

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP



FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

ANNEE 2018

N° 135

**Caractérisation moléculaire de la résistance aux Fluoroquinolones
des souches de *Escherichia coli* uropathogènes BLSE isolées au
Laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar.**

Mémoire

Du diplôme de Master de Microbiologie

Fondamentale et Appliquée 2017-2018

Présenté et soutenu publiquement le 30 Juillet 2018

par

Kossivi Sylvestre ATIKAKO

MEMBRES DU JURY

Président : Pr Ndèye Coumba TOURE-KANE

Membres :

Mme. Halimatou Diop NDIAYE, Maître de conférences Agrégé

M. Camara MAKHTAR, Maître de Conférences Agrégé

M. Abdoulaye SECK, Maître-Assistant

Directeur de mémoire : Pr Cheikh Saad Bouh BOYE

Co-Directeur : Dr Abdoulaye Seck, Maître-Assistant

Dédicaces

A mon Papa Kokou Mawusi ATIKAKO

A ma mère Sossi AKOLI

A ma sœur Afi Djigbodi ATIKAKO

A mes frères et sœurs

Remerciements

Je remercie **Professeur Cheikh Saad Bouh BOYE** coordonateur du Master microbiologie fondamentale et appliquée. Je vous remercie également pour les opportunités de formation que vous offrez aux étudiants Africains de toute origine afin de parfaire leur cursus et d'apporter leur contribution à l'évolution de la Microbiologie en Afrique. Longue vie à vous Professeur.

Je remercie **Professeure Coumba TOURE-KANE** d'avoir bien voulu présider le jury de ce travail. Je vous remercie également pour vos enseignements, vos conseils, votre disponibilité malgré vos nombreuses occupations scientifiques et pédagogique, vous contribuez à l'évolution de la Microbiologie en Afrique. Longue vie à vous Professeur.

Je remercie **Professeure Halimatou Diop NDIAYE**, Maître de conférences Agrégé d'avoir bien voulu juger ce travail. Merci également pour vos enseignements et conseils tout au long de la formation. Longue vie à vous Professeure.

Je remercie **Professeur Camara MAKHTAR**, Maître de Conférences Agrégé, d'avoir bien voulu juger ce travail. Merci également pour vos enseignements et conseils tout au long de la formation. Longue vie à vous Professeur.

Je remercie **Dr. Abdoulaye SECK**, Maître-Assistant, qui m'a accueilli au laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar et m'a proposé ce projet de mémoire. Merci également pour vos enseignements, votre encadrement, votre rigueur scientifique et votre disponibilité malgré vos multiples occupations pédagogiques et scientifiques. Vous êtes un modèle pour moi Docteur.

Je remercie **Professeure Amy GASSAMA** de m'avoir accepté au sein de son unité de bactériologie expérimentale.

Je remercie **Dr. Assane DIENG**, pour ses précieux conseils, son aide et sa disponibilité permanente au cours de ma formation.

Je remercie **Dr. Raymond BERCIION** chef service du LBM à l'institut pasteur de Dakar pour ses conseils et son aide au cours de mon stage de mémoire.

Je remercie le Consul **Pascal Bléwussi DAUGBEY** Haut représentant du TOGO au Sénégal pour leur aide cruciale aux étudiants Togolais voulant s'inscrire dans les universités de Dakar.

Je remercie **Madame Dior DIENG-CISSE** pour sa disponibilité, ses conseils et son assistance au cours de cette formation.

Mes remerciements au personnel du laboratoire de Biologie Médicale et au personnel de l'Unité de Bactériologie Expérimentale de l'Institut Pasteur spécialement Monsieur **ABDOUL Aziz Wane, SOW Ousmane, ISSA Ndiaye** du Laboratoire de Dakar ainsi qu'à tout le personnel de l'institut pasteur de Dakar.

Mes remerciements au personnel du laboratoire de Bactériologie-virologie de l'hôpital Universitaire Aristide le Dantec de Dakar.

Merci à tous mes amis spécialement à **M. Yves Kodjo VIGBEDOR, DOSSOUVI Komla et AKAKPO Emmanuel** pour leur soutien et leurs conseils au cours de ces deux ans de formation.

Merci à ma famille et à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué à l'élaboration de ce travail et à la réussite de cette formation.

Liste des abréviations

AAC	: Aminoglycoside acétyltransférase
<i>aac (6')-Ib-cr</i>	: Acétylase en 6' isoforme Ib pour ciprofloxacine résistante
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ATB	: Antibiotique
BET	: Bromure d'éthidium
BLSE	: Bêta- lactamase à spectre Elargi ou Etendu
DAEC	: <i>E. coli</i> à adhérence diffuse
EAEC	: <i>Escherichia coli</i> entéro-agrégatifs
E. coli	: <i>Escherichia coli</i>
ECE	: <i>Escherichia coli</i> Entérique
EHEC	: <i>E. coli</i> entéro-hémorragiques
EIEC	: <i>E. coli</i> entéro-invasifs
EMB	: Eosine blue de méthylène
EPEC	: <i>E. coli</i> entéro-pathogène
ETEC	: <i>E. coli</i> entéro-toxinogènes
ExPEC	: Extra-intestinal pathogenic <i>E. coli</i>
FQ	: fluoroquinolones
Gyr	: Gyrase
InPEC	: Intestinal pathogenic <i>E. coli</i>
ITU	: Infection du tractus urinaire
MFS	: <i>Major Facilitator Superfamily</i>
MT	: Marqueur de taille
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
ParC	: Topoisomérase IV C
Pb	: Paire de bases
PCR	: Polymérase Chaîne Reaction
PMQR	: <i>Plasmid mediated quinolone resistance</i>
QepA	: Quinolones efflux pump A

QRDR : *Quinolone resistance determining region*
qnr : Quinolone resistance
Qnr : Protéine codée par le gène *qnr*
TM : Température matricielle

Table des matières

Introduction :	1
Première partie :	2
I. Généralités sur <i>Escherichia coli</i>	3
I.1. Historique.....	3
I.2. Taxonomie.....	3
I.3. Caractères bactériologiques.....	3
I.3.1. Caractères morphologiques.....	3
I.3.2. Caractères cultureux.....	4
I.3.3. Caractères biochimiques.....	4
I.3.3. Caractères antigéniques.....	4
I.4. Facteurs de virulence.....	5
I.5. Epidémiologie.....	6
I.5.1. Habitat.....	6
I.5.2. Mode de transmission.....	6
I.6. Pouvoir pathogène.....	7
I.6.1. Souches de <i>Escherichia coli</i> pathogènes à localisation intestinale.....	7
I.6.2. Souches de <i>Escherichia coli</i> à localisation Extraintestinale.....	8
II. Les fluoroquinolones	8
II.1. Structure et classification.....	8
II.2. Mécanisme d'action des fluoroquinolones.....	10
III. Résistance d'<i>E. coli</i> aux fluoroquinolones	10
III.1 Mécanisme chromosomique de la résistance aux fluoroquinolones.....	10
III.1.1. Perte d'affinité des fluoroquinolones pour les topoisomérases.....	10
III.1.2. Diminution de la perméabilité et surexpression des pompes à efflux.....	11
III.2. Mécanisme de la résistance plasmidique aux fluoroquinolones.....	11
III.2.1. Protection de la cible des fluoroquinolones.....	11
III.2.2. Acétylation enzymatique des fluoroquinolones.....	11
III.2.3. Excrétion des fluoroquinolones hors du cytoplasme.....	12
IV. Définition et principe de la technique PCR	13

IV.1. Définition.....	13
IV.2. Principe.....	13
V. Séquençage.....	14
2^{ème} partie : travail expérimental	15
I. Objectif.....	16
II. Cadre d'étude.....	16
III. Souches bactériennes.....	16
IV. Matériels et méthodes.....	16
IV.1. Matériels.....	16
IV.2. Méthodologie.....	17
V. Résultats.....	21
VI. Discussion.....	27
Références bibliographiques.....	32

Liste des tableaux

<u>Tableau I</u> : Résumé des facteurs de virulence	5
<u>Tableau II</u> : les différents mécanismes de résistance aux fluoroquinolones et gènes de résistances.....	12
<u>Tableau III</u> : Amorces utilisées pour la recherche des gènes de résistance aux fluoroquinolones.	18
<u>Tableau IV</u> : Composition du mélange réactionnel pour une PCR simplex.....	18
<u>Tableau V</u> : Composition du mélange réactionnel pour une PCR Multiplex.....	19
<u>Tableau VI</u> : Programmes PCR des gènes de résistance.....	20
<u>Tableau VII</u> : Répartition des gènes identifiés en fonction des souches.....	25

Liste des Figures

<u>Figure 1</u> : Aspect de <i>Escherichia coli</i> après coloration de Gram.....	3
<u>Figure 2</u> : Structure chimique des fluoroquinolones.....	9
<u>Figure 3</u> : Etapes de la PCR : amplification des fragments d'ADN.....	13
<u>Figure 4</u> : Dépôt des amplicons dans le gel d'agarose 1%.....	21
<u>Figure 5</u> : Répartition des gènes QRDR détectés.....	21
<u>Figure 6</u> : PCR duplex : <i>gyrA</i> et <i>parE</i>	22
<u>Figure 7</u> : PCR duplex : gènes <i>gyrB</i> , <i>parC</i>	22
<u>Figure 8</u> : Répartition des gènes PMQR détectés.....	23
<u>Figure 9</u> : PCR multiplex : <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrC</i>	23
<u>Figure 10</u> : Répartition des gènes <i>aac(6')-Ib</i> et <i>qepA</i> détectés.....	24
<u>Figure 11</u> : PCR simplex <i>aac(6')-Ib</i>	24
<u>Figure 12</u> : Répartition des Souches en fonction des gènes portés.....	26

Introduction

Les infections urinaires du tractus urinaire (ITU) constituent un problème majeur de santé publique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les infections urinaires à *Escherichia coli* (*E. coli*) sont de loin les plus fréquentes des infections nosocomiales et communautaires. *E. coli* est responsable de 90% de tous les ITU observées chez les patients non hospitalisés et jusqu'à 50% de toutes les infections nosocomiales [43].

E. coli est naturellement sensible à de très nombreux antibiotiques dont les fluoroquinolones (FQ). L'émergence de la résistance chez les souches d'*E. coli* a conduit à l'apparition des souches résistantes aux FQ. Cette résistance aux FQ est répandue dans le monde causant dans certaines régions des échecs thérapeutiques chez plus de la moitié des patients. Selon l'OMS, cette résistance compromet le traitement efficace des infections urinaires, mais aussi cela implique un coût plus élevé des soins pour ces patients [31].

La prévalence de souches productrices de bêtalactamase à spectre élargie (BLSE) et résistantes aux FQ est peu documentée en Afrique, plus particulièrement à Dakar. Les études réalisées en Afrique sur les souches de *E. coli* productrices de BLSE ont montré des taux de résistances de 48,9 % (283/580) à Dakar [10], 51% (203/398) au Maroc [4],

C'est dans ce cadre que nous avons mené cette étude dont l'objectif était de caractériser les gènes de résistance aux fluoroquinolones des souches d'*E. coli* productrices de BLSE isolées au laboratoire de biologie médicale (LBM) de l'Institut Pasteur de Dakar (IPD).

Première partie : Revue bibliographique

I. Généralités sur *E. coli*

I.1. Historique

C'est en 1885 que Theodore Escherich, un pédiatre allemand, a identifié pour la première fois la bactérie *E. coli* dans des selles de nourrissons, qu'il appela *Bacterium coli*. Son nom actuel lui a été donné par Castellani et Chambers en 1919 [3].

I.2. Taxonomie

E. coli appartient aux règnes des Bactéries, à l'embranchement des Protéobactéries, à la classe des Gamma protéobactéries, à l'ordre des Entérobactériales, à la famille des *Enterobacteriaceae* et au genre *Escherichia* [3, 15].

I.3. Caractères bactériologiques

I.3.1. Caractères morphologiques

E. coli est un bacille à Gram négatif à coloration bipolaire non sporulé. C'est une bactérie fine, allongée aux extrémités arrondies (figure 1). Elle est mobile grâce à une ciliature péritriche. Sa taille varie en fonction des conditions de croissance (entre 0,5 à 3 μm), pesant de 0,5 à 5 picogrammes. Bien qu'*E. coli* est généralement mobile grâce à une ciliature péritriche, certaines souches sont immobiles, et d'autres isolées d'infections extraintestinales possèdent une capsule polysaccharidique [2, 50].



Figure 1 : Aspect d'*Escherichia coli* après coloration de Gram

(<https://bacteriologynotes.com/morphology-of-e-coli/>; consulté le 29/06/2018)

I.3.2. Caractères cultureux

E. coli peut être facilement isolé à partir d'échantillons cliniques en utilisant des milieux de culture simples (Mac conkey et EMB). Elle se développe entre 18 à 24 heures à 37°C sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées. Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif [3, 48].

I.3.3. Caractères biochimiques

E. coli possède un métabolisme respiratoire et fermentaire avec une production de catalase sans production d'oxydase. *E. coli* possède une nitrate réductase, produit de l'indole à partir de tryptophane, n'utilise pas le citrate comme source de carbone, ne produit pas d'acétoïne ni d'uréase [3, 21].

I.3.4. Caractères antigéniques

Il existe près de 200 antigènes somatiques (O) décrits, près de 60 antigènes flagellaire (H), environ 70 antigènes capsulaires (K) et des antigènes fimbriales (F). Les différents antigènes somatiques, capsulaires et flagellaires permettent de donner les sérotypes de la souche d'*E. coli* [42].

- **Antigènes somatiques**

L'antigène somatique (O) permet de définir le sérotype d'*E. coli*. Il est présent sur la membrane externe de la bactérie, il est de nature lipopolysaccharidique et il est thermostable [38].

- **Antigènes flagellaires**

Il s'agit de l'antigène H présente sur le flagelle bactérien, il est de nature protéique (flagelline) thermolabile et spécifique du genre. Les antigènes H ne servent pas à l'identification des *E. coli* pathogènes mais présentent un grand intérêt du point de vue épidémiologique pour confirmer la présence d'un même sérotype en cas d'épidémie [34].

- **Antigènes capsulaires**

C'est l'antigène K de nature polysaccharidique présente sur la capsule bactérienne et dont la présence empêche la détection de l'antigène O, il est thermolabile et joue un rôle dans l'inhibition de la phagocytose [26, 38].

- **Antigènes fimbriales**

Il s'agit de l'antigène F de nature protéique, il est thermolabile et présent dans les pili [25].

I.4. Facteurs de virulence

En général, la capacité de la souche *E. coli* uropathogène (UPEC) à se déplacer du tractus intestinal, à coloniser et à provoquer l'infection dans les voies urinaires résulte d'une action cumulative de plusieurs facteurs de virulence. Ces facteurs de virulence comprennent des déterminants favorisant la résistance aux défenses de l'hôte, à l'adhésion et à l'augmentation de l'acquisition du fer [40].

Tableau I : Résumé des facteurs de virulence [16, 21, 24]

Facteurs	Activité	
Adhesines		
	▪ P fimbriae	Adhésion
	▪ Dr. Family	Adhésion
▪ Type I fimbriae	Adhésion	
Siderophore		
Aerobactine	Acquisition du fer	
Toxines		
	▪ Haemolysine (HlyA)	Lyse de érythrocytes et leucocytes
	▪ Cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1)	Inhibe l'activité phagocytaire
▪ Shigella like toxin	Arrêt de la synthèse protéique cellulaire, entraînant la mort des cellules cibles	
Antigène O	Antiphagocytaire	
Antigène K	Résistance au sérum	

I.5. Epidémiologie

I.5.1. Habitat

E. coli appartient à la flore commensale de l'Homme et de nombreux animaux. C'est une bactérie colonisatrice du tube digestif des animaux à sang chaud. Dans le tractus digestif, elle est localisée au niveau du colon et du cæcum et plus particulièrement dans le mucus recouvrant les cellules épithéliales de la paroi du tube digestif. Via les fèces, *E. coli* est rejetée dans les eaux environnementales par le biais des effluents, tels que les eaux usées, les lisières ou les déjections des animaux d'élevage et sauvages [13].

I.5.2. Mode de transmission

E. coli peut être transmis par contact direct avec les objets ou surfaces contaminés. La transmission d'une personne à l'autre se fait principalement par voie féco-orale. La transmission à l'homme peut se faire par contact direct avec des animaux contaminés ou un environnement contaminé par leurs excréments. La transmission à l'homme peut s'effectuer par la consommation d'aliments contaminés comme la viande hachée crue ou mal cuite, le lait cru, les salades et les légumes contaminés. Cette transmission se fait également par voie manuportée [13].

I.6. Pouvoir pathogène

L'infection urinaire survient généralement suite au passage d'*E. coli* du tractus intestinal ou du vagin, vers la région péri – urétrale par expression des facteurs de virulence (Cf. Tableau I). A partir de la zone péri- urétrale, *E. coli* remonte l'urètre et colonise la vessie entraînant une cystite. Certaines souches d'*E. coli* peuvent ensuite envahir et se multiplier à l'intérieur des cellules épithéliales et rénales pour provoquer une pyélonéphrite. A partir des reins *E. coli* peut ensuite envahir la circulation sanguine et entraîner d'autres complications [12, 23].

Les souches d'*E. coli* pathogènes sont généralement classés en deux grandes catégories selon leur capacité à provoquer une maladie. *E. coli* entérique (ECE) cause principalement des infections limitées à la muqueuse des intestins et des pathogènes extra-intestinaux (Ex PEC), qui ont la capacité de se propager à partir de l'intestin et vont provoquer des infections dans d'autres organes [50, 42].

I.6.1. Souches d'*E. coli* pathogènes à localisation intestinale

Les souches d'*E. coli* pathogènes intestinales sont regroupées sous la dénomination commune InPEC (Intestinal Pathogenic *E. coli*) [36]. On distingue sept pathovars au sein des In PEC :

➤ ***E. coli* Entéro-Toxinogènes (ETEC)**

L'ETEC est responsable de diarrhée infantile avec des conséquences fatales chez les enfants de moins de 5 ans. L'ETEC sécrète des toxines caractéristiques (les entérotoxines thermostables (ST), l'entérotoxine thermolabile (LT)). L'ETEC est la cause principale de la diarrhée chez les voyageurs [6].

➤ ***E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC)**

E. coli entérohémorragiques est responsable de diarrhée sanglante ou de colite hémorragique. La caractéristique de ce pathovar est la production de vérotoxine également connu sous le nom de Shiga toxine (Stx). Stx est produite dans le côlon et endommage le tissu entraînant une diarrhée sanglante [49].

➤ ***E. coli* entéro-invasifs (EIEC)**

Les EIEC sont très similaires dans leurs aspects biochimiques, génétiques et pathogéniques aux *Shigella spp.* Ils ont les mêmes mécanismes de pathogénicité [6].

➤ ***E. coli* entéro-pathogènes (EPEC)**

E. coli entéro-pathogène est une cause fréquente de diarrhée infantile dans les pays en développement. EPEC colonisent d'abord l'épithélium intestinal, puis entraîne un effacement de microvillosités à la surface des entérocytes et cause ainsi une diarrhée sanglante [8, 47].

➤ ***E. coli* à adhérence diffuse (DAEC)**

Les DAEC sont définis par leur profil d'adhérence sur les cellules HeLa et ont été associés à la diarrhée dans le monde. Elles sont également responsables d'infections récurrentes des voies urinaires [39].

➤ ***E. coli* adhérents et invasifs (AIEC)**

L'AIEC a la capacité d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales ainsi que la capacité à échapper à l'autophagie à l'intérieur des macrophages. Les AIEC sont souvent impliquées dans la maladie de Crohn [33].

➤ ***E. coli* entéro-agrégatifs (EAEC)**

Les EAEC sont responsables de diarrhées endémique et épidémique dans le monde entier [6]. Elles provoquent d'abord la colonisation du côlon, suivie de la sécrétion d'entérotoxines et de cytotoxines entraînant des lésions muqueuses importantes [29].

1.6.2. Souches d'*E. coli* pathogène à localisation Extraintestinale

Les souches d'*E. coli* pathogènes extra-intestinales sont regroupées sous la dénomination commune ExPEC (Extra intestinal Pathogenic *E. coli*) [44]. On distingue essentiellement deux pathovars au sein des ExPEC :

- les *E. coli* uro-pathogènes (UPEC),
- les *E. coli* responsables de méningites, le plus souvent chez le nouveau-né.

Les infections extra-intestinales à *E. coli* sont communes à tous les groupes d'âge et peuvent infecter n'importe quel organe ou site anatomique chez l'homme.

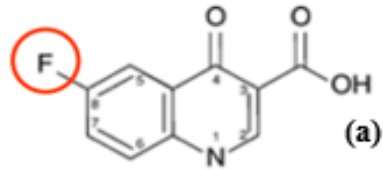
Le clone ST131 est responsable d'infections urinaires et de septicémies à travers le monde. Il est caractérisé par sa multirésistance aux antibiotiques dont les fluoroquinolones [45].

II. Fluoroquinolones

II.1. Structure et classification

La structure chimique des fluoroquinolones est un acide pyridine- β -carboxylique avec un azote en position 1, un carboxylate en position 3 et un carbonyle en position 4, avec addition d'une molécule de fluor en position 6. Cette dernière a augmenté l'activité des quinolones et leur distribution dans les tissus [7, 30]. Les fluoroquinolones ont pour structure commune l'acide nalidixique (Cf. figure a). Les fluoroquinolones sont classées en fonction de leur spectre d'activité et de leur date de mise sur le marché et on distingue :

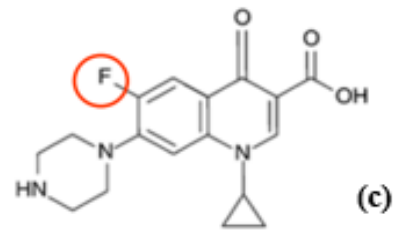
- Quinolones de 2^{ème} génération ou « premières fluoroquinolones » (Cf. figures b et c)
- Quinolones de 3^{ème} génération ou « nouvelles fluoroquinolones » (Cf. figures d, e, f et g)



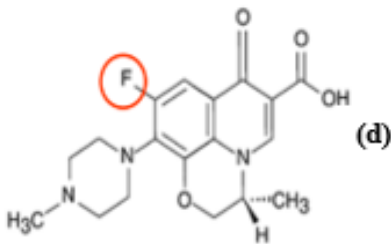
Structure commune aux fluoroquinolones



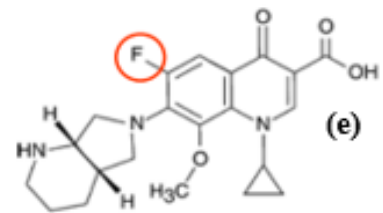
Norfloxacin



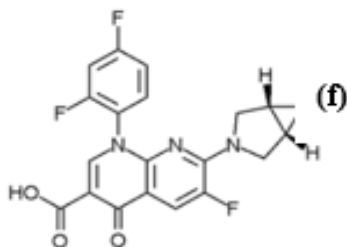
Ciprofloxacin



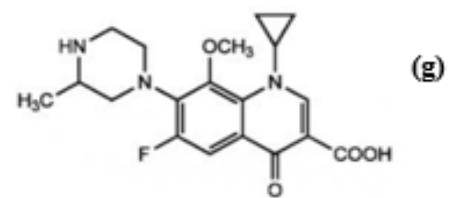
Levofloxacin



Moxifloxacin



Trovafloxacin



Gatifloxacin

Figure 2 : Structures chimiques des fluoroquinolones [9]

II.2. Mécanisme d'action des fluoroquinolones

Après avoir franchi la paroi bactérienne, les fluoroquinolones se fixent sur les complexes formés entre l'ADN bactérien et la topoisomérase II (ADN gyrase) ou la topoisomérase IV, qui sont respectivement responsables du surenroulement négatif de la molécule d'ADN et de la séparation des brins néoformés au cours de la réplication. La fixation des fluoroquinolones stabilise le complexe topoisomérase/ADN ce qui conduit à une accumulation de brins d'ADN cassés, ce qui est létale pour la bactérie. L'action des fluoroquinolones est bactéricide [1, 9]

III. Résistance d'*Escherichia coli* aux fluoroquinolones

Depuis leur mise sur le marché, l'incidence de la résistance aux fluoroquinolones ne cesse de croître chez les entérobactéries, la proportion de souches résistantes aux fluoroquinolones à Dakar est passée de moins de 28,0% en 2000 à 48,9% en 2015 [19, 20, 30]. Cette résistance fait intervenir différents mécanismes chromosomiques et plasmidiques.

III.1. Mécanisme chromosomique de la résistance aux fluoroquinolones

La résistance chromosomique est due à des mutations localisées à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane plasmique. Ces mutations conduisent soit à la perte d'affinité de l'antibiotique pour sa cible, soit à une augmentation de son excrétion hors du cytoplasme, soit à une diminution de sa pénétration transmembranaire [28, 30, 35].

III.1.1. Perte d'affinité des fluoroquinolones pour les topoisomérases

La perte d'affinité provient de mutations dans la région quinolone resistance determining region (QRDR) des topoisomérase II et IV qui sont les cibles principales des fluoroquinolones. Les topoisomérases sont des complexes enzymatiques constitués de deux paires de sous-unités, d'une part la protéine GyrA (97 kDa), codée par le gène *gyrA* et la protéine GyrB (90 kDa), codée par le gène *gyrB* pour la topoisomérase II, d'autre part la protéine ParC (75 kDa), codée par le gène *parC* et la protéine ParE (70 kDa), codée par gène *parE* pour la topoisomérase IV. Les mutations impliquent des substitutions en acides aminés qui apparaissent dans la région QRDR des sous-unités Gyr et Par [11, 28].

III.1.2. Réduction de la perméabilité et surexpression des pompes à efflux

La résistance chromosomique aux quinolones peut également être associée à la diminution de la perméabilité membranaire et/ou à la surexpression des systèmes d'efflux. Chez *E. coli*, les porines OmpF et OmpC sont nécessaires à la diffusion des quinolones dans le cytoplasme bien que certaines fluoroquinolones aient la capacité de diffuser à travers la bicouche phospholipidique. Une mutation de ces porines conduit à une réduction de la perméabilité membranaire aux fluoroquinolones chez *E. coli*.

. De plus, des systèmes d'efflux constitutifs exprimés par *E. coli* excrètent les fluoroquinolones hors du cytoplasme cellulaire. *E. coli* possède plus d'une vingtaine de pompes à efflux dont la pompe à efflux AcrAB-TolC codée par le gène *acrAB-tolC* situé dans la membrane interne. Les mutations survenant dans le gène *acrR* (répresseur de *acrAB*) augmentent l'activité de la pompe et à une augmentation de l'efflux des fluoroquinolones [11, 32].

Le support de la résistance aux quinolones était supposé être uniquement chromosomique, jusqu'en 1998 où Martinez-Martinez et ses collaborateurs, ont décrit pour la première fois une souche de *Klebsiella pneumoniae* dont le support de la résistance aux quinolones est un plasmide transférable PMQR (Plasmid Mediated Quinolone Resistance) [41, 46].

III.2. Mécanisme plasmidique de la résistance aux fluoroquinolones

La résistance plasmidique est due à l'acquisition de gènes de résistance par *E. coli*. En fonction du gène de résistance acquis, nous distinguons trois mécanismes plasmidiques : la protection de la cible des fluoroquinolones ; l'acétylation enzymatique de l'antibiotique et les pompes à efflux [20, 41].

III.2.1. Protection de la cible des fluoroquinolones

Ce mécanisme a pour déterminant génétique les gènes *qnr* codant pour les protéines Qnr. Les Qnr sont des protéines à motifs pentapeptidiques qui se fixent aux topoisomérase II et IV en compétition avec l'ADN. Ainsi, les protéines Qnr s'intercalent entre les topoisomérases et les fluoroquinolones bloquant ainsi leur activité. Il existe plusieurs variants des protéines Qnr (QnrA, QnrB, QnrS et QnrD) décrits à travers le monde [30, 46].

III.2.2. Acétylation enzymatique des fluoroquinolones

Ce mécanisme a été décrit chez des souches d'*E. coli* isolées en Chine. Le déterminant de cette résistance est le gène *aac(6')-Ib-cr* qui est un variant du gène *aac(6')-Ib* avec deux substitutions (Trp102Arg et Asp179Tyr) de la protéine AAC(6')-Ib élargissant ainsi le spectre d'activité de la nouvelle enzyme AAC(6')-Ib-cr, qui confère également une résistance de bas niveau à la ciprofloxacine et la norfloxacine par acétylation de l'atome d'azote présent sur le noyau pipérazinyl [22, 27].

III.2.3. Excrétion des fluoroquinolones hors du cytoplasme

Les déterminants plasmidiques de ce mécanisme sont des gènes *qepA* et *oqxAB*, codant des pompes d'efflux.

- La pompe à efflux QepA

Découverte en 2002 au Japon, la pompe à efflux nommée QepA est codée par le gène *qepA* situé sur un plasmide de résistance. Le gène *qepA* code pour une protéine de 511 acides aminés qui est une pompe à efflux de la famille des transporteurs MFS (pour Major Facilitator Superfamily). Depuis la découverte du gène *qepA*, un variant de ce gène, nommé *qepA2*, qui présente deux substitutions en acides aminés a été mis en évidence. Ce variant confère un phénotype de résistance similaire à *qepA*, renommé depuis *qepA1* [46].

- La pompe à efflux OqxAB

Un plasmide conjugatif porteur d'une résistance à l'olaquinox, utilisé en agriculture dans certains pays du monde comme promoteur de croissance, a été identifié parmi des souches d'*E. coli* provenant d'élevages de porcs. Le mécanisme de résistance impliqué est une pompe à efflux non spécifique nommée OqxAB. Il s'agit d'un mécanisme rare conférant une résistance de bas niveaux aux fluoroquinolones [17].

Tableau II : les différents mécanismes de résistance aux fluoroquinolones et gènes de résistances [28].

Mécanismes de résistance		
Modification de la cible enzymatique des FQ	<i>gyrA</i>	
	<i>gyrB</i>	
	<i>parC</i>	
	<i>parE</i>	
Diminution de la concentration intracellulaire des FQ	Réduction de la production des porines	
	Augmentation de l'activité des pompes à efflux	
Résistances plasmidiques	Protection de la cible des FQ	<i>qnr</i>
	Modification enzymatique des FQ	<i>aac(6')Ib-cr</i>
	Pompes à efflux	<i>qepA</i>
		<i>oqxAB</i>

IV. Définition et Principe de la Technique PCR

IV.1. Définition

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification génétique qui a été conçue au début des années 80 par Kary Mullis, Cette technique, qui a révolutionné les approches expérimentales en biologie moléculaire, permet le diagnostic rapide des infections causées par des micro-organismes fastidieux dont la culture est difficile, voire impossible [14]

IV.2. Principe de la PCR

La PCR est basée sur le mécanisme de réplication de l'ADN in vivo : l'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire, puis dupliqué et ré-enroulé. Il se déroule en trois étapes principales :

- Dénaturation de l'ADN par fusion à haute température pour convertir l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire. Cette étape est réalisée à une température comprise entre 93 et 96°C.
- Hybridation à l'ADN cible de deux oligonucléotides utilisés comme amorces. Cette hybridation a lieu à une température comprise entre 55 et 65°C.
- Elongation de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase (2) comme catalyseur en présence d'ions Mg^{2+} . La température optimale de travail de l'ADN polymérase est de 72°C.

L'ensemble de ces trois étapes constitue un cycle PCR et il faut plusieurs cycles (25-30) pour obtenir une quantité suffisante d'ADN.

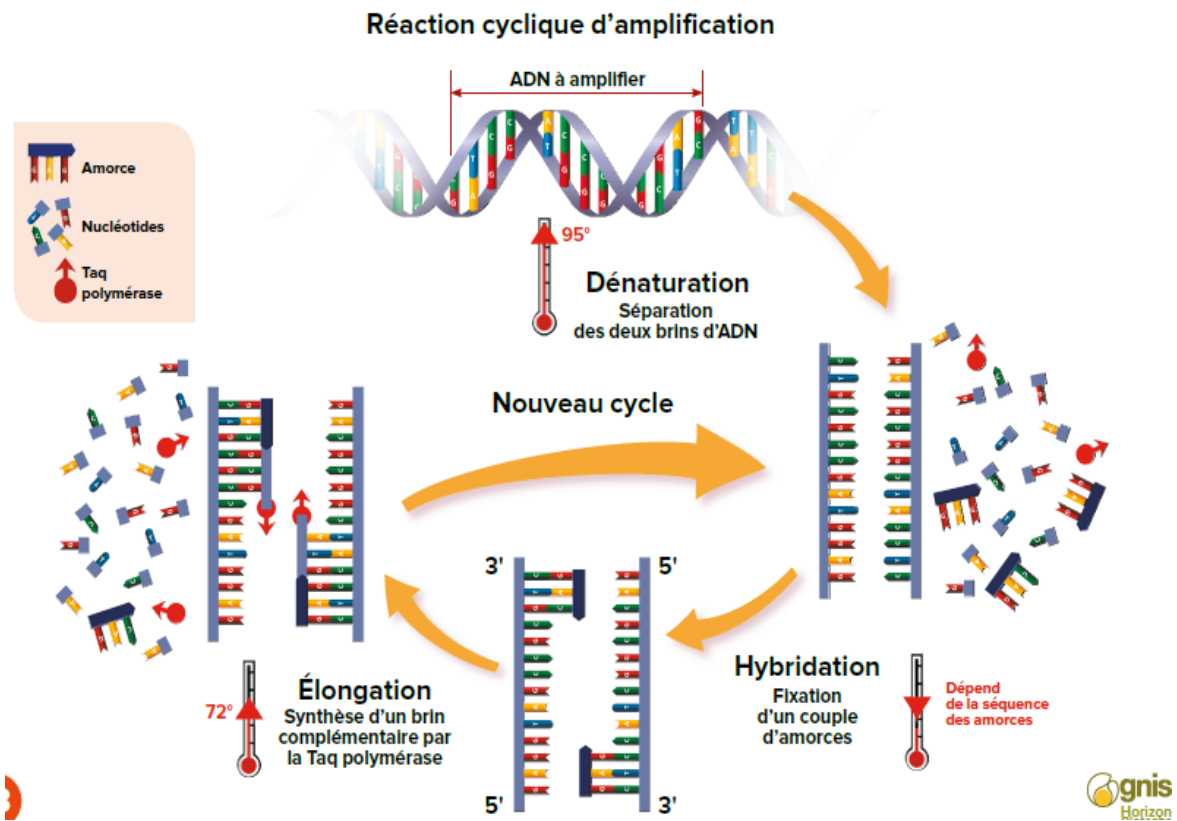


Figure 3: Etapes de la PCR : amplification des fragments d'ADN.

(<https://www.horizonbiotechs.com>. Consulté le 03 /07/2018)

V. Séquençage

Le séquençage de l'ADN permet de déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. Toute l'information génétique nécessaire à la bactérie pour vivre, se reproduire et se défendre dans son environnement se retrouve dans son génome. Un séquençage complet du génome bactérien permet d'identifier les gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques d'une souche bactérienne. Le séquençage permet également de quantifier le nombre de mutations entre les différentes espèces bactériennes. Déterminer les différences entre les génomes en quantifiant le nombre de mutations entre les organismes bactériens **[18]**.

Deuxième Partie : Travail expérimental

I. Objectif :

L'objectif principal de notre étude était de caractériser les gènes de résistance aux fluoroquinolones des souches d'*Escherichia coli* uropathogènes isolées au Laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar.

Nos objectifs spécifiques étaient d'identifier :

- les gènes de résistances chromosomiques aux fluoroquinolones (QRDRs : *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*),
- les gènes de résistances plasmidiques aux fluoroquinolones (PMQR : *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrD*),
- le gène *aac(6')-Ib*,
- le gène *qepA*.

II. Cadre de l'étude

Cette étude prospective a été réalisée au LBM en collaboration avec l'Unité de Bactériologie Expérimentale de l'Institut Pasteur de Dakar entre Juin 2018 et Juillet 2018.

III. Souches bactériennes

Cinquante (50) souches d'*Escherichia coli* BLSE uropathogènes résistantes aux fluoroquinolones isolées au Laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar ont été analysées.

IV. Matériel et méthode

IV.1. Matériels

- Amorces
- ADN bactérien
- Master mix PCR
- BET (Bromure d'Ethidium)
- Agarose lyophilisée (Ultra pure DNA Grade Agarose, BIO-RAD)
- Tampon TAE 10X, 50X

- Eau pour PCR
- Eau distillée
- Micropipettes réglables (0.5-10 μ l ; 10-100 μ l et 100-1000 μ l)
- Tubes PCR (barrettes 1,5ml)
- Cônes 10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l
- Gants en Nitrile
- Tubes Eppendorf 0,2 ml ; 1,5ml
- Eprouvette graduée (50 -500ml et 200-2000ml)
- Balance
- Thermocycleur AB 2720®
- Chambre d'électrophorèse horizontale Thermo Scientific Biorad®
- Camera photo gel
- Générateur pour électrophorèse Power PAC Biorad®
- Hotte (HOLTEN Laminair)
- Four micro-ondes
- Appareil SCOTS man
- Hotte (HOLTEN Laminair)
- Cuve de migration.
- Logiciels Excel, Word

IV.2. Méthodologie

IV.2.1. Extraction ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée par thermolyse sur souche pure obtenue après repiquage sur milieu MH. Deux colonies de culture pure d'*E. coli* ont été mises en suspension dans un tube Eppendorff® contenant de l'eau physiologique stérile placé dans un bain-marie à une température de 100°C pendant 12 min. Le tube était ensuite centrifugé à 4°C (centrifugation réfrigérée), à la vitesse de 10 000 tr/min pendant 10min. Le surnageant contenant l'ADN a été recueilli et la pureté de l'ADN a été évaluée au Nanodrop Lite®.

IV.2.2. Préparation des Mix

Nous avons utilisé des paires d'amorces spécifiques (amorce sens et amorce anti-sens) (Cf. Tableau III), de l'ADN matriciel, de l'eau tamponnée (Reaction buffer B Solis BioDyne) et du master mix (Master Mix FIREPol® Solis Biodyne) prêt à l'emploi pour préparer le mélange réactionnel sous hotte à flux laminaire. Le master mix contenait de l'ADN polymérase (FIREPol® DNA polymerase), des désoxyribonucléotides (1 mM dNTP), du chlorure de magnésium (12,5 mM MgCl₂).

Tableau III : Amorces utilisées pour la recherche des gènes de résistance aux fluoroquinolones

Gènes	Primers	DNA séquences (5'→3')	Taille (pb)
<i>gyrA</i>	gyrA-F	5'- TACACCGGTCAACATTGAGG -3'	647
	gyrA-R	5'- TTAATGATTGCCGCCGTCGG-3'	
<i>gyrB</i>	gyrB-F	5'- TGAAATGACCCGCCGTAAAGG-3'	469
	gyrB-R	5'- GCTGTGATAACGCAGTTTGTCCGGG-3'	
<i>parC</i>	parC-F	5'- GTCTGAACTGGGCCTGAATGC -3'	248
	parC-R	5'-AGCAGCTCGGAATATTTTCGACAA -3'	
<i>parE</i>	parE-F	5'-ATGCGTGCGGCTAAAAAAGTG -3'	289
	parE-R	5'-TCGTGTCAGGATCGATAC -3'	
<i>qnrA</i>	qnrA-F	5'- TACACCGGTCAACATTGAGG -3'	657
	qnrA-R	5'- TTAATGATTGCCGCCGTCGG-3'	
<i>qnrB</i>	qnrB-F	5'- TACACCGGTCAACATTGAGG -3'	469
	qnrB-R	5'- TTAATGATTGCCGCCGTCGG-3'	
<i>qnrS</i>	qnrS-F	5'- ACGACATTCGTCAACTGCAA-3'	417
	qnrS-R	5'- TAAATTGGCACCCTGTAGGC-3'	
<i>qnrC</i>	qnrC-F	5'- GGGTTGTACATTTATTGAATCG-3'	307
	qnrC-R	5'- CACCTACCCATTTATTTTCA -3'	
<i>qnrD</i>	qnrD-F	5'-TGTGATTTTTTCAGGGGTTGA -3'	520
	qnrD-R	5'-CCTGCTCTCCATCCAACCTTC -3'	
<i>aac(6')-ib</i>	aac(6')-ib-F	5'-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA -3'	482
	aac(6')-ib-R	5'-CTCGAATGCCTGGCGTGTTT -3'	
<i>qepA</i>	qepA-F	5'-AACTGCTTGAGCCCGTAGAT -3'	596
	qepA-R	5'-GTCTACGCCATGGACCTCAC -3'	

➤ *Mix pour PCR simplex*

Les gènes *qepA* et *aac(6')-Ib* ont été détectés par PCR simplex (Tableau IV).

Pour une réaction, la PCR en simplex nécessite deux volumes 0,5µl de primers + un volume 12,5µl d'H₂O + un volume de Mix PCR répartis sous 17,5 µl. Le mélange réactionnel est complété par un

volume 2,5 µl d'ADN matriciel (Tableau IV). Nous avons opté lors de notre étude pour un mélange réactionnel total 20µl.

Tableau IV : Composition du mélange réactionnel pour une PCR simplex

Réactifs	Volume par puits (µl)	Volume pour 50 réactions
Mix PCR	4	200
A₁ (Forward)	0,5	25
A₂ (Reverse)	0,5	25
H₂O	12,5	625
Répartir sous	17,5	875
DNA	2,5	125
Volume final	20	1000

➤ *Mix pour PCR duplex*

Pour deux gènes à amplifier, il faut un volume cumulé H₂O + Primers + Master Mix réparti sous 17,5 µl correspondant aux quatre amorces (Tableau V). Le volume de Master Mix étant identique à celui d'une PCR simplex.

Tableau V : Composition du mélange réactionnel pour une PCR duplex

Réactifs	Volume par puits (µl)	Volume pour 50 réactions (µl)
Mix PCR	4	200
A₁	0,5	25
A₂	0,5	25
B₁	0,5	25
B₂	0,5	25
H₂O	11,5	575
Répartir sous	17,5	875
DNA	2,5	125
Volume final	20	1000

IV.2.2 Amplification PCR

Nous avons réparti 17.5µl du mélange réactionnel (Mix) et 2.5µl d'ADN matriciel dans des tubes PCR (0,2 ml) placés dans un thermocycleur programmé selon les gènes de résistance recherchés.

Tableau VI : Programmes PCR des gènes de résistance

Paramètres	<i>gyrA/B</i>	<i>parC/E</i>	<i>qnr</i> A/B/C	<i>qnrD/S</i>	<i>qepA</i>	<i>aac(6')</i>
Dénaturation initiale	94°C/5'	94°C/5'	94°C/5'	94°C /5'	94°C/5'	94°C/5'
Dénaturation**	94°C/30'	94°C/30'	94°C/30'	94°C/30'	94°C/30'	94°C/30'
	,	,	,	,	,	,
Appariement**	60°C/1'	60°C/1'	55°C/1'	55°C/1'	55°C/1'	55°C/1'
Elongation**	72°C/1'	72°C/1'	72°C/1'	72°C/1'	72°C/1'	72°C/1'
Élongation Finale	72°C/10'	72°C/10'	72°C/10'	72°C/10'	72°C/10'	72°C/7'
Nombre de cycles	30	30	30	30	30	30

IV.2.3. Migration des produits PCR

➤ Préparation des gels d'Agarose 1%

Des gels d'agarose à 1 % ont été préparés à partir de 1g de poudre d'agarose contenu dans 100 ml de tampon TBE 1X (10 ml de TBE 10X + 90ml H₂O) ou du tampon TAE 1X (2 ml de TAE 50X dans 100 ml de H₂O) et 0,5 mg/l de BET.

Les amplicons, les témoins (positif et négatif) et le marqueur de taille ont été déposés dans les puits du gel d'agarose 1% (Figure 4) immergé dans du tampon de migration TBE 1X contenu dans la cuve. La migration des produits PCR a été réalisée sous une tension de 120 volts pendant 45 min.

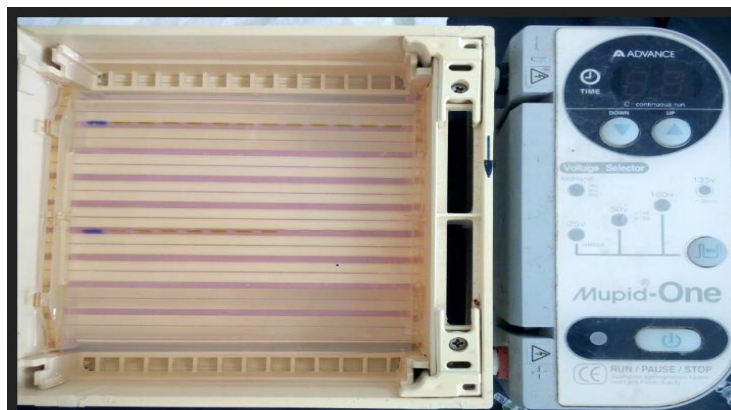


Figure 4 : Dépôt des amplicons dans le gel d'agarose 1%

IV.2.4. Révélation des produits de migration

La visualisation des bandes au niveau du gel contenant du bromure d'éthidium (BT) a été réalisée sous UV avec l'appareil photographique Doc printer. Le marqueur de taille (*100 bp DNA Ladder- Solis BioDyne*) et les témoins positifs ont permis de valider la PCR et d'identifier les gènes de résistance recherchés en fonction de leur taille.

V. Résultats

V.1. Détection des gènes QRDR

Les gènes *gyrA*, *parC* et *parE* ont été détectés respectivement chez 86% (43/50) ; 94% (47/50) ; 88% (44/50) des souches d'*Escherichia coli* alors que le gène *gyrB* n'a pas été détecté (cf. figures 5, 6 et 7)

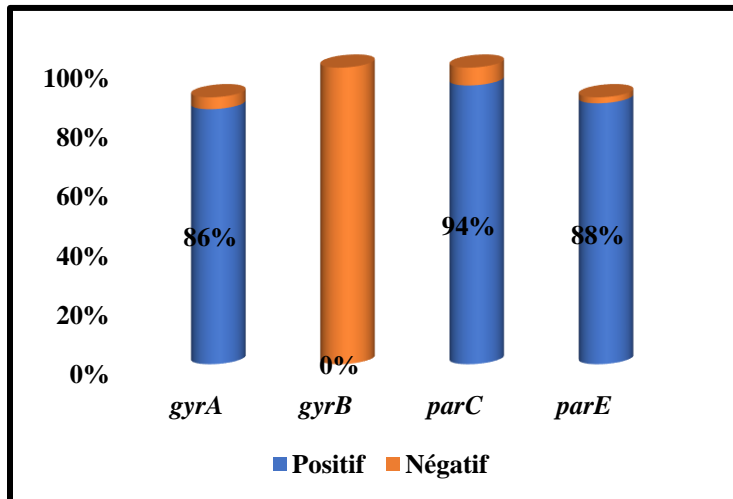
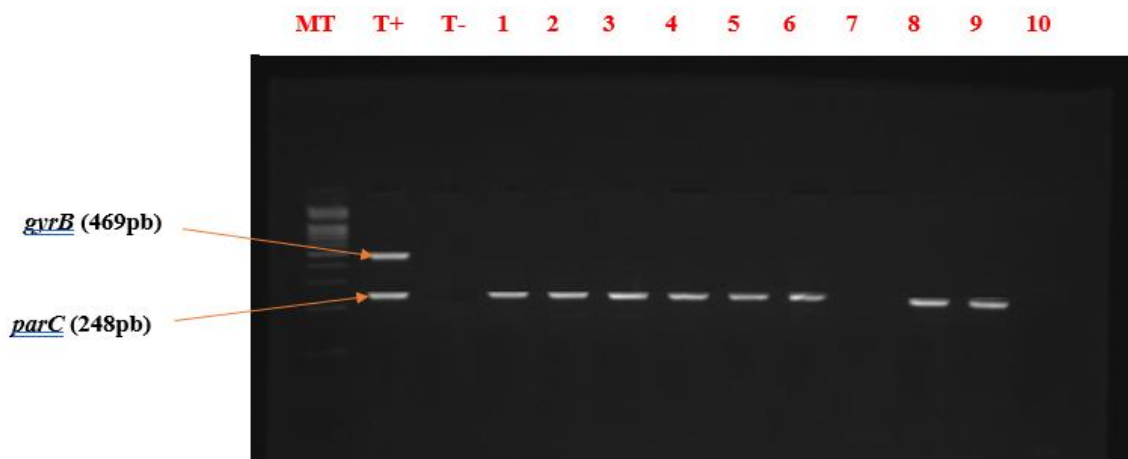


Figure 5 : Répartition des gènes QRDR détectés



MT : Marqueur de taille T+ : Témoin positif T- : Témoin négatif Souches :1, 2,3...

Figure 6 : PCR duplex : *gyrA* et *parE*



MT : Marqueur de taille T+ : Témoin positif T- : Témoin négatif Souches :1, 2,3...

Figure 7 : PCR duplex : *gyrB*, *parC*

V.2. Détection des gènes PMQR

Le gène *qnrB* a été détecté chez 7 souches (14%), les gènes *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* et *qnrS* n'ont pas été détectés chez les souches de *E. coli* (cf. figures 8 et 9).

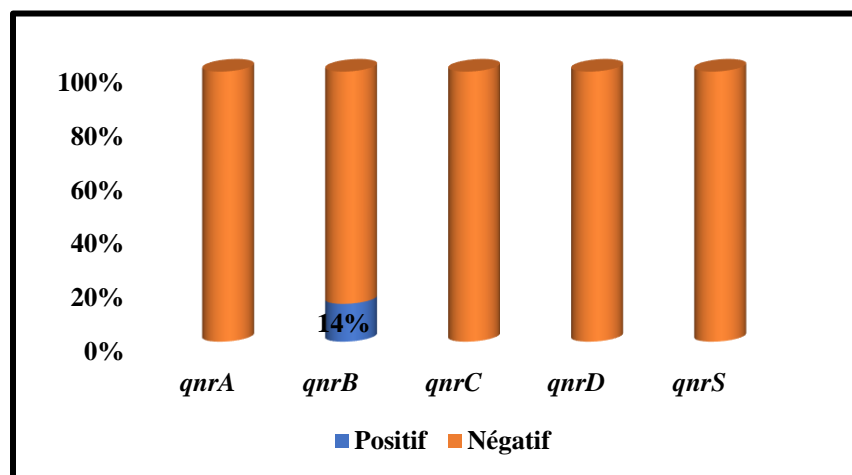


Figure 8 : Répartition des gènes PMQR détectés.



MT : Marqueur de taille T+ : Témoin positif T- : Témoin négatif Souches : 1, 2,3...

Figure 9 : PCR multiplex : *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*

V.3. Détection des gènes *aac(6')-Ib* et *qepA*

Le gène *aac(6')-Ib* a été détecté chez 66% (33/50) des souches, alors que le gène *qepA* était non détecté (cf. figures 10 et 11).

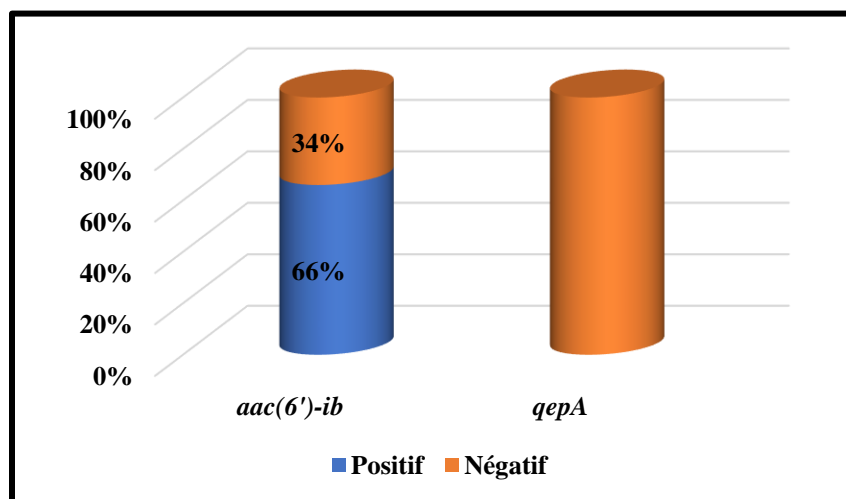
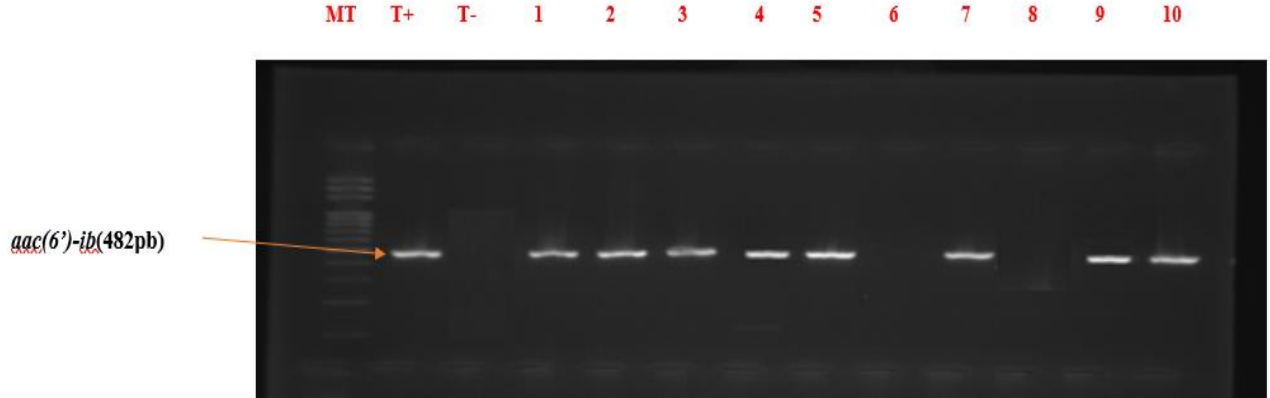


Figure 10 : Répartition des gènes *aac(6')-Ib* et *qepA* détectés.



MT : Marqueur de taille T+ : Témoin positif T- : témoins négatif Souches :1, 2,3...

Figure 11 : PCR simplex : *aac(6')-Ib*

V.5. Répartition des Souches en fonction des gènes portés

Toutes les souches analysées hébergeaient au moins un gène de résistance détecté.

Trois souches (6%) portaient cinq gènes de résistance (*gyrA-parC-parE-qnrB-aac(6')-ib*, $n=3$).

Cinquante pourcent (50%, 25/50) des souches portaient quatre gènes de résistance (*gyrA-parC-parE-aac(6')Ib* $n=24$, *gyrA-parC-parE-qnrB* $n=1$).

Trente-six pourcent (36%, 18/50) des souches portaient trois gènes de résistances (*gyrA-parC-parE*, $n=18$).

Quatre pourcent (4%, 2/50) des souches portaient deux gènes de résistance (*parC-aac(6')-ib*, $n=2$).

La présence d'un seul gène (cf. figure 12) a été trouvé chez 4% (2/50) des souches.

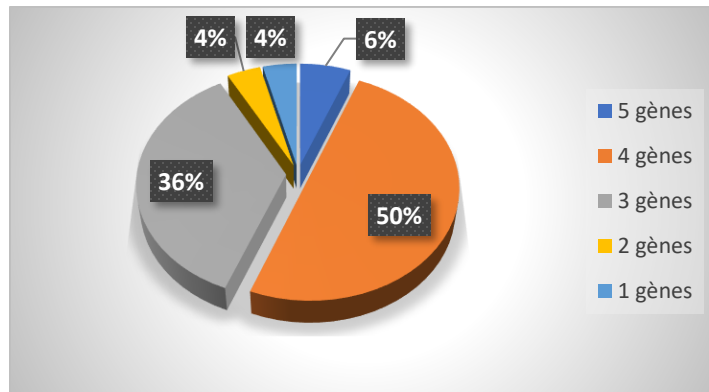


Figure12 : Répartition des Souches en fonction des gènes portés

Tableau VII : Répartition des gènes identifiés en fonction des souches

N°	QRDR				PMQR						
	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	<i>qnrS</i>	<i>qepA</i>	<i>aac(6'-Ib)</i>
1	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
2	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
3	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
4	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
5	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
6	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
8	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
10	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
11	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
13	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
14	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
15	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
16	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
17	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
18	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
19	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
20	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
21	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
22	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
23	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
24	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
25	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
26	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
27	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
28	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
29	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
30	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
31	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
32	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
33	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
34	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
35	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
37	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
38	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
39	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
40	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
42	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
43	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
45	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
46	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
47	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
48	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
49	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
50	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+

V.6. Discussion

Dans cette étude qui a porté sur des souches d'*E. coli* uropathogènes, la présence de gènes de résistance aux fluoroquinolones (QRDRs, PMQR, *aac(6')-Ib*, *qepA*) a été détectée chez 100% (50/50) des souches.

Dans notre étude, l'analyse des déterminants chromosomiques (QRDR) a montré une présence des gènes *gyrA*, *parC* et *parE* respectivement chez 86% (43/50) ; 94% (47/50) et 88% (44/50) des souches d'*E. coli* alors que le gène *gyrB* n'a pas été détecté. Les mutations pour ces trois gènes n'ont pas été recherchées. Ces résultats contrastent avec une étude réalisée au Kenya en 2016 sur des souches de *E. coli* qui a montré la présence des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* respectivement chez 56% (n= 17), 23.3% (n= 7), 10% (n= 3) et 10% (n= 3) [5]. Une autre étude réalisée en Tunisie en 2014 sur des souches de *E. coli* uropathogènes montraient aussi la présence des gènes *gyrA* (avec les mutations S83L et D87N) et *parC* (avec les mutations S80I et E84G) chez 57,5% des souches étudiées [37]. De même, une étude menée en Italie en 2012 sur 72 souches d'*E. coli* uropathogènes a montré la présence des gènes *gyrA* et *parC*. Les mutations les plus rencontrées étaient Ser83Ile et Asp87Asn pour le gène *gyrA* et Ser80Ile et Glu84Val pour le gène *parC* [27].

L'analyse des déterminants plasmidiques (PMQR, *aac(6')-Ib* et *qepA*) a montré la présence du gène *qnrB* (seul gène PMQR détecté) chez 14% (n=7) des souches, le gène *aac(6')-Ib* a été détecté chez 66% (n=33) des souches. Le séquençage de ces gènes n'a pas été réalisé pour identifier les sous-types du gène *qnrB* et le variant *aac(6')-Ib-cr* qui code à la fois pour la résistance aux fluoroquinolones et aux aminosides. Les gènes *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* et *qnrS* n'ont pas été détectés. On note une prévalence moins élevée dans une étude réalisée au Maroc en 2017 sur des souches d'*E. coli* montrant la présence des gènes *qnrB*, *qnrS*, et *aac(6')-Ib-cr* respectivement chez 05.02% (3/66), 01.50% (1/66) et 13.81% (9/66) des souches [4]. L'étude menée en Tunisie sur les souches d'*E. coli* uropathogènes a montré la présence des gènes *aac(6')-Ib-cr* (n = 66) et des gènes *qnrB* (*qnrB1*, n = 3), *qnrA* (*qnrA6*, n = 1) et *qnrS* (*qnrS1*, n = 1) [37].

L'étude menée en Italie a montré la présence du gène *aac(6')-Ib-cr* chez 11.1% des souches (8/72) [27].

Au cours de notre étude, le gène *qepA* n'a pas été détecté, résultat comparable aux études réalisées au Maroc, en Italie et en Tunisie [37, 27, 4].

Le séquençage permettra d'identifier la présence ou non de mutations au niveau des gènes QRDRs, les sous-types des gènes PMQR ainsi que l'identification du variant *aac(6')Ib-cr*.

La réalisation des tests de conjugaison sur les souches de même que l'étude des intégrons et transposons nous permettront d'identifier le support génétique et de comprendre le mode de dissémination de ces gènes de résistance.

Vu la résistance aux fluoroquinolones des souches d'*E. coli* BLSE observée, l'utilisation des fluoroquinolones en traitement de première intention dans les ITU doit être proscrite. Une réglementation de l'accès à ces antibiotiques par la population doit être instaurée afin de réduire leur utilisation abusive.

Conclusion

Cette étude réalisée sur 50 souches d'*Escherichia coli* uropathogènes productrices de BLSE résistantes aux fluoroquinolones isolées au LBM de l'IPD a montré que 100% des souches hébergeaient au moins un gène de résistance aux fluoroquinolones. Quarante-sept (47) souches hébergeaient les gènes QRDRs (*gyrA*, n=43 ; *parC*, n=47, *parE*, n=44). Sept souches hébergeaient Les gènes PMQR (*qnrB*, n=7/50).

Le gène *aac(6')-Ib* a été trouvé chez 66% des souches. Les gènes *gyrB*, *qnrA*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD* et *qepA* n'ont pas été identifiés.

La distribution des gènes à montrer que 6% (3/50) des souches portaient cinq gènes (*gyrA-parC-parE-qnrB-aac(6')-ib*, n= 3), 50% (25/50) des souches portaient quatre gènes de résistance (*gyrA-parC-parE- aac(6')Ib* n= 24, *gyrA-par-parE-qnrB* n=1), 36% (18/50) des souches portaient trois gènes de résistances (*gyrA-parC-parE*, n=18), 4% (2/50) des souches portaient deux gènes de résistance (*qnrC-aac(6')-Ib*, n=2).

Le séquençage de ces gènes permettra d'identifier la présence ou non de mutations au niveau des gènes QRDR, de sous-typer les gènes PMQR et d'identifier le variant *aac(6')Ib-cr*.

La réalisation des tests de conjugaison sur les souches et l'étude des intégrons et transposons nous permettront d'identifier le support génétique et de comprendre la dissémination des gènes de résistance détectés. -

Cette résistance des souches d'*E. coli* BLSE nécessite donc une surveillance en vue de limiter le risque épidémiologique dû à la co-sélection de déterminants de résistance ainsi que leur dissémination.

Références bibliographiques

- 1- Aldred katie j., Kerns robert J. et Osherof neil. Mechanism of Quinolone Action and
- 2- Resistance. *Biochemistry*, 2014 ; 53 : 1565-1574.
- 3- Topley and Wilson's. Microbiology and Microbial Infection. Bacteriology Volume 2. Part VI. Organisms and their biology. Chapter 36. *Escherichia*, 1360.
- 4- Avril J.L., Denis F., Dabernat H., Monteil H. Bacteriologie clinique. 2^{ème} édition Marketing, paris. 2000 : 148-280.
- 5- Benaicha H., Barrijal S., Ezzakkioui F., Elmalki F. Prevalence of PMQR genes in *E. coli* and *Klebsiella spp* isolated from North- West of Morocco. *JGAR*. 2017 : 20 p.
- 6- Bonventure W. J., Kariuki S., Waiyaki P. G., Mutugi M. W., et Bulimo W. D. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance genes in isolates obtained from patients with diarrhea in Machakos District Hospital, Kenya. *Afr. J. Pharmacol. Ther.* 2016. 5(3) : 118-127.
- 7- Croxen M., Finlay B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010 ; 8 : 26-38.
- 8- Dana E., Robb M., Pharm.D., et al. New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics. *Am Fam Physician.*, 2000 ; 61(9) : 2741-2748.
- 9- Dean P, Young L, Quitard S, Kenny B. Insights into the Pathogenesis of Enteropathogenic *E. coli* Using an Improved Intestinal Enterocyte Model. *PLoS ONE*. 2013 ; 8(1). doi: 10.1371/journal.pone.0055284.
- 10- Dentan C. Fluoroquinolones. Grenoble : Prs Stahl et Epaulard, 2015, 103p.
- 11- Dia ML., Chabouny H., Diagne R., Kâ R., Ba-Diallo A., Lô S., Gassama B., Cisse M., Sow A. Profil antibiotypique des bactéries uropathogènes isolées au CHU de Dakar. *Uro-Andro*. 2015 ; 1 : 212-217.
- 12- Fàbrega A., Madurga S., Giralt E. et al. Mechanism of action and resistance to quinolones. *Microbial Biotech. Rev.*, 2009 ; 2(1) : 40-61.
- 13- Flores-Mireles Ana L., Walker Jennifer N., Caparon Michael C. et al. Urinary tract infections : epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.*, 2015 ; 13(5) : 269-284.

- 14-** Gordon, D. et A. Cowling. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*. 2003 ; 149 (12) : 3575-3586.
- 15-** Greub Jaton K. G. PCR en microbiologie : de l'amplification de l'ADN à l'interprétation du résultat. *Rev Med Suisse*, 2007 ; 3 : 106p.
- 16-** Grimont, P. Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect*. 1987 ; 17 : 6-10.
- 17-** Guyer D.M., Radulovic S., Jones F.E., Mobley H.L. The secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect Immun*. 2003 ; 70, 4539-4546.
- 18-** Hansen L.H., Johannesen E., Burmolle M., Sorensen A.H., Sorensen S.J. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 3332-3337.
- 19-** Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016; 107(1) : 1-8.
- 20-** Ja D., Nabeth P., Perrier G. Distribution and susceptibility of bacterial urinary tract infections in Dakar, Senegal. *Int J Antimicrob Agents*, 2002 ; 20(5) : 339-47.
- 21-** Jacoby A., Strahilevitz J. et Hooper C. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr.*, 2014, 2(2) : 42.
- 22-** Kaper J.B., Nataro J.P. et Mobley H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004 ; 2 : 123-140.
- 23-** Machuca J., Ortiz M., Recacha E. et al. Impact of AAC (6') -Ib-cr in combination with chromosomal-mediated mechanisms on clinical quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 2016 ; 6 p.
- 24-** McLellan Lisa K. et Hunstad David A. Urinary Tract Infection : Pathogenesis and Outlook. *Trends Mol Med.*, 2016 ; 22(11) : 946-957.
- 25-** Mills M., Meysick K.C., O'brien A.D. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infect Immun*. 2000 ; 68 : 5869-5880.
- 26-** Mol O., Oudega B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev.*, 1996 ; 19 : 25-52.

- 27-** Musangu N., Josee H., Mario J., et Fairbrother M. Characterization of a Polysaccharide Capsular Antigen of Septicemic *Escherichia coli* O115 : K"V165" : F165 and Evaluation of Its Role in Pathogenicity. *AMS*, 1992 ; 60(12) : 5048-5056.
- 28-** Musumeci R., Rausa M., Giovannoni R. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated in a Teaching Hospital of Northern Italy. *MDR*. 2012 ; 18(1) : 33-41.
- 29-** Muylaert A., Mainil J.G. Résistances aux fluoroquinolones : la situation actuelle. *Ann. Méd. Vét.*, 2013 ; 257 : 15-26.
- 30-** Nataro JP, Kaper JB. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *CMR*. 1998 ; 11(1) : 142–201.
- 31-** Nordmann P., Mammeri H. Résistance plasmidique aux quinolones. *Antibiotiques*, 2007 ; 9 : 246-253.
- 32-** OMS Aide-mémoire. Résistance aux antimicrobiens, 194 Septembre 2016.
- 33-** Pages J.-M., Garnotel E. Perméabilité Membranaire Et Résistance Aux Antibiotiques Chez Les Bactéries A Gram Négatif. *Elsevier*. 2003 ; 352 : 7 p.
- 34-** Pamela C., Chevarin C., Xu Z., Torres J., Sevrin G., Hirten Robert H. et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *BMJ*, 2017 : 1-14.
- 35-** Ratiner Y. A., Salmenlinna S., Eklund M. Serology and Genetics of the Flagellar Antigen of *Escherichia coli* O157:H7a,7c. *J. Clin. Microbiol.*, 2003 ; 43(3) : 1033-104.
- 36-** Redgrave Liam S., Sutton Sam B., Webber Mark A. et Piddock Laura J.V. Fluoroquinolone résistance : mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trend. Microbiol, Rev*, 2014 ; 22(8) : 8.
- 37-** Rojas-Lopez M., Montario R., Pizza M. et al. Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* : Insights for Vaccine Development. *Rev. Front. Microbiol*, 2018 ; 9 : 17.
- 38-** Sana F., Mabrouka S., Claudine Q., Faouzi S., Ilhem B., Dubois V. Prevalence and characterization of uropathogenic *Escherichia coli* harboring plasmid-mediated quinolone resistance in a Tunisian university hospital. *ELSEVIER*. 2014 : 5 p.
- 39-** Sarkar S., Ulett G. C., Totsika M. T. et al. Role of Capsule and O Antigen in the Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Plos ONE*, 2014 ; 9(2) : 11p.
- 40-** Servin A. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *CMR*. 2005 ; 18 : 264-292.

- 41- Slavchev G., PISAREVA E. et MARKOVA N. Virulence of Uropathogenic *Escherichia Coli*. *JCC*, 2008-2009 ; 6 : 3-9.
- 42- Strahilevitz J., Jacoby G. A., Hooper David C. H. et Robicsek A. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance : a Multifaceted Threat. *CMR*. 2009 ; 22(4) : 664-689.
- 43- Tahir H. An introduction to the Serotypes, Pathotypes and Phylotypes of *Escherichia coli*. *IJOMAS*, 2015 ; 2(1) : 9-16.
- 44- Tartof S.Y., Solberg O.D., Manges A.R. et Riley L.W. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2005 ; 43, 5860-5864.
- 45- Thomas A. et James R. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli* : ExPEC. *JID*, 2000 ; 181 : 1753-1754.
- 46- Totsikaa M., Nicola K., Nouri L. et al. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *PNAS*, 2014 ; 111(15) : 5694-5699.
- 47- Tran J. H., Jacoby George A. et Hooper David C. Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Antimicrobial Agents Chemoter.*, 2005 ; 49(1) : 118-125.
- 48- Vallance Ba, Finlay Bb. Exploitation of Host Cells by Enteropathogenic *Escherichia coli*. *NAS*. 2000 ; 97 : 8799–8806.
- 49- Weintraub A. Enteroaggregative *Escherichia coli* : epidemiology, virulence and detection. *JMM*. 2007 ; 56 : 4-8.
- 50- Welinder-Olsson C, Kaijser B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *JID*. 2005 ; 37(6-7) : 405-16.
- 51- Zachary D. B. The natural history of model organisms. The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife*, 2015 : 12.

Résumé

Introduction : La résistance aux fluoroquinolones (l'ATB le plus utilisé dans le traitement des ITU) ne cesse d'augmenter à travers le monde et particulièrement à Dakar. Cette résistance croissante observée chez les souches d'*Escherichia coli* BLSE, est due à des mécanismes chromosomiques (gènes QRDR) et des mécanismes plasmidiques (gènes PMQR, *aac(6')-Ib*, *qepA*). Peu d'étude ont été réalisés à Dakar pour identifier les gènes de résistances.

Objectif : l'objectif de cette étude était de caractériser les gènes de résistance aux fluoroquinolones des souches d'*E. coli* productrices de bêtalactamases à spectre étendu, isolées dans les urines au LBM de l'Institut Pasteur de Dakar.

Méthodologie Cinquante (50) isolats de *E. coli* BLSE ont constitué l'échantillonnage. Les ADNs ont été extraits et amplifiés par la technique « PCR classique » à partir des amorces spécifiques des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *qnr*, *qepA* et *aac(6')Ib*. Les gènes de résistance ont été identifiés et révélés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Résultats : Les gènes plasmidiques *aac(6')-Ib* et *qnrB* ont été détectés respectivement chez soixante-six pourcent (66%, 33/50), quatorze pourcent (14%, 7/50) des souches. Les gènes chromosomiques *gyrA*, *parC* et *parE* ont été détectés respectivement chez quatre-vingt-six pourcent (86%, 43/50), quatre-vingt-quatorze pourcent (94%, 47/50) et quatre-vingt-huit pourcent (88%, 44/50) des souches. Les gènes *gyrB*, *qepA*, *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* et *qnrS* n'ont pas été détectés.

Conclusion : La résistance aux FQ de *E. coli* uropathogène n'a cessé d'augmenter au cours de ces dernières années. Des mesures doivent être prise par rapport à la prescription et à l'utilisation des fluoroquinolones afin de limiter le phénomène de pression de sélection.

Mots clés : *E. coli*, Résistance, Fluoroquinolones, Topoisomérases, BLSE, PCR.

Abstract :

Introduction: Resistance to fluoroquinolones (the most used ATB in the treatment of UTIs) continues to increase around the world and particularly in Dakar. This increasing resistance observed in *Escherichia coli* ESBL strains is due to chromosomal mechanisms (QRDR genes) and plasmid mechanisms (PMQR genes, *aac(6')-Ib*, *qepA*). Few studies have been conducted in Dakar to identify resistance genes.

Objective : The aim of this study was to characterize the fluoroquinolone resistance genes of *E. coli* strains. coli producing extended-spectrum betalactamases, isolated in urine at the LBM of the Pasteur Institute of Dakar.

Methodology : Fifty (50) isolates of *E. coli* ESBL constituted the sampling. The DNAs were extracted and amplified by the "classical PCR" technique from the primers specific for the *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *qnr*, *qepA* and *aac(6')Ib* genes. The resistance genes were identified and revealed by agarose gel

electrophoresis. **Results** : The *aac(6')-Ib* and *qnrB* plasmid genes were detected in sixty-six percent (66%, 33/50), fourteen percent (14%, 7/50) of strains, respectively. The *gyrA*, *parC* and *parE* chromosomal genes were detected in eighty-six percent (86%, 43/50), ninety-four percent (94%, 47/50) and eighty-eight percent (88%, 44/50) of the strains respectively. The genes *gyrB*, *qepA*, *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* and *qnrS* were not detected.

Conclusion : FQ resistance of uropathogenic *E. coli* has increased steadily in recent years. Measures must be taken in relation to the prescription and use of fluoroquinolones to limit the phenomenon of selection pressure.

Key words: *E. coli*, Resistance, Fluoroquinolones, Topoisomerases, ESBL, PCR.