

● Liste des abréviations

● Liste des tableaux

● Liste des figures

● Cadre de stage

- 01 | 1. Présentation du lieu de stage
- 02 | 2. Techniques maîtrisées durant ce stage

● Applications pratiques : **Support Moléculaire de la résistance des entérobactéries productrices de BLSE.**

- 12 | Introduction
- 13 | ● Chapitre I : Revue bibliographique
- 13 | = Partie 1 : Les entérobactéries
- 13 | 1. Définition
- 13 | 2. Classification
- 13 | 3. Réservoir
- 14 | 4. Les infections causées par les entérobactéries
- 15 | = Partie 2 : La résistance bactérienne aux antibiotiques
- 15 | 1. Définition des antibiotiques
- 15 | 2. Les grandes familles d'antibiotiques
- 16 | 3. La résistance des bactéries aux antibiotiques
- 16 | 4. Les mécanismes de résistance aux Bêta-lactamines
- 16 | 4.1- Diminution de la perméabilité
- 16 | 4.2- Production de Bêta-lactamases
- 17 | 4.3- Hyperproduction du système d'efflux
- 17 | 4.4- Modifications de protéines de liaison des pénicillines (PLP)
- 18 | = Partie 3 : Bêta-Lactamases à spectre étendu
- 18 | I - Généralités sur les BLSE.
- 18 | I.1- Définition des BLSE
- 18 | I.2- Classification
- 19 | II- Les types de gènes de résistance chez les entérobactéries productrices de BLSE

21	III-Epidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE
21	III.1- Dissémination des entérobactéries productrices de BLSE
22	III.2- Infections et facteurs de risque liés aux BLSE
23	Chapitre II : Matériel et Méthodes
23	1. Etude de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques : L'antibiogramme
23	a- Préparation de la culture fraîche
23	b- Réalisation de l'inoculum
23	c- Ensemencement par écouvillonnage
23	d- Antibiotiques utilisés
24	e- Applications des disques d'antibiotiques
25	f- Lecture
25	2. Recherche du gène de résistance blaCTXM1 par la méthode PCR
25	2.1- Définition de la PCR
26	2.2- Procédure pour réaliser l'extraction d'ADN et la PCR pour le gène CTX-M 1
27	2.3- Electrophorèse sur gel d'agarose
30	Chapitre III : Résultats et discussion
30	Résultat
31	Discussion
32	Conclusion
33	Références bibliographiques

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADH : Arginine Dihydrolase
ADN : Acide désoxyribonucléique
AK : Amikacine
AMC : Amoxicilline
API : Analytical profil index
ARN : Acide ribonucléique
BBT : Bleu de bromothymol
BHI : Bouillon cœur-cervelle
BLSE : β -lactamases à spectre étendu
BPO : Bactéries pathogènes opportunistes
BPS : Bactéries pathogènes strictes
C2G : Céphalosporines de 2ème génération
C3G : Céphalosporines de 3ème génération
CAZ : Céfotaxime
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIP : Ciprofloxacine
CIT : Citrate utilization
CN : Gentamicine
CTX : Céfotaxime
CTX-M : Céfotaximase-Munich
E-BLSE : Entérobactérie productrice de β -lactamases à spectre étendu
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
EMB : Eosine Bleu de Méthylène
FEP : Céfépime
FOX : Céfoxitine
GEL : Gelatinase
GO : Gélose nutritive ordinaire
IPM : Imipénème
IPP : Institut Pasteur de Paris
LDC : Lysine
MH : Mueller-Hinton
NA : Acide Nalidixique
NOR : Norfloxacine
ODC : Ornithine
PBP : Protéines de liaison de pénicillines
PCR : Réaction en chaîne par polymérase
PLP : Protéines de liaison de pénicillines
SHV : Sulfhydryl variable
SXT : Sulfaméthoxazole
TBE : Tris, Borate, EDTA
TEM : Temoneira.
TRI : TEM résistantes aux inhibiteurs
TSA : Trypto-caséine soja
URE : Urée
VP : Na pyruvate

LISTE DES TABLEAUX

- 08 — **Tableau 1** : Interprétation de la lecture de l'uréase dans le milieu urée
- 08 — **Tableau 2** : Interprétation de la lecture de la tryptophanase
- 15 — **Tableau 3** : Les grandes familles d'antibiotiques
- 19 — **Tableau 4** : Classification des Bêta-lactamases selon Bush et Ambler
- 22 — **Tableau 5** : Caractéristiques des infections à BLSE
- 26 — **Tableau 6** : Volume des composants du Mix PCR
- 27 — **Tableau 7** : Les conditions d'amplifications du gène blaCTXM dans le thermocycleur en 35 cycles
- 28 — **Tableau 8** : Composition de 100mL du tampon TBE 10X

LISTE DES FIGURES

- 17 — **Figure 1** : Pompe d'efflux chez un bacille à Gram Négatif
- 24 — **Figure 2** : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie
- 25 — **Figure 3** : Figure montrant le résultat du test de synergie
- 29 — **Figure 4** : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%
- 30 — **Figure 5** : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification de la PCR du gène blaCTXM1

CADRE DE STAGE

1. Présentation du lieu de stage

Mon stage de fin d'études en licence sciences biologiques appliquées et santé a été réalisé au sein de l'un des 8 laboratoires de recherche de la **faculté de Médecine et Pharmacie de Fès**.

Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire

Le laboratoire de « **Microbiologie et Biologie Moléculaire** » fait partie du Laboratoire de recherche en « **Pathologie Humaine, Biomédecine et Environnement** ».

Structure du Laboratoire de Recherche Biologique

Les différentes équipes dont se compose le **Laboratoire de Pathologie Humaine, Biomédecine et Environnement** :

Anatomie Pathologique

Microorganismes et Facteur oncogènes

Physiopathologie et Nutrition

Génomique et Santé

Maladie de l'appareil digestif

Les éléments traces Métalliques

Équipement du Laboratoire

Le laboratoire est équipé d'un appareillage qui permet de réaliser :

- L'identification des bactéries par des tests d'identifications Biochimiques ou par les galeries API.
- L'antibiogramme.
- Extraction d'ADN.
- PCR.



2. Techniques maîtrisées durant ce stage

1- Préparation et stérilisation des milieux de culture

La plupart des milieux se présentent sous forme déshydratée, ce qui assure une composition constante, un stockage facile et une préparation simplifiée. Lors de la reconstitution des milieux, la poudre doit être mélangée au volume d'eau préconisé, être homogénéisée, puis dissoute totalement par chauffage (l'ébullition ne doit pas dépasser 1 à 2 minutes). Après refroidissement à 50-60°C, la distribution des milieux se fait dans d'autres récipients (tubes à essais) en vue d'être stérilisé. La stérilisation se fait par autoclavage. Le temps et la température peuvent varier d'un milieu à l'autre (tenir compte également du conditionnement, de préférence des petits volumes). En général, une stérilisation de 15-20 minutes à 120°C est préconisée. Les milieux sont ensuite laissés à refroidir jusqu'à 50°C dans l'autoclave (ne pas les sortir avant car la différence de températures provoquerait une dépression au sein des tubes). Ils peuvent ensuite être conservés tels quels après refroidissement en position verticale, ou inclinés en pente ou pente et culot, ou distribués dans des boîtes de pétri. Finalement, les boîtes de pétri doivent subir un test de stérilité.

2. Ensemencement d'un prélèvement

2.1-Techniques d'ensemencement

Nous avons réalisé plusieurs types et différentes techniques d'ensemencement :

a- Ensemencement sur un milieu solide

Pour ce type d'ensemencement on distingue soit des techniques d'ensemencement sur des boîtes soit sur des tubes.

Pour les techniques d'ensemencement sur des boîtes de pétri :

- Ensemencement par épuisement : C'est la technique des 4 quadrants qui consiste à disperser le microorganisme à la surface d'un milieu solide afin d'isoler des bactéries et d'obtenir des colonies séparées. Tout d'abord, l'échantillon doit être déposé sur le plus grand quadrant puis l'étaler. Ensuite, retourner la boîte afin d'étaler les bactéries sur un quadrant plus petit, puis retourner afin d'ensemencer le dernier petit quadrant. Les stries doivent être serrées et l'anse de platine doit être flambée entre chaque quadrant.

C'est la technique utilisée pour l'ensemencement des milieux sélectifs (EMB et Chapman).

Après l'ensemencement, il faut incuber les boîtes dans l'étuve à 37°C pendant 24h pour tous les milieux sauf le milieu Chapman qui nécessite une incubation de 48h.

- Ensemencement en tapis : C'est la technique utilisée pour la réalisation de l'antibiogramme.

Les techniques d'ensemencement sur tubes :

- **Pour un milieu incliné en pente :** ensemercer toujours du bas en haut par des stries serrées.

- **Pour un milieu en culot :** ensemencement par piqûre centrale.

- **Pour un milieu en culot + pente :** ensemercer d'abord la pente par des stries serrées et ensuite le culot par piqûre centrale. C'est la technique utilisée pour l'identification des entérobactéries.

b- Ensemencement sur milieu liquide

On peut ensemercer un milieu liquide :

- ✓ Soit à partir d'un produit liquide : Mettre quelques gouttes dans le milieu à ensemercer à l'aide d'une micropipette.

- ✓ Soit à partir d'un produit solide : Ecraser la colonie prélevée à l'aide d'une anse de platine ou pipette de pasteur sur la paroi du tube, pour obtenir une suspension homogène.

* Remarque

Les différentes techniques d'ensemencement citées au dessus doivent être effectuées dans des conditions aseptiques.

2.2- Culture sur milieu sélectif et sur milieu non sélectif

L'ensemencement peut être réalisé sur un milieu sélectif qui permet à des bactéries spécifiques de pousser ou sur un milieu non sélectif qui permet la croissance de toutes les bactéries.

a- Culture sur milieux sélectifs

Milieu EMB

Le milieu EMB (Eosine Bleu de Méthylène) est un milieu sélectif qui favorise la croissance et identifie les entérobactéries ainsi que les bactéries intestinales à Gram-.

Le bleu de méthylène et l'éosine jaune sont deux colorants inhibiteurs partiels des bactéries Gram +. Ces colorants assurent la différenciation entre les germes ayant l'aptitude à fermenter ou non le lactose (lactose + ou lactose -).

***Lecture**

La lecture se fait après 24h à une température de 37°C :

- Les colonies violettes foncées désignent un pH acide. Dans ce cas, les bactéries fermentent le lactose en produisant des acides (Lactose+).
- Les colonies grisâtres désignent quant à elles un pH neutre ou basique. Dans ce cas, les bactéries ne fermentent pas le lactose (Lactose-).

Milieu Chapman

La gélose Chapman est un milieu sélectif des bactéries halophiles et plus particulièrement fermentant le mannitol. C'est un milieu semi synthétique, utilisé pour l'isolement des *staphylococcus*. La teneur en NaCl du milieu permet la sélection des bactéries halophiles et inhibe la grande majorité des autres bactéries.

***Lecture**

La fermentation du mannitol est révélée grâce au virage de l'indicateur coloré de pH : Rouge de phénol qui permet une orientation vers certaines espèces.

- Absence de virage (le milieu reste rouge) : les colonies ne fermentent pas le mannitol (mannitol-).
- Virage du milieu au jaune : les colonies fermentent le mannitol (mannitol+).

b- Culture sur milieux non sélectifs**Milieu TSA**

La gélose Trypto-caséine soja (TSA) est un milieu universel convenant à assurer une excellente nutritivité. Elle peut être utilisée, d'une part, pour la culture et l'isolement des bactéries aérobies et anaérobies et d'autre part pour favoriser la croissance des germes particulièrement exigeants. Après une incubation de 18 - 24h à 37°C, une croissance bactérienne est alors constatée.

Milieu MH

Le milieu Mueller-Hinton est un milieu de base pour les bactéries non exigeantes. Il est non sélectif, riche et permet la réalisation de l'antibiogramme standard.

3. Identification des bactéries

3.1- Coloration de Gram

La coloration de Gram est effectuée à partir de la culture pour étudier les caractéristiques morphologiques des bactéries étudiées, y compris la forme (par exemple Cocci ou Bacilles) et aussi pour distinguer les bactéries Gram- des bactéries Gram+. Sur le Gram, les entérobactéries apparaissent sous forme de bacilles de couleur rose.

* Protocole

La coloration de gramme se fait en deux étapes :

1- Préparation d'un frottis bactérien dans des conditions stériles :

- Sur une lame propre, déposer une petite goutte d'eau distillée stérile.
- Prélever une colonie et l'étaler sur la lame.
- Fixer le frottis en séchant la lame sur la flamme.

2- Coloration de Gram :

- Recouvrir la lame de cristal violet pendant 1 minute.
- Laver la lame à l'envers par un filet d'eau.
- Verser du Lugol sur la lame pendant 1 minute.
- Laver la lame toujours à l'envers.
- Faire une décoloration en versant de l'alcool pendant quelques secondes.
- Laver la lame.
- Plonger la lame dans la fuchsine pendant 1 minute.

* Résultat

Bactérie de couleur rose ==> Gram-.

Bactéries de couleur violette ==> Gram+.

3.2- Tests d'identification biochimique classique des entérobactéries et des staphylococcus

Test Oxydase

Ce test permet de détecter une enzyme qui est la phénylène diamine oxydase.

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine.

* Technique

- Placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée.
- Déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné.

- Avec une pipette Pasteur, prélever une colonie sur un milieu solide (GO) et la déposer délicatement sur le disque.

*** Lecture**

Si la bactérie adopte une coloration rose violette, elle possède donc une activité oxydase et elle est dite : Oxydase positive.

Si la bactérie ne prend pas de coloration violette, elle ne possède pas d'activité oxydase et elle est dite : Oxydase négative.

*** Remarque**

Les entérobactéries comme *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* sont dépourvues d'oxydase.

A- Tests d'identification des entérobactéries

a- Hajna-Kligler

Le milieu Hajna-Kligler est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs traits biochimiques. Il est largement utilisé dans l'identification des entérobactéries.

*** Mode d'ensemencement**

Bien ensemencer la surface par striations serrées ou par inondation, puis le culot par simple piqûre, tout en gardant la même pipette boutonnée.

Il est important de ne pas oublier de dévisser partiellement la capsule afin de permettre les échanges gazeux.

*** Caractères recherchés**

La consommation du glucose et du lactose est marquée par un virage de couleur, la production de l' H_2S se manifeste par un précipité noir, tandis que la production de gaz implique un décollement de la gélose.

- Bactérie de type fermentatif du glucose et lactose + : culot jaune et pente jaune.
- Bactérie de type fermentatif du glucose et lactose - : culot jaune et pente rouge.
- Bactérie de type oxydatif du glucose ou glucose - et lactose - : culot rouge et pente rouge.
- Bactérie de type oxydatif du glucose et lactose + : culot rouge et pente jaune.

b- Milieu citrate de Simmons

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate par les bactéries comme source de carbone et d'énergie. Dans ce cas, le milieu va virer au bleu, et le BBT permet de mettre en évidence une alcalisation en cas d'utilisation du citrate.

* Mode d'ensemencement

L'ensemencement de la pente se fait par une strie longitudinale, réalisée avec une anse stérile chargée à partir d'une suspension de la culture solide.

* Remarque

Il est important de ne pas apporter de substrats carbonés. Ainsi, l'ensemencement à partir d'une souche pure fournie en bouillon nutritif ou en eau peptonée est impossible.

Ne pas visser le bouchon à fond, afin de permettre les échanges gazeux (en particulier l'élimination du dioxyde de carbone).

* Résultat

Si le milieu vire au bleu : Citrate +.

Si le milieu reste vert comme au départ : Citrate -.

c- Milieu urée-tryptophane

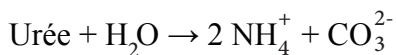
Ce milieu permet de mettre en évidence les caractères suivants :

- ✓ Présence d'une uréase.
- ✓ Présence d'une tryptophanase.

Ce milieu est utilisé pour l'identification des entérobactéries et autres bactéries.

*Principe

- Recherche de l'uréase qui dégrade l'urée selon la réaction suivante :



- Les ions CO_3^{2-} vont entraîner une forte alcalinisation du milieu qui sera révélée par un virage de l'indicateur de pH (le rouge de phénol) à sa teinte basique (rouge).

- Recherche de la production d'indole (mise en évidence de la tryptophanase)

- La tryptophanase hydrolyse le tryptophane selon la réaction suivante :



L'indole forme un complexe coloré en rouge en présence d'un réactif : le réactif de Kovacs.

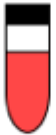

* Ensemencement

Ensemencer avec quelques gouttes de suspension bactérienne ou avec une colonie prélevée à l'anse sur un milieu solide. Ensuite, incuber pendant 24h à 37°C.

* Lecture de l'uréase

La lecture de l'uréase est interprétée dans le tableau suivant :



Tableau 1 : Interprétation de la lecture de l'uréase dans le milieu urée

Caractère recherché	Observation	Interprétation	Conclusion
Uréease (lecture après 24 heures d'incubation)	 Milieu rouge	Alcalinisation du milieu due à la dégradation de l'urée	La bactérie possède l'uréase Elle est dite uréase +
	 Milieu orangé (inchangé)	Pas d'alcalinisation du milieu	La bactérie ne possède pas l'uréase Elle est dite uréase -

* Lecture de la tryptophanase

La lecture de la tryptophanase se fait par l'ajout de 3 gouttes du réactif de Kovacs sans agiter le milieu. Ceci est interprété dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Interprétation de la lecture de la tryptophanase

Indole	 Apparition d'un anneau rouge	Présence d'indole. Le tryptophane a donc été hydrolysé	La bactérie a produit de l'indole Elle est dite indole +
	 L'anneau reste orangé	Absence d'indole	La bactérie n'a pas produit d'indole Elle est dite indole -

d- Milieu RM

*Principe

Ce milieu permet de mettre en évidence les bactéries qui produisent les acides organiques par la voie des acides mixtes.

* Technique

Dans un tube à hémolyse, mettre une suspension bactérienne au milieu RM liquide et après une incubation de 24h à 37°C, y ajouter quelques gouttes du rouge de méthyle pour la révélation de couleur.

* Résultat

Si la coloration est rouge, on note RM+.

Si la coloration n'est pas rouge, on note RM-.

B-Tests d'identification des staphylococcus

a- Test catalase

*Principe

Ce test permet l'identification des bactéries Gram+, il met en évidence la présence de l'enzyme catalase, qui catalyse les peroxydes en eau avec libération d'oxygène.

* Technique

Sur une lame, on met une goutte d'eau oxygénée dans laquelle on dépose une colonie bactérienne.

* Lecture

Si on a une effervescence, ceci indique un dégagement gazeux de dioxyde et donc une catalase+.

b- Test coagulase

*Principe

Ce test permet l'identification de *Staphylococcus aureus*.

* Technique

La technique consiste à mettre dans un tube à hémolyse 0,5 mL de plasma oxalaté + 0,5 mL de culture microbienne enrichie au BHI, puis incuber à 37°C en veillant à ne pas incliner, ni faire bouger les tubes à hémolyse réalisés.

* Lecture

La lecture se fait dans les 6 heures qui suivent le test. La présence de *Staphylococcus aureus* se manifeste par une coagulation.

3.3- Identification des entérobactéries par la galerie d'API20E

* Principe

L'identification peut être réalisée par la galerie rapide API système (Analytical profil index). La galerie biochimique API20E est un système pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles à Gram-, utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Ces galeries API 20E sont fournies par l'IPP (Institut Pasteur de Paris), il s'agit de galerie qui se présente sous forme de produits desséchés, réhydratés par inoculation de la suspension du germe à étudier.

* Technique

On réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation en répartissant environ 5 mL d'eau distillée dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide. Sans oublier d'inscrire la

référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. Ensuite, il faut préparer l'inoculum bactérien : une colonie dans 5 mL d'eau physiologique dont l'opacité doit être équivalente à 0,5 McFarland. Pour inoculer la galerie, il faut remplir à l'aide d'une pipette Pasteur les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne, et pour les autres tests; il faut remplir uniquement les tubes (et non les cupules) avec la création d'une anaérobiose dans les tests: ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule par l'huile de vaseline stérile. Enfin, on incube à 37 C° ± 1C° pendant 18-24 heures.

*** Lecture**

La lecture des galeries API20E s'adapte aux indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique, on se réfère à un catalogue analytique où l'identification est donnée.

*** Remarque**

Pour identifier les *staphylococcus*, on utilise la galerie API STAPH.

4. Antibiogramme : (détaillé dans le chapitre Matériel et méthodes)

Un antibiogramme est l'examen biologique conçu pour tester la sensibilité d'une souche bactérienne à un ou plusieurs antibiotiques. Cet examen consiste à placer la souche bactérienne étudiée en présence d'un antibiotique et d'observer l'effet de ce dernier sur le développement de la souche bactérienne étudiée.

Nous avons réalisé 3 types d'antibiogrammes : pour les entérobactéries, pour *staphylococcus aureus* et pour *Pseudomonas aeruginosa*.

5. PCR : (détaillée dans le chapitre Matériel et méthodes)

En microbiologie moléculaire, la PCR est utilisée pour soit identifier des bactéries, ou isoler des gènes de résistance.

La PCR comporte trois étapes :

Une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, suivie d'une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée. Puis une élongation grâce à l'action de la Taq polymérase.

Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible. La révélation se fait par électrophorèse sur gel d'agarose.

**SUPPORT MOLÉCULAIRE DE LA RÉSISTANCE DES
ENTÉROBACTÉRIES PRODUCTRICES DE
BÊTA-LACTAMASES À SPECTRE ÉLARGI**

INTRODUCTION

La résistance des entérobactéries aux antibiotiques présente une menace extrêmement préoccupante à la santé mondiale, ce qui exige une réponse des cliniciens et des professionnels de la santé publique.

Depuis leur découverte, les antibiotiques ont été notre principal moyen de défense. Avec une aggravation du phénomène de résistance, ils risquent de devenir inefficaces et la société pourrait retrouver les conditions qui prévalaient avant, comme quand une infection pulmonaire simple pouvait tuer un enfant, ou quand les médecins étaient impuissants devant les cas de méningite. **(1)**

Les β -Lactamines sont parmi les antibiotiques les plus prescrits en médecine humaine. Toutefois, en raison de leur utilisation massive et souvent inappropriée, la résistance des entérobactéries à ces médicaments a nettement augmenté, notamment car elles ont acquis, par échange de matériel génétique, des β -lactamases à spectre étendu (BLSE).

Les gènes de type TEM, CTX-M et SHV représentent les 3 familles majeures des BLSE. Ces gènes permettent aux entérobactéries de développer une résistance en inactivant la plupart des β -lactamines à l'exception des Céphamycines et des Carbapénèmes. **(2)**

Les BLSE de type TEM et de type SHV sont surveillées en continu depuis plusieurs années sur différents CHU du monde entier. Cependant, leur nombre décroît depuis de nombreuses années et sont de plus en plus remplacées par les BLSE de type CTX-M.

Les entérobactéries productrices de BLSE peuvent causer aussi bien des infections nosocomiales que des infections communautaires. Elles constituent un grave problème sur les lieux des soins médicaux et elles occupent une place importante en pathologie infectieuse humaine. Les entérobactéries productrices de BLSE (E-BLSE) sont désormais responsables de conséquences mortelles, présentent un risque accru d'échec thérapeutique et sont associées à des hospitalisations prolongées ainsi que des surcoûts liés aux soins.

Des études menées ont confirmé que les bactériémies à E-BLSE étaient associées à une grande mortalité. **(3)**

L'objectif de cette étude est de définir le profil de résistance BLSE des entérobactéries, ainsi que de déterminer le support moléculaire codant pour cette résistance à plusieurs antibiotiques.

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : Les entérobactéries

1. Définition

Les entérobactéries sont des bacilles (en forme de bâtonnets) à Gram-, de 2 à 3 μm de long sur 0,6 μm de large. Elles se développent aisément sur milieu ordinaire à 37°C en aéro-anaérobie facultatif et fermentent le glucose (avec ou sans production de gaz). Elles détiennent une Catalase ainsi qu'une Réductase de Nitrates en Nitrites mais ne possèdent pas d'Oxydase. Certaines espèces sont mobiles grâce à des flagelles polaires tandis que d'autres ne le sont pas (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*).

2. Classification

Les entérobactéries constituent une famille composée de 28 genres et de plus de 100 espèces. Principalement, les genres à intérêt médical au sein des laboratoires de bactériologie sont les suivants :

- *Escherichia*
- *Klebsiella*
- *Enterobacter*
- *Citrobacter*
- *Proteus*
- *Providencia*
- *Morganella*
- *Serratia*
- *Salmonella*

3. Réservoir

Les entérobactéries sont ubiquitaires, elles sont retrouvées dans de nombreux écosystèmes. Certaines espèces sont saprophytes et vivent dans les milieux humides, les sols, les eaux, les végétaux et les produits alimentaires. Alors que d'autres sont phytopathogènes. Mais, la plupart des espèces sont commensales, isolées dans l'intestin de l'homme et des animaux.

4. Les infections causées par les entérobactéries

En pathologie humaine, les entérobactéries pathogènes appartiennent à des groupes :
D'une part les bactéries pathogènes opportunistes (BPO) qui font partie des flores fécales commensales habituelles du tube digestif des mammifères, y compris l'homme. Elles n'entraînent pas de pathologies mais peuvent causer des infections extra-intestinales où les infections urinaires sont les plus répandues.

D'autre part les bactéries pathogènes strictes (BPS) qui attaquent l'intestin et dont l'ingestion provoque une infection intestinale.

Le pouvoir pathogène des entérobactéries chez l'homme est considérable. Les infections peuvent être communautaires ou nosocomiales. Elles sont soit bien définies et peuvent concerner tous les sujets soit non spécifiques touchant les sujets immunodéprimés, en particulier ceux qui sont hospitalisés.

Parmi ces bactéries, celles qui représentent des infections très périlleuses et très risquées. On en cite :

- *Salmonella typhi* : qui entraîne des intoxications alimentaires et développe de la diarrhée, de la fièvre Typhoïde et des crampes abdominales dans les 12 à 48 heures suivant l'infection. La maladie dure habituellement de 4 à 7 jours.
- *Escherichia coli* : qui provoque des infections gastriques, des infections urinaires et des méningites et qui se révèle par des diarrhées aqueuses, des vomissements et des maux de têtes.
- *Klebsiella pneumoniae* : qui peut engendrer des infections pulmonaires et respiratoires (comme la pneumonie), des septicémies et des angines.
- *Serratia marcescens* : qui peut donner des infections urinaires, des infections de blessures, des pneumonies et des septicémies.
- *Shigella dysenteriae* : qui est l'agent de la dysenterie bacillaire.
- *Yersinia pestis* : qui est responsable de la peste.

Partie 2 : La résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement. **(1)**

1. Définition des antibiotiques

Un antibiotique désigne tout produit microbien qui, même à de très faibles concentrations, inhibe ou tue certains micro-organismes. Il agit en un site bien précis. Cette cible peut être située dans la paroi cellulaire, dans la membrane cytoplasmique, dans la machinerie de synthèse des protéines, ou dans la synthèse de l'ADN ou de l'ARN.

Aucun antibiotique n'est efficace contre toutes les bactéries. Certains agissent contre un petit nombre d'espèces tandis que d'autres sont actifs contre un large spectre d'organismes incluant aussi bien les bactéries Gram+ que les Gram-. **(4)**

2. Les grandes familles d'antibiotiques

Parmi les multiples antibiotiques connus, les plus courants sont les suivants :

Tableau 3 : Les grandes familles d'antibiotiques

Famille	Antibiotiques
β-Lactamines	Pénicillines : amoxicilline, oxacilline... Céphalosporines : Céftaxime, Céftazidine, Céfalexine, Céfépime, Céfoxitine...
Aminosides	Amikacine, Gentamicine, Nétilmicine, streptomycine, Tobramycine
Macrolides	Erythromycine, Spiramycine, Aithromycine
Cyclines	Doxycycline, Minocycline, Métacycline...
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine, Ofloxacine, Péfloxacine, Lévofloxacine, Norfloxacine
Glycopeptides	Vancomycine, Nelcoplanine
Nitro-5-imidazolés	Métronidazole
Carbapénème	Imipénème



3. La résistance des bactéries aux antibiotiques

Une souche bactérienne qui est insensible à un antibiotique ne se développe qu'en présence d'une concentration de cet antibiotique qui est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la plupart des souches appartenant à la même espèce bactérienne.

La résistance d'un germe peut être naturelle, c'est à dire constitutive, ou être acquise à la suite d'un emploi abusif d'antibiotiques qui n'ont alors plus d'effet sur des germes antérieurement sensibles.

4. Les mécanismes de résistance aux Bêta-lactamines

Les entérobactéries utilisent différents mécanismes pour développer une résistance aux Bêta-lactamines : il peut s'agir de troubles de perméabilité aux antibiotiques, qui empêchent la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie, de systèmes d'efflux pour éliminer les antibiotiques qui ont pénétré dans la bactérie, ou de changements dans la cible bactérienne de l'antibiotique (exemples : sites de liaison de pénicilline, protéines liant la pénicilline (PBP) qui empêchent la formation de la paroi bactérienne). Mais le plus souvent, ce sont des enzymes (Bêta-lactamases) qui détruisent les Bêta-lactamines.

4.1- Diminution de la perméabilité

La pénétration des Bêta-lactamines, molécules hydrophiles, à travers la membrane externe se fait à travers des porines, qui sont des canaux protéiques remplis d'eau. Par conséquent, la sensibilité aux Bêta-lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles.

L'altération des porines par mutation est à l'origine de la résistance acquise aux Bêta-lactamines, soit par une modification structurelle d'une porine essentielle, soit par une diminution quantitative de l'effectif de porines, ce qui est la situation la plus courante.

4.2- Production de β -lactamases

Chez les entérobactéries, le mécanisme prédominant de résistance aux Bêta-lactamines est l'inactivation enzymatique par production des Bêta-lactamases, notamment les Bêta-lactamases à spectre élargi. (5)

Ces derniers sont des enzymes d'inactivation dont les substrats sont les Bêta-lactamines. Ils ont la capacité d'ouvrir le cycle β -lactame tout en créant un intermédiaire acylenzyme instable, ce qui mène au final à la perte d'un groupement carboxyle, responsable de l'inactivation de l'antibiotique.

4.3- Hyperproduction du système d'efflux

Le système d'efflux actif est efficace grâce aux protéines transmembranaires ancrées dans la membrane plasmatique mais aussi dans la membrane externe des bactéries Gram-.

Les mutations dans les régions régulatrices des opérateurs des systèmes d'efflux multi-médicamenteux peuvent conduire à une surexpression des systèmes d'efflux constitutifs, avec ou sans perte de porines, et conférer des antibiotiques multirésistants.

L'implication des systèmes d'efflux dans la résistance aux Bêta-lactamines a été clairement démontrée dans plusieurs études, en particulier chez *Klebsiella pneumoniae*. Cependant, ce type de mécanisme affectant préférentiellement la Céfoxitine et le C2G semble difficile à distinguer du point de vue phénotypique de la résistance par modification des porines.

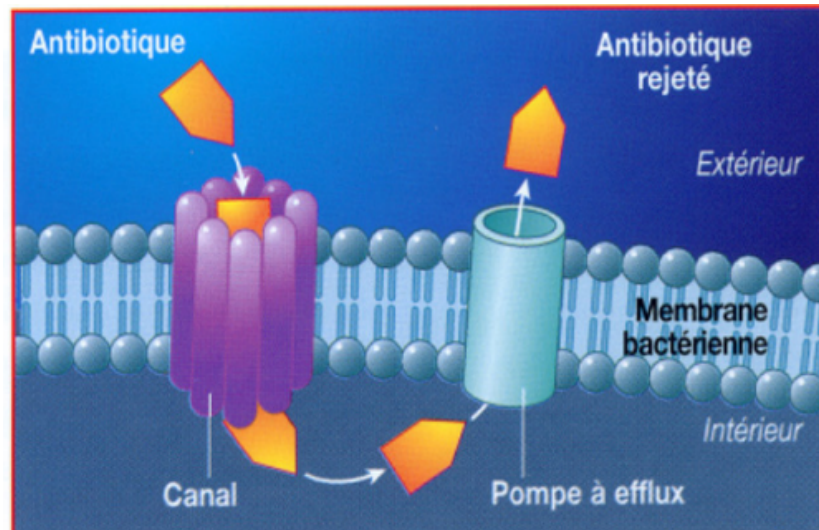


Figure 1 : Pompe d'efflux chez un bacille à Gram Négatif

4.4- Modifications de protéines de liaison des pénicillines (PLP)

La résistance aux β -lactamines, apportée par les PLP, joue un rôle plus important dans la résistance chez les bactéries Gram- que chez les bactéries Gram+.

Cette résistance peut se manifester par des mutations dans les gènes chromosomiques codant pour les PLP ou par l'acquisition de gènes étrangers codant pour de nouveaux PLP ayant une affinité différente pour les β -lactamines.

Partie 3 : Bêta-Lactamases à spectre étendu (BLSE)

I- Généralités sur les BLSE

I.1- Définition des BLSE

Les bêta-Lactamases à spectre étendu (BLSE) ont été décrites pour la première fois en 1983 en Allemagne, puis signalées en France, en Angleterre, dans d'autres pays européens et aux États-Unis. Ce sont des enzymes produites par certaines bactéries et qui inactivent les antibiotiques bêta-lactamines, y compris les céphalosporines de 3ème et 4ème génération. En fait, les BLSE sont responsables de la résistance aux pénicillines, aux oxyiminocephalosporines (Céftriaxone, Céfotaxime, Céfotaxime) et aux Monobactames (Aztréonam). Par contre, ils n'inactivent pas les Céphamycines (Céfoxitine) ou les Carbapénèmes (Imipénèmes). Les gènes de résistance de type TEM, SHV, OXA et CTX-M représentent les familles majeures de BLSE.

I.2- Classification des BLSE

Les deux schémas les plus couramment utilisés pour classer les BLSE sont celui d'Amblar qui est basé sur l'homologie de séquence des acides aminés et celui de Bush-Jacoby-Medeiros qui est basé sur les propriétés fonctionnelles des enzymes.

a- Classification des Bêta-lactamases à spectre étendu selon Amblar

La classification structurelle d'Amblar, proposée dans les années 1970, tient compte des analogies de séquences peptidiques, en particulier celles du site de l'enzyme.

Selon Amblar, les β -lactamases peuvent être regroupées en 4 classes principales : (6)

- Classe A : elle correspond aux Bêta-lactamases inhibées par l'acide clavulanique.
- Classe B : elle correspond aux métallo-bêta-lactamases inhibées par l'acide éthylène diamine Tétracétique (EDTA).
- Classe C : elle correspond aux Céphalosporinases non inhibées par l'acide clavulanique.
- Classe D : elle correspond aux Oxacillinases de sensibilité variable à l'acide clavulanique.

Les bêta-lactamases des classes A, C et D sont appelées sérine active parce qu'elles contiennent une sérine active responsable de l'ouverture du cycle Bêta-lactame. Les BLSE appartiennent soit au groupe A (types TEM, SHV, CTX-M) soit en plus petit nombre au groupe D (type OXA). Tandis que pour le groupe C, les Bêta-lactamases sont des Céphalosporinases (type AMP) mais non des BLSE. En revanche, les Bêta-lactamases de classe B nécessitent un ou deux atomes de zinc ionisés (Zn^{2+}) pour hydrolyser les Carbapénèmes et sont donc communément appelés métallo-Bêta-lactamases. (6,7)

b- Classification des Bêta-lactamases à spectre étendu selon Bush et al

La classification fonctionnelle de 1988 de Bush, Jacoby et Medeiros (Bush et al.) est basée sur l'activité hydrolytique (nature du substrat) et la sensibilité aux inhibiteurs (profil d'inhibition) des Bêta-lactamases à large spectre. Il est plus ramifié, en particulier par la présence de sous-classes pour les Bêta-lactamases de classe A. C'est ainsi qu'apparaît la notion de groupe fonctionnel tel que le groupe 2b qui est subdivisé en sous-groupes incluant le groupe 2be représentatif de β -lactamases à large spectre. (8,9)

Tableau 4 : Classification des Bêta-lactamases selon Bush et Ambler

Ambler class	Bush-Jacoby Medeiros group	Active site	Enzyme type	Host organisms	Substrates
A	2b, 2be, 2br, 2c, 2e, 2f	Serine	Broad-spectrum β -lactamases (TEM, SHV) ESBL (TEM, SHV, CTX-M) Carbapenemases (KPC, GES, SME)	Enterobacteriaceae and nonfermenters	Ampicillin, cephalothin Penicillins, 3rd-generation cephalosporins All β -lactams
B	3	Zinc-binding thiol group	Carbapenemases (VIM, IMP)	Enterobacteriaceae and nonfermenters	All β -lactams
C	1	Serine	AmpC cephamycinases (AmpC) AmpC cephamycinases (CMY, DHA, MOX FOX, ACC)	<i>Enterobacter</i> species <i>Citrobacter</i> species	Cephameycins, 3rd-generation cephalosporins Cephameycins, 3rd-generation cephalosporins
D	2d	Serine	Broad-spectrum β -lactamases (OXA) ESBL (OXA) Carbapenemases (OXA)	Enterobacteriaceae Enterobacteriaceae and nonfermenters	Oxacillin, ampicillin, cephalothin Penicillins, 3rd-generation cephalosporins All β -lactams

II-Les types de gènes de résistance chez les entérobactéries productrices de BLSE

Il existe actuellement différents types de BLSE codés par plasmide, dont les groupes TEM, SHV, OXA, CTX-M.

La distinction entre ces enzymes est due à des mutations génétiques. En effet, de petits changements peuvent survenir dans certains nucléotides et conduire à la modification des acides

aminés situés dans la partie active de l'enzyme, conduisant à l'hydrolyse de certains antibiotiques et donc à l'apparition de la résistance des bactéries porteuses de BLSE. En Europe occidentale, les BLSE plasmidiques sont principalement des CTX-M et des SHV.

a- Type TEM (Temoneira - nom du patient)

En 1965, la première β -lactamase plasmidique de type TEM (TEM-1) a été isolée en Grèce, à partir d'une souche d'*Escherichia coli* chez une patiente nommée Temoneira, d'où la nomination. La plupart des BLSE de ce type sont dérivées par 4 à 7 mutations ponctuelles de l'enzyme originale (TEM-1 ou TEM2). Actuellement, il existe plus de 140 enzymes TEM. Ces mutations rendent l'enzyme capable d'hydrolyser le C3G, mais aussi plus vulnérable à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique). Cependant, d'autres mutations peuvent conférer une résistance aux inhibiteurs. Ces variantes sont appelées TRI (TEM résistantes aux inhibiteurs). Les enzymes dérivées par des mutations permettant l'hydrolyse au niveau du C3G et des inhibiteurs sont de plus en plus courantes.

b- Type SHV

Après TEM, le type SHV est celui qui comporte le plus grand nombre (supérieur à 70) d'enzymes BLSE. Comme dans le cas des enzymes de type TEM, les enzymes de type SHV dérivent par mutations ponctuelles de l'enzyme originale SHV-1. L'origine de ces enzymes est probablement une variante de l'enzyme chromosomique K2 de *Klebsiella pneumoniae*.

c- Type OXA

Ces enzymes possèdent une grande activité catalytique pour la Cloxacilline, l'Oxacilline et la Mécicilline. À l'exception de l'OXA-18, elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. Il y'a actuellement 11 BLSE du groupe OXA, dérivées de OXA-1, OXA-2 et OXA-10. Ces enzymes ont été fréquemment observés chez *Pseudomonas aeruginosa* mais aussi chez les entérobactéries, particulièrement en France et en Turquie. Les BLSE de type OXA sont codés par de gènes portés par des éléments mobiles comme les transposons et intégrons. **(10,11,12)** Certaines enzymes de cette classe (OXA-21, OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-58) confèrent une résistance aux Carbapénèmes. **(13,14)**

d- Type CTX-M (Céfotaximase-Munich)

Ces enzymes « émergentes » sont les plus courantes chez les entérobactéries à l'échelle mondiale après une propagation rapide depuis le milieu des années 1990. En ce qui concerne leur spectre d'activité, ils hydrolysent préférentiellement le Céfotaxime, d'où leur nom de Céfotaximases et confèrent aussi une résistance marquée au Céfepime.

D'après l'appariement de leurs séquences d'acides aminés, ils semblent provenir de Céphalosporinases chromosomiques de bactéries du genre *Kluyvera*. Par contre, l'inactivation de la Céfotaxime est plus limitée, à l'exception des enzymes récemment décrites (CTX-M-15, CTXM-16, CTX-M-27) qui ont une capacité hydrolytique élevée pour la Céfotaxime. Les CTX-M sont plus fortement inhibés par le Tazobactam que par l'acide clavulanique. Ces BLSE ont été trouvées principalement chez *Escherichia coli* et *Salmonella enterica*. Leur émergence parmi les autres espèces et genres d'entérobactéries est rapide. Les groupes 1, 9 et 2 sont actuellement prédominants.

III-Epidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE

III.1- Dissémination des entérobactéries productrices de BLSE

La dissémination de souches d'entérobactéries produisant les BLSE est un phénomène complexe qui résulte de trois mécanismes enchevêtrés.

- Le premier mécanisme est la dissémination clonale, dans laquelle une souche productrice de BLSE peut se propager par contact horizontal d'un patient à l'autre. **(15)**
- Le deuxième mécanisme est la transmission d'un ou plusieurs plasmides à une autre souche (de la même espèce ou d'une espèce différente).
- Le troisième mécanisme est le transfert d'éléments de résistance présents dans des transposons ou intégrons entre des plasmides différents.

La transmission peut provoquer des épidémies locales dans une unité de soins intensifs, un hôpital ou un centre de soins. Elle peut être étendue au niveau interhospitalier par le transfert de patients colonisés ou infectés. **(16)**

Dans la majorité des cas, la transmission nosocomiale est liée au contact avec les mains du personnel soignant. Des sources de contamination ponctuelles à partir de l'environnement ont été occasionnellement impliquées, comme les stéthoscopes, thermomètres, endoscopes et appareils d'échographie, baignoires, gels de bains, shampoings, ongles artificiels chez les infirmières, ainsi que les insectes comme les blattes. **(17)**

III.2- Infections et facteurs de risque liés aux BLSE

Les bactéries productrices de BLSE ont démontré une capacité à se propager en provoquant de nombreuses épidémies aux niveaux local, régional et international, souvent avec les services de réanimation comme source. De nouveaux défis sont apparus, comme l'émergence des BLSE chez les espèces causant des infections dans la communauté, l'augmentation de la multirésistance aux médicaments associée aux BLSE et l'émergence de la résistance aux Carbapénèmes.

Tableau 5 : Caractéristiques des infections à BLSE

	Communautaire	Nosocomiale
Organisme	Escherichia Coli	Klebsiella (et autres)
Type de BLSE	CTX-M	TEM et SHV
Infection	Plusieurs infections urinaires, mais aussi bactériémie et gastroentérite	Infections respiratoires, intra-abdominales...
Résistance aux antibiotiques	Multirésistance	Multirésistance
Epidémiologie moléculaire	Généralement pas de relation clonale entre les isolats bien que des épidémies aient été décrites	La plupart du temps clonale
Facteurs de risque	Infections urinaires à répétition, Pathologies sous-jacentes, antibiothérapie préalable (céphalosporines et Fluoroquinolones), hospitalisation préalable, diabète ...	Durée d'hospitalisation, sévérité de la maladie, durée de séjour en réanimation (intubation, ventilation mécanique..), Antibiothérapie préalable

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons récupéré un prélèvement clinique du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II (CHU) de Fès afin de rechercher le support moléculaire de la résistance d'une entérobactérie productrice de BLSE.

Après avoir isolé puis identifié la bactérie *Klebsiella pneumoniae*, nous avons réalisé un antibiogramme pour définir le profil de résistance et nous avons détecté le typage moléculaire codant à cette résistance par PCR.

1. Etude de la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques : L'antibiogramme

* Principe

L'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en gélose (méthode des disques), selon le communiqué du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM. 2018), qui repose sur la connaissance du phénotype sauvage caractéristique de l'espèce et de différents phénotypes de résistance acquise.

* Techniques

a- Préparation de la culture fraîche

Pour obtenir une culture jeune, il faut suspendre une colonie bien isolée, l'ensemencer sur une gélose nutritive et ensuite l'incuber pendant une durée allant de 18-24h à une température de 37°C.

b- Réalisation de l'inoculum

Suite à la préparation du milieu non sélectif gélosé Mueller-Hinton, une dilution au 1/10 dans l'eau physiologique (0,9 % NaCl) est préparée et bien homogénéisée. Elle est équivalente au standard McFarland 0,5.

c- Ensemencement par écouvillonnage

L'ensemencement se fait sur des boîtes de Pétri gélosées en milieu (MH) par écouvillonnage. Les stries doivent être extrêmement serrées et reprises trois fois à trois angles séparés de 60°C, sans oublier les bords de la gélose.

d- Antibiotiques utilisés

Les antibiotiques étudiés lors de l'antibiogramme réalisé pour les entérobactéries se présentent comme suit :

- Aminopénicillines : Amoxicilline / Acide clavulanique (AMC) (10 μ g).
- Une céphalosporine de deuxième génération : la Céfoxitine (FOX) (30 μ g).
- Trois céphalosporines de troisième génération : le Céfotaxime (CTX) (30 μ g), la Céfotazidime (CAZ) (30 μ g) et la Céfépime (FEP) (30 μ g).
- Deux aminosides : la Gentamicine (CN) (10 μ g) et l'Amikacine (AK) (30 μ g).
- Deux quinolones : l'Acide nalidixique (NA) (30 μ g) et la Ciprofloxacine (CIP) (5 μ g).
- Un sulfamide : Sulfaméthoxazole (SXT) (1,25-23,75 μ g).
- Un carbapénème : Imipénème (IPM) (10 μ g).
- Fluoroquinolone : Norfloxacine (NOR) (5 μ g).

e- Application des disques d'antibiotiques

Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm centre à centre à l'aide d'une pince flambée et incubés pendant 18-24 h à 35 ° C en atmosphère ordinaire.

Ils sont disposés de manière à ce que le disque porteur de l'Amoxicilline / acide clavulanique (AMC) soit placé en face d'un ou deux céphalosporines de 3ème génération : Céfotaxime (CTX), Céfotazidime (CAZ). Ceci consiste à rechercher une image de synergie permettant la détection de β -lactamases à spectre étendue chez une souche donnée entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de B-lactamase et les disques de céphalosporines de troisième génération (Céfotaxime, Céfotazidime et Céfépime) et l'aztréonam. Cette image est dite «bouchon de champagne».

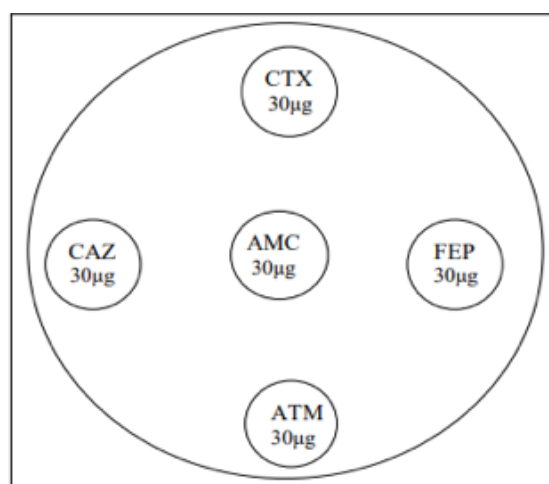


Figure 2 : Disposition des disques d'antibiotiques pour le test de synergie

f- Lecture

La lecture de l'antibiogramme se fait par mesure avec précision des diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée. Ensuite, il faut comparer ces résultats aux valeurs critiques.

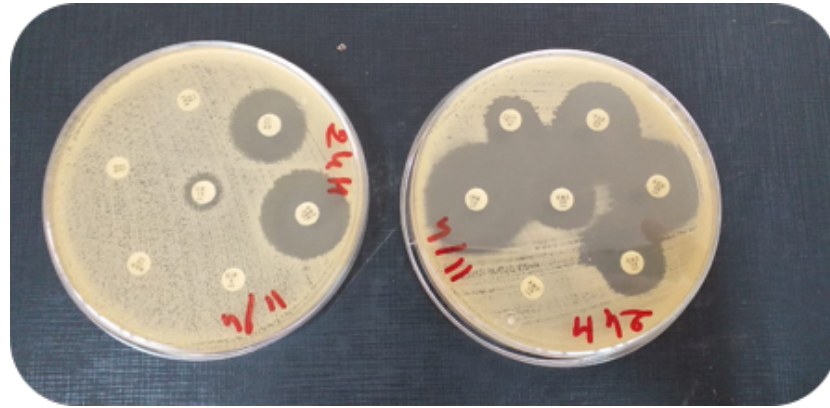


Figure 3 : Figure montrant le résultat du test de synergie

La production des enzymes BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques d'AMC et les C3G.

L'antibiogramme effectué sur cette EBLSE a permis d'étudier le profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques testés.

2. Recherche du gène de résistance blaCTXM1 par la méthode PCR

On parle de déterminisme génétique quand la résistance bactérienne aux antibiotiques est liée à une information dont le support est un élément génétique qui peut être le chromosome bactérien, un plasmide ou un transposon. Ce déterminisme génétique est de mieux en mieux appréhendé grâce aux progrès des techniques de biologie moléculaire tels que la réaction de polymérisation en chaîne « PCR » et le séquençage.

En effet, lors de la détection génotypique, des techniques de détection de gènes plasmidiques spécifiques (CTX-M, TEM et SHV) par PCR conventionnelle ou en temps réel sont utilisées.

Cette étude s'intéressait plus précisément à la détection du gène blaCTXM1 qui est notamment le plus fréquent.

2.1- Définition de la PCR

La PCR est une réaction de polymérisation en chaîne. C'est une technique d'amplification enzymatique in vitro (Taq polymérase) qui permet à partir d'un fragment d'ADN ou d'ARN, d'obtenir un grand nombre (plusieurs millions) de copies identiques à ce même fragment en quelques heures.

2.2- Procédure pour réaliser l'extraction d'ADN et la PCR pour le gène CTX-M1

a- Extraction d'ADN

Pour extraire de l'ADN total, nous avons adopté la méthode du choc thermique. A partir des cultures jeunes, nous avons prélevé cinq colonies à l'aide d'une anse stérile et nous les avons mises dans des tubes eppendorfs contenant 500 μ L d'eau distillée stérile. Les tubes doivent être homogénéisés par vortex. Ensuite, ils sont mis dans un bain-marie à 100°C pendant 10 minutes puis immédiatement dans la glace durant 2 min. Enfin, une centrifugation de 14000tr/min pendant 10minutes a été réalisée pour récupérer l'ADN présent dans le surnageant et qui va servir dans la réaction PCR. Une aliquote de chaque ADN a été conservée à -20°C.

b- Mix PCR

Le mix PCR est un mélange réactionnel qui s'effectue toujours sur la glace. Le volume final utilisé est de 50 μ L, le tableau ci-dessous représente les différents réactifs suivant un ordre précis ainsi que les volumes utilisés.

Tableau 6 : volume des composants du Mix PCR

Réactifs	Volume des réactifs (en μ l)
Eau ultrapure	38,3
Tampon contenant du MgCl ₂	7,5
Amorce F (10 μ M)	1
Amorce R (10 μ M)	1
Taq polymérase	0,2
ADN	2

Remarque : on réalise un témoin négatif dans lequel l'ADN est remplacé par de l'eau afin de déceler une éventuelle contamination. Et aussi, un témoin positif qui permet de valider la bonne conservation des réactifs, de l'enzyme responsable de la polymérisation et des performances du thermocycleur.

c- Programme du thermocycleur

La technique PCR est réalisée à l'aide d'un dispositif programmable appelé thermocycleur dans lequel sont placés les microtubes contenant le mélange réactionnel. Ce dispositif permet

d'exposer les tubes à des températures sélectionnées. La réaction PCR est extrêmement rapide, ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles). Elle se déroule en 3 étapes :

- **La dénaturation thermique de l'ADN** : à 95°C, les liaisons d'hydrogènes sont rompues et les 2 brins de l'ADN se séparent. L'ADN passe de la forme double brin à la forme simple brin dans le milieu.

- **Hybridation des amorces** : le milieu réactionnel contient 2 amorces, chacune complémentaire d'un des 2 brins. La température permettant la fixation des amorces sur les monobrans d'ADN est comprise entre 50°C et 65°C. Les amorces en larges excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires.

- **Extension des amorces** : intervention de la Taq polymérase (ADN polymérase) qui allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléiques complémentaires de la séquence de la matrice auquel elle est hybridée. Cette étape s'effectue à une température de 72°C.

Tableau 7 : Les conditions d'amplifications du gène blaCTXM dans le thermocycleur en 35 cycles

Etapes d'amplification	Conditions de Température/durée du gène bla _{CTX-M}
Dénaturation initiale	94°C/5min
Dénaturation	94°C/1min
Hybridation	60°C/1min
Elongation	72°C/1min
Elongation finale	72°C/5min

2.3- Electrophorèse sur gel d'agarose

- Préparation du gel d'agarose à 1,5% :

Pour la préparation d'un gel d'agarose à 1,5% , il faut réaliser le protocole suivant :

- Dans un bécher ; mélanger 1,5g d'agarose avec 100ml de tampon TBE 1X.
- Faire fondre le mélange 2 min au micro-onde.
- Laisser refroidir à une température de 60°C.

- Ajouter 1,5 μ l de bromure d'éthidium.
- Couler le gel dans le moule sur 3 à 5 mm d'épaisseur.
- Laisser refroidir.

- Préparation du tampon TBE :

La préparation de 100ml de TBE 10X à pH= 8 se compose des constituants cités dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Composition de 100mL du tampon TBE 10X

Tris base	10,8g	390 Mm
EDTA	4ml	20mM
Acide borique	5,5g	890Mm
Eau distillée	q.s.p 100ml	

Ensuite, il faut suivre les instructions suivantes :

- Bien mélanger les composés pour homogénéiser le tampon.
- Diluer le 1/10 : (100ml de tampon+1900ml de l'eau distillée) pour avoir un tampon TBE 1X.
- Conserver à température ambiante.

- Electrophorèse sur gel d'agarose :

L'électrophorèse est une méthode qui permet la séparation des protéines ou des acides nucléiques grâce à leur différence de masse sous l'action d'un champ électrique.

La migration est réalisée à 100Volts (55mA) et dure 1 heure.

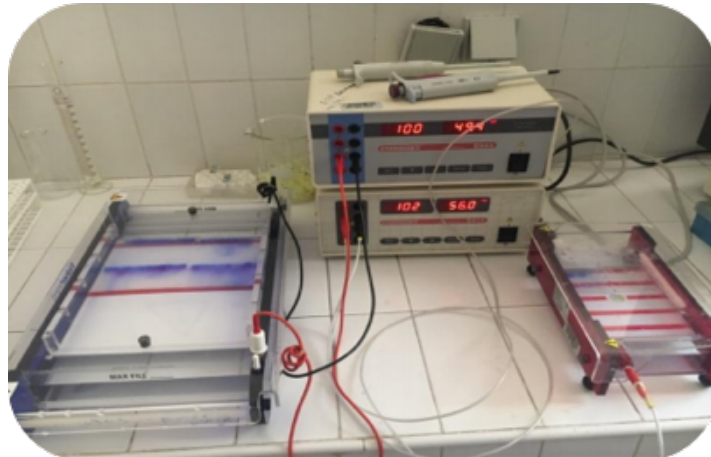


Figure 4 : Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%

- Révélation :

Après la migration, le gel a été immergé dans une solution de TBE contenant bromure d'éthidium pendant 15 à 20 minutes sous agitation mécanique.

La lecture se fait sous UV.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

RÉSULTAT

Au cours de ce stage, notre travail consistait à rechercher le support moléculaire de la résistance des entérobactéries productrices de BLSE.

Après avoir observé un profil de résistance BLSE de *Klebsiella pneumoniae*, nous avons réalisé la technique de détection génotypique du gène plasmidique blaCTXM1 qui est notamment le plus répandu dans le monde entier.

L'électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) des produits d'amplification de la PCR du gène blaCTXM1 (863pb) de *Klebsiella pneumoniae* a donné le résultat suivant : (voir Figure 5).

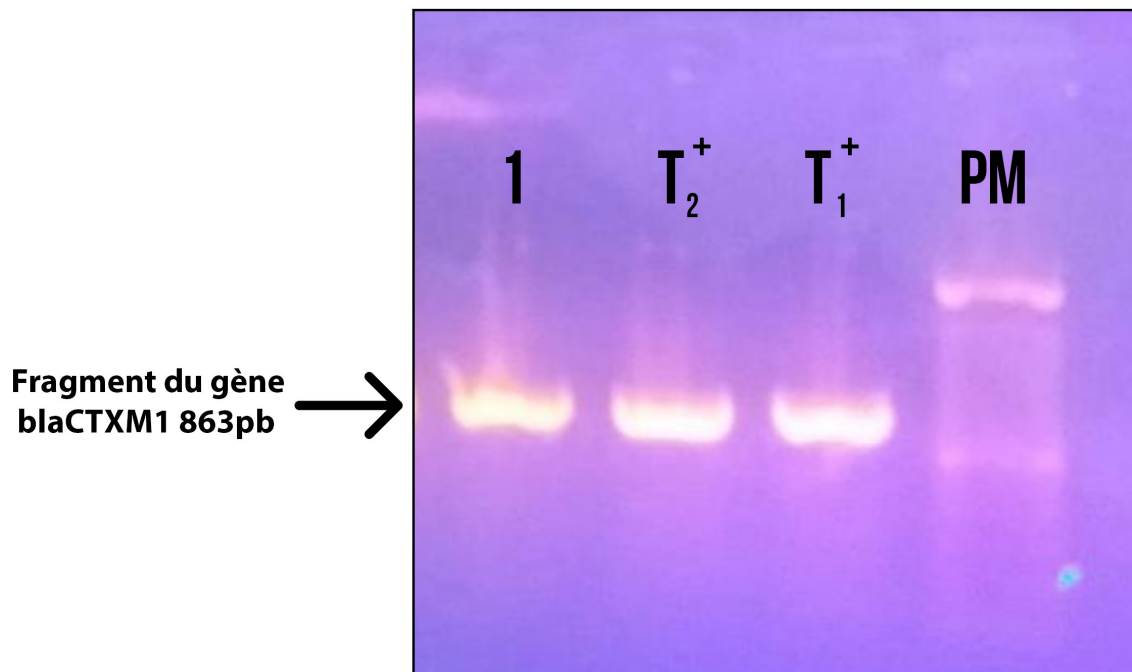


Figure 5 : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification de la PCR du gène blaCTXM1 (PM : marqueur de poids moléculaire, T₁⁺ : premier témoin positif, T₂⁺ : deuxième témoin positif, 1 : souche de *Klebsiella pneumoniae* étudiée)

* Interprétation

Le résultat obtenu suite à la migration se traduit par :

- La présence de la bande attendue (863pb) au niveau des deux témoins positifs (T₁⁺ et T₂⁺) nous permet de valider la bonne conservation de tous les réactifs.

-L'apparition de la bande (863pb) au niveau de la souche étudiée *Klebsiella pneumoniae* confirme la présence du gène blaCTXM1.

Suite à ce résultat, nous pouvons confirmer que *Klebsiella pneumoniae* possède le gène de résistance blaCTXM1.

DISCUSSION

L'objectif de cette étude était de définir le profil de résistance BLSE d'une entérobactérie, ainsi que de déterminer le support moléculaire codant à cette résistance par PCR.

Dans le cadre de cette recherche, la résistance à quelques antibiotiques a été évaluée chez une souche identifiée *Klebsiella pneumoniae* qui est une des bactéries les plus souvent isolées en milieu hospitalier, elle est impliquée dans des infections nosocomiales sévères. L'antibiogramme réalisé a montré la production des enzymes BLSE qui se traduit par l'apparition d'une image de synergie entre les disques d'AMC et les C3G (CTX et CAZ). Cette résistance aux antibiotiques est commune chez cette espèce, conduisant à des choix thérapeutiques restreints et à une durée d'hospitalisation prolongée pour les patients infectés.

Le support génétique de cette résistance est principalement plasmidique. Dans les années 1980–1990, les principaux gènes de résistance codant pour des enzymes de type β -lactamases à spectre étendu associés à *K. pneumoniae* dérivait des β -lactamases TEM et SHV. Une modification de cette distribution mondiale est observée. Des BLSE de type CTX-M est constatée et depuis leur découverte, le nombre d'isolats cliniques produisant les CTX-M à (BLSE) n'a cessé d'augmenter. Ces gènes deviennent de plus en plus répandus dans le monde entier, aussi bien dans le milieu communautaire que le milieu hospitalier.

La large diffusion des E-BLSE dans le milieu communautaire peut être expliquée par la diffusion en communauté de germes porteurs des gènes de résistance codant pour les BLSE, notamment des BLSE de type CTX-M.

Afin de rechercher les gènes CTX-M1, nous avons adapté une technique d'amplification PCR rapide en temps réel, utilisant des amorces dégénérées spécifiques de tous les allèles blaCTXM1. L'amplification, suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose a montré une bande de 863pb correspondant au produit d'amplification du gène blaCTXM1.

CONCLUSION

La diffusion des entérobactéries productrices de (BLSE) dans nos hôpitaux constitue une préoccupation majeure en milieu hospitalier. En raison de leur diffusion épidémique et de leur multirésistance aux antibiotiques, elles réduisent de manière importante les alternatives thérapeutiques pour le traitement des infections sévères. Ces bactéries multirésistantes ont été rapportées dans plusieurs pays, notamment au Maroc.

En effet, les BLSE sont retrouvées chez une vaste proportion de bacilles à gram négatif, mais les entérobactéries représentent les germes les plus incriminés. Les infections à entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi constituent un risque infectieux croissant. Les principaux facteurs de risque associés seraient les infections urinaires répétées, âge, transferts d'autres établissements, hospitalisations récentes, dispositifs invasifs, la prise d'antibiotiques, en particulier de céphalosporines, aminosides et de Fluoroquinolones ainsi qu'un antécédent d'hospitalisation.

Pour cela, l'émergence des EBLSE permet de rappeler qu'il est évidemment nécessaire d'être plus attentif aux divers types de souches qui circulent dans nos hôpitaux.

La gestion du risque infectieux que représente la diffusion de ces souches multirésistantes exige une collaboration étroite entre les différents acteurs de santé concernés (Médecins cliniciens, Infectiologues, Bactériologistes, Hygiénistes, Personnels soignants...).

Des mesures d'hygiène strictes restent indispensables au sein des services pour limiter la diffusion de ces souches multirésistantes, on note : L'hygiène des mains, tenue de protection, port de gants, gestion du matériel et des surfaces souillées, circuit du linge, des déchets et des prélèvements biologiques, la détection précoce des porteurs lors de leur admission à l'hôpital et le renforcement des mesures d'hygiène autour des patients.

Ce stage, avait pour objectif de détecter le support moléculaire de la résistance des EBLSE tout en appliquant les différentes techniques du laboratoire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Site de l'organisation mondiale de la santé <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/résistance-aux-antibiotiques> . Consulté le 12 mai 2019.
2. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-51
3. Qureshi ZA, Paterson DL, Pakstis DL, Adams-Haduch JM, Sandkovsky G, Sordillo E, et al. Risk factors and outcome of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* bloodstream infections. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37(1): 26–32.
4. Paul Singleton Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies 6eme édition les antibiotiques 455
5. David M Livermore. “Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact, «Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases -135- Society of America 36, no. Suppl. 1 (January 15, 2003): S11–23.
6. Ambler RP. “The Structure of Beta-Lactamases,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 289, no. 1036 (May 16, 1980): 321–331.
7. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352:380-91.
8. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 ;39 (6): 1211–33.
9. Ruppé E. Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques* 2010 ; 12 : 3-16.
10. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001 ;14 :933–51.
11. Thomson KS, Moland ES. Version 2000: the new β -lactamases of Gramnegative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect* 2000 ;2 :1225–35.
12. Naas T, Nordmann P. OXA-type β -lactamases. *Curr Pharm Des* 2005 ;5 : 865–79.
13. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002 ;8 :321–31.
14. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000 ;3 :489–95.

15. Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987; 2:302–6.
16. Monnet DL, Biddle JW, Edwards JR, Culver DH, Tolson JS, Martone WJ, et al. Evidence of interhospital transmission of extended-spectrum β -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the USA, 1986 to 1993. *Infect Control Hosp Epidemiology* 1997; 18:492–8.
17. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Revu* 2005 ;18 :657–86