Temkin, E., Harbarth, S., Carmeli, Y., Schwaber, M.J., 2013. Epidemiological interpretation of studies examining the effect of antibiotic usage on resistance. *Clin Microbiol Rev* 26, 289–307. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-13>

Schmiedel, J., Falgenhauer, L., Domann, E., Bauerfeind, R., Prenger-Berninghoff, E., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., 2014. Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiol* 14, 187. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-187>

Schneider, C.L., 2021. Bacteriophage-Mediated Horizontal Gene Transfer: Transduction, in: Harper, D.R., Abedon, S.T., Burrowes, B.H., McConville, M.L. (Eds.), *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*. Springer International Publishing, Cham, pp. 151–192. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2_4

Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckaert, A., 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev* 28, 519–542. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>

Shah, A.A., Hasan, F., Ahmed, S., Hameed, A., 2004. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection. *Crit Rev Microbiol* 30, 25–32. <https://doi.org/10.1080/10408410490266429>

Shaheen, A., Tariq, A., Iqbal, M., Mirza, O., Haque, A., Walz, T., Rahman, M., 2021. Mutational Diversity in the Quinolone Resistance-Determining Regions of Type-II Topoisomerases of *Salmonella* Serovars. *Antibiotics* 10, 1455. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121455>

Shariff V A, A.R., Shenoy M, S., Yadav, T., M, R., 2013. The antibiotic susceptibility patterns of uropathogenic *Escherichia coli*, with special reference to the fluoroquinolones. *J Clin Diagn Res* 7, 1027–1030. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/4917.3038>

Sharma, P.C., Jain, A., Jain, S., 2009. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Pol Pharm* 66, 587–604.

Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S., Miller, G.H., 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57, 138–163. <https://doi.org/10.1128/mr.57.1.138-163.1993>

Shutter, M.C., Akhondi, H., 2021. Tetracycline, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Silver, L.L., 2017. Fosfomycin: Mechanism and Resistance. Cold Spring Harb Perspect Med 7, a025262. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025262>

Simmons, J.S., 1926. A Culture Medium for Differentiating Organisms of Typhoid-Colon Aerogenes Groups and for Isolation of Certain Fungi: With Colored Plate. The Journal of Infectious Diseases 39, 209–214. <https://doi.org/10.1093/infdis/39.3.209>

Société Française de Microbiologie, *Antibiotiques À Tester, Concentrations, Diamètres Critiques Et Règles De Lecture Interprétative Spécifiques*. 2017 In : CASFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie, p.37, 118.

Société Française de Microbiologie, *Antibiotiques A Tester, Concentrations, Diamètres Critiques Et Règles De Lecture Interprétative Spécifiques*. 2013 In : CASFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie, p.19.

Sojo-Dorado, J., López-Hernández, I., Rosso-Fernandez, C., Morales, I.M., Palacios-Baena, Z.R., Hernández-Torres, A., Merino de Lucas, E., Escolà-Vergé, L., Bereciartua, E., García-Vázquez, E., Pintado, V., Boix-Palop, L., Natera-Kindelán, C., Sorlí, L., Borrell, N., Giner-Oncina, L., Amador-Prous, C., Shaw, E., Jover-Saenz, A., Molina, J., Martínez-Alvarez, R.M., Dueñas, C.J., Calvo-Montes, J., Silva, J.T., Cárdenas, M.A., Lecuona, M., Pomar, V., Valiente de Santis, L., Yagüe-Guirao, G., Lobo-Acosta, M.A., Merino-Bohórquez, V., Pascual, A., Rodríguez-Baño, J., REIPI-GEIRAS-FOREST group, 2022. Effectiveness of Fosfomycin for the Treatment of Multidrug-Resistant Escherichia coli Bacteremic Urinary Tract Infections: A Randomized Clinical Trial. JAMA Netw Open 5, e2137277. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.37277>

Sonda, T., Kumburu, H., van Zwetselaar, M., Alifrangis, M., Lund, O., Kibiki, G., Aarestrup, F.M., 2016. Meta-analysis of proportion estimates of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-producing Enterobacteriaceae in East Africa hospitals. Antimicrob Resist Infect Control 5, 18. <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0117-4>

Souna, D., Amir, A.S., Bekhoucha, S.N., Berrazeg, M., Drissi, M., 2014. Molecular typing and characterization of TEM, SHV, CTX-M, and CMY-2 β -lactamases in Enterobacter cloacae strains isolated in patients and their hospital environment in the west of Algeria. Med Mal Infect 44, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.01.008>

Squadrito, F.J., del Portal, D., 2021. Nitrofurantoin, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. Front Microbiol 3, 119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>

Sun, J., Chen, C., Cui, C.-Y., Zhang, Y., Liu, X., Cui, Z.-H., Ma, X.-Y., Feng, Y., Fang, L.-X., Lian, X.-L., Zhang, R.-M., Tang, Y.-Z., Zhang, K.-X., Liu, H.-M., Zhuang, Z.-H., Zhou, S.-D., Lv, J.-N., Du, H., Huang, B., Yu, F.-Y., Mathema, B., Kreiswirth, B.N., Liao, X.-P., Chen, L.,

Liu, Y.-H., 2019. Plasmid-encoded tet(X) genes that confer high-level tigecycline resistance in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol* 4, 1457–1464. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0496-4>

T

Tamma, P.D., Simner, P.J., 2018. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol* 56, e01140-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01140-18>

Tan, T.Y., 2003. Use of molecular techniques for the detection of antibiotic resistance in bacteria. *Expert Rev Mol Diagn* 3, 93–103. <https://doi.org/10.1586/14737159.3.1.93>

Tansirichaiya, S., Rahman, Md.A., Roberts, A.P., 2019. The Transposon Registry. *Mob DNA* 10, 40. <https://doi.org/10.1186/s13100-019-0182-3>

Thomas, C.M., 2014. Plasmid Incompatibility, in: Bell, E. (Ed.), *Molecular Life Sciences: An Encyclopedic Reference*. Springer, New York, NY, pp. 1–3. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6436-5_565-2

Thorns, C.J., 2000. Bacterial food-borne zoonoses. *Rev Sci Tech* 19, 226–239. <https://doi.org/10.20506/rst.19.1.1219>

Tooke, C.L., Hinchliffe, P., Bragginton, E.C., Colenso, C.K., Hirvonen, V.H.A., Takebayashi, Y., Spencer, J., 2019. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol* 431, 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>

Torres, D.A., Seth-Smith, H.M.B., Joosse, N., Lang, C., Dubuis, O., Nüesch-Inderbinnen, M., Hinic, V., Egli, A., 2021. Colistin resistance in Gram-negative bacteria analysed by five phenotypic assays and inference of the underlying genomic mechanisms. *BMC Microbiology* 21, 321. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02388-8>

Torres-Sangiao, E., Leal Rodriguez, C., García-Riestra, C., 2021. Application and Perspectives of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories. *Microorganisms* 9, 1539. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071539>

Touati, A., Benallaoua, S., Forte, D., Madoux, J., Brasme, L., Dechamps, C., 2006. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Béjaia, Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 27, 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.12.007>

Touati, A., Brasme, L., Benallaoua, S., Gharout, A., Madoux, J., De Champs, C., 2008. First report of qnrB-producing Enterobacter cloacae and qnrA-producing Acinetobacter baumannii recovered from Algerian hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 60, 287–290. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.10.002>

Touati, A., Medboua, C., Touati, D., Denine, R., de Champs, C., 2012. CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algiers (Algeria). *International Research Journal of Microbiology* 3, 181–185.

Touati, M., Hadjadj, L., Berrazeg, M., Baron, S.A., Rolain, J.M., 2020. Emergence of *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *mcr-3* genes in North West Algerian farmlands. *J Glob Antimicrob Resist* 21, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.10.001>

Toy, T., Pak, G.D., Duc, T.P., Campbell, J.I., Tayeb, M.A.E., Kalckreuth, V.V., Im, J., Panzner, U., Espinoza, L.M.C., Eibach, D., Dekker, D.M., Park, S.E., Jeon, H.J., Konings, F., Mogeni, O.D., Cosmas, L., Bjerregaard-Andersen, M., Gasmelseed, N., Hertz, J.T., Jaeger, A., Krumkamp, R., Ley, B., Thriemer, K., Kabore, L.P., Niang, A., Raminosa, T.M., Sampo, E., Sarpong, N., Soura, A., Owusu-Dabo, E., Teferi, M., Yeshitela, B., Poppert, S., May, J., Kim, J.H., Chon, Y., Park, J.K., Aseffa, A., Breiman, R.F., Schütt-Gerowitt, H., Aaby, P., Adu-Sarkodie, Y., Crump, J.A., Rakotozandrindrainy, R., Meyer, C.G., Sow, A.G., Clemens, J.D., Wierzb, T.F., Baker, S., Marks, F., 2019. Multicountry Distribution and Characterization of Extended-spectrum β -Lactamase-associated Gram-negative Bacteria From Bloodstream Infections in Sub-Saharan Africa. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 69, S449. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz450>

Tran, J.H., Jacoby, G.A., 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5638–5642. <https://doi.org/10.1073/pnas.082092899>

Tsafnat, G., Copt, J., Partridge, S.R., 2011. RAC: Repository of Antibiotic resistance Cassettes. Database (Oxford) 2011, bar054. <https://doi.org/10.1093/database/bar054>

Tsai, T.-A., Tsai, C.-K., Kuo, K.-C., Yu, H.-R., 2021. Rational stepwise approach for *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *J Microbiol Immunol Infect* 54, 557–565. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.10.002>

U

Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., Osek, J., 2022. Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. *Antibiotics* 11, 1079. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>

V

Valladales-Restrepo, L.F., Constain-Mosquera, C.A., Álvarez-Amaya, V., Machado-Alba, J.E., 2022. Study of prescription-indication of tetracyclines in a population in Colombia. *Fundam Clin Pharmacol* 36, 390–396. <https://doi.org/10.1111/fcp.12724>

van Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J.M., 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2, 203. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>

Vardakas, K.Z., Tansarli, G.S., Rafailidis, P.I., Falagas, M.E., 2012. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 67, 2793–2803. <https://doi.org/10.1093/jac/dks301>

Venter, H., Henningsen, M.L., Begg, S.L., 2017. Antimicrobial resistance in healthcare, agriculture and the environment: the biochemistry behind the headlines. *Essays Biochem* 61, 1–10. <https://doi.org/10.1042/EBC20160053>

Voges and Proskauer, 1898. *Z. Hyg.* 28:20.

Vrancianu, C.O., Gheorghe, I., Dobre, E.-G., Barbu, I.C., Cristian, R.E., Popa, M., Lee, S.H., Limban, C., Vlad, I.M., Chifiriuc, M.C., 2020. Emerging Strategies to Combat β -Lactamase Producing ESKAPE Pathogens. *Int J Mol Sci* 21, E8527. <https://doi.org/10.3390/ijms21228527>

W

Webber, M.A., Piddock, L.J.V., 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 51, 9–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>

Weinstein, R.A., Gaynes, R., Edwards, J.R., National Nosocomial Infections Surveillance System, 2005. Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. *Clinical Infectious Diseases* 41, 848–854. <https://doi.org/10.1086/432803>

Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 3, 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>

Wilke, M., Lovering, A., Strynadka, N., 2005. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current opinion in microbiology* 8. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.016>

Winstanley, T.G., Ridgway, E.J., Parys, B.T., Woodford, N., Ward, E., Livermore, D.M., 2004. First isolation of a CTX-M-3 beta-lactamase producer in the United Kingdom. *Int J Antimicrob Agents* 24, 625–627. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.007>

World Health Organization, 2011. Critically important antimicrobials for human medicine, 3rd Revision.

Wyres, K.L., Holt, K.E., 2018. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol* 45, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.004>

X

Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhai, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S., 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill* 21. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280>

Xiong, X., Bromley, E.H.C., Oelschlaeger, P., Woolfson, D.N., Spencer, J., 2011. Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Res* 39, 3917–3927. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1296>

Y

Yagi, T., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Arakawa, Y., 2000. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* 184, 53–56. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08989.x>

Yahiaoui, M., Robin, F., Bakour, R., Hamidi, M., Bonnet, R., Messai, Y., 2015. Antibiotic Resistance, Virulence, and Genetic Background of Community-Acquired Uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. *Microb Drug Resist* 21, 516–526. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0045>

Yanat, B., Vinuesa, T., Vinas, M., Touati, A., 2014. Determinants of quinolone resistance in *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in Bejaia, Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7, 462–467. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60075-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60075-4)

Yang, Y.J., Wu, P.J., Livermore, D.M., 1990. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 34, 755–758. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.5.755>

Yousfi, H., Hadjadj, L., Dandachi, I., Lalaoui, R., Merah, A., Amoura, K., Dahi, A., Dekhil, M., Messalhi, N., Diene, S.M., Baron, S., Rolain, J.-M., 2019. Colistin- and Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates: Algeria. *Microb Drug Resist* 25, 258–263. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0147>

Yousfi, K., Touati, A., Lefebvre, B., Garneau, P., Brahmi, S., Gharout-Sait, A., Harel, J., Bekal, S., 2019. Characterization of multidrug-resistant Gram-negative bacilli isolated from hospitals effluents: first report of a blaOXA-48-like in *Klebsiella oxytoca*, Algeria. *Braz J Microbiol* 50, 175–183. <https://doi.org/10.1007/s42770-018-0010-9>

Yousfi, M., Mairi, A., Bakour, S., Touati, A., Hassissen, L., Hadjadj, L., Rolain, J.-M., 2015. First report of NDM-5-producing *Escherichia coli* ST1284 isolated from dog in Bejaia, Algeria. *New Microbes New Infect* 8, 17–18. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.09.002>

Yu, D., Banting, G., Neumann, N.F., 2021. A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 67, 553–571. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0508>

Yun, M.-K., Wu, Y., Li, Z., Zhao, Y., Waddell, M.B., Ferreira, A.M., Lee, R.E., Bashford, D., White, S.W., 2012. Catalysis and sulfa drug resistance in dihydropteroate synthase. *Science* 335, 1110–1114. <https://doi.org/10.1126/science.1214641>

Z

Zamorano, L., Miró, E., Juan, C., Gómez, L., Bou, G., González-López, J.J., Martínez-Martínez, L., Aracil, B., Conejo, M.C., Oliver, A., Navarro, F., 2015. Mobile Genetic Elements Related to the Diffusion of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases or Carbapenemases from Enterobacteriaceae: Findings from a Multicenter Study in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

Zango, U.U., Ibrahim, M., Shawai, S.A.A., Shamsuddin, I.M., 2019. A review on β -lactam antibiotic drug resistance. *MOJ Drug Design Development & Therapy* 3.

Zemmour, A., Dali-Yahia, R., Maatallah, M., Saidi-Ouahrani, N., Rahmani, B., Benhamouche, N., Al-Farsi, H.M., Giske, C.G., 2021. High-risk clones of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from the University Hospital Establishment of Oran, Algeria (2011–2012). *PLoS ONE* 16, e0254805. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254805>

Zenati, K., Sahli, F., Garcia, V., Bakour, S., Belhadi, D., Rolain, J.M., Touati, A., 2017. Occurrence and clonal diversity of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* recovered from inanimate surfaces in Algerian hospital environment: First report of *armA*, *qnrB* and *aac(6)-Ib-cr* genes. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 10, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.015>

Zeng, X., Lin, J., 2013. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol* 4, 128. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00128>

Zhang, j, L, Z., Z, W., J, J., L, L., Y, X., 2014. Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals. *BMC infectious diseases* 14. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0659-0>

Zhang, H., Srinivas, S., Xu, Y., Wei, W., Feng, Y., 2019. Genetic and Biochemical Mechanisms for Bacterial Lipid A Modifiers Associated with Polymyxin Resistance. *Trends Biochem Sci* 44, 973–988. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.06.002>

Zhao, W.-H., Hu, Z.-Q., 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 39, 79. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460>

Zheng, H., Zeng, Z., Chen, S., Liu, Y., Yao, Q., Deng, Y., Chen, X., Lv, L., Zhuo, C., Chen, Z., Liu, J.-H., 2012. Prevalence and characterisation of CTX-M β -lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. *Int J Antimicrob Agents* 39, 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.12.001>

Zhou, Y., Ai, W., Guo, Y., Wu, X., Wang, B., Xu, Y., Rao, L., Zhao, H., Wang, X., Yu, F., 2022. Co-Occurrence of Rare *ArmA*-, *RmtB*-, and *KPC-2*-Encoding Multidrug-Resistant Plasmids and Hypervirulence *iuc* Operon in ST11-KL47 *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr* 10, e0237121. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02371-21>

Zhuo, C., Li, X., Zong, Z., Zhong, N.-S., 2013. Epidemic plasmid carrying *bla*(CTX-M-15) in *Klebsiella pneumoniae* in China. *PLoS One* 8, e52222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052222>

Zimbardo, M.J. (Ed.), 2009. *Difco & BBL Manual: manual of microbiological culture media*, 2. ed. ed. Becton, Dickinson, Sparks, MD.

Zurfluh, K., Hächler, H., Nüesch-Inderbinen, M., Stephan, R., 2013. Characteristics of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Isolates

from rivers and lakes in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 79, 3021–3026. <https://doi.org/10.1128/AEM.00054-13>

Zurfluh, K., Wang, J., Klumpp, J., Nesch-Inderbinen, M., Fanning, S., Stephan, R., 2014. Vertical transmission of highly similar blaCTX-M-1-harboring IncI1 plasmids in *Escherichia coli* with different MLST types in the poultry production pyramid, in: *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00519>

Annexes

Annexe I. Exemple de résultats d'identification des isolats d'Entérobactéries par MALDI-TOF-MS avec les scores.

A3 (++)(A)	A3	Escherichia coli	2.23	Escherichia coli	2.036
A4 (++)(A)	A4	Escherichia coli	2.261	Escherichia coli	2.128
A5 (+++)(A)	A5	Klebsiella pneumoniae	2.532	Klebsiella pneumoniae	2.515
A6 (+++)(A)	A6	Klebsiella pneumoniae	2.479	Klebsiella pneumoniae	2.471
A7 (+++)(A)	A7	Klebsiella pneumoniae	2.520	Klebsiella pneumoniae	2.466
A8 (+++)(A)	A8	Klebsiella pneumoniae	2.486	Klebsiella pneumoniae	2.479
A9 (+++)(C)	A9	Enterobacter cloacae	2.362	Enterobacter cloacae	2.303
A10 (+++)(C)	A10	Enterobacter cloacae	2.24	Enterobacter cloacae	2.248

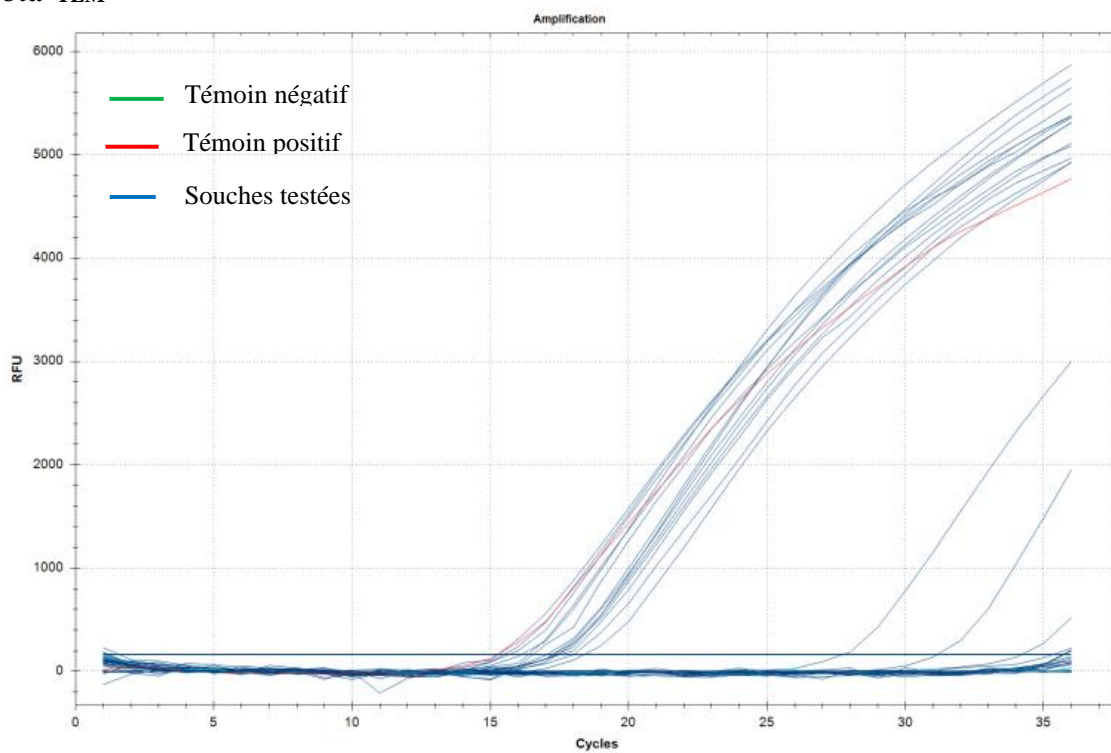
Annexe II. Distribution et caractéristiques des isolats des entérobactéries

Isolat	Nature du prélèvement	Service hospitalier	Age	Sexe	Date d'isolement
<i>E. coli</i> (n=49, 58.3%)					
E1	pus	Chirurgie	Adulte	F	Jan 2013
E2	urine	Médecine Interne	Adulte	F	Feb2 013
E3	sang	Médecine Interne	Adulte	F	Mar 2013
E4	pus	Médecine Interne	Adulte	F	Mar 2013
E5	pus	Médecine Interne	Adulte	F	Aug 2013
E6	sang	Médecine Interne	Adulte	F	Sep 2013
E7	urine	Médecine Interne	Adulte	F	Dec 2013
E8	urine	Externe	-	F	Feb 2015
E9	urine	Externe	-	F	Dec 2016
E10	urine	Pédiatrie	Enfant	M	Dec 2016
E11	urine	Externe	-	F	Dec 2016
E12	urine	Externe	-	F	Dec 2016
E13	urine	Externe	-	F	Dec 2016
E14	urine	Pédiatrie	Enfant	F	Jan 2017
E15	urine	Externe	-	F	Jan 2017
E16	urine	Pédiatrie	Enfant	F	Jan 2017
E17	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	M	Jan 2017
E18	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	F	Jan 2017
E19	urine	Externe	-	F	Jan 2017
E20	urine	Externe	-	F	Jan 2017
E21	urine	Externe	-	F	Jan 2017
E22	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	F	Jan 2017
E23	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	M	Jan 2017
E24	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	F	Jan 2017
E25	urine	Obstétrique	Adulte	F	Jan 2017
E26	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	F	Jan 2017
E27	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	M	Feb 2017
E28	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	F	Feb 2017
E29	urine	Pédiatrie	Enfant	M	Nov 2013
E30	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	F	Feb 2017
E31	sang	Chirurgie	Adulte	M	Feb 2017
E32	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	M	Nov 2014
E33	urine	Externe	-	F	Feb 2017
E34	urine	Externe	-	M	Mar 2017
E35	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	F	Aug 2013
E36	urine	Externe	-	F	Mar 2017
E37	urine	Externe	-	F	Mar 2017
E38	urine	Pédiatrie	Enfant	F	Mar 2017
E39	urine	Externe	-	-	Apr 2017
E40	urine	Externe	-	M	May 2017

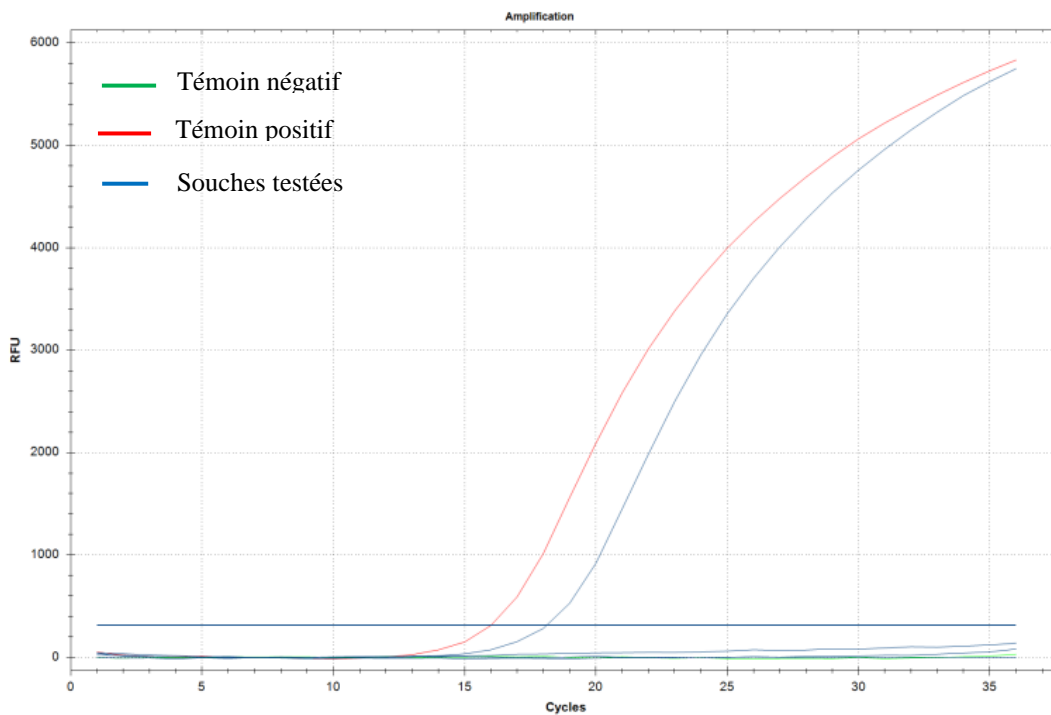
E41	urine	Externe	-	F	May 2017
E42	selles	Urgence Pédiatrie	Enfant	M	Apr 2017
E43	selles	Urgence Pédiatrie	Enfant	M	Apr 2017
E44	selles	Urgence Pédiatrie	Enfant	M	Apr 2017
E45	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	F	Jan 2017
E46	urine	Externe	-	F	Jan 2017
E47	urine	Externe	-	F	May 2013
E48	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	M	Nov 2016
E49	écouvillon vaginal	Obstétrique	Adulte	F	Feb 2017
<i>K. pneumoniae</i> (n=30, 35.7%)					
K1	urine	Pédiatrie		F	Oct 2012
K2	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	M	Feb 2017
K3	urine	Externe	-	F	Jan 2017
K4	urine	Pédiatrie	Enfant	M	Sep 2012
K5	pus	Médecine Interne	Adulte	F	Jan 2014
K6	urine	Externe	-	M	Sep 2013
K7	pus	Chirurgie	Adulte	M	Feb 2017
K8	cathéter	Obstétrique	Adulte	F	Jan 2017
K9	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	F	Jan 2017
K10	urine	Pédiatrie	Enfant	M	Jan 2017
K11	urine	Externe	-	F	Feb 2017
K12	pus	Externe	-	F	Feb 2017
K13	pus	Chirurgie	Adulte	M	Feb 2017
K14	urine	Pédiatrie	Enfant	M	Dec 2016
K15	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	M	Dec 2016
K16	urine	Pédiatrie	Enfant	M	Sep 2016
K17	urine	Pédiatrie	Enfant	F	Oct 2012
K18	urine	Pédiatrie	Enfant	M	Jan 2017
K19	urine	Externe	-	F	Jan 2014
K20	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	M	Jan 2017
K21	urine	Médecine Interne	Adulte	F	May 2013
K22	urine	Pédiatrie	Enfant	F	Jan 2013
K23	urine	Pédiatrie	Enfant	M	Mar 2017
K24	urine	Externe	-	M	Nov 2014
K25	urine	Externe	-	F	Dec 2016
K26	urine	Externe	-	M	Jan 2017
K27	selles	Externe	-	M	Apr 2017
K28	urine	Pédiatrie	Enfant	M	Mar 2017
K29	crachat	Médecine Interne	Adulte	F	Mar 2017
K31	urine	Pédiatrie	Enfant	F	Nov 2012
<i>K. oxytoca</i> (n=1, 1.2%)					
<i>K. oxytoca</i> k30	urine	Externe	-	M	Mar 2017
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=1, 1.2%)					
<i>E. aerogenes</i> Et01	urine	Externe	-	F	May 2017
<i>E. cloacae</i> (n=3, 3.6%)					
<i>E. cloacae</i> Et02	urine	Urgence Pédiatrie	Enfant	M	Mar 2017
<i>E. cloacae</i> Et03	liquide ascétique	Médecine Interne	Adulte	F	Dec 2013
<i>E. cloacae</i> Et04	urine	Externe	-	M	Jan 2013

Annexe III. Courbes d'amplification par qPCR des gènes codants les β -lactamases TEM, SHV et CTX.

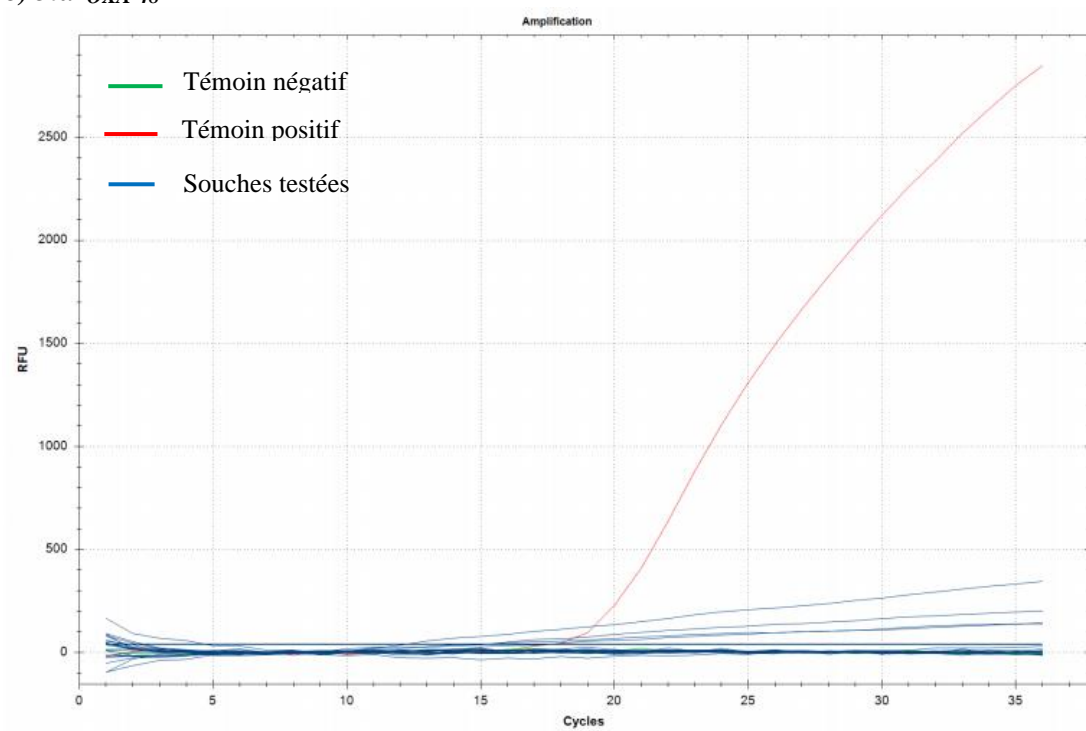
a) *bla*-TEM



b) *bla*-SHV



c) *bla-OXA-48*



Annexes IV. Pourcentages de similarités entre les séquences des gènes de β -lactamases de nos isolats avec celles présentes dans les bases de données

Isolat	Gène de β-lactamase	Numéro d'accèsion	Numéros des bases (nombre total de bases)	% de similarité
K27	CTX-M-55	HM748991	321-1196 (876)	100.00
E16	CTX-M-27	AY156923	1-876 (876)	100.00
E3	CTX-M-15	JQ686199	261-1136 (876)	100.00
E14	TEM-98	AF397068	1-861 (861)	100.00
K14	SHV-100	AM922306	1-900 (900)	100.00
K16	SHV-99	AM922305	1-861 (861)	100.00
K5	SHV-76	AM176551	31-891 (861)	100.00
K1	SHV-16	AF072684	118-993 (876)	100.00
K3	SHV-75	AM176550	31-891 (861)	100.00

Annexe V. Séquences des protéines MgrB, PhoQ, PhoP, PmrA et PmrB

Protéines MgrB

Souche de référence

MKKLRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLNVMCDQDVQFFSGICTINKFIPW

Isolats K09

MLNVMCDQDVQFFSGICTINKFIPW-

Isolat K12

MLNVMCDQDVQFFSGICTINKFIPW-

Protéines PhoP

Souche de référence

MRVLVVEDNALLRHHLKVQLQELGHQVDAEDAREADYYLGEHLPDIAIVDLGLPDEDGLSLIRRWRS HDVSLPVLVLTAREGWQDKVEVLSAGADDYVTKPFHIEEVAARMQALLRRNSGLASQVISLPPFQVDLSRRELSVNDQPIKLTAFEYTIMETLIRNRGKVVSKDSLMLQLYPDAELRESHTIDVLMGRRLRKKIQAEYPQDVITTVRGQGYLFELR

Isolat K06

MSVRLLSKMLGRTAMRVLVVEDNALLRHHLKVQLQELGHQVDAEDAREADYYLGEHLPDIAIVDLGLPDEDGLSLIRRWRS HDVSLPVLVLTAREGWQDKVEVLSAGADDYVTKPFHIEEVAARMQALLRRNSGLASQVISLPPFQVDLSRRELSVNDQPIKLTAFEYTIMETLIRNRGKVVSKDSLMLQLYPDAELRESHTIDVLMGRRLRKKIQAEYPQDVITTVRGQGYLFELR

Isolat K09

MSVRLLSKMLGRTAMRVLVVEDNALLRHHLKVQLQELGHQVDAEDAREADYYLGEHLPDIAIVDLGLPDEDGLSLIRRWRS HDVSLPVLVLTAREGWQDKVEVLSAGADDYVTKPFHIEEVAARMQALLRRNSGLASQVISLPPFQVDLSRRELSVNDQPIKLTAFEYTIMETLIRNRGKVVSKDSLMLQLYPDAELRESHTIDVLMGRRLRKKIQAEYPQDVITTVRGQGYLFELR

Isolat K12

MSVRLLSKMLGRTAMRVLVVEDNALLRHHLKVQLQELGHQVDAEDAREADYYLGEHLPDIAIVDLGLPDEDGLSLIRRWRS HDVSLPVLVLTAREGWQDKVEVLSAGADDYVTKPFHIEEVAARMQALLRRNSGLASQVISLPPFQVDLSRRELSVNDQPIKLTAFEYTIMETLIRNRGKVVSKDSLMLQLYPDAELRESHTIDVLMGRRLRKKIQAEYPQDVITTVRGQGYLFELR

Isolat K31

MSVRLLSKMLGRTAMRVLVVEDNALLRHHLKVQLQELGHQVDAEDAREADYYLGEHLPDIAIVDLGLPDEDGLSLIRRWRS HDVSLPVLVLTAREGWQDKVEVLSAGADDYVTKPFHIEEVAARMQALLRRNSGLASQVISLPPFQVDLSRRELSVNDQPIKLTAFEYTIMETLIRNRGKVVSKDSLMLQLYPDAELRESHTIDVLMGRRLRKKIQAEYPQDVITTVRGQGYLFELR

Protéines PhoQ

Souche de référence

MKGLLRHIFPLSLRVRFLATAGVVLVLSLAYGMVALVGYSVSFDKTTFRLLRGESNLFYMLARWENGAIDVDIP ENLNMESPTVTLIYDEQGKLLWAQRDVPWLAKRIQPEWLKRNGFHEIEADV DSSSMLLRNNHEIQEQLD AIREQG DDSEMTSHVAINLYPATSKMPQLSIVVVDTIPVELKRSYMWVSWFVYVLAANLLLVIPLLWVAAWWSLRPIESLA KEVRELEEHHRKLNPNNTTRELTRLVSNLNRLVRSERERYDKYRTTLDLTHSLKTP LAVMQSTLRSRGEKISV DEAEFVMLEQISRISQQIGYYLHRASMRSGGTTLSRELHPIAPLLDSLTSALNKVYQRKGVNISL DISPEITFVG EQNDFMEVMGNVLDNACKYCLEFVEVSVRQT TDSHLHILVEDDGPPIQSQRRAVFD RQQRADTLRPGQGVGLSV AREIVEQYDGEIIAGESLLGGACMEVVFGRQQMEDKQS

Isolat K06

MKGLLRHIFPLSLRVRFLATAGVVLVLSLAYGMVALVGYSVSFDKTTFRLLRGESNLFYMLARWENGAIDVDIP ENLNMESPTVTLIYDEQGKLLWAQRDVPWLAKRIQPEWLKRNGFHEIEADV DSSSMLLRNNHEIQEQLD AIREQG DDSEMTSHVAINLYPATSKMPQLSIVVVDTIPVELKRSYMWVSWFVYVLAANLLLVIPLLWVAAWWSLRPIESLA KEVRELEEHHRKLNPNNTTRELTRLVSNLNRLVRSERERYDKYRTTLDLTHSLKTP LAVMQSTLRSRGEKISV DEAEFVMLEQISRISQQIGYYLHRASMRSGGTTLSRELHPIAPLLDSLTSALNKVYQRKGVNISL DISPEITFVG EQNDFMEVMGNVLDNACKYCLEFVEVSVRQT TDSHLHILVEDDGPPIQSQRRAVFD RQQRADTLRPGQGVGLSV AREIVEQYDGEIIAGESLLGGACMEVVFGRQQMEDKQS

Isolat K09

MKGLLRHIFPLSLRVRFLATAGVVLVLSLAYGMVALVGYSVSFDKTTFRLLRGESNLFYMLARWENGAIDVDIP
ENLNMESPTVTLIYDEQ GKLLWAQRDVPWLAKRIQPEWLKRNGFHEIEADVDS SMLLRNNHEIQEQLD AIREQG
DDSEMTHSVAINLYPATSKMPQLSIVVVDTIPVELKRSYMWVSWFVYVLAANLLLVIPLLWVAAWWSLRPIESLA
KEVRELEEHHREKLNPNNTTRELTRLVSNLNRLVRSERERYDKYRTTLDLTHSLKTPLAVMQSTLRSLRGEKISV
DEAEPVMLEQISRISQQIGYYLHRASMRSGGTLLSRELHPIAPLLDSLTSALNKVYQRKGVNISLDISPEITFVG
EQNDFMEVMGNVLDNACKYCLEFVEVSVRQT TDSHLHILVEDDGGPI PQSQRRAVFDRGQRADTLRPGQGVGLSV
AREIVEQYDGEI IAGESLLGGACMEVVFGRQQMEDKQS

Isolat K12

MKGLLRHIFPLSLRVRFLATAGVVLVLSLAYGMVALVGYSVSFDKTTFRLLRGESNLFYMLARWENGAIDVDIP
ENLNMESPTVTLIYDEQ GKLLWAQRDVPWLAKRIQPEWLKRNGFHEIEADVDS SMLLRNNHEIQEQLD AIREQG
DDSEMTHSVAINLYPATSKMPQLSIVVVDTIPVELKRSYMWVSWFVYVLAANLLLVIPLLWVAAWWSLRPIESLA
KEVRELEEHHREKLNPNNTTRELTRLVSNLNRLVRSERERYDKYRTTLDLTHSLKTPLAVMQSTLRSLRGEKISV
DEAEPVMLEQISRISQQIGYYLHRASMRSGGTLLSRELHPIAPLLDSLTSALNKVYQRKGVNISLDISPEITFVG
EQNDFMEVMGNVLDNACKYCLEFVEVSVRQT TDSHLHILVEDDGGPI PQSQRRAVFDRGQRADTLRPGQGVGLSV
AREIVEQYDGEI IAGESLLGGACMEVVFGRQQMEDKQS-

Isolat K31

MKGLLRHIFPLSLRVRFLATAGVVLVLSLAYGMVALVGYSVSFDKTTFRLLRGESNLFYMLARWENGAIDVDIP
ENLNMESPTVTLIYDEQ GKLLWAQRDVPWLAKRIQPEWLKRNGFHEIEADVDS SMLLRNNHEIQEQLD AIREQG
DDSEMTHSVAINLYPATSKMPQLSIVVVDTIPVELKRSYMWVSWFVYVLAANLLLVIPLLWVAAWWSLRPIESLA
KEVRELEEHHREKLNPNNTTRELTRLVSNLNRLVRSERERYDKYRTTLDLTHSLKTPLAVMQSTLRSLRGEKISV
DEAEPVMLEQISRISQQIGYYLHRASMRSGGTLLSRELHPIAPLLDSLTSALNKVYQRKGVNISLDISPEITFVG
EQNDFMEVMGNVLDNACKYCLEFVEVSVRQT TDSHLHILVEDDGGPI PQSQRRAVFDRGQRADTLRPGQGVGLSV
AREIVEQYDGEI IAGESLLGGACMEVVFGRQQMEDKQS

Protéines PmrA

Souche de référence

MKILVIEDDALLLQGLILAMQSEGYVCDGVSTAHEAALSLASNHYSLIVLDLGLPDEDGLHFLSRMRREKMTQPV
LILTARDTLEDRISGLDTGADDYLVKPFAL EELNARIRALLRRHNNQGDNEISVGNLRLNVTRRLVWLGETALDL
TPKEYALLSRLMMKAGSPVHREI LYNDIYSWDNEPATNTLEVHIHNLREKIGKSRI RTVIRGFGYMLANNIDTE

Isolat K06

MKILVIEDDALLLQGLILAMQSEGYVCDGVSTAHEAALSLASNHYSLIVLDLGLPDEDGLHFLSRMRREKMTQPV
LILTARDTLEDRISGLDTGADDYLVKPFAL EELNARIRALLRRHNNQGDNEISVGNLRLNVTRRLVWLGETALDL
TPKEYALLSRLMMKAGSPVHREI LYNDIYSWDNEPATNTLEVHIHNLREKIGKSRI RTVIRGFGYMLANNIDTE-

Isolat K09

MKILVIEDDALLLQGLILAMQSEGYVCDGVSTAHEAALSLASNHYSLIVLDLGLPDEDGLHFLSRMRREKMTQPV
LILTARDTLEDRISGLDTGADDYLVKPFAL EELNARIRALLRRHNNQGDNEISVGNLRLNVTRRLVWLGETALDL
TPKEYALLSRLMMKAGSPVHREI LYNDIYSWDNEPATNTLEVHIHNLREKIGKSRI RTVIRGFGYMLANNIDTE-

Isolat K12

MKILVIEDDALLLQGLILAMQSEGYVCDGVSTAHEAALSLASNHYSLIVLDLGLPDEDGLHFLSRMRREKMTQPV
LILTARDTLEDRISGLDTGADDYLVKPFAL EELNARIRALLRRHNNQGDNEISVGNLRLNVTRRLVWLGETALDL
TPKEYALLSRLMMKAGSPVHREI LYNDIYSWDNEPATNTLEVHIHNLREKIGKSRI RTVIRGFGYMLANNIDTE-

Isolat K31

MKILVIEDDALLLQGLILAMQSEGYVCDGVSTAHEAALSLASNHYSLIVLDLGLPDEDGLHFLSRMRREKMTQPV
LILTARDTLEDRISGLDTGADDYLVKPFAL EELNARIRALLRRHNNQGDNEISVGNLRLNVTRRLVWLGETALDL
TPKEYALLSRLMMKAGSPVHREI LYNDIYSWDNEPATNTLEVHIHNLREKIGKSRI RTVIRGFGYMLANNIDTE

Protéines PmrB

Souche de référence

MALFATETWTMRHRLLLTIGAILVVCQLISVFVLWVESKEQIQLLVASAIEGHNNQKHVEHEVREAVASLLVPSL
LIVGLALYISMLAVRKITRPLSRLQSELENRTPDNLTPIVLSESVPEVTAVTTALNQLVSRLNLTDRERLFTAD
VAHELRTPLAGLRLHLELLAKVHGMGVDPLIQRLDQMTTTSISQLLQLARVGQSFSAGSYQQVLLDDVVKPLQDE
LEAMLAQRQQRLLLLTDIENEAVVSGDATLIRVILRNLVENAHRYSPGSGTIRVSVKAGLMPVMAVEDEGPGIDEA
KSGELSKAFVRMDSRYGGIGLGLSIVTRIAQLHDAQFFLHNRQPGPGVRAWVLFPPQRGGQNVSTH

Isolat K06

MALFATETWTMRHRLLLTIGAILVVCQLISVFVLWVESKEQIQLLVASAIEGHNNQKHVEHEVREAVASLLVPSL
LIVGLALYISMLAVRKITRPLSRLQSELENRTPDNLTPIVLSESVPEVT
AVTTALNQLVSRLNLTDRERLFTADVAHELRTPLAGLRLHLELLAKVHGMGVDPLIQRLDQMTTTSISQLLQLAR
VGQSFSAGSYQQVLLDDVVKPLQDELEAMLAQRQQRLLLLTDIENEAVVSGDATLIGVILRNLVENAHRYSPGSG
TIRVSVKAGLMPVMAVEDEGPGIDEAKSGELSKAFVRMDSRYGGIGLGLSIVTRIAQLHDAQFFLHNRQPGPGVR
AWVLFPPQRGGQNVSTH-

Isolat K09

MPVMAVEDEGPGIDEAKSGELSKAFVRMDSRYGGIGLGLSIVTRIAQLHDAQFFLHNRQPGPGVRAWVLFPPQRGG
QNVSTH-

MALFATETWTMRHRLLLTIGAILVVCQLISVFVLWVESKEQIQLLVASAIEGHNNQKH
VEHEVREAVASLLVPSLLIVGLALYISMLAVRKITRPLSRLQSELENRTPDNLTPIVLS
ESVPEVTAVTTALNQLVSRLNLTDRERLFTADVAHELRTPLAGLRLHLELLAKVHG
MGVDPLIQRLDQMTTTSISQLLQLARVGQSFSAGSYQQVLLDDVVKPLQDELEAML
AQRQQRLLLLTDIENEAVVSGDATLIRVILRNLVENAHRYSPGSGTIRVSVKAGLMPV
MAVEDEGPGIDEAKSGELSKAFVRMDSRYGGIGLGLSIVTRIAQLHDAQFFLHNRQP
GPGVRAWVLFPPQRGGQNVSTH-

Isolat K12

MALFATETWTMRHRLLLTIGAILVVCQLISVFVLWVESKEQIQLLVASAIEGHNNQKHVEHEVREAVASLLVPSL
LIVGLALYISMLAVRKITRPLSRLQSELENRTPDNLTPIVLSESVPEVTAVTTALNQLVSRLNLTDRERLFTAD
VAHELRTPLAGLRLHLELLAKVHGMGVDPLIQRLDQMTTTSISQLLQLARVGQSFSAGSYQQVLLDDVVKPLQDE
LEAMLAQRQQRLLLLTDIENEAVVSGDATLIRVILRNLVENAHRYSPGSGTIRVSVKAGLMPVMAVEDEGPGIDEA
KSGELSKAFVRMDSRYGGIGLGLSIVTRIAQLHDAQFFLHNRQPGPGVRAWVLFPPQRGGQNVSTH-

Isolat K19

MALFATETWTMRHRLLLTIGAILVVCQLISVFVLWVESKEQIQLLVASAIEGHNNQKHVEHEVREAVASLLVPSL
LIVGLALYISMLAVRKITRPLSRLQSELENRTPDNLTPIVLSESVPEVTAVTTALNQLVSRLNLTDRERLFTAD
VAHELRTPLAGLRLHLELLAKVHGMGVDPLIQRLDQMTTTSISQLLQLARVGQSFSAGSYSRCCWMTW-

Isolat K31

MALFATETWTMRHRLLLTIGAILVVCQLISVFVLWVESKEQIQLLVASAIEGHNNQKHVEHEVREAVASLLVPSL
LIVGLALYISMLAVRKITRPLSRLQSELENRTPDNLTPIVLSESVPEVTAVTTALNQLVSRLNLTDRERLFTAD
VAHELRTPLAGLRLHLELLAKVHGMGVDPLIQRLDQMTTTSISQLLQLARVGQSFSAGSYQQVLLDDVVKPLQDE
LEAMLAQRQQRLLLLTDIENEAVVSGDATLIRVILRNLVENAHRYSPGSGTIRVSVKAGLMPVMAVEDEGPGIDEA
KSGELSKAFVRMDSRYGGIGLGLSIVTRIAQLHDAQFFLHNRQPGPGVRAWVLFPPQRGGQNVSTH-