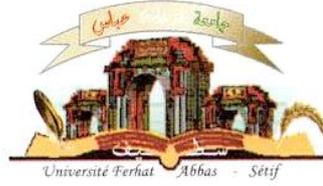


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ÉCOLOGIE VÉGÉTALE

N°/SNV/2020

THÈSE

Présenté par

NABTI Larbi Zakaria

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOLOGIE VÉGÉTALE

THÈME

Sensibilité aux antibiotiques et aux huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* Desf. des souches d'*Escherichia coli* isolées d'infection urinaire au CHU de Sétif.

Soutenue publiquement le 17 Novembre 2020

DEVANT LE JURY

Président	BELHATTAB Rachid	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	SAHLI Farida	Pr. UFA Sétif 1
Examineur	LAOUER Hocine	Pr. Univ de Constantine 3
Examineur	LOUCIF Lotfi	MCA Univ de Batna 2
Examineur	BENDIF Hamdi	MCA Univ de M'sila

Laboratoire de Valorisation des Ressources Biologiques Naturelles

Dédicaces

Je dédie cette thèse à :

Mes très chers parents

Les mots ne suffiront pas pour exprimer ma reconnaissance de votre amour et de tout ce que vous avez sacrifié pour mon éducation ; je n'aurais rien accompli sans votre appui et encouragement,

Ma chère épouse

Qui m'a toujours encouragé et soutenu moralement durant la préparation de ma thèse,

Mon fils ADEM

Ma joie, mon bonheur et ma raison de vivre,

Mes frères et sœurs

Pour leur soutien permanent et encouragement.

Remerciements

Avant toute chose, Je remercie **DIEU** Tout Puissant, maître des cieux et de la terre, pour m'avoir donné la force, le courage et la patience pour mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, le Professeur **SAHLI Farida**, qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction. Merci pour la confiance qu'elle m'a accordée pour la réalisation de ce travail, pour sa rigueur, sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Mes remerciements s'adressent également à :

Mr BELHATTAB Rachid, professeur à l'Université de Sétif 1 d'avoir accepté de présider le jury de thèse et de me faire l'honneur de juger mon travail.

Messieurs, LAOUAR Hocine, professeur à l'Université de Constantine 3, **LOUCIF Lotfi**, MCA à l'université de Batna 2 et **BENDIF Hamdi**, MCA à l'université de M'sila, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'examiner ce travail. Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude.

Pr GODREUIL Sylvain, laboratoire de bactériologie, hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier (France) de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour la réalisation des analyses moléculaires.

Pr ROLAIN Jean-Marc, pour l'accueil et l'encadrement qu'il m'a accordés au sein de son équipe de recherche à l'institut hospitalo-universitaire (IHU) méditerranée infection, Marseille (France).

Je remercie aussi tous les **collègues de l'IHU**, particulièrement les docteurs, **Seydina, Linda et Edgarthe**, et les étudiants, **David, Mouna et Ahmed Olowo**.

Pr MAGGI Filippo de l'université de Camerino (Italie) pour son aide concernant la réalisation des analyses chimiques des huiles essentielles.

Je tiens à remercier aussi :

Tous mes collègues de laboratoire de microbiologie de CHU-Sétif, pour leur aide et collaboration particulièrement, **Mustapha, Nassim, Badri, Wided, Nardjes, Naziha, Zineb, Nora, Dr Radji et Dr Mezaghcha**.

Messieurs, KHENFRI Younes, BENSLAMA Abderahim, MAIZA Mohamed-Khalil et SEDRATI Tahar pour leur aide dans la collecte des plantes et **Pr LAOUER Hocine** de l'université de Sétif 1 pour l'identification de ces plantes.

Mr HARRAR Abdenacer et Mme MEROUANI Nawel pour leur aide, conseils et soutien moral.

Je finis par adresser mes plus chaleureux remerciements à ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre à réaliser ce travail.

Un grand merci à tous.

ملخص

تعتبر البكتيريا *Escherichia coli* العامل الرئيسي المسؤول عن عدوى المسالك البولية المرتبطة بالرعاية الصحية أو المكتسبة من المجتمع. يمثل ظهور وانتشار مقاومة المضادات الحيوية عند هذا النوع مشكلا رئيسيا للصحة العمومية. تتمثل أهداف هذا العمل في دراسة الحساسية للمضادات الحيوية لسلاسلات *E. coli* معزولة من عدوى المسالك البولية وتقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية ال 5 عينات من نبتة *Origanum glandulosum* وذلك ضد سلاسلات *E. coli* المقاومة.

في الفترة الممتدة بين جانفي 2015 وفبري 2017، تم جمع 215 سلالة *E. coli* من عينات البول التي تم تلقيها في مختبر علم الأحياء الدقيقة للمركز الاستشفائي الجامعي لمدينة سطيف. أدت دراسة مقاومة المضادات الحيوية من نوع البيبتالاكتامين إلى تحديد 37 (17.2%) سلالة منتجة لإنزيمات بيتالاكتاماز واسعة الطيف (BLSE). تم تحديد كل من العمر (≤ 60 عامًا)، الاستشفاء والاستخدام السابق للمضادات الحيوية كعوامل خطر للإصابة بسلاسلات *E. coli* منتجة ل BLSE (EC-BLSE). بالإضافة إلى البيبتالاكتامينات، تم تسجيل مقاومة ملحوظة للكينولونات (حمض الناليديكسيك وسيبروفلوكساسين، 34% و 26.5% على الترتيب)، التريميثوبريم-سلفاميثوكسازول (45.6%) والجنتاميسين (14%). كما تم تسجيل مستويات منخفضة من المقاومة للأميكاسين، الفوسفومييسين، النيتروفورانتوين والكولستين. تم الكشف عن جينات مختلفة لمقاومة البيبتالاكتامين (*bla*_{CTX-M-15}، *bla*_{CTX-M-14}، *bla*_{TEM}، *bla*_{CMY-2} و *bla*_{OXA-48}) مع هيمنة جينات *bla*_{CTX-M-15}. كما تم الكشف عن جينات مقاومة للأمينوزيدات (*aadA1*)، الكينولونات (*qnrB* و *aac(6')-Ib-cr*) والكوليسيتين (*mcr-1*). تم تطوير اختبار جديد لتفاعل البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي (PCR en temps réel) والذي يستهدف البحث عن جين مقاومة الكوليسيتين الجديد *mcr-8*. أظهر الاختبار غياب هذا الجين في كامل سلاسلات *E. coli*. أظهر تحليل مجموعات النشوء والتطور عن هيمنة المجموعة B2 وذلك ب 106 (49.3%) سلالة. تمكنت 20 (54%) سلالة EC-BLSE من نقل جينات المقاومة عن طريق عملية الاقتران. هذه الجينات كانت محمولة بواسطة بلازميدات مختلفة (IncI1, IncFIB, IncHI2).

أعطت عملية التقطير المائي للأجزاء الهوائية ل 5 عينات من نبتة *Origanum glandulosum* كميات من الزيت الأساسي تتراوح بين 1.8 و 5.6% (وزن / وزن). سمح إجراء التحليل الكيميائي للزيوت الأساسية بواسطة كروماتوغرافيا طور الغازي المرفقة بمطيافية الكتلة (CPG/SM) بتحديد 43، 37، 37، 34 و 21 مركب في كل من الزيوت الأساسية ل مسيلة، سطيف، برج بوعريريج، ميله والوادي على الترتيب. كما تم الكشف عن أربع مركبات رئيسية في جميع ال 5 زيوت الأساسية وهي: thymol (15.1-56.3%)، carvacrol (2.8-59.6%)، γ -terpinène (9.8-21.8%) و *p*-cymène (8.5-13.9%). أظهرت اختبارات النشاطية المضادة للبكتيريا أن جميع الزيوت الأساسية لها نشاط جيد ضد كل من سلاسلات *E. coli* المرجعية والسلاسلات ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية. عند التخفيف 1/2، أعطت جميع الزيوت الأساسية مناطق تثبيط نمو بقطر ≤ 23 مم. الزيت الأساسي الذي يحتوي على أكبر كمية من *monoterpènes oxygénés* (76.2%) ومن carvacrol (59.6%) (عينة البرج) كان الأكثر نشاطا.

أظهرت هذه الدراسة زيادة نسبة المقاومة للمضادات الحيوية لدى سلاسلات *E. coli* المسببة لعدوى المسالك البولية في المركز الاستشفائي الجامعي لمدينة سطيف. تشير النتائج المتحصل عليها إلى إمكانية استخدام الزيوت الأساسية لنبتة *O. glandulosum* في بعض الحالات السريرية للعلاج أو الوقاية من بعض أنواع العدوى التي تسببها البكتيريا ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية مثل عدوى المسالك البولية.

الكلمات المفتاحية: عدوى المسالك البولية، *E. coli*، مقاومة المضادات الحيوية، *O. glandulosum*، الزيوت الأساسية، النشاط المضاد للبكتيريا.

Résumé

Escherichia coli est le principal agent responsable d'infection urinaire (IU) associée aux soins ou d'origine communautaire. L'émergence et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez cette espèce, représente un problème majeur de santé publique. Les objectifs de ce travail sont l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches d'*E. coli* isolées d'IU et l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles (HE) de 5 populations d'*Origanum glandulosum* contre les souches résistantes.

Un total de 215 souches d'*E. coli* a été collecté, entre janvier 2015 et février 2017, à partir de prélèvements d'urine reçus au laboratoire de microbiologie du CHU de Sétif. L'analyse des profils de résistance aux β -lactamines a permis l'identification de 37 (17.2 %) souches productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE). L'âge (≥ 60 ans), l'hospitalisation et l'utilisation antérieure d'antibiotiques ont été identifiés comme facteurs de risque d'infection par une souche d'*E. coli* productrice de BLSE (EC-BLSE). Outre les β -lactamines, une résistance marquée a été observée à l'égard des quinolones (acide nalidixique et ciprofloxacine, 34 % et 26.5 % respectivement), du triméthoprim-sulfaméthoxazole (45.6 %) et de la gentamicine (14 %). Des taux de résistance faibles ont été observés pour l'amikacine, la fosfomycine, le nitrofurantoïne et la colistine. Différents gènes de résistance aux β -lactamines ont été détectés (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY-2} et *bla*_{OXA-48}) avec prédominance des *bla*_{CTX-M-15}. D'autres gènes de résistance aux aminosides (*aadA1*), aux quinolones (*qnrB* et *aac(6')-Ib-cr*) et à la colistine (*mcr-1*) ont été également détectés. Un nouveau test de PCR en temps réel ciblant le nouveau gène de résistance à la colistine *mcr-8* a été développé. Le test a révélé l'absence de ce gène dans toute la collection. L'analyse des groupes phylogénétiques a révélé la prédominance du groupe B2 avec 106 (49.3 %) souches. Vingt (54 %) souches d'EC-BLSE ont transféré leurs gènes de résistance par conjugaison. Le transfert a été assuré par des plasmides de différents groupes d'incompatibilité (Inc11, IncFIB, IncHI2).

L'hydrodistillation des parties aériennes de 5 populations d'*O. glandulosum* a donné des rendements en HE qui varient entre 1.8 et 5.6 % (m/m). La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) a permis l'identification de 43 (HE de M'sila), 37 (HE de Sétif), 37 (HE de Bordj Bou Arreridj), 34 (HE de Mila) et 21 (HE d'El Oued) composés. Quatre composés majeurs ont été détectés dans toutes les 5 HE, thymol (15.1–56.3 %), carvacrol (2.8–59.6 %), γ -terpinène (9.8–21.8 %) et *p*-cymène (8.5–13.9 %). Les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne ont montré que toutes les HE avaient une bonne activité antibactérienne à la fois sur les souches de référence d'*E. coli* et les souches multirésistantes. À la dilution $\frac{1}{2}$, toutes les HE ont généré des zones d'inhibition d'un diamètre ≥ 23 mm. L'HE de Bordj, contenant la plus grande quantité de monoterpènes oxygénés (76.2 %) et de carvacrol (59.6 %), était le plus actif.

Cette étude a fait le point sur l'augmentation de la fréquence des souches d'*E. coli* multirésistantes dans les IU au CHU de Sétif. Les résultats obtenus suggèrent que les HE d'*O. glandulosum* pourraient être utilisées dans certaines situations cliniques pour traiter ou prévenir certaines infections à bactéries multirésistantes comme les infections urinaires.

Mots clés : infection urinaire, *E. coli*, résistance aux antibiotiques, *O. glandulosum*, huiles essentielles, activité antibactérienne.

Abstract

Escherichia coli is the main agent responsible for healthcare-associated and community acquired urinary tract infections (UTI). The emergence and spread of antibiotic resistance in this species represent a major public health problem. The aims of this work are the study of the antibiotic sensitivity of *E. coli* strains isolated from UTI and the evaluation of the antibacterial activity of essential oils (EO) from 5 populations of *Origanum glandulosum* against *E. coli* resistant strains.

A total of 215 *E. coli* strains were collected, between January 2015 and February 2017, from urine samples received at the microbiology laboratory of Setif university hospital. The analysis of resistance profiles to β -lactams led to the identification of 37 (17.2%) extended-spectrum β -lactamases (ESBL) -producing strains. Age (≥ 60 years), hospitalisation and previous antibiotic use were identified as risk factors for infection with ESBL -producing *E. coli* strains (ESBL-EC). In addition to β -lactam antibiotics, marked resistance was observed to quinolones (nalidixic acid and ciprofloxacin, 34% and 26.5% respectively), trimethoprim-sulfamethoxazole (45.6%) and gentamicin (14%). Low levels of resistance were observed for amikacin, fosfomicin, nitrofurantoin and colistin. Different β -lactam resistance genes were detected (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY-2} and *bla*_{OXA-48}) with predominance of *bla*_{CTX-M-15}. Other resistance genes to aminoglycosides (*aadA1*), quinolones (*qnrB* and *aac(6')-Ib-cr*) and colistin (*mcr-1*) were also detected. A new real-time PCR assay targeting the novel colistin resistance gene *mcr-8*, has been developed. The test revealed the absence of this gene throughout the collection. Phylogenetic group analysis revealed the predominance of group B2 with 106 (49.3%) strains. Twenty (54%) strains of ESBL-EC transferred their resistance genes by conjugation. The transfer was carried out by plasmids of different incompatibility groups (IncI1, IncFIB, IncHI2).

Hydrodistillation of the aerial parts of 5 *O. glandulosum* populations gave EO yields ranging from 1.8 to 5.6% (w/w). Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) allowed for the identification of 43 (M'sila EO), 37 (Setif EO), 37 (Bordj EO), 34 (Mila EO) and 21 (El Oued EO) compounds. Four major compounds were detected in all 5 EO, thymol (15.1-56.3%), carvacrol (2.8-59.6%), γ -terpinene (9.8-21.8%) and *p*-cymene (8.5-13.9%). Antibacterial activity tests showed that all EO had good antibacterial activity against both reference and multidrug-resistant strains. At the dilution $\frac{1}{2}$, all EO generated inhibition zones with a diameter ≥ 23 mm. Bordj's EO, containing the highest amount of oxygenated monoterpenes (76.2%) and carvacrol (59.6%), was the most active.

This study investigated the increased frequency of multi-drug resistant *E. coli* strains in UTI at Setif university hospital. The results obtained suggest that *O. glandulosum* EO could be used in some clinical situations to treat or prevent some infections caused by multi-drug resistant bacteria such as UTI.

Key words: urinary tract infection, *E. coli*, antibiotic resistance, *O. glandulosum*, essential oils, antibacterial activity.

Sommaire

Liste des abréviations.....	I
Liste des figures.....	III
Liste des tableaux.....	V
Introduction	1

Partie Bibliographique

Chapitre I

I. Les infections urinaires.....	3
I.1. Définitions et classification des infections urinaires.....	3
I.1.1. Colonisations urinaires.....	3
I.1.2. Infections urinaires.....	3
I.2. Épidémiologie des infections urinaires.....	6
I.3. Germes impliqués dans les infections urinaires.....	6
I.4. Physiopathologie des infections urinaires.....	8
I.4.1. Modes d'infection.....	8
I.4.2. Facteurs de virulence et infections urinaires.....	8
I.4.3. Mécanismes de défense de l'hôte.....	10

Chapitre II

II. Résistance aux antibiotiques chez <i>E. coli</i>.....	12
II.1. Les β -lactamines.....	12
II.1.1. Structure et classification.....	12
II.1.2. Mécanismes d'action.....	14
II.1.3. Résistance d' <i>E. coli</i> aux β -lactamines.....	15
II.2. Les aminosides.....	22
II.2.1. Structure et classification.....	22
II.2.2. Mécanismes d'action.....	23
II.2.3. Résistance d' <i>E. coli</i> aux aminosides.....	23
II.3. Les quinolones.....	26
II.3.1. Structure et classification.....	26
II.3.2. Mécanismes d'action.....	27
II.3.3. Résistance d' <i>E. coli</i> aux quinolones.....	28
II.4. La colistine.....	29

II.4.1. Structure et mode d'action.....	29
II.4.2. Résistance d' <i>E. coli</i> à la colistine.....	30

Chapitre III

III. Étude des plantes médicinales et huiles essentielles.....	32
III.1. La plante utilisée dans cette étude : <i>Origanum glandulosum</i> Desf.....	32
III.1.1. Présentation de la plante.....	32
III.1.2. Description botanique	32
III.1.3. Classification botanique d' <i>Origanum glandulosum</i>	33
III.1.4. Usage traditionnel	33
III.2. Les huiles essentielles	34
III.2.1. Définitions	34
III.2.2. Méthodes d'extraction	34
III.2.3. Techniques d'analyse de la composition chimique	38
III.2.4. Composition chimique	39
III.2.5. Activités biologiques des huiles essentielles.....	41

Partie expérimentale

Chapitre IV Matériel et méthodes

IV.1. Présentation des lieux de travail.....	45
IV.2. Matériel biologique.....	45
IV.2.1. Souches bactériennes.....	45
IV.2.2. Matériel végétal.....	45
IV.3. Collecte des données.....	46
IV.4. Méthodes expérimentales.....	46
IV.4.1. Isolement et identification des souches bactériennes.....	46
IV.4.2. Étude de la sensibilité aux antibiotiques.....	48
IV.4.3. Détection phénotypique des mécanismes de résistance aux β -lactamines.....	49
IV.4.4. Identification des gènes de résistance aux antibiotiques.....	50
IV.4.5. Développement d'une qPCR ciblant le gène <i>mcr-8</i> et screening pour des souches productrices de ce gène.....	54
IV.4.6. Détermination des groupes phylogénétiques.....	55
IV.4.7. Étude du transfert des gènes de résistance.....	55

IV.4.8. Extraction des huiles essentielles.....	57
IV.4.9. Analyse chimique des huiles essentielles.....	58
IV.4.10. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles.....	59
IV.4.11. Analyse statistique.....	60

Chapitre V

Résultats et Discussion

V.1. Répartition des souches isolées d'infection urinaire.....	61
V.1.1. Répartition des souches isolées selon l'espèce bactérienne.....	61
V.1.2. Répartition des souches d' <i>E. coli</i>	62
V.1.2.1. En fonction du sexe.....	62
V.1.2.2. Selon la tranche d'âge.....	63
V.1.2.3. Selon l'origine de l'isolat.....	63
V.2. Résistance des souches d' <i>E. coli</i> aux antibiotiques.....	64
V.2.1. Résistance aux β -lactamines.....	64
V.2.1.1. Phénotypes de résistance aux β -lactamines.....	64
V.2.1.2. Facteurs de risque liés à la production de BLSE.....	68
V.2.2. Résistances à l'ensemble des antibiotiques.....	69
V.3. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques.....	72
V.3.1. Gènes de résistance aux β -lactamines.....	72
V.3.2. Gènes de résistance aux quinolones et aux aminosides.....	76
V.3.3. Gènes de résistance à la colistine.....	78
V.4. Développement d'une qPCR ciblant le gène <i>mcr-8</i>	79
V.5. Groupes phylogénétiques.....	81
V.6. Transfert des gènes de résistance aux antibiotiques.....	82
V.6.1. Conjugaison bactérienne.....	82
V.6.2. Typage des plasmides.....	86
V.7. Rendement des huiles essentielles.....	87
V.8. Composition chimique des Huiles essentielles.....	89
V.9. Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	96
Conclusion	102
Références bibliographiques.....	104
Annexes	

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AME :	Enzymes Modifiant les Aminosides
AmpC :	β -lactamase de classe C ou céphalosporinase
ARN:	Acide ribonucléique
ATCC:	American Type Culture Collection
ATP:	Adénosine triphosphate
BET:	Bromure d'éthidium
BGN:	bacilles à Gram négatif
bla :	Gène codant une β -lactamase
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
BLSE :	β -lactamases à spectre élargi ou étendu
C1G/C2G/C3G/C4G :	Céphalosporines de 1 ^{ère} , 2 ^{ème} , 3 ^{ème} et 4 ^{ème} génération
CASE :	Céphalosporinase
CHU :	Centre Hospitalier Universitaire
CMB :	Concentration minimale bactéricide
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CMY:	Céphamycinase
CPG/SM	Chromatographie en phase gazeuse/ Spectrométrie de masse
CTX-M:	Cefotaximase Munich
DHA :	DHArhan hospital
DMSO	Diméthyl sulfoxide
EC :	<i>E. coli</i>
EC-BLSE	<i>E. coli</i> productrice de β -lactamases à spectre élargi
EC-non-BLSE	<i>E. coli non</i> -productrice de β -lactamases à spectre élargi
EDTA :	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EUCAST :	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDR :	Facteurs de risque
GES:	Guyana Extended-Spectrum β -lactamase
HE :	Huile (s) essentielle (s)
Inc :	Incompatibilité
IR :	Indice de rétention
IU :	Infection (s) urinaire (s)
Kb :	Kilobase

MBL :	Métallo- β -lactamases
MCR :	Mobile Colistin Resistance
NpmA :	novel plasmid-mediated Aminoglycoside-resistance rRNA methyltransferase A
OXA :	Oxacillinase
Pb :	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-STD :	Standard Polymerase Chain Reaction
PER:	Pseudomonas Extended Resistance
PLP :	Protéines liant les pénicillines
PMQR :	Plasmid Mediated Quinolone Resistance
PNA :	Pyélonéphrite aiguë
QepA:	Quinolone efflux pump A
Qnr:	Quinolone resistance
qPCR :	Quantitative Polymerase Chain Reaction
QRDR :	Quinolone Resistance Determining Region
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> méticillinorésistant
SHV:	Sulfhydryl reagent Variable
SPILF :	Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française
TBE :	Tris-borate-EDTA
TC :	Transconjugant
TEM:	Temoneira : nom du patient
TLA :	Tlahuicas-tribu indienne
UFC :	Unité Formant Colonie
UPEC :	<i>E. coli</i> Uropathogène
UV :	Ultra-violet
VEB:	Vietnam Extended-Spectrum β -lactamase

Liste des figures

Figure 1 : Terminologie et stratégie de prise en charge globale en cas de bactériurie	5
Figure 2 : Localisations des principaux sites du corps humain pouvant être atteints par une infection due à <i>E. coli</i> , avec les pathotypes correspondants.....	7
Figure 3 : Pathogénèse des infections urinaires.....	9
Figure 4 : Structure des β -lactamines	14
Figure 5 : Mécanisme d'action d'une β -lactamase	15
Figure 6 : Classification des aminosides selon leur structure chimique.	23
Figure 7 : Structure chimique de quelques quinolones.....	27
Figure 8 : Structure des polymyxines (colistine et polymyxine B)	30
Figure 9 : Mécanismes de résistance à la colistine décrits chez <i>E. coli</i> en Algérie	31
Figure 10 : <i>O. glandulosum</i> Desf.	33
Figure 11 : Illustration schématique de la méthode d'hydrodistillation.....	35
Figure 12 : Illustration schématique de la méthode de distillation à la vapeur	36
Figure 13 : Un chromatographe en phase gazeuse et ses principaux composants.....	38
Figure 14 : Structure de l'unité isoprénique.....	39
Figure 15 : Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles	41
Figure 16 : Spectromètre de masse MALDI-TOF.....	47
Figure 17 : Exemple de résultats obtenus par MALDI-TOF MS.....	48
Figure 18 : Lecteur automatisé des antibiogrammes	49
Figure 19 : Appareil d'hydrodistillation type Clevenger.....	58
Figure 20 : Plaque à 96 puits utilisée pour la détermination des CMI et CMB.....	60
Figure 21 : Pourcentage (%) d'isolement des grands groupes de bactéries.....	61
Figure 22 : Fréquence d'isolement (%) des différentes espèces responsables d'infection urinaire.	62
Figure 23 : Répartition des souches d' <i>E. coli</i> selon le service d'hospitalisation.	64
Figure 24 : Antibiogramme de souches productrices de BLSE.....	65
Figure 25 : Phénotype BLSE masqué par phénotype HCASE.....	65
Figure 26 : Test de synergie dans un milieu MH additionné de cloxacilline	66
Figure 27 : Phénotype HCASE.....	66
Figure 28 : CMI par E-test à l'ertapénème de la souche <i>E. coli</i> 667	67
Figure 29 : Détermination de la CMI de la colistine par microdilution.	72
Figure 30 : Résultats de la recherche des gènes de résistance aux β -lactamines.....	73
Figure 31 : Détection des gènes de résistance aux β -lactamines par PCR standard.....	73
Figure 32 : Détection des gènes de résistance aux aminosides et aux quinolones	76
Figure 33 : Détection des gènes de résistance à la colistine par PCR quantitative et standard.	78
Figure 34 : Test de sensibilité et de reproductibilité de la qPCR- <i>mcr-8</i>	79

Figure 35 : Transfert des gènes de résistance par conjugaison.....	84
Figure 36 : Résultats des PCR de typage plasmidique.	86
Figure 37 : Rendement en % (m/m) des huiles essentielles d' <i>O. glandulosum</i>	88
Figure 38 : Pourcentage de détection des principales familles des composés chimiques	92
Figure 39 : Structure chimique des composés majoritaires des huiles essentielles.	94
Figure 40 : Pourcentage des composés chimiques de l'huile essentielle d' <i>O. glandulosum</i> (Sétif).....	94
Figure 41 : Pourcentage des composés chimiques de l'huile essentielle d' <i>O. glandulosum</i> (Mila).....	94
Figure 42 : Pourcentage des composés chimiques de l'huile essentielle d' <i>O. glandulosum</i> (Bordj).	95
Figure 43 : Pourcentage des composés chimiques de l'huile essentielle d' <i>O. glandulosum</i> (M'sila).....	95
Figure 44 : Pourcentage des composés chimiques de l'huile essentielle d' <i>O. glandulosum</i> (L'Oued).....	95
Figure 45 : Photos de l'activité antibactérienne des différentes huiles essentielles.	100

Liste des tableaux

Tableau 1. Facteurs de virulence des principaux germes uropathogènes.....	12
Tableau 2. Classification des β -lactamases selon Bush et <i>al.</i> et Ambler	18
Tableau 3. les Différentes types de β -lactamases décrites chez <i>E. coli</i> en Algérie.....	22
Tableau 4. Gènes de résistance aux aminosides décrits chez <i>E. coli</i> en Algérie.....	26
Tableau 5. Amorces utilisées pour les réactions de PCR et de séquençage.....	52
Tableau 6. Amorces utilisées pour la détermination des groupes phylogénétiques.....	55
Tableau 7. Amorces utilisées pour le typage plasmidique	56
Tableau 8. Répartition des souches d' <i>E. coli</i> en fonction de la tranche d'âge.....	63
Tableau 9. Caractéristiques de la population étudiée, divisée selon la production ou non de bêta-lactamases à spectre étendu.....	67
Tableau 10. Pourcentages de résistance aux antibiotiques testés.....	68
Tableau 11. Gènes de résistance aux antibiotiques de 39 souches d' <i>E. coli</i> isolées de patients hospitalisés et externes.....	73
Tableau 12. Groupage phylogénétiques des souches d' <i>E. coli</i>	81
Tableau 13. Résultats des tests de conjugaison et de typage plasmidique.....	83
Tableau 14. Composition chimique des huiles essentielles de 5 populations d' <i>O. glandulosum</i> Desf.....	90
Tableau 15. Activité antibactérienne des huiles essentielles de 5 populations d' <i>O. glandulosum</i> exprimée en diamètre des zones d'inhibition.....	97
Tableau 16. Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) des huiles essentielles d' <i>O. glandulosum</i> et des principaux composés actifs purs.....	98

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction

Les infections urinaires (IU) comptent parmi les infections bactériennes les plus courantes, touchant 150 millions de personnes dans le monde chaque année (Stamm et Norrby, 2001). Ces infections constituent une cause importante de morbidité chez les bébés garçons, les hommes plus âgés et les femmes de tous âges. Les coûts sociétaux de ces infections, y compris les coûts des soins de santé et le temps d'absence du travail, s'élèvent à environ 3.5 milliards de dollars américains par an rien qu'aux États-Unis, ce qui représente un lourd fardeau économique (Flores-Mireles et *al.*, 2015).

Les infections urinaires sont causées par des bactéries à Gram-négatif et Gram-positif, ainsi que par certains champignons. Cependant, *Escherichia coli* représente le principal agent responsable d'IU associées aux soins ou d'origines communautaires. Cette espèce cause à elle seule jusqu'à 75 à 90 % de toutes les IU diagnostiquées (Foxman, 2003).

L'utilisation massive et inappropriée d'antibiotiques telles que les céphalosporines de troisième génération (C3G) et les fluoroquinolones dans le traitement des IU a été rapidement suivie par l'émergence de souches multirésistantes et a compromis en maints cas l'utilisation de ces molécules de choix dans le traitement de ce genre d'infections (El bouamri et *al.*, 2014). Comme toute autre entérobactérie, *E. coli* est devenue de plus en plus résistante à l'action de nombreux antibiotiques (Rossignol et *al.*, 2017). L'émergence et la dissémination de différents mécanismes de résistance acquise au sein de cette espèce ont entraîné l'apparition des souches multirésistantes, conduisant parfois à des impasses thérapeutiques. De nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques sont constamment détectés, ces nouveaux gènes concernent même d'anciennes molécules comme la colistine. En 2015, Liu et *al.* ont décrit, pour la première fois, un gène mobile codant pour la résistance à la colistine (*mcr-1*) chez des souches d'*E. coli* (Liu et *al.*, 2016). Aujourd'hui, plusieurs variants de ce gène ont été détectés. En Algérie, le variant *mcr-8* a été détecté très récemment chez une souche clinique de *Klebsiella pneumoniae* (Nabti et *al.*, 2020). La détection de ces nouveaux gènes de résistance revêt un intérêt épidémiologique majeur.

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour la recherche et le développement de nouvelles molécules dotées de propriétés antimicrobiennes à partir de diverses sources naturelles dont l'objectif est de lutter contre la résistance aux antibiotiques. Par conséquent, une grande attention a été accordée aux plantes médicinales et aromatiques et à leurs métabolites secondaires tels que les composés terpéniques, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Les huiles essentielles (HE) ont reçu un intérêt particulier dans ce domaine de recherche, car plusieurs études

ont rapporté l'efficacité de ces composés comme agents antimicrobiens. Les HE possèdent un large spectre d'activité antibactérienne, antifongique et même antivirale (Tarique et *al.*, 2019). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à étudier une plante endémique de la flore algérienne très riche et diversifiée, il s'agit d'*Origanum glandulosum* Desf. collectée dans cinq différentes localités en Algérie (Sétif, Bordj Bou Arreridj, Mila, M'sila et El-Oued).

Les objectifs fixés par la présente étude sont:

- ✓ Détermination de l'état actuel de la résistance aux antibiotiques chez les souches d'*E. coli* responsables d'infection urinaire au CHU de Sétif;
- ✓ Étude moléculaire des mécanismes de résistance aux antibiotiques (β -lactamines, aminosides, quinolones et colistine) et détermination du support plasmidique des gènes de résistance;
- ✓ Développement de nouvelles méthodes moléculaires pour l'analyse de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques;
- ✓ Extraction des HE à partir d'*O. glandulosum* provenant de cinq différentes régions d'Algérie;
- ✓ Analyse phytochimique des HE par CPG/SM;
- ✓ Evaluation du pouvoir antibactérien des HE sur une collection de souches d'*E. coli* responsables d'IU.

CHAPITRE I
LES INFECTIONS URINAIRES

I. Les infections urinaires

I.1 Définitions et classification des infections urinaires

I.1.1. Colonisations urinaires

Anciennement dénommées bactériuries asymptomatiques, les colonisations urinaires correspondent à la présence de micro-organismes dans les urines sans manifestations cliniques avec association ou non à une leucocyturie (Caron et *al.*, 2018). Il n'y a pas de seuil de bactériurie, sauf dans le cas de grossesse où un seuil $\geq 10^5$ UFC /ml est retenu (Caron et *al.*, 2018).

I.1.2. Infections urinaires

Les infections urinaires (IU) correspondent à l'agression d'un tissu de l'appareil urinaire par un ou plusieurs micro-organismes, conduisant à une réponse inflammatoire associée avec des signes et symptômes qui varient selon le terrain (Bruyère et *al.*, 2008). Sur le plan clinique, les IU peuvent être classées en IU simples, à risque de complication ou graves (**Fig. 1**).

I.1.2.1. Les infections urinaires simples

Ce sont des IU qui surviennent chez des patients sans facteurs de risque (FDR) de complication (SPILF, 2015). Elles touchent généralement des personnes qui sont en bonne santé et qui n'ont aucune anomalie structurelle ou neurologique des voies urinaires (Flores-Mireles et *al.*, 2015). Ces infections se subdivisent en IU inférieures dites cystites et IU supérieures dites pyélonéphrites (Flores-Mireles et *al.*, 2015).

I.1.2.2. Les infections urinaires à risque de complication

Le terme d'IU à risque de complication est préféré à l'ancienne dénomination d'IU compliquée, car, il s'agit des formes avec au moins un FDR pouvant rendre l'infection plus sévère ou plus difficile à traiter, sans que la complication ne soit nécessairement constituée (Caron et *al.*, 2018). Les FDR de complication d'une IU sont (SPILF, 2015) :

- ✓ Toute anomalie organique ou fonctionnelle de l'arbre urinaire, quelle qu'elle soit (résidu vésical, reflux, lithiase ou corps étranger dans les voies urinaires, tumeur, acte urologique récent, ...etc.).
- ✓ Certains terrains favorables : sexe masculin, grossesse, immunodépression grave (immunosuppresseurs, cirrhose, transplantation...etc.), insuffisance rénale chronique sévère (clairance de créatinine < 30 ml/min), sujet âgé : sujets de plus de 75 ans ou sujets de plus de 65 ans cumulant au moins 3 critères de fragilité (critères de Fried) qui sont :

- perte de poids involontaire au cours de la dernière année; - vitesse de marche lente;
 - faible endurance; - faiblesse/fatigue; - activité physique réduite.
- ✓ Il convient de noter que le diabète a été exclu des FDR de complication. En effet, bien que les IU soient plus fréquentes chez les sujets présentant un diabète, la plupart des études ne mettent pas en évidence de pronostic plus défavorable des IU chez les sujets diabétiques comparés à ceux non-diabétiques.

I.1.2.3. Les infections urinaires graves

Qu'elle soit initialement simple ou à risque de complication, une IU (autres que les cystites) peut s'accompagner d'un sepsis grave ou d'un choc septique. Une IU est aussi qualifiée de grave dans toute situation clinique où un drainage chirurgical ou interventionnel est nécessaire, (risque d'aggravation du sepsis en péri-opératoire) (SPILF, 2015; Caron *et al.*, 2018).

(i). Cystite aiguë

Elle correspond à l'infection de la vessie. Elle peut être simple ou à risque de complication. La cystite aiguë se manifeste par des signes cliniques de type (SPILF, 2015):

- Brûlures mictionnelles,
- Pollakiurie (augmentation de la fréquence des mictions),
- Impériosités (envies pressantes d'uriner).

Ces signes peuvent être isolés ou associés entre eux.

- Une hématurie macroscopique survient dans environ 30 % des cas et ne constitue pas un signe de gravité de l'infection.

(ii). Cystite récidivante

Une cystite est considérée comme récidivante s'il y a eu au moins 4 épisodes pendant une période de 12 mois (SPILF, 2015). D'après Albert *et al.* (2004), 20 % à 30% des femmes qui ont eu une cystite aiguë, connaîtront une récurrence. Les cystites récidivantes surviennent fréquemment en l'absence de toute uropathie ou autre FDR de complication (Caron *et al.*, 2018). Elles peuvent être, dans certains cas, associées à un ou plusieurs FDR de complication (en particulier vessie neurologique) (Dason *et al.*, 2011).

(iii). Pyélonéphrite aiguë

Elle correspond à l'infection du haut appareil urinaire (bassin et parenchyme rénal) (Choe *et al.*, 2018). Elle peut être une IU simple ou à risque de complication, comme elle peut se développer en une IU grave s'il y a présence de critère de gravité (Caron *et al.*, 2018). Sur le plan clinique, une pyélonéphrite aiguë typique associe inconstamment, des signes de cystite souvent discrets et des signes témoignant d'une atteinte parenchymateuse rénale, à savoir:

- Fièvre, frissons,
- Douleurs lombaires typiquement unilatérales,
- Des signes digestifs: vomissements, diarrhée et météorisme abdominal peuvent être présents, parfois au premier plan (SPILF, 2015).

(iv). Infection urinaire masculine

Le terme d’IU masculine a remplacé celui de prostatite, trop réducteur (Caron et al., 2018). Une grande variabilité est observée dans la présentation clinique des IU masculines, de formes peu symptomatiques sans fièvre jusqu’à des formes avec atteinte parenchymateuse évidente pouvant aller jusqu’au choc septique. Dans certains cas, l’atteinte prostatique est cliniquement évidente ; ces tableaux peuvent évidemment être qualifiés de prostatite. Dans d’autres cas, les signes dominants sont ceux d’une PNA. Parfois, tout se résume à des signes fonctionnels urinaires sans manifestation systémique (Caron et al., 2018).

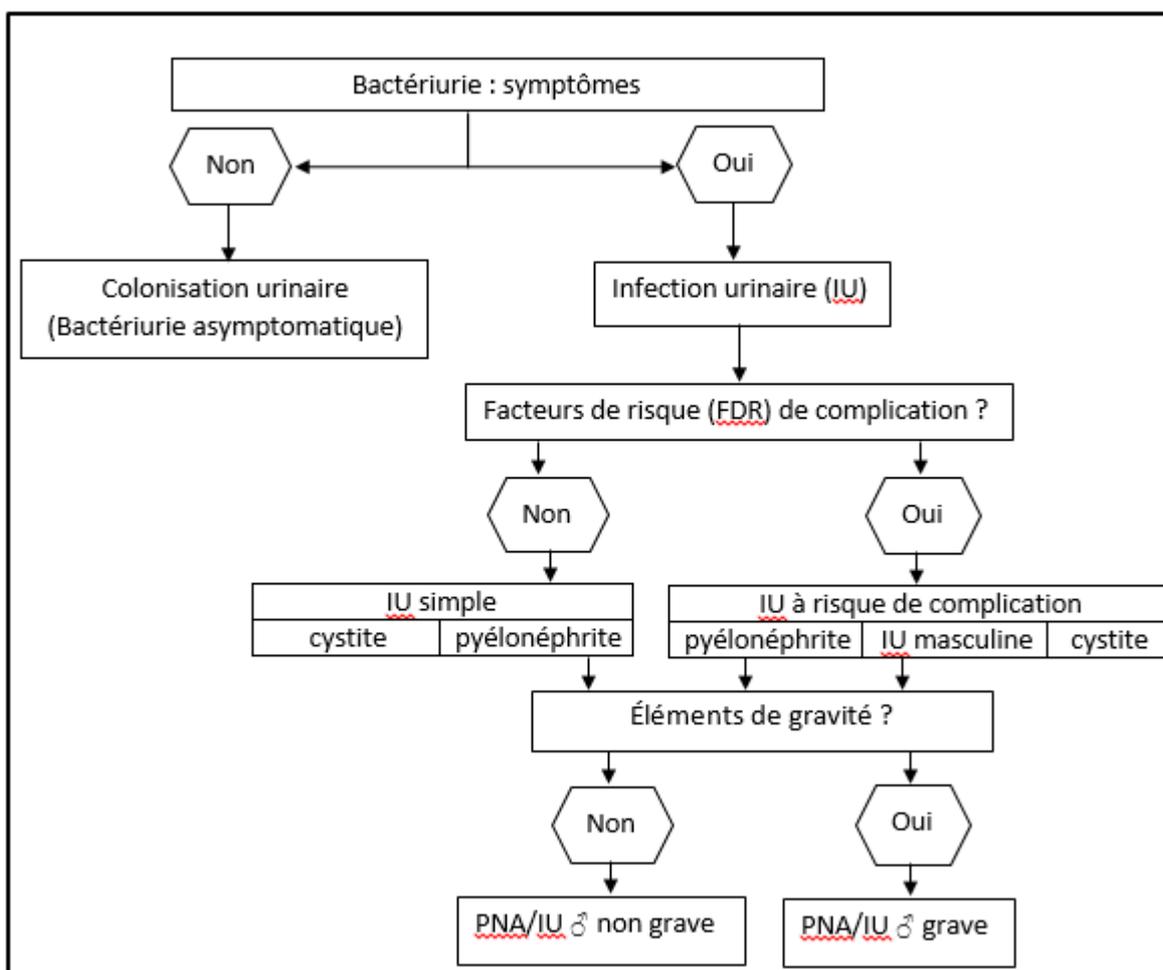


Figure 1. Terminologie et stratégie de prise en charge globale en cas de bactériurie (Caron et al., 2018).

I.2. Épidémiologie des infections urinaires

Les infections urinaires comptent parmi les infections bactériennes les plus courantes, touchant 150 millions de personnes dans le monde chaque année (Stamm et Norrby, 2001). L'incidence annuelle des IU est estimée à 11 millions de cas aux États-Unis et à 4-6 millions de cas en France (Chemlal et *al.*, 2015).

Près de la moitié de toutes les femmes connaîtront une IU au cours de leur vie et près d'une femme sur trois aura eu au moins un épisode d'IU nécessitant une antibiothérapie avant l'âge de 24 ans (Foxman, 2003). L'urètre féminin (3,8 à 5,1 cm de long) est considérablement plus court que l'urètre masculin (13 à 20 cm de long) (Hickling et *al.*, 2015). Cette différence anatomique est parmi les facteurs qui rendent les femmes plus susceptibles d'être victimes d'IU que les hommes. D'après Taur et Smith (2007), 7 millions de femmes feraient une demande de soins ambulatoires en raison d'IU simple. Le taux maximal d'IU simple survient pendant les années d'activité sexuelle maximale, habituellement entre 18 et 39 ans (Medina et Castillo-Pino, 2019). Les IU récurrentes simples sont également courantes chez les jeunes femmes. Après un premier épisode d'IU, 27 % des femmes ont une récurrence confirmée au cours des six prochains mois et 2,7 % ont une deuxième récurrence au cours de la même période de temps (Alos, 2005).

On estime à 250 000 le nombre de cas de pyélonéphrite par an aux États-Unis, avec une fréquence plus élevée chez les femmes. Chez les femmes âgées de 18 à 49 ans, l'incidence estimée de la pyélonéphrite est de 28/10 000 et 7 % des cas nécessitent une hospitalisation (Medina et Castillo-Pino, 2019). La récurrence est moins fréquente dans les pyélonéphrites, 9 % des femmes et 5,7 % des hommes peuvent avoir un deuxième épisode dans l'année (Alos, 2005).

Les IU associées aux soins de santé (infections nosocomiales) sont les infections les plus fréquentes parmi toutes les infections associées aux soins de santé. La prévalence de ces infections varie de 12,9 % aux États-Unis et 19,6 % en Europe à 24 % dans les pays en développement (Allegranzi et *al.*, 2011; Magill et *al.*, 2014; Tandogdu et Wagenlehner, 2016). 80 % des IU associées aux soins enregistrées aux États-Unis sont attribués aux sondes urinaires (Foxman, 2010). Le risque d'IU augmente avec la durée du sondage urinaire (Foxman, 2003).

I.3. Germes impliqués dans les infections urinaires

Escherichia coli est le principal agent responsable d'IU associée aux soins ou d'origine communautaire. Cette espèce cause toute seule jusqu'à 75 à 90 % de toutes les IU diagnostiquées (Foxman, 2003). C'est un bacille à Gram négatif appartenant à famille des *Enterobacteriaceae*. Sa taille (0.5 à 3 µm) et son poids (0.5 à 5 picogrammes) varient en fonction des conditions de

croissance (Bleibtreu, 2016). *E. coli* est une bactérie commensale du microbiote intestinal des humains et des animaux homéothermes. Son établissement dans le tractus digestif s'effectue durant les premières heures ou journées qui suivent l'accouchement (Donnet-Hughes et al., 2010). Le nombre d'*E. coli* chez l'humain sain est estimé entre 10^6 et 10^7 par gramme de selles constituant ainsi l'espèce bactérienne dominante de la flore aérobie facultative intestinale (Bleibtreu, 2016). *E. coli* est responsable à la fois d'infections intestinales et extra-intestinales diverses impliquant une dizaine de pathovars différents (**Fig. 2**) (Bleibtreu, 2016). Les *E. coli* uropathogènes (UPEC) sont responsables de la majorité (90%) des IU (Bleibtreu, 2016).

D'autres micro-organismes peuvent être responsables d'IU, comprenant, des bactéries à Gram négatif membres de la famille des *Enterobacteriaceae* comme *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis*, d'autres bacilles à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*, des streptocoques comme *Streptococcus agalactiae*, des staphylocoques comme *Staphylococcus saprophyticus*, des entérocoques comme *Enterococcus faecalis* et des levures comme *Candida albicans* (Foxman, 2010; Flores-Mireles et al., 2015).

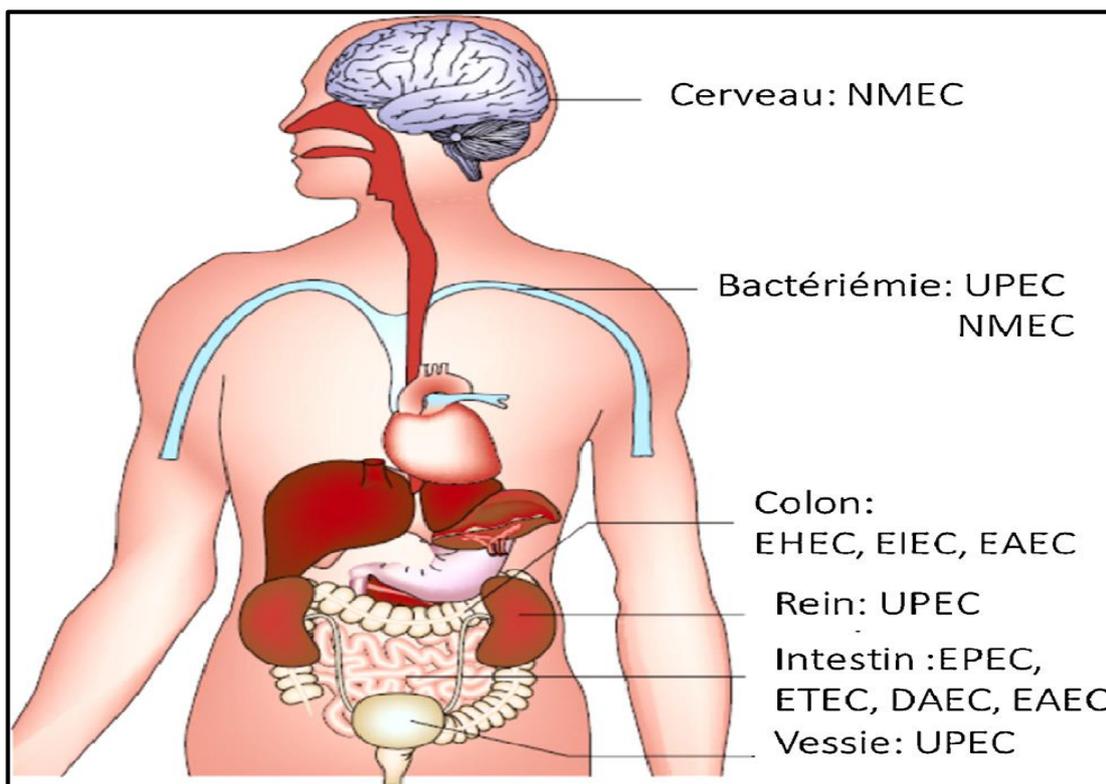


Figure 2. Localisations des principaux sites du corps humain pouvant être atteints par une infection due à *E. coli* avec les pathovars correspondants. **UPEC** : *E. coli* uropathogène, **NMEC** : *E. coli* responsable de méningites néonatales, **EHEC** : *E. coli* entérohémorragique, **EIEC** : *E. coli* entéroinvasive, **EAEC** : *E. coli* entéroaggrégative, **EPEC** : *E. coli* entéro-pathogène, **ETEC** : *E. coli* entérotoxinogène, **DAEC** : *E. coli* à adhérence diffuse.

I.4. Physiopathologie des infections urinaires

I.4.1. Modes d'infection

Les micro-organismes peuvent introduire l'appareil urinaire par 3 voies : ascendante, hématogène et lymphatique (Bruyère et *al.*, 2008).

La voie ascendante : l'arbre urinaire est normalement stérile, à l'exception de la colonisation de l'urètre distal par une flore diverse regroupant différents types de germes comme les entérobactéries (flore digestive), staphylocoques à coagulase négative (flore cutanée) et lactobacilles (flore génitale chez la femme) (Caron, 2003). La grande majorité des IU surviennent par voie ascendante. À partir de la flore urétrale, les micro-organismes peuvent remonter jusqu'à la vessie atteignant éventuellement les reins et la prostate chez l'homme (Caron, 2003).

La voie hématogène : ce mode d'infection est moins fréquent et survient lors d'état de septicémie (Ifergan et *al.*, 2012). Cette voie ne concerne que quelques rares espèces bactériennes tels que *Staphylococcus aureus*, *Candida spp* et *Mycobacterium tuberculosis* (Bruyère et *al.*, 2008).

La voie lymphatique : Dans de rares cas, des bactéries provenant d'organes adjacents peuvent pénétrer dans les voies urinaires par voie lymphatique. Les conditions associées à cette voie sont les abcès rétro-péritonéaux et les infections intestinales graves (Davis and Flood, 2011).

I.4.2. Facteurs de virulence et infections urinaires

Un facteur de virulence (FV) est un gène bactérien dont le produit est impliqué dans le pouvoir pathogène de la bactérie sur l'hôte (Bleibtreu, 2016). Les FVs bactériens jouent un rôle très important dans la détermination de la capacité d'un organisme donné à envahir les voies urinaires et le niveau d'infection qui peut être acquis (Davis et Flood, 2011).

Les UPEC qui sont présents dans la flore intestinale peuvent infecter les voies urinaires en mettant en jeu différents mécanismes incluant des adhésines, des toxines, des mécanismes d'invasion cellulaire, de formation de biofilm et des capacités d'utilisation des ressources du microenvironnement urinaire (Davis et Flood, 2011; Bleibtreu, 2016).

L'adhésion est la première étape impliquée dans la pathogenèse des IU. Une IU commence généralement par une contamination péri-urétrale par un uropathogène résidant dans l'intestin comme les UPEC. L'adhésion est suivie de la colonisation de l'urètre et de l'ascension subséquente du pathogène vers la vessie (**Fig. 3**), un événement nécessitant des adhésines spécifiques. Dans la vessie, les conséquences des interactions complexes hôte-pathogène déterminent si les

uropathogènes réussissent ou non la colonisation (Flores-Mireles et *al.*, 2015). De multiples adhésines bactériennes (**Tab. 1**) comme les Pili type 1 reconnaissent les récepteurs de l'épithélium vésical et agissent comme des médiateurs de la colonisation.

Les germes uropathogènes tels que les UPEC survivent après envahissement de l'épithélium vésical, en produisant des toxines comme l'hémolysine (HlyA), le facteur nécrosant cytotoxique (Cnf1) et des protéases pour libérer les nutriments des cellules hôtes (Flores-Mireles et *al.*, 2015; Bleibtreu, 2016).

La capacité des uropathogènes à croître dépend aussi de leur capacité d'acquérir du fer de leur environnement d'où le nombre important de FV (**Tab. 1**) impliqués dans la capture du fer (Bleibtreu, 2016).

En se multipliant et en surmontant la surveillance immunitaire de l'hôte, les uropathogènes peuvent ensuite remonter jusqu'aux reins, se fixant à nouveau par des adhésines ou des pili comme les P pili, sur des motifs glycolipidiques présents à la surface des cellules épithéliales rénales et produisant ensuite, des toxines nuisibles aux tissus. Par conséquent, les uropathogènes sont capables de traverser la barrière épithéliale tubulaire pour accéder à la circulation sanguine, ce qui provoque une bactériémie (**Fig. 3**) (Flores-Mireles et *al.*, 2015).

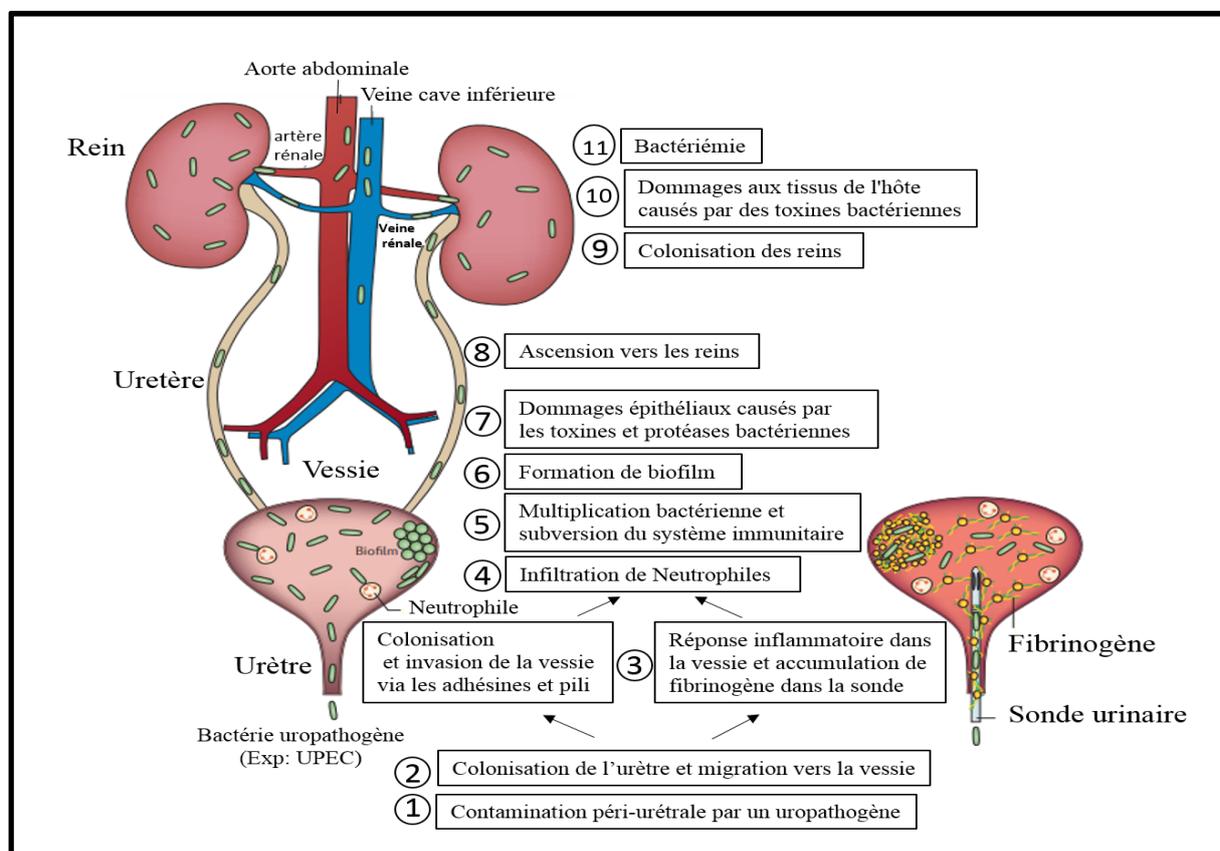


Figure 3. Pathogénèse des infections urinaires (Flores-Mireles et *al.*, 2015).

I.4.3. Mécanismes de défense de l'hôte

L'hôte est doté de plusieurs moyens le protégeant du développement d'une IU. Sur le plan anatomique, l'urètre constitue le premier obstacle à l'invasion des bactéries. Sa longueur plus grande chez l'homme explique la faible fréquence de développer une IU chez le sujet masculin (Caron, 2003). De plus, les caractéristiques physicochimiques de l'urine normale (osmolarité, pH, concentration en urée et en sels, teneur en acides organiques) empêchent la multiplication de la majorité des germes colonisant l'urètre (Sobel, 1997). Si dans certains cas, une pullulation intra-vésicale parvient à se produire, la miction suivante permet l'élimination de 99,9 % de la population bactérienne (Caron, 2003). Les défauts de miction causées par l'hyperplasie bénigne de la prostate et le reflux vésico-urétéral, constituent ainsi, des facteurs prédisposant majeurs pour le développement des IU (Sobel, 1997). En outre, l'urine contient des glycoprotéines (comme la protéine de Tamm-Horsfall) et d'oligosaccharides agissant comme des récepteurs solubles captant les bactéries et favorisant leur clairance (Caron, 2003).

En cas de colonisation bactérienne, il existe différents facteurs qui interviennent pour éviter l'invasion de la muqueuse :

- L'inhibition de l'adhérence des germes par différentes types de molécules présentes à la surface de l'urothélium (protéine de de Tamm-Horsfall, mucopolysaccharides) (Caron, 2003);
- L'existence d'un effet bactéricide local de mécanisme inconnu, mais indépendant de la réponse inflammatoire (polynucléaires, cytokines) et de la réponse immunitaire (humorale et cellulaire) (Sobel 1997; Caron, 2003);
- Les cellules épithéliales s'exfolient dans les heures qui suivent l'infection initiale et les cellules urothéliales infectées sont éliminées au cours de ce processus (Mysorekar et al., 2002).
- Le sphincter vésico-urétéral et le flux permanent de l'urine pyélique jouent un rôle primordial dans la protection des reins de l'invasion bactérienne (Caron, 2003).
- Quant à la prostate, elle est protégée par des sécrétions possédant des effets antibactériens (Sobel, 1997).

Compte tenu de tout cet arsenal, la survenue d'une IU implique soit une déficience des défenses de l'hôte, soit le développement dans la flore urétrale d'une bactérie particulièrement virulente dite uropathogène.

Tableau 1. Facteurs de virulence des principaux germes uropathogènes (Flores-Mireles et al., 2015).

Uropathogène	Facteurs de virulence				
	Adhésion	Toxine	immuno-évasion	Capture du fer	Autres
UPEC	<ul style="list-style-type: none"> • F1C pili • P pili • S pili • Type 1 pili • Dr adhésines 	<ul style="list-style-type: none"> • HlyA • CNF1 	<ul style="list-style-type: none"> • HlyA • Antigènes capsulaires • CNF1 • Yersiniabactine 	<ul style="list-style-type: none"> • Aérobactine • Entérobactine • Salmochéline • Yersiniabactine 	<ul style="list-style-type: none"> • Antigène43 • Flagelles
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Type 1 pili • Type 3 pili 	ND	Capsule	<ul style="list-style-type: none"> • Aérobactine • Entérobactine 	ND
<i>Proteus mirabilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • MR/P pili • NAFs • PMFs • AipA adhésine • TaaP adhésine 	<ul style="list-style-type: none"> • Hémolysines (HpmA et HlyA) • Pta 	<ul style="list-style-type: none"> • Capsule • ZapA 	<ul style="list-style-type: none"> • Protéobactine • Yersiniabactine reliée 	<ul style="list-style-type: none"> • Flagelles • Uréase
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ADN Extracellulaire • Exopolysaccharides (alginate, PEL et PSL) 	ND	<ul style="list-style-type: none"> • Capsule • Élastase • ExoS • Phospholipase • Rhamnolipides 	<ul style="list-style-type: none"> • Pyochéline • Pyoverdine 	Quorum sensing
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Aas adhésine • SdrI adhésine • Uaf adhésine 	Aas	ND	ND	Uréase
<i>Enterococcus faecalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ebp pili • Ace adhésine • Esp adhésine 	ND	Epa	ND	<ul style="list-style-type: none"> • Sortase A • SigV • MsrA et MsrB
<i>Enterococcus faecium</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ebp pili • Esp adhésine 	ND	ND	ND	ND

AipA: adhésion et invasion médiées par *Proteus* autotransporteur; CNF1: facteur nécrosant cytotoxique1; Ebp: associé à l'endocardite et au biofilm; Epa: polysaccharide antigène de l'entérocoque; Esp: protéine de surface de l'entérocoque; ExoS: éozymose S; F1C pili : type 1-like group immunologique C pili; HlyA : α -hémolysine; HpmA: hémolysine; MR/P: mannose-résistant *Proteus*-like; Msr: méthionine sulfoxide réductase; NAF: fimbria non agglutinantes; ND: non déterminé; PMF: *P. mirabilis*-like fimbria; P pili: pili associée aux pyélonéphrites; Pta: Agglutinine toxique de *Proteus*; TaaP: Agglutinine trimérique autotransporteur de *Proteus*; UPEC: *E. coli* uropathogène.

CHAPITRE II
RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ *E. coli*

II. Résistance aux antibiotiques chez *E. coli*

Les β -lactamines, les aminosides, les quinolones et la colistine sont parmi les principaux antibiotiques utilisés en thérapeutique contre les entérobactéries, y compris *E. coli*. Cette dernière est capable de développer facilement et rapidement des mécanismes de résistance nombreux et variés.

II.1. Les β -lactamines

Les β -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, tant par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie. La large utilisation de ces antibiotiques est liée à plusieurs facteurs, comme, la grande variété de leurs modes d'administration, leur large spectre d'activité antibactérien associé à une action bactéricide, une bonne diffusion tissulaire, une bonne tolérance et un faible nombre d'interactions médicamenteuses (Cavallo et *al.*, 2004).

II.1.1. Structure et classification

La famille des β -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle β -lactame (**Fig. 4A**) (Cavallo et *al.*, 2004). Ces molécules, qu'elles soient naturelles ou produites par hémisynthèse, sont classées en fonction de la nature de leur structure de base en trois grands groupes (**Fig. 4 A/B/C**) :

A/ Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique

La structure de base associe un cycle β -lactame à un cycle thiazolidine, spécifique des pénicillines. Il intègre le grand groupe des β -lactamines ayant un noyau péname, caractéristique des pénicillines. Ce groupe renferme plusieurs sous-groupes qui diffèrent par leur structure et leur spectre d'activité :

- Les phénoxygénicillines et analogues de la pénicilline G,
- La méthicilline et les isoxazolygénicillines (oxacilline et cloxacilline),
- Les aminopénicillines (ampicilline et amoxicilline),
- Les carboxypénicillines (ticarcilline),
- Les acyluréidopénicillines (pipéracilline),
- Les amidinopénicillines (pivmécillinam),
- Les pénicillines sulfonées (tazobactam et sulbactam),
- Les méthoxycarboxypénicillines (témocilline).

Des substitutions au niveau du noyau pénème sont à l'origine de nouveaux groupes de β -lactamines :

- La substitution du soufre en position 1 du noyau pénème par un atome de carbone (**Fig. 4A**) est à l'origine du noyau pénème spécifique de la structure des carbapénèmes, les plus connus sont l'imipénème, le méropénème et l'ertapénème. Ces antibiotiques ont un spectre très large et sont très stables à l'hydrolyse de la plupart des β -lactamases, y compris celles à spectre étendu (BLSE).
- La substitution du soufre en position 1 du noyau pénème par un oxygène (**Fig. 4A**) est à l'origine du noyau clavame (Exp : l'acide clavulanique).

B/ Dérivés de l'acide 7-amino-céphalosporanique

Leur noyau de base (noyau céphème) associe un cycle β -lactame à un cycle dihydrothiazine, qui distingue les céphalosporines des pénicillines (**Fig. 4B**). Suivant les substituants en R3 et R4, on distingue les céphalosporines, les céphamycines ou 7- α -méthoxy-céphalosporines (Exp : céfoxitine et céfotétan) et les oxacéphèmes (Exp : moxalactam) (**Fig. 4B**) (Cavallo et *al.*, 2004).

Les céphalosporines renferment plusieurs générations d'antibiotiques, de spectre et d'intérêt clinique variables (Ruppé, 2010) :

- Les céphalosporines de première génération (C1G) (Exp : céfalotine et céfalexine) : ces molécules sont plutôt actives sur les bactéries à Gram positif, mais également sur certains bacilles à Gram négatif.
- Les C2G (Exp : céfuroxime et céfamandole) : elles possèdent un spectre étendu vers les bactéries à Gram négatif.
- Les C3G (Exp : céfotaxime, ceftazidime et ceftriaxone) : ce sont les antibiotiques de choix dans le traitement des infections sévères à entérobactéries.
- Les C4G (Exp : céfépime et cefpirome) : sont relativement stables à l'hydrolyse des céphalosporinases de type AmpC (β -lactamases de classe C).
- Les C5G (Exp : ceftaroline et ceftibiprole) : céphalosporines anti SARM (*Staphylococcus aureus* méticillinorésistant) (Duplessis et Crum-Cianflone, 2011).

C/ Monobactames

Leur noyau se caractérise par la présence du noyau monocyclique, **azétidine**, limité au cycle β -lactame (**Fig. 4C**). Seul l'aztréonam est à l'heure actuelle prescrit, il n'est actif que sur les bacilles à Gram négatif (Cavallo et *al.*, 2004; Ruppé, 2010).

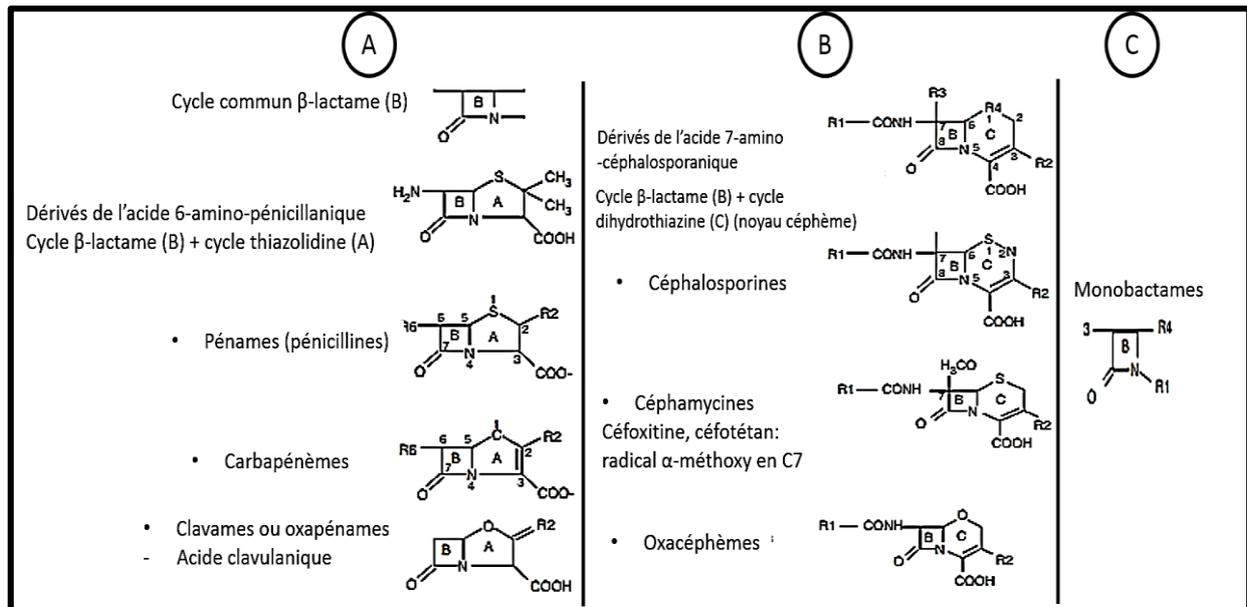


Figure 4. Structure des β -lactamines : A/ Dérivés de l'acide pénicillanique; B/Dérivés de l'acide 7-céphalosporinique; C/ Monobactames (Cavallo et *al.*, 2004).

II.1.2. Mécanismes d'action

Chez les bactéries à Gram négatif, les β -lactamines, molécules le plus souvent hydrophiles, doivent traverser la membrane externe pour atteindre leurs cibles, qui sont, les protéines liant les pénicillines (PLP). Ces dernières, sont des enzymes clés (transpeptidases et carboxypeptidases) pour la synthèse du peptidoglycane. Le caractère hydrophobe de la membrane externe, oblige les β -lactamines à traverser cette barrière essentiellement par des porines (Cavallo et *al.*, 2004). Chez *E. coli*, les deux porines les plus importantes (OmpC et OmpF) ont une lumière très étroite, ne laissant passer que des molécules de petite taille comme l'ampicilline ou surtout l'imipénème, alors que d'autres molécules comme les carboxypénicillines diffusent mal à cause de leur grande taille (Jaffe et *al.*, 1982). Après avoir traversé la membrane externe, les β -lactamines diffusent facilement à travers le peptidoglycane. Pour développer leur action antibiotique, les β -lactamines doivent ensuite traverser l'espace périplasmique sans être inactivées par les β -lactamases y présentes ou expulsées à l'extérieur par des pompes d'efflux. La présence d'une analogie structurale entre le noyau β -lactame et le dipeptide terminal D-alanine-D-alanine (substrat naturel des PLP) du pentapeptide constitutif du peptidoglycane favorise une fixation irréversible du cycle β -lactame sur le site actif (comportant une sérine) des enzymes cibles (transpeptidases et carboxypeptidases) présentes sur la membrane cytoplasmique. Cette fixation entraîne une ouverture du cycle β -lactame par rupture de la liaison amide et une acylation du site actif sérine avec formation d'un complexe pénicilloyl-enzyme covalent qui aboutit à l'inactivation du site actif de l'enzyme, provoquant une inhibition de la synthèse du peptidoglycane et l'arrêt de la croissance

bactérienne. Les β -lactamines provoquent également l'intervention du système autolytique (muréine-hydrolases) endogène, responsable de la lyse bactérienne ultérieure d'où une action bactéricide (Cavallo et *al.*, 2004).

II.1.3. Résistance d'*E. coli* aux β -lactamines

Différents mécanismes peuvent rendre les entérobactéries, y compris *E. coli*, résistantes aux β -lactamines comme la faible affinité pour les PLP, les phénomènes d'imperméabilité (par modification ou perte de porines) et d'efflux, et surtout la production d'enzymes inactivatrices appelées β -lactamases (Robin et *al.*, 2010).

II.1.3.1. Les β -lactamases

Ce sont des enzymes localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram négatif. Elles sont capables d'ouvrir le cycle β -lactame en créant un intermédiaire acyl-enzyme instable, menant au final à la perte d'un groupement carboxyle (Fig. 5) (Ruppé, 2010).

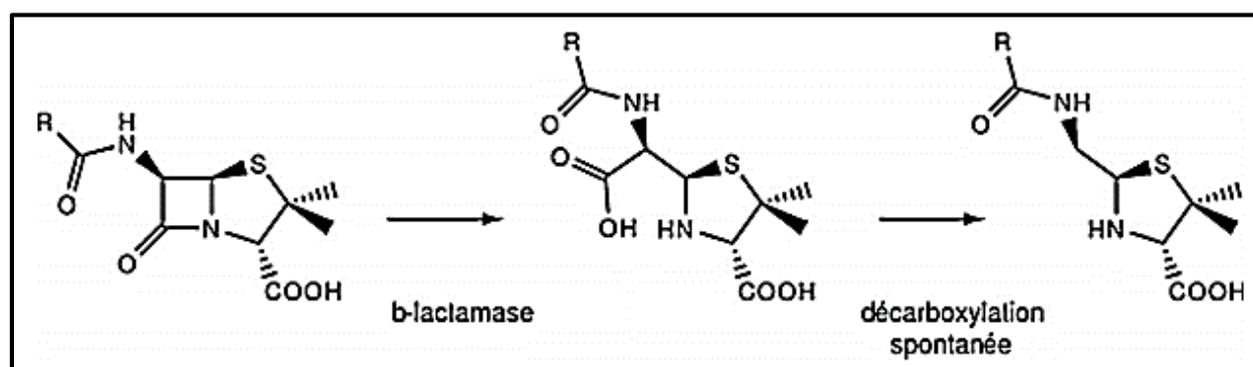


Figure 5. Mécanisme d'action d'une β -lactamase (Ruppé, 2010).

II.1.3.2. Classification des β -lactamases

De nombreuses classifications ont été proposées pour les β -lactamases, mais les plus utilisées sont la classification structurale proposée par Ambler (1980) et la classification fonctionnelle proposée par Bush et *al.* (1995).

La classification d'Ambler reflète la structure fondamentale de l'enzyme, elle est basée sur la séquence peptidique du site enzymatique ou sur la séquence totale du gène codant pour l'enzyme. Cette classification comporte quatre classes (Tab. 2) de β -lactamases : classes A, C, D (sérine enzymes) et classe B (métalloenzymes).

- Classe A : regroupe la majorité des β -lactamases qu'on peut rencontrer chez *E. coli* (Exp : TEM, SHV, BLSE de type CTX-M, et des carbapénémases comme KPC et certains variants de GES). Ces enzymes sont inhibées par l'acide clavulanique.

- Classe B : renferme principalement des carbapénémases (Exp : NDM, IMP et VIM). Ces enzymes sont inhibées par l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA).
- Classe C : ce sont les céphalosporinases de type AmpC, inhibées par la cloxacilline.
- Classe D : regroupe des oxacillinases, une famille d'enzymes extrêmement composite en terme de spectre d'hydrolyse.

La classification fonctionnelle de Bush et *al.* (1995) reflète le spectre d'activité de l'enzyme. Elle se caractérise notamment, par la présence de sous-classes pour les β -lactamases de classe A (Tab. 2).

Enfin, la description des β -lactamases par grand type d'activité enzymatique (Exp : β -lactamase à spectre élargi (BLSE), céphalosporinases ou β -lactamases AmpC, carbapénémases, ...etc.) est la plus largement utilisée dans la pratique médicale courante (Cavallo et *al.*, 2004).

Tableau 2. Classification des β -lactamases selon Bush et *al.* et Ambler (Ruppé, 2010).

Type	Bush	Ambler	Inhibiteur	Exemple
Céphalosporinase de type AmpC	1	C	Cloxacilline	AmpC des entérobactéries du groupe 3 et leurs dérivés plasmidiques
Pénicillinase des bactéries Gram positifs	2a	A	Clavulanate	Pénicillinase de <i>Staphylococcus aureus</i>
Pénicillinase à spectre étroit	2b	A	Clavulanate	TEM-1, SHV-1
Bêta-lactamases à spectre élargi	2be	A	Clavulanate	TEM-3, SHV-2, CTX-M, PER, VEB, GES (170Gly)
Pénicillinases résistantes aux inhibiteurs	2br	A	—	TEM-30
Complex mutant TEM	2ber	A	—	TEM-50
Carbénicillinases	2c	A	Clavulanate	PSE-1
Oxacillinases	2d	D	—	OXA-1
Céfuroximases	2e	A	Clavulanate	Céphalosporinase de <i>Proteus vulgaris</i>
Carbapénémases	2f	A	Clavulanate	KPC, GES (170Ser et 170Asn)*
Métallo-bêta-lactamases	3	B	EDTA	NDM, VIM, IMP
Autres bêta-lactamases non classées	4	—	—	Pénicillinase de <i>Burkholderia cepacia</i>

* : mutation Gly170Ser ou Gly170Asn.

II.1.3.2.1. Les β -lactamases à spectre élargi (BLSE)

Les BLSE font partie des β -lactamases de classe A d'Ambler (1980) (à l'exception des BLSE de type OXA appartenant à la classe D), et du groupe 2be selon la classification de Bush et *al.* (1995). Ces enzymes sont capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines (C1G jusqu'au C4G) et l'aztréonam. Les souches productrices de BLSE restent généralement sensibles

aux céphamycines et aux carbapénèmes (Livermore, 2008). Les BLSE sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases (comme l'acide clavulanique). La recherche des BLSE, *in vitro*, repose sur la détection d'une synergie entre au moins une C3/4G ou l'aztréonam et le clavulanate (Robin, 2012).

A/ BLSE de type SHV et TEM

La première β -lactamase plasmidique hydrolysant les C3G, nommée SHV-2, fut isolée en Allemagne en 1983 chez une souche de *Klebsiella ozaenae* (Knothe et al., 1983). Cette enzyme était dérivée de SHV-1 (une β -lactamase à spectre étroit), par une simple mutation (Kliebe et al., 1985) conduisant à l'élargissement du spectre d'activité de l'enzyme. La majorité des mutants dérivés du SHV-1 sont des BLSE. Ces enzymes ont été rapportées chez plusieurs entérobactéries principalement chez *K. pneumoniae* (Bradford, 2001). Les variant SHV-5 et SHV-12 sont les enzymes les plus fréquentes en Europe (Cantón et al., 2008). En Algérie, quelques études seulement ont signalé la présence de ces enzymes chez *E. coli* (**Tab. 3**). Le variant SHV-12 a été rapporté chez des souches cliniques (Ayad et al., 2016; Zenati et al., 2019) et animales (Yousfi et al., 2016; Belmahdi et al., 2016; Benameur et al., 2019). Les enzymes SHV-2a/SHV-2 ont été aussi décrites chez une souche clinique (Yahiaoui et al., 2015) et une souche prélevée sur un sandwich, respectivement (Yaici et al., 2017).

En 1985, une autre enzyme plasmidique dérivée du TEM-1 (enzyme à spectre étroit), hydrolysant le céfotaxime fut isolée en France chez une *K. pneumoniae* (Sirot et al., 1987). Cette enzyme, fut au début nommée CTX-1, puis finalement renommée TEM-3 (Ruppé, 2010). De nombreux BLSE dérivées de TEM-1/2 ont été décrites chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et autres entérobactéries ainsi que chez d'autres espèces à Gram négatif non-entérobactéries (Bradford, 2001). Le variant TEM-52 est la BLSE de type TEM la plus fréquente chez *E. coli* en Europe (Cantón et al., 2008). En Algérie, les variants TEM-24, TEM-3, TEM-4 et TEM-167 ont été décrits chez des souches cliniques d'*E. coli* (Agabou et al., 2014 ; Yahiaoui et al., 2015 ; Ayad et al., 2016). Le variant TEM-24 a été aussi rapporté chez des souches d'*E. coli* isolées de poissons sauvages (Brahmi et al., 2017). Enfin Touati et al. (2019) ont décrit le variant TEM-12 chez des *E. coli* isolées du fumier (**Tab. 3**).

B/ BLSE de type CTX-M

En 1989, Bauernfeind et al. caractérisèrent une nouvelle β -lactamase (non-TEM et non-SHV) chez une souche d'*E. coli*, isolée à partir d'un exsudat d'oreille d'un nouveau-né, qu'ils nommèrent CTX-M-1 (pour « céfotaximase Munich ») en raison de son hydrolyse préférentielle du céfotaxime

(CTX) par rapport à la ceftazidime (Bauernfeind et al., 1990). Peu après leur description, ces nouvelles enzymes BLSE ont été rapportées sur tous les continents, jusqu'à devenir les BLSE majoritaires. Leur diffusion est qualifiée de pandémie (Cantón et Coque, 2006). Les analyses phylogénétiques suggèrent que les gènes codants les CTX-M dérivent de la mobilisation des gènes *bla* chromosomiques d'espèces du genre *Kluyvera* (Exp : *K. ascorbata* et *K. georgiana*) par l'incorporation dans des éléments génétiques mobiles (Ruppé, 2010). Les BLSE de type CTX-M sont classés en 6 groupes phylogénétiques, chaque groupe renferme plusieurs variants (Rossolini et al., 2008; Ruppé, 2010):

- Le groupe CTX-M-1 (Exp : CTX-M-1, CTXM-3, CTX-M-10 et CTX-M-15);
- Le groupe CTX-M-2 (Exp : CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6);
- Le groupe CTX-M-8 (Exp : CTX-M-8, CTX-M-40, CTX-M-63);
- Le groupe CTX-M-9 (Exp : CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14);
- Le groupe CTX-M-25 (Exp : CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-41);
- Le groupe CTX-M-45

Les gènes codant pour les CTX-M ont été fréquemment isolés sur des plasmides de groupe d'incompatibilité F, dont la bonne diffusion au sein de l'espèce *E. coli* pourrait en partie expliquer le succès de ces enzymes au sein de cette espèce (Marcadé et al., 2009). Parmi les enzymes CTX-M, les variants CTX-M-15 et CTX-M-14 sont de loin les plus largement décrites, elles ont une diffusion mondiale (Cantón et al., 2008). En Algérie, Touati et al. (2006) ont fait la première description des BLSE-CTX-M, chez des souches cliniques d'entérobactéries. A ce jour, plusieurs autres études ont rapporté la présence de ce type de BLSE, chez des souches d'*E. coli* de différentes origines (clinique, animale, environnementale, alimentaire,...etc.) avec la prédominance du variant CTX-M-15 dans les différents type de prélèvement (**Tab. 3**).

C/ BLSE de type VEB, PER, GES et TLA

Ces BLSE sont beaucoup moins fréquentes que celles du groupe CTX-M et sont caractérisées par un haut niveau de résistance à la ceftazidime et parfois à l'aztréonam (Philippon et Arlet, 2005). En Algérie, aucun type de ces enzymes n'a été détecté chez *E. coli*.

II.1.3.2.2. Les céphalosporinase de haut niveau

L'hyperproduction d'une céphalosporinase confère une résistance à au moins une C3G. La résistance touche aussi toutes les pénicillines (seules ou en association avec des inhibiteurs), les C2G et les céphamycines (céfoxitine). Les C4G, comme la céfépime, ne sont généralement pas touchées et la sensibilité aux carbapénèmes n'est pas modifiée (Robin et al., 2012). Ce phénotype

est principalement observé chez les entérobactéries du groupe 3 (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *M. morgani*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*) en cas de dérégulation partielle ou totale du gène codant leur céphalosporinase chromosomique naturelle (Cavallo et al., 2004; Robin et al., 2012). Par contre, chez *E. coli*, les céphalosporinases chromosomiques constitutives d'AmpC s'expriment à très bas niveau ; elles ne sont pas inductibles et sont exprimées à tellement bas niveau qu'elles ne contribuent pas de façon significative à la résistance aux β -lactamines chez cette espèce : les souches restent sensibles aux aminopénicillines et aux C1G (Cavallo et al., 2004).

Plus récemment, des céphalosporinases plasmidiques ont été détectées chez des entérobactéries comme *E. coli* et *K. pneumoniae*. Ces céphalosporinases plasmidiques sont très proches génétiquement des céphalosporinases AmpC chromosomiques et, donnent le même phénotype de résistance (Cavallo et al., 2004). Les AmpC plasmidiques sont classées en différents groupes, en fonction de leurs séquences en acides aminés : CMY, DHA, FOX, MOX, ACT, ACC, LAT, ...etc. Les principaux groupes sont ceux du type CMY, DHA et ACC, avec une importante prévalence des enzymes CMY dans le monde entier (Philippon et al., 2002). En Algérie, CMY, DHA et récemment MOX, sont les seules enzymes AmpC plasmidiques identifiées chez des souches d'*E. coli*. Les variantes CMY-2, CMY-4, DHA-1 et MOX ont été identifiées chez des souches cliniques (Labadene et al., 2009; Robin et al., 2010; Gharout-Sait et al., 2015; Zenati et al., 2019). Le variant CMY-2 a été aussi identifié avec le variant CMY-42 (**Tab. 3**) chez des *E. coli* de divers origines (animale, lait cru, sandwich) (Yousfi et al., 2016; Belmahdi et al., 2016; Yaici et al., 2016; Yaici et al., 2017).

II.1.3.2.3. Les carbapénémases

Trois familles principales de carbapénémases sont retrouvées chez les entérobactéries :

A/ Carbapénémase de type OXA-48-like (β -lactamase de classe D)

Ces enzymes ont été détectées pour la première fois en 2001 en Turquie, chez une souche de *K. pneumoniae*. Depuis lors, elles ont été observées principalement en Inde, au Moyen-Orient et dans les pays d'Afrique du Nord (Poirel et al., 2012) comme le Maroc (Girlich et al., 2014) et la Tunisie (Saidani et al., 2012). En Algérie, plusieurs études ont rapporté la présence de ce type d'enzymes chez *E. coli* de divers origines (Agabou et al., 2014; Yagoubat et al., 2016; Bouaziz et al., 2018; Tafoukt et al., 2017; Bourafa et al., 2018; Bachiri et al., 2018; Mairi et al., 2019); ce sont les carbapénémases prédominantes dans ce pays. Les enzymes OXA-48 présentent une diminution de sensibilité aux carbapénèmes, principalement l'ertapénème. Des niveaux élevés de

résistance sont observés en cas d'association avec d'autres mécanismes de résistance, notamment une baisse de la perméabilité (Robin *et al.*, 2012).

B/ Métallo- β -lactamase (β -lactamase de classe B)

À partir de 1991, les premières métallo- β -lactamases (MBL) plasmidiques acquises ont été identifiées au Japon avec l'enzyme IMP-1 chez *S. marcescens*. Cette enzyme s'est depuis largement répandue chez de nombreuses autres espèces bactériennes à Gram négatif. Depuis, d'autres enzymes de type IMP ou proches de celles-ci comme les enzymes VIM ont été décrites dans différentes parties du monde (Cavallo *et al.*, 2004). En 2009, une nouvelle MBL, nommée NDM, a été identifiée dans des souches cliniques de *K. pneumoniae* et *E. coli* isolées en Suède, chez un voyageur revenant d'Inde (Yong *et al.*, 2009). Depuis lors, plusieurs rapports ont identifié ces enzymes dans le monde entier (Solé *et al.*, 2011). Les MBL (IMP, VIP, NDM) sont presque actives sur toutes les β -lactamines incluant les pénicillines, les céphalosporines (y compris les céphamycines) et les carbapénèmes, mais restent sensibles à l'aztréonam. Elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique, mais par l'EDTA. Habituellement portées par des éléments génétiques mobiles, elles peuvent se situer sur le chromosome (Cavallo *et al.*, 2004; Robin *et al.*, 2012). En Algérie, VIM et NDM sont les seules MBL décrites chez *E. coli*. Une seule étude a décrit la présence du gène *bla*_{VIM-19} chez des souches d'*E. coli* d'origines cliniques (Robin *et al.*, 2010). De plus, le gène *bla*_{NDM-5} a été rapporté dans quatre études (Sassi *et al.*, 2014; Yousfi *et al.*, 2015; Yousfi *et al.*, 2016; Yaici *et al.*, 2016) chez des souches d'*E. coli* provenant de divers origines (**Tab. 3**).

C/ Carbapénémase de classe A

Les enzymes de type KPC représentent le groupe le plus répandu de carbapénémases de classe A. Ces enzymes confèrent une résistance à toutes les β -lactamines (pénicillines, céphalosporines, céphamycines et carbapénèmes). Elles sont peu inhibées par les inhibiteurs tel que le clavulanate, mais sont sensibles à l'action inhibitrice de certains acides boroniques qui sont parfois utilisés dans les tests de détection (Robin *et al.*, 2012). D'autres carbapénémases de classe A, moins fréquentes que les KPC, regroupent des variantes de GES, IMI, Sme, NMC-A (Robin *et al.*, 2012). Chez *E. coli*, les carbapénémases de classe A restent rares. Aucune publication n'a rapporté la présence de cette classe d'enzymes, chez cette espèce, en Algérie.

Tableau 3. Les Différentes types de β -lactamases décrites chez *E. coli* en Algérie.

Type de prélèvement	Ville d'isolement	Enzymes décrites				Référence
		AmpC	BLSE	Carba	Autres	
Clinique	Béjaia		CTX-M-15			Touati et al., 2006
Clinique	Alger		CTX-M-type		TEM	Messai et al., 2006
Clinique	Alger		CTX-M-15/3			Ramdani-Bougouessa et al., 2006
Environnement hospitalier	Béjaia		CTX-M-15			Touati et al., 2007
Clinique	Alger	CMY-2, DHA-1	CTX-M-15			Iabadene et al., 2009
Clinique	Alger	CMY-4		VIM-19	TEM-1	Robin et al., 2010
Clinique	Alger		CTX-M-15			Touati et al., 2012
Clinique	Tlemcen		CTX-M-15			Baba Ahmed et al., 2012
Clinique	Béjaia		CTX-M-15/3			Gharout-Sait et al., 2012
Eau de mer	Alger		CTX-M-15			Alouache et al., 2012
Clinique	Tlemcen		CTX-M-15/3		TEM-1, OXA-1	Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2013
Effluents hospitaliers	Alger		CTX-M-15		TEM-1	Anssour et al., 2014
Clinique	Annaba		CTX-M-15	NDM-5		Sassi et al., 2014
Station d'épuration	Boumerdes		CTX-M-15/3			Alouache et al., 2014
Clinique	Constantine		CTX-M-15; TEM-3/24	OXA-48		Agabou et al., 2014
Clinique	Béjaia		CTX-M-15		TEM-1	Yanat et al., 2014
Chien	Béjaia			NDM-5		Yousfi et al., 2015
Poulets	Béjaia		CTX-M-Gr-1		TEM-1	Mezhoud et al., 2015
Clinique	Béjaia	CMY-4	CTX-M-15		TEM-1	Gharout-Sait et al., 2015
Clinique	Alger		CTX-M-15; TEM-4; SHV-2a		TEM-1/31/35	Yahiaoui et al., 2015
Oiseaux	Centre de l'Algérie		CTX-M-15			Meguenni et al., 2015
Clinique	Oran		CTX-M-15			Yanat et al., 2016
Clinique	Oran		CTX-M-15			Yanat et al., 2016
Clinique	Béjaia		CTX-M-15		TEM-1	Yanat et al., 2017
Chiens et chats	Béjaia		CTX-M-15/1; SHV-12		TEM-1	Yousfi et al., 2016
Chiens et chats	Béjaia	CMY-2/42	CTX-M-15	NDM-5; OXA-48	TEM-1	Yousfi et al., 2016
Effluents hospitaliers	Alger		CTX-M-15			Anssour et al., 2016
Poulets	Béjaia	CMY-2	CTX-M-1; SHV-12			Belmahdi et al., 2016
Clinique	Tlemcen, Oran, Sidi Belabes		CTX-M-15/14/1/3; TEM-167; SHV-12			Ayad et al., 2016
Lait cru	Béjaia	CMY-42	CTX-M-15	NDM-5		Yaici et al., 2016
Clinique	Ouargla			OXA-48		Yagoubat et al., 2016
Sanglier	Béjaia, Jijel		CTX-M-15		TEM-1	Bachiri et al., 2016

Oiseaux migrateurs	Batna		CTX-M-15	OXA-48	TEM	Bouaziz <i>et al.</i> , 2018
Eau de rivière	Béjaia		CTX-M-15	OXA-48-like	TEM-1	Tafoukt <i>et al.</i> , 2017
Poissons sauvages	Béjaia		CTX-M-15/9; TEM-24			Brahmi <i>et al.</i> , 2017
Viande hachée (bœuf)	Alger		CTX-M-15/14/1/3/24/32			Rebbah <i>et al.</i> , 2018
Clinique	Alger		CTX-M-5/14/3			Medboua-Benbalagh <i>et al.</i> , 2017
Sandwiches	Béjaia	CMY-2	CTX-M-15/14/1/2; SHV-2			Yaici <i>et al.</i> , 2017
Clinique	Annaba			OXA-48		Bourafa <i>et al.</i> , 2018
Sanglier	Béjaia			OXA-48		Bachiri <i>et al.</i> , 2018
Poulets et œufs	Chlef, Mostaganem		CTX-M-1			Benameur <i>et al.</i> , 2018
Différentes niches	Six villes de l'Est			OXA-48		Mairi <i>et al.</i> , 2019
Clinique	Tlemcen	CMY-2, MOX	CTX-M-15/14/1/28; SHV-12			Zenati <i>et al.</i> , 2019
Fumier	Oran		TEM-12			Touati <i>et al.</i> , 2019
Poulets	Tiaret, Oran, Chlef		CTX-M-1; SHV-12		TEM-1	Benameur <i>et al.</i> , 2019

AmpC : céphalosporinases de haut niveau ; Carba : carbapénémases ; BLSE : β -lactamases à spectre élargi

II.2. Les aminosides

Ce sont des antibiotiques d'origine naturelle produits par des microorganismes appartenant aux genres *Streptomyces* et *Micromonospora* (Poirel *et al.*, 2018), mais certains d'entre eux sont des dérivés semi-synthétiques comme l'amikacine (Padilla et Burgos, 2010). Les aminosides sont souvent utilisés en combinaison avec un autre antimicrobien (principalement une β -lactamine) afin d'exploiter leur action bactéricide rapide pour traiter des infections compliquées telles que septicémie, pneumonie, méningite et infections urinaires/abdominales, chez l'homme et les animaux (Poirel *et al.*, 2018).

II.2.1. Structure et classification

Les aminosides représentent une grande famille d'agents thérapeutiques hydrosolubles et cationiques, qui possède un large spectre d'activité antimicrobienne. Ces antibiotiques appartiennent à différentes classes structurales. La première classe, contenant un cycle 2-déoxystreptamine, comprend des antibiotiques avec un cycle déoxystreptamine bisubstitué en position 4 et 6, tels que la kanamycine et la gentamicine (**Fig. 6a**) ou des antibiotiques avec un déoxystreptamine bisubstitué en position 4 et 5, comme la néomycine et la paromomycine (**Fig. 6b**). Les autres classes comprennent la streptomycine qui contient un cycle streptidine (**Fig. 6c**) ou l'hygromycine B qui contient un cycle hyosamine (**Fig. 6d**) (Padilla et Burgos, 2010).

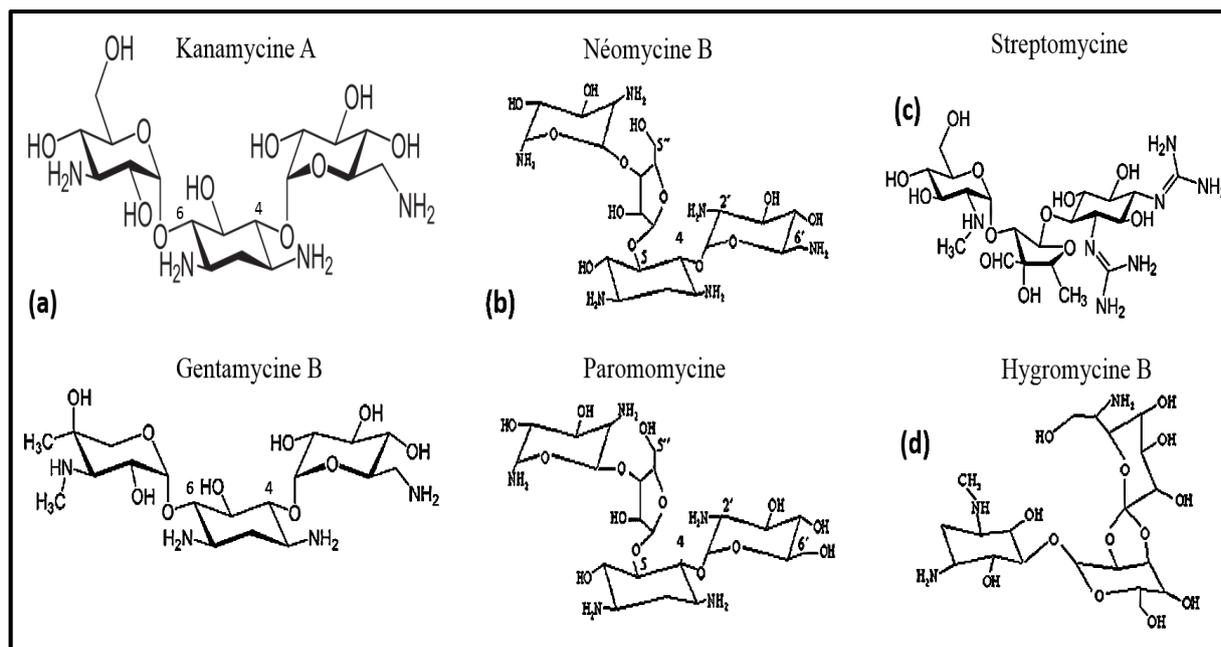


Figure 6. Classification des aminosides selon leur structure chimique. (a) : déoxystreptamine bisubstitué en position 4 et 6; (b) : déoxystreptamine bisubstitué en position 4 et 5; (c) : streptidine; (d) : hyosamine (Padilla et Burgos, 2010).

II.2.2. Mécanismes d'action

Les aminosides interagissent avec les ribosomes ce qui provoque un manque de fidélité dans le processus de traduction (Padilla et Burgos, 2010). L'absorption des aminosides par les cellules bactériennes se fait en trois phases (Bryan et Van Den Elzen, 1976): la première consiste en une liaison ionique aux cellules, suivie de deux phases dépendantes d'énergie, appelées PDE-I et PDE-II, dans lesquelles, il y a une absorption d'aminoside à un rythme lent (PDE-I) suivie d'une accumulation très rapide (PDE-II). Une petite quantité d'aminoside pénètre dans la cellule pendant la PDE-I et le début de PDE-II et se lie aux ribosomes sensibles (au site aminoacyl de l'ARNr 16S, dans la sous-unité ribosomal 30S), ce qui entraîne une mauvaise lecture de l'ARNm et la formation de protéines non fonctionnelles. Ces protéines peuvent interagir avec la membrane, entraînant ainsi, la perte de son intégrité. Cela provoque un efflux d'ions et la formation de pores, précipitant un afflux supplémentaire et irréversible d'antibiotique qui sature tous les ribosomes de manière irréversible, entraînant la mort cellulaire (Davis, 1988).

II.2.3. Résistance d'*E. coli* aux aminosides

La résistance aux aminosides peut se produire par plusieurs mécanismes qui peuvent coexister simultanément dans une même cellule. Parmi les mécanismes décrits, il y a la modification de la cible par mutation de l'ARNr 16S ou des protéines ribosomiques; la méthylation de l'ARNr 16S;

la réduction de la perméabilité; l'exportation hors de la cellule par des pompes d'efflux actives et l'inactivation enzymatique de l'antibiotique (Ramirez et Tolmasky, 2010).

La modification du site cible des aminosides entraîne une résistance de haut niveau à plusieurs molécules d'intérêt clinique (Exp : amikacine, tobramycine, gentamicine et nétilmicine). Cela peut être obtenu par méthylation au niveau des nucléotides G1405 et A1408 du site A de l'ARNr 16S, (site de liaison des aminosides sur le ribosome), empêchant la liaison entre l'antibiotique et la sous-unité 30S du ribosome (Griffey *et al.*, 1999). Les méthylases de l'ARNr 16S, y compris ArmA, RmtA/B/C/D/E/F/G/H et NmpA, sont produites naturellement par des microorganismes producteurs d'aminosides en guise d'autodéfense contre ces antimicrobiens (Davies et Wright, 1997). L'enzyme ArmA est la première méthylase décrite en 2003 dans une souche clinique de *K. pneumoniae*, dont le gène correspondant était porté sur un plasmide transférable (Galimand *et al.*, 2003). En Algérie, deux études ont rapporté la présence du gène *armA* chez des souches cliniques d'*E. coli* (Ayad *et al.*, 2016; Zenati *et al.*, 2019). La dissémination du gène *armA* est favorisée par son emplacement sur le transposon composite Tn1548, qui porte également des gènes codant pour la résistance aux sulfamides, qui à leur tour sont situés sur des plasmides auto-transmissibles appartenant à plusieurs groupes d'incompatibilité (Galimand *et al.*, 2003). Le gène *rmtB* est le seul variant des gènes *rmt* décrit en Algérie, chez des souches cliniques d'*E. coli* (Yanat *et al.*, 2016; Ayad *et al.*, 2016; Zenati *et al.*, 2019).

L'inactivation enzymatique des aminosides est le mécanisme de résistance le plus fréquemment décrit. Cette résistance a émergé dans pratiquement toutes les bactéries d'intérêt clinique (Wright et Thompson, 1999). L'action des enzymes consiste en une modification de l'antibiotique de sorte qu'il devient incapable d'atteindre ou de se lier au site cible. Actuellement, trois types d'enzymes modifiant les aminosides (AME) sont connus et, selon le groupe de modification lié aux aminosides, elles sont classées en acétyltransférases, nucléotidyltransférases et phosphotransférases (Poirel *et al.*, 2018).

- Les aminosides acétyltransférases (AACs) catalysent l'addition d'un groupe acétyle (CH_3CO) à un groupe amine ($-\text{NH}_2$) aux positions 1 [AAC(1)], 3 [AAC(3)], 2' [AAC(2')], ou 6' [AAC(6')] de la structure d'aminoside, ce qui détermine le sous-groupe de l'enzyme (Ramirez et Tolmasky, 2010). Plusieurs variantes ont été rapportées pour chaque enzyme, et elles sont généralement définies par un chiffre romain. L'AAC(3)-II/ IV et l'AAC(6')-Ib sont les acétyltransférases les plus fréquemment rencontrées chez les souches d'*E. coli* d'origine humaine et animale (Poirel *et al.*, 2018). En Algérie, l'AAC(6')-Ib-cr est l'enzyme le plus fréquemment décrit chez les souches d'*E. coli* (**Tab. 4**).

- Les aminosides nucléotidyltransférases (ANTs) catalysent le transfert d'un groupe AMP du substrat donneur (ATP) vers un groupe hydroxyle dans la molécule d'aminoside (Ramirez et Tolmasky, 2010). Il existe cinq classes d'ANTs qui catalysent l'adénylation aux positions 6 [ANT(6)], 9 [ANT(9)], 4' [ANT(4')], 2'' [ANT(2'')] et 3'' [ANT(3'')] (Ramirez et Tolmasky, 2010). Les nucléotidyltransférases ANT(2'') et ANT(3'') se trouvent le plus souvent chez les bactéries à Gram-négatif. Elles sont codées par les gènes *aadB* et *aadA* respectivement, qui sont fréquemment situés sur des cassettes de gènes dans des intégrons de classe 1 (Poirel et *al.*, 2018). Comme toutes les AME, les ANTs se sont également, globalement émergés. En Algérie, ces gènes ont été isolés dans des souches d'*E. coli* d'origines humaine (Baba Ahmed-Kazi Tani et *al.*, 2013; Sassi et *al.*, 2014), animale (Belmahdi et *al.*, 2016) et aussi dans des *E. coli* provenant d'effluents hospitaliers (Anssour et *al.*, 2016) (**Tab. 4**).
- Les aminosides phosphotransférases (APHs) catalysent le transfert d'un groupe phosphate vers la molécule d'aminoside (Wright et Thompson, 1999). Les classes et sous-classes des APHs sont: APH(4)-I, APH(6)-I, APH(9)-I, APH(3')-I à VII, APH(2'')-I à IV, APH(3'')-I et APH(7'')-I (Ramirez et Tolmasky, 2010). Plusieurs variants d'APHs (Exp: APH(6)-Ic, APH(6)-Id, APH(3')-Ia, APH(3')-Ib et APH(2'')-IIa) ont été décrits chez *E. coli* à travers le monde (Ramirez et Tolmasky, 2010). En Algérie, une seule étude a rapporté la présence du variant APH(3')-Ia chez 4 souches d'*E. coli* isolées d'effluents hospitaliers (Anssour et *al.*, 2016).

Tableau 4. Gènes de résistance aux aminosides décrits chez *E. coli* en Algérie.

Type de prélèvement	Ville d'isolement	Gènes de résistance (nombre de souche)	Référence
Clinique	Tlemcen	<i>aac(3')-II</i> (8); <i>aadA2</i> (7); <i>aac(6')-Ib-cr</i> (6)	Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2013
Station d'épuration	Boumerdes	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (1)	Alouache et al., 2014
Clinique	Annaba	<i>aadA2</i> (3)	Sassi et al., 2014
Animal (poissons sauvages)	Béjaia	<i>ant(2'')-I</i> (2); <i>aac(3')-I</i> (1); <i>aac(3')-II</i> (4); <i>aac(3)-III</i> (5); <i>aac(3')-IV</i> (6); <i>aac(6')-Ib-cr</i> (5)	Brahmi et al., 2017
Clinique	Alger	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (2)	Yahiaoui et al., 2015
Effluents hospitaliers	Alger	<i>aadA1</i> et <i>aadA2</i> (4); <i>aadA5</i> (1); <i>aph(3')-Ia</i> (4)	Anssour et al., 2016
Animal (chiens et chats)	Béjaia	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (5)	Yousfi et al., 2016
Clinique et animal (poulets)	Constantine	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (51+8)	Agabou et al., 2016
Animal (poulets)	Béjaia	<i>aadA</i> (20)	Belmahdi et al., 2016
Clinique	Béjaia	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (11)	Yanat et al., 2017
Clinique	Tlemcen, Sidi Bel Abbes, Oran	<i>armA</i> (4), <i>rmtB</i> (8)	Ayad et al., 2016
Clinique	Oran	<i>rmtB</i> (2)	Yanat et al., 2016
Sandwiches	Béjaia	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (14)	Yaici et al., 2017
Clinique	Alger	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (11)	Medboua-Benbalagh et al., 2017
Animal (viande hachée)	Alger	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (2)	Rebbah et al., 2018
Clinique	Tlemcen	<i>armA</i> (4), <i>rmtB</i> (2), <i>aac(6')-Ib-cr</i> (15)	Zenati et al., 2019
Effluents hospitaliers	Béjaia et Tizi-ouzou	<i>aac(6')-Ib</i> (6); <i>aacC2</i> (9)	Yousfi et al., 2019

II.3. Les quinolones

Les quinolones constituent une classe importante d'antibiotiques synthétiques, largement utilisés pour le traitement de divers types d'infections chez l'homme et l'animal. Ces molécules sont connues pour être bactéricides contre pratiquement toutes les bactéries (Poirel et al., 2018).

II.3.1. Structure et classification

Le développement des quinolones a commencé en 1962, lorsque Leshner et al. (1962) ont découvert accidentellement l'acide nalidixique comme sous-produit de synthèse de la chloroquine; un composé antipaludique. La structure des quinolones a été développée par la suite, par l'introduction des modifications au noyau bicyclique des quinolones en ajoutant différents

substituants aux positions N-1, C-6, C-7 et C-8 (**Fig. 7**). Un des changements clés consistait en l'ajout d'un atome de fluor en position C-6 (**Fig. 7**), les produits dérivés sont désignés fluoroquinolones (Exp : ciprofloxacine, norfloxacine, pefloxacine, lévofloxacine) (Andriole, 2005).

Les quinolones sont généralement classées en plusieurs générations en fonction de leur spectre d'activité et de leur date d'introduction sur le marché (Cattoir, 2012). Les quinolones de première génération (Exp : acide nalidixique, acide oxolinique, acide pipémidique) regroupent des molécules à spectre étroit qui ont été utilisées contre des entérobactéries responsables d'infections urinaires. Les fluoroquinolones de deuxième génération comme la norfloxacine, l'ofloxacine, la pefloxacine et la ciprofloxacine présentent un spectre élargi à d'autres bacilles à Gram négatif (Exp : ciprofloxacine contre *Pseudomonas aeruginosa*), à quelques cocci à Gram positif (Exp : *S. aureus*) et aux bactéries intracellulaires. Les molécules de troisième génération, nommées aussi fluoroquinolones anti-pneumococciques (Exp : sparfloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine) ont été développées pour étendre le spectre à *Streptococcus pneumoniae*. Enfin, des fluoroquinolones de quatrième génération (Exp : trovafloxacine, gatifloxacine) possèdent une bonne activité contre les bactéries anaérobies strictes (Cattoir, 2012).

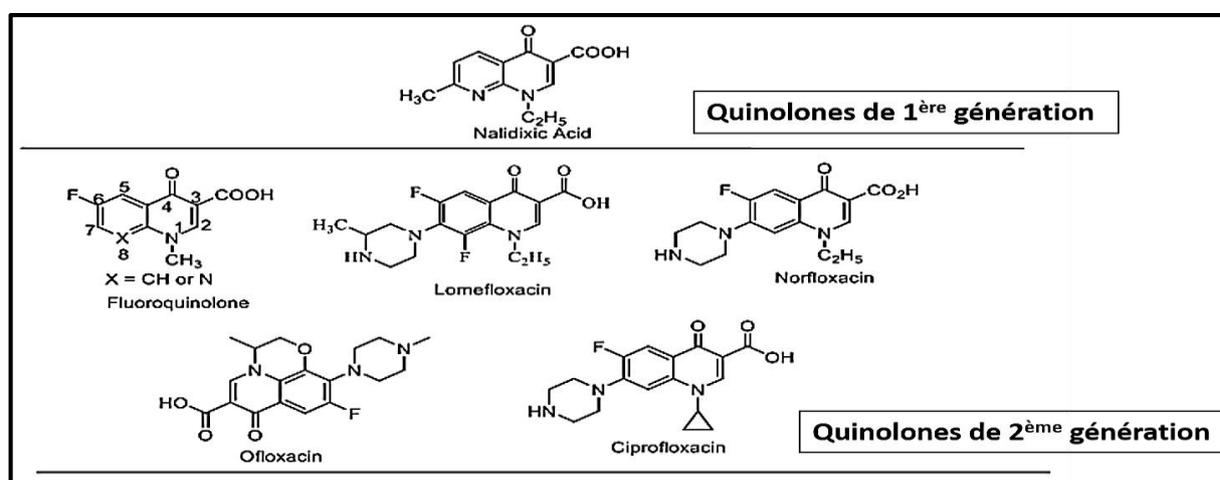


Figure 7. Structure chimique de quelques quinolones (Dhiman et *al.*, 2019).

II.3.2. Mécanismes d'action

Les quinolones ciblent deux enzymes essentielles à la croissance bactérienne qui sont l'ADN gyrase (appelée aussi topoisomérase II) et la topoisomérase IV (Cattoir, 2012). Ces deux enzymes contrôlent la topologie de l'ADN lors des étapes de réplication, de transcription, et de recombinaison/réparation de l'ADN. L'ADN gyrase est responsable du surenroulement négatif de la molécule d'ADN, il constitue la principale cible des quinolones dans les bactéries à Gram négatif. Cependant, la topoisomérase IV représente la principale cible chez les bactéries à Gram

positif, cette enzyme est plus spécifiquement impliquée dans la décaténation (relaxation) des copies d'ADN répliquées (des chromosomes fils) en fin de réplication, aboutissant à la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire (Cattoir, 2012). Le complexe quinolone-enzyme (gyrase ou topoisomérase IV)-ADN formé, bloque la progression de l'ADN polymérase au cours de la réplication en inhibant donc, la synthèse de l'ADN, ce qui conduit à l'arrêt de la croissance bactérienne.

II.3.3. Résistance d'*E. coli* aux quinolones

La résistance aux quinolones est en constante augmentation chez pratiquement toutes les espèces bactériennes à travers le monde (Cattoir, 2012). La résistance à cette classe d'antibiotiques est généralement due à des mutations dans les cibles de ces agents antimicrobiens, à savoir les gènes de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV, souvent en combinaison avec d'autres mécanismes tels que la réduction de perméabilité de la membrane externe (diminution de l'expression des porines) ou la surexpression des pompes à efflux (Hopkins et *al.*, 2005).

Chez *E. coli*, la cible principale des quinolones est la gyrase, cette enzyme se compose de deux sous-unités GyrA et de deux sous-unités GyrB. La topoisomérase IV (se composant aussi de deux sous-unités ParC et deux ParE) constitue une cible secondaire chez les bactéries à Gram négatif. La plupart des mutations ont été détectées dans une région conservée (appelée : région de détermination de la résistance aux quinolones), se situant dans GyrA entre Ala67 et Gln107, et le plus souvent, ces mutations se produisent aux codons 83 et 87. Une seule mutation dans le gène *gyrA* peut conférer une résistance aux quinolones (Exp : acide nalidixique), mais pour la résistance aux fluoroquinolones, d'autres mutations au sein de *gyrA* et/ou *parC* sont nécessaires. La plupart des mutations *parC* se produisent aux codons 80 et 84 (Hopkins et *al.*, 2005). En Algérie, des souches d'*E. coli* résistantes aux quinolones par mutation chromosomique (au niveau des gènes *gyrA* et *parC*) ont été détectées dans des prélèvements d'origines clinique (Yanat et *al.*, 2014), animale (Anssour et *al.*, 2016) ou dans des prélèvements de stations d'épuration des eaux (Alouache et *al.*, 2014).

En plus de la résistance chromosomique, plusieurs autres mécanismes de résistance codés par plasmide (PMQR: Plasmid Mediated Quinolone Resistance) ont été identifiés, notamment des protéines de type Qnr (QnrA, QnrB, QnrC, QnrD et QnrS) qui empêchent la fixation des quinolones sur leur cible, l'acétyltransférase AAC(6')-Ib-cr qui modifie certaines fluoroquinolones comme la ciprofloxacine, et les pompes à efflux actives (QepA et OqxAB). Globalement, ces déterminants de résistance ne confèrent pas un niveau élevé de résistance aux (fluoro) quinolones, mais confèrent plutôt une sensibilité réduite à ces agents antimicrobiens. Cependant, ils pourraient

contribuer à la sélection d'isolats présentant des niveaux de résistance plus élevés grâce à des mécanismes chromosomiques supplémentaires (Rodríguez-Martínez et al., 2016). Divers déterminants plasmidiques, notamment des *qnrB*, *qnrS* et *aac(6')-Ib-cr* ont été détectés en Algérie dans des souches d'*E. coli* d'origines cliniques (Meradi et al., 2011; Yanat et al., 2014; Agabou et al., 2016; Yanat et al., 2017) ou animales (Anssour et al., 2016; Yousfi et al., 2016; Laarem et al., 2017; Benameur et al., 2018).

II.4. La colistine

La colistine et la polymyxine B appartiennent à la classe des polymyxines, une des principales classes d'antibiotiques ayant une activité contre la plupart des bactéries à Gram-négatif (Poirel et al., 2017). L'émergence de la résistance aux carbapénèmes est l'une des principales causes de la réintroduction de la colistine dans les années 1990 pour le traitement des infections causées par des bactéries à Gram-négatif multirésistantes (Kaye et al., 2017).

II.4.1. Structure et mode d'action

La colistine (également connue sous le nom de polymyxine E) est isolée, pour la première fois, en 1947, d'une bactérie du sol *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus* (Benedict et Langlykke, 1947). Les polymyxines (y compris la colistine) sont des polypeptides cationiques contenant un heptapeptide cyclique possédant une chaîne latérale tripeptidique acylée à l'extrémité-N par une queue d'acide gras (**Fig. 8**).

La membrane externe des bactéries à Gram négatif constitue la cible des polymyxines. En raison d'une interaction électrostatique survenant entre le résidu d'acide α,γ -diaminobutyrique (Dab) de la polymyxine chargée positivement et les groupes phosphate du lipide A de la membrane chargé négativement, les cations divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) sont déplacés des groupes phosphate (chargés négativement) des lipides membranaires (Dixon et Chopra, 1986). Le lipopolysaccharide (LPS) est donc déstabilisé, ce qui augmente la perméabilité de la membrane bactérienne, entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et provoquant, finalement, la mort cellulaire (Falagas et Kasiakou, 2005; Li et al., 2006). Un autre mécanisme antibactérien est l'effet endotoxine. En effet, le lipide A du LPS constitue l'endotoxine des pathogènes à Gram-négatif ; les polymyxines ont la capacité de se lier à cette molécule libérée lors de la lyse cellulaire et de la neutraliser (Li et al., 2005). Un autre mode d'action des polymyxines est l'inhibition d'enzymes respiratoires vitales (inhibition des NADH-quinone oxydoréductases de type II [NDH-2]) dans la membrane interne de la bactérie (Deris et al., 2013).

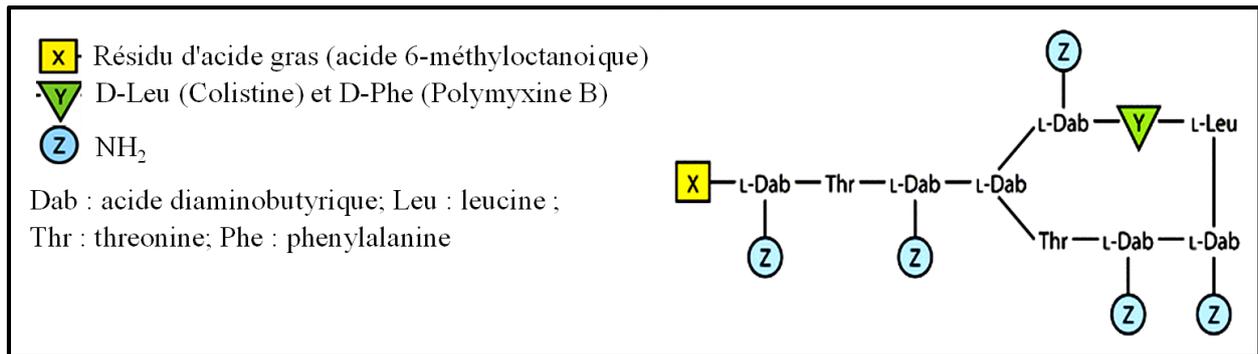


Figure 8. Structure des polymyxines (colistine et polymyxine B) (Poirel et al., 2017).

II.4.2. Résistance d'*E. coli* à la colistine

Certaines espèces bactériennes comme *P. mirabilis* et *S. marcescens* sont naturellement résistantes à la colistine. Cette résistance intrinsèque est liée à l'expression constitutive de l'opéron *arnBCADTEF* et/ou du gène *eptB*, ce qui entraîne l'ajout de groupes cationiques phosphoéthanolamine (pEtN) et/ou 4-amino-4-désoxy-1-arabinose (1-Ara4N) au LPS. Cette modification augmente la charge du LPS, cible initiale des polymyxines, et diminue donc la liaison des polymyxines, entraînant ainsi, une résistance intrinsèque chez ces espèces (Jiang et al., 2010; Aquilini et al., 2014; Lin et al., 2014).

La résistance acquise aux polymyxines a été identifiée dans plusieurs genres d'entérobactéries, comme *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* et *Salmonella*. Cette résistance peut être de nature chromosomique ou plasmidique (Poirel et al., 2017). Comme ce qui est observé chez les souches naturellement résistantes à la colistine, l'ajout de groupes cationiques (1-Ara4N et pEtN) au LPS est responsable de l'acquisition de la résistance chez les entérobactéries. Un large panel de gènes et d'opérons sont impliqués dans la modification qualitative du LPS, comme les gènes *pmrC*, *pmrE* et l'opéron *pmrHFIJKLM* (responsables de la synthèse de groupes cationiques et/ou de leur ajout au LPS) et le gène *mgrB*, (régulateur des systèmes à deux composants PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB) (Poirel et al., 2017).

En 2015, Liu et al. ont décrit, pour la première fois, un gène mobile codant pour la résistance à la colistine (*mcr-1*) chez des souches d'*E. coli* (Liu et al., 2016). Ce gène code pour une pEtN-transférase, dont l'expression chez *E. coli* entraîne l'ajout de pEtN au lipide A (Liu et al., 2016). Suite à cette découverte, plusieurs autres gènes mobiles conférant une résistance à la colistine (*mcr*), ont été rapportés, dans différents pays du monde, tant chez l'homme que chez l'animal. À ce jour, neuf gènes *mcr* (*mcr-1* à *mcr-9*) ont été décrits (Carroll et al., 2019). En Algérie, *mcr-1* et *mcr-3* sont les seuls gènes mobiles identifiés chez des souches d'*E. coli* (Nabti et al., 2019; Touati

et *al.*, 2019) (**Fig. 9**). Cependant, le gène *mcr-8* a été identifié récemment chez une souche clinique de *K. pneumoniae* (Nabti et *al.*, 2020).

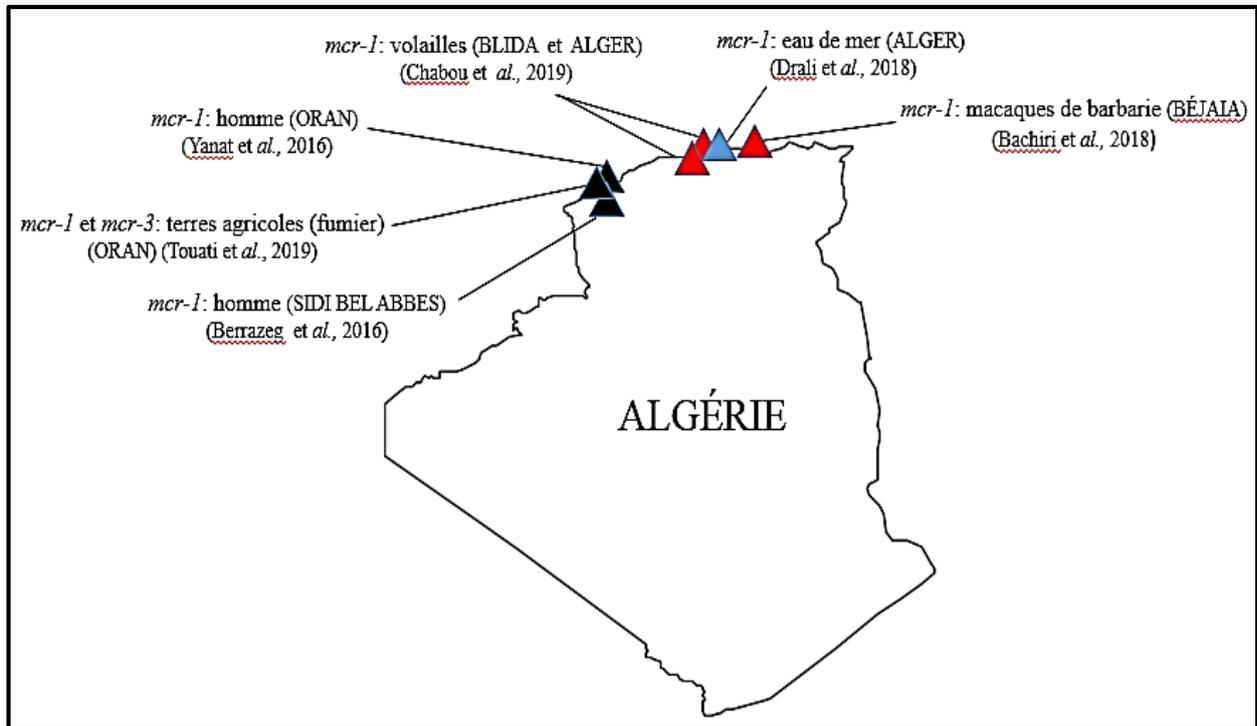


Figure 9. Mécanismes de résistance à la colistine décrits chez *E. coli* en Algérie (Nabti et *al.*, 2019).

CHAPITRE III

**ÉTUDE DES PLANTES MÉDICINALES ET
HUILES ESSENTIELLES**

III. Étude des plantes médicinales et huiles essentielles

III.1. La plante utilisée dans cette étude : *Origanum glandulosum* Desf.

III.1.1. Présentation de la plante

La famille des *Lamiaceae* regroupe environ 260 genres et 7000 espèces largement distribués dans la région méditerranéenne (Mechergui et *al.*, 2010). L'origan occupe une place très importante parmi les plantes aromatiques appartenant à la famille des Lamiacées. En Algérie, trois espèces d'origan sont décrites : *Origanum majorana* L., *Origanum floribundum* Munby et *Origanum glandulosum* Desf. (Quezel et Santa, 1963). Cette dernière, synonyme aussi d'*O. vulgare* ssp. *glandulosum* (Desf.) est une plante endémique dans deux pays Afro-méditerranéens, l'Algérie et la Tunisie (Belhatab et *al.*, 2005; Sari et *al.*, 2006). Cette plante communément appelée «zaâter» en Algérie ou «zaâter moulouk» en Tunisie (Mechergui et *al.*, 2010), pousse souvent dans les régions montagneuses, (jusqu'à environ 1200m), surtout, dans les endroits rocaillieux. Sa période de floraison s'étale du mois de mai jusqu'au mois d'août (Ietswaart, 1980).

III.1.2. Description botanique

O. glandulosum Desf. (**Fig 10**) est une plante herbacée vivace à tiges dressées d'une hauteur qui peut aller jusqu'à 100 cm. Cette plante est caractérisée par des feuilles (jusqu'à 35 paires par tige) ovoïdes ou ovales de 18 (4-38) mm de long et 13 (2-27) mm de large, des pétioles faisant jusqu'à 15 mm de long, un calice tubuleux de 3,5 (3 - 4) mm contenant 5 dents courtes, bilabié ou non, des fleurs restant contiguës après floraison, une corolle de couleur blanchâtre ou rosâtre caractérisée par une lèvre supérieure émarginée et une lèvre inférieure trilobée, bien plus longue que la lèvre supérieure (Quezel et Santa, 1963; Ietswaart, 1980).

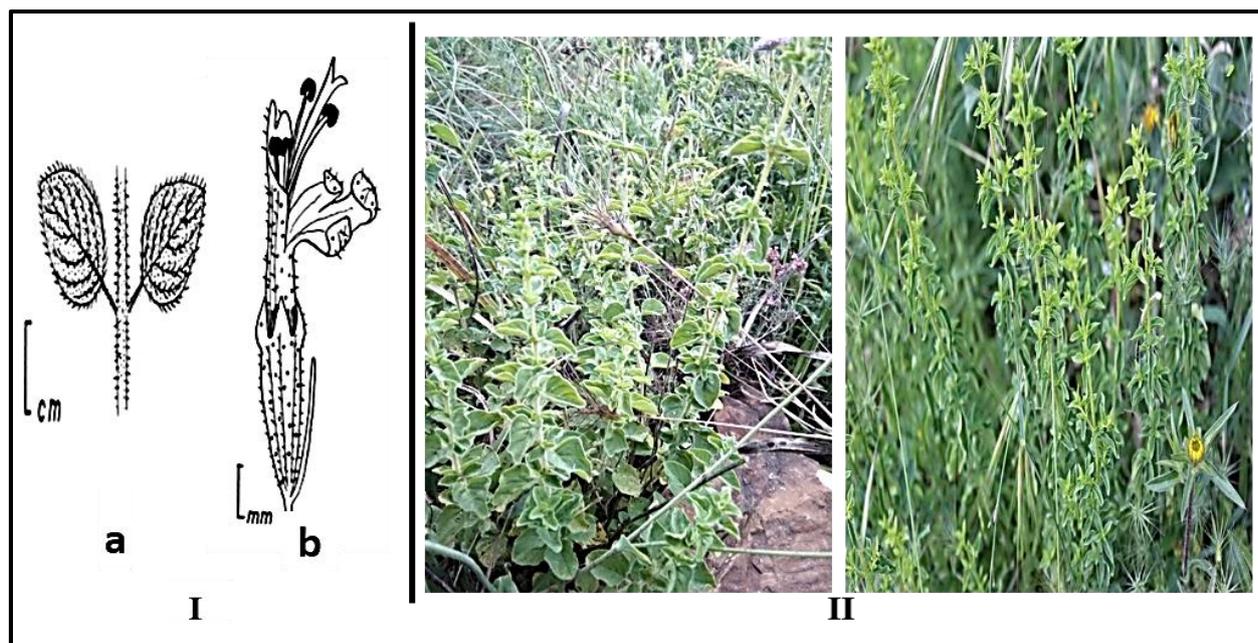


Figure 10. *O. glandulosum* Desf. **I/ a** : tige avec feuilles, **b** : fleur (Ietswaart, 1980).

II/ photos prises par Nabti dans la région de Bouslah, Mila, 2018.

III.1.3. Classification botanique d'*Origanum glandulosum*

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous classe : Gamopétales
- Ordre : Lamiales
- Famille : *Lamiaceae*
- Genre : *Origanum*
- Espèce : *Origanum glandulosum* Desf.

Synonyme de : *Origanum vulgare* L.ssp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart (Ietswaart, 1980).

III.1.4. Usage traditionnel

Les populations locales de plusieurs villes algériennes utilisent cette plante dans le traitement de la toux, la fièvre et la bronchite (Belhattab et *al.*, 2005). D'après Ouelbani et *al.*, (2016) cette espèce est employée dans certaines régions algériennes, pour ses effets, antibiotique, analgésique, diurétique et aussi pour renforcer le système immunitaire. Elle est aussi utilisée pour traiter les troubles digestifs, et l'hypertension artérielle (Boudjelal et *al.*, 2013).

III.2. Les huiles essentielles

III.2.1. Définitions

Les huiles essentielles (HE), également appelées "huiles volatiles", sont des mélanges complexes de composés volatils produits par des plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires. Les HE se caractérisent par des odeurs fortes, elles sont responsables des propriétés aromatiques d'une plante (Bakkali et *al.*, 2008). Les HE sont généralement, liquides, volatiles et solubles dans les lipides et les solvants organiques. Elles peuvent être présentes dans tous les organes végétaux, tels que, bourgeons, fleurs, feuilles, graines, tiges et fruits. Elles sont stockées dans des cellules sécrétoires, cavités, canaux, cellules épidermiques ou aussi dans des trichomes glandulaires (Bakkali et *al.*, 2008; Valdivieso-Ugarte et *al.*, 2019).

Les plantes productrices des HE sont regroupées en un petit nombre de familles, incluant : *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Asteraceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae*, *Cupressaceae* et *Piperaceae* (Bruneton, 1999).

Les HE jouent un rôle très important dans la nature en protégeant les plantes des attaques des différents micro-organismes (bactéries, champignons, virus), des insectes et des herbivores (en donnant un goût désagréable à la plante). Elles ont aussi un rôle dans l'attraction de certains insectes pour favoriser la dispersion des graines et du pollen (Bakkali et *al.*, 2008). D'autres fonctions ont été aussi attribuées aux HE, comme, l'augmentation de la thermotolérance chez les plantes, la défense et la cicatrisation des plaies chez les espèces de pins (Singsaas et *al.*, 1997).

III.2.2. Méthodes d'extraction

La méthode d'extraction est l'un des principaux facteurs qui déterminent la qualité de l'HE. Une procédure d'extraction inappropriée peut entraîner des dommages ou altérer l'action chimique de l'HE. Il en résulte une perte de bioactivité ou dans les pires cas, une décoloration, une odeur/saveur désagréable ainsi que des changements physiques telle que l'augmentation de la viscosité (Tongnuanchan et Benjakul, 2014). Parmi les méthodes d'extraction des HE les plus utilisées, on peut citer :

III.2.2.1. L'hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et la plus anciennement utilisée pour l'extraction des HE. Historiquement, Avicenne (980-1037) a été le premier à développer l'extraction à travers l'alambic. Il a extrait la première HE pure de rose (Asbahani et *al.*, 2015). Le dispositif d'extraction comprend une source de chauffage surmontée d'un récipient (alambic) dans lequel le matériel végétal est

plongé directement dans l'eau et le tout est porté à ébullition. L'installation comprend également un condenseur pour la collecte de l'eau de condensat et un décanteur pour séparer les HE de l'eau (Fig. 11). Le principe d'extraction est basé sur la distillation azéotrope. Pendant le processus d'extraction (chauffage), l'eau et les molécules d'HE forment un mélange hétérogène qui atteint sa température d'ébullition à un point bas proche de 100 °C, cependant, pour les composés d'HE seuls, ce point est très élevé (Exp : 233 °C et 237.7 °C pour le thymol et carvacrol respectivement) (Asbahani et al., 2015). Le mélange HE/eau est ensuite distillé simultanément comme s'il s'agissait d'un seul composé; c'est ce qu'on appelle la co-distillation. L'avantage de l'utilisation de l'eau est qu'elle est non miscible avec la majorité des molécules terpéniques des HE et donc, après condensation, les HE peuvent être facilement séparées de l'eau (différence de densité) par simple décantation. Le Clevenger est le système d'hydrodistillation utilisé au laboratoire, où, la plante est mise en contact avec de l'eau dans un ballon. L'hydrodistillation présente toutefois plusieurs inconvénients comme le long temps d'extraction (3-6 h ; 24 h pour les pétales de rose), les altérations chimiques des molécules terpéniques par contact prolongé avec de l'eau bouillante (hydrolyse, cyclisation...) et la surchauffe et la perte de certaines molécules polaires dans l'eau (Bohra et al., 1994).

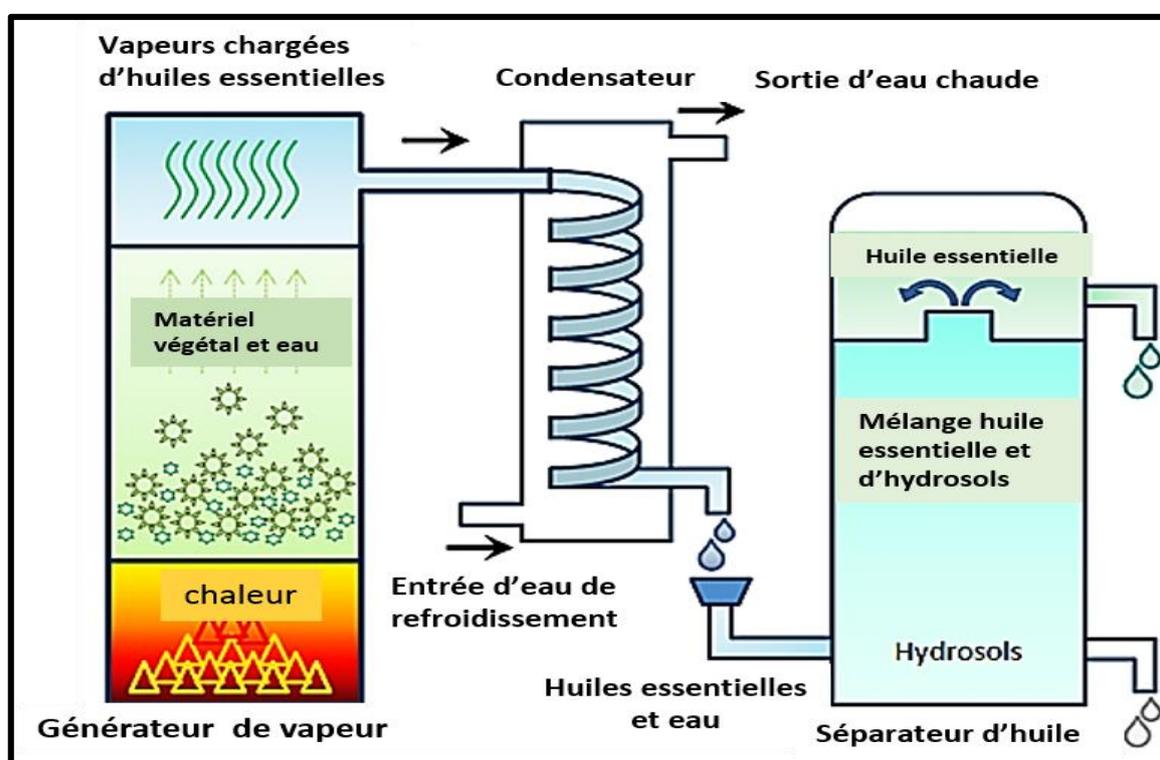


Figure 11. Illustration schématique de la méthode d'hydrodistillation (Tongnuanchan et Benjakul, 2014).

III.2.2.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes les plus utilisées pour extraire les HE. Elle est basée sur le même principe de l'hydrodistillation, sauf qu'il n'y a pas de contact direct entre la plante et l'eau. Le système consiste en une grille remplie du matériel végétal, qui se trouve au-dessus de la source de vapeur (**Fig. 12**). L'eau bouillante n'est pas mélangée avec le matériel végétal et la vapeur seule passe à travers la grille. La durée d'extraction est raccourcie, réduisant ainsi les altérations chimiques (Masango, 2005).

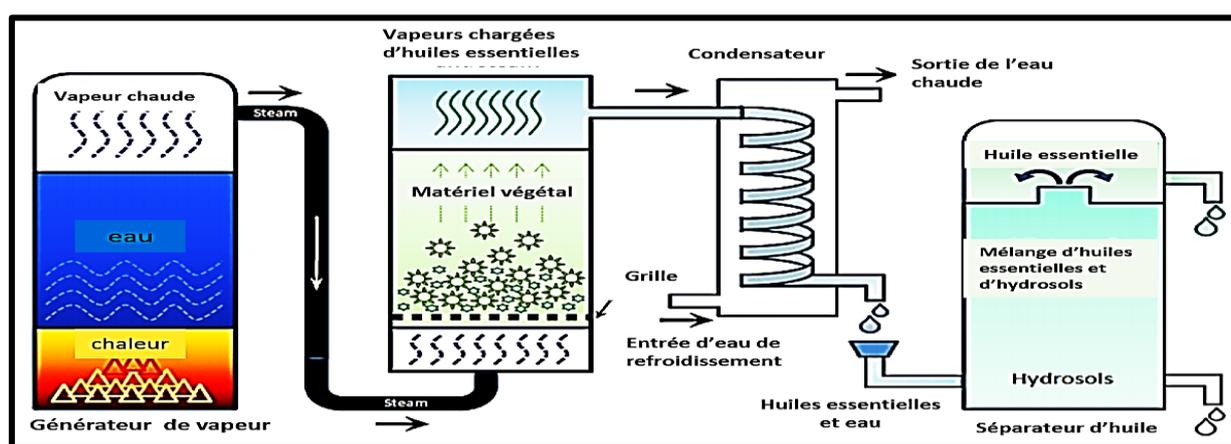


Figure 12. Illustration schématique de la méthode de distillation à la vapeur (Tongnuanchan et Benjakul, 2014).

III.2.2.3. L'hydrodiffusion

Cette méthode d'extraction est une variante de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau. La seule différence réside dans la manière de faire entrer de la vapeur dans l'alambic. Pour l'hydrodiffusion, la vapeur traverse le matériel végétal du haut vers le bas, tandis que pour la méthode d'entraînement à la vapeur, cette dernière est introduite du bas vers le haut. L'hydrodiffusion peut également fonctionner sous basse pression ou sous vide en réduisant ainsi, la température de la vapeur à moins de 100 °C. La technique d'hydrodiffusion possède plusieurs avantages comme la réduction du temps de traitement, l'obtention d'un rendement en HE plus élevé, ainsi que la réduction de consommation de vapeur (Tongnuanchan et Benjakul, 2014).

III.2.2.4. L'expression à froid

C'est le plus simple procédé utilisé pour l'extraction d'HE. Le matériel végétal, constitué essentiellement du zeste d'agrumes (citron, orange, mandarine, etc.) est pressé mécaniquement à froid pour libérer son contenu en HE. Après déchirement des péricarpes riches en cellules sécrétrices, l'HE libérée est entraînée par un courant d'eau puis séparée par décantation ou centrifugation (bruneton, 1999; Ferhat *et al.*, 2007).

III.2.2.5. L'extraction au fluide supercritique (EFSC)

Le dioxyde de carbone est souvent le solvant le plus utilisé pour l'extraction des HE car son point critique est facilement atteignable [pression critique (Pc) : 72.9 atm et température critique (Tc) : 31.2 °C basses]. Le CO₂ présente aussi d'autres avantages; il est non agressif pour les molécules thermolabiles, ininflammable, inerte chimiquement, non toxique et facile à éliminer. Il est aussi disponible en grande pureté et à un coût relativement faible. Sa polarité similaire au pentane le rend approprié pour l'extraction de composés lipophiles (Asbahani et *al.*, 2015).

Le principe de l'EFSC consiste à placer le matériel végétal dans un réservoir en acier inoxydable et injecter du CO₂ dans ce réservoir. Sous haute pression, le CO₂ se liquéfie et agit comme solvant pour extraire l'HE du végétal. Lorsque la pression diminue, le CO₂ revient à l'état gazeux et se sépare de l'huile volatile (Pushpangadan et George, 2012). Les extraits supercritiques se sont révélés être de qualité supérieure, avec de meilleures activités fonctionnelles et biologiques par rapport aux extraits obtenus par d'autres méthodes d'extraction comme l'hydrodistillation (Asbahani et *al.*, 2015). Ils sont également, caractérisés par des odeurs similaires aux arômes naturels des plantes (Pushpangadan et George, 2012).

III.2.2.6. L'extraction assistée par micro-ondes

L'utilisation de cette technique a évolué avec le développement du concept de l'extraction verte et la nécessité de nouvelles méthodes d'extraction économes en énergie (Asbahani et *al.*, 2015). Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques avec une fréquence comprise entre 300 MHz et 30 GHz et une longueur d'onde comprise entre 1 cm et 1 m. La fréquence couramment utilisée est de 2450 MHz, ce qui correspond à une longueur d'onde de 12,2 cm (Asbahani et *al.*, 2015). Dans ce procédé d'extraction, c'est le produit traité (matériel végétal) qui est la source de chaleur. Contrairement au chauffage classique, le dégagement de chaleur s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur. Les composés volatiles sont entraînés par la vapeur d'eau formé à partir de l'eau propre de la plante. Ils sont ensuite récupérés après condensation et décantation. Cette technique est rapidement devenue l'une des méthodes d'extraction d'HE les plus efficaces. Elle offre une reproductibilité élevée dans des temps plus courts, une manipulation simplifiée, une consommation de solvant réduite et un apport d'énergie inférieur (Asbahani et *al.*, 2015). Plusieurs variantes de l'extraction assistée par micro-ondes ont été développées, telles que l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (Stashenko et *al.*, 2004), l'extraction par solvant assistée par micro-ondes (Paré et *al.*, 1990), la distillation à la vapeur accélérée par micro-ondes (Chemat et *al.*, 2006) et l'hydrodiffusion par micro-ondes (Vian et *al.*, 2008).

III.2.3. Techniques d'analyse de la composition chimique

III.2.3.1 Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très utilisée en chimie analytique pour séparer et analyser les composés qui peuvent être vaporisés sans décomposition (Li et Liu, 2019). Ce type de chromatographie emploie une phase mobile gazeuse inerte et une phase stationnaire liquide. Un chromatographe en phase gazeuse (**Fig. 13**) fonctionne en introduisant un échantillon via un port d'injection (également appelé injecteur). Le gaz vecteur (généralement l'hélium), qui est la phase mobile, passe à travers l'entrée et emporte l'échantillon vers la colonne, où se trouve la phase stationnaire. La colonne est enfermée dans un four à température contrôlée. La séparation chromatographique aura lieu lorsque le mélange (gaz-échantillon) se déplace à travers la colonne. Les composés séparés de l'échantillon sortent de la colonne et pénètrent dans un détecteur, qui fournit un signal électronique proportionnel à la quantité du composé élué (Stauffer et al., 2008). L'élué de chaque composé se réalise à un temps donné, connu sous le nom de temps de rétention du composé. La comparaison des temps de rétention donne à la CPG son utilité analytique (Li et Liu, 2019).

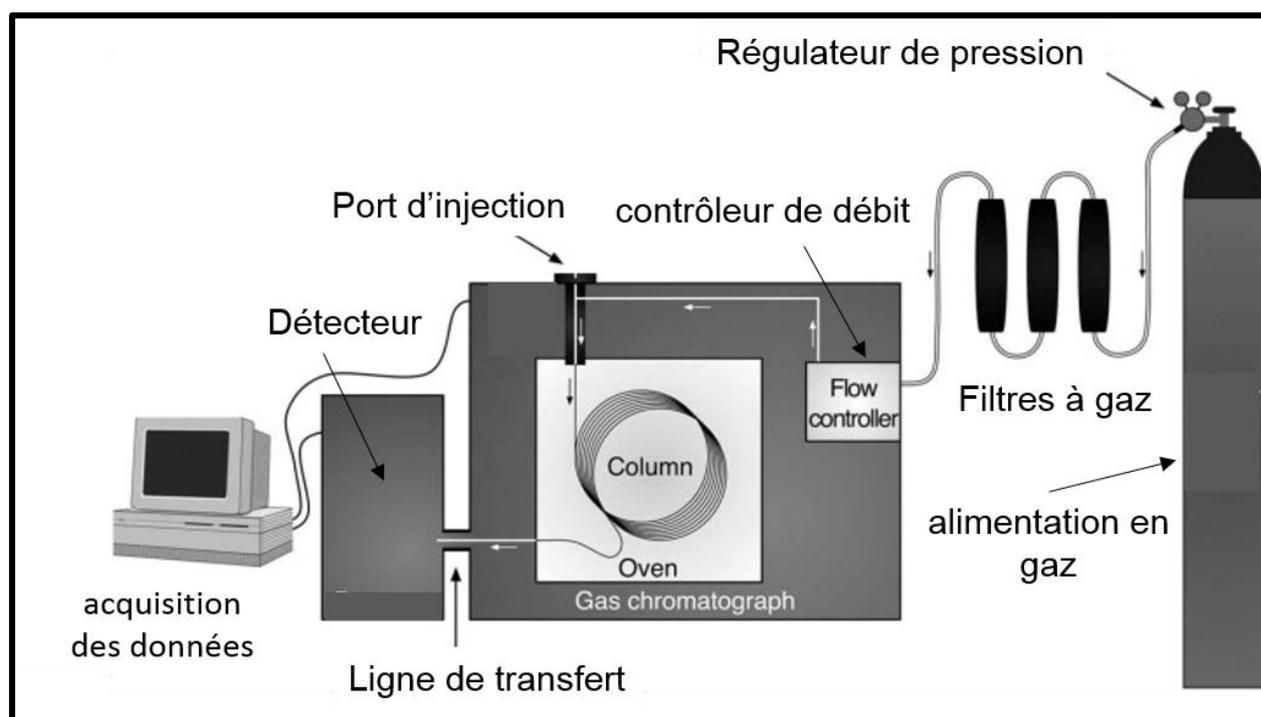


Figure 13. Un chromatographe en phase gazeuse et ses principaux composants (Stauffer et al., 2008).

III.2.3.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

Différents systèmes de détection tels que le détecteur à ionisation de flamme (FID) et le spectromètre de masse (SM) peuvent être couplés à la CPG, pour une meilleure analyse qualitative et quantitative (Jalali-Heravi et Parastar, 2011). La CPG/SM est l'une des méthodes de référence utilisée pour l'analyse des composés volatils tels que ceux présents dans les HE. Le principe de cette technique consiste à transférer les composés séparés par CPG dans le spectromètre de masse où, chaque molécule sera bombardée à l'aide d'électrons, ce qui conduit à sa fragmentation. Les différents fragments obtenus constituent le spectre de masse de la molécule. L'identification du composé est ensuite effectuée en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres de référence (Sneddon et *al.*, 2007). Les principaux avantages de la CPG/SM sont la possibilité d'analyser un grand nombre de substances chimiques, l'identification des composés séparés en utilisant des spectres de masse, la très grande sensibilité et la faible limite de détection (Jalali-Heravi et Parastar, 2011).

III.2.4. Composition chimique

Les HE se caractérisent par la présence de mélanges variables de composés bioactifs, principalement des composés terpéniques, en particulier des monoterpènes et des sesquiterpènes. Les HE contiennent également des composés non terpéniques générés par la voie des phénylpropanoïdes (Dhifi et *al.*, 2016). Elles peuvent aussi contenir divers autres produits issus du processus de dégradation de quelques constituants non volatils (Bruneton, 1999).

III.2.4.1. Les composés terpéniques

L'élément principal caractérisant la structure des terpènes est la présence dans leur squelette d'une unité isoprène (2-méthyl-1,3-butadiène) (**Fig. 14**). Cette dernière est représentée par la formule structurale générale $(C_5H_8)_n$ dans laquelle, n représente le nombre d'unités isoprènes liées.

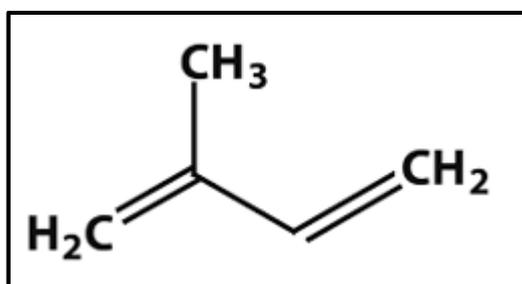


Figure 14. Structure de l'unité isoprénique.

Les terpènes sont classées, ainsi, en fonction du nombre de leurs unités isoprènes en : monoterpènes (avec deux unités d'isoprène), sesquiterpènes (3 unités d'isoprène), diterpènes (4

unités d'isoprène), triterpènes (6 unités) et tétraterpènes (8 unités). Les HE ne renferment que les terpènes de faible masse moléculaire, à savoir, les mono et sesquiterpènes (Bruneton, 1999).

a- Les monoterpènes

Ce sont les terpènes les plus simples, ils sont formés de deux unités d'isoprènes et ayant pour formule brute $C_{10}H_{16}$ (**Fig. 15**). Ils peuvent être linéaires (acycliques) ou cycliques (mono ou bicyclique) et regroupent de nombreux isomères. Bien qu'ils sont regroupés au sein du même groupe, les composés monoterpéniques possèdent différentes fonctions chimiques, comme, la fonction alcool (Exp: géraniol et linalol), aldéhyde (Exp: géranial et néral), Phénol (Exp: thymol et carvacrol) et autres fonctions (Bruneton, 1999).

b- Les sesquiterpènes

Il s'agit du groupe le plus diversifié des terpènes. Les sesquiterpènes ont pour formule $C_{15}H_{24}$ (constituée de l'assemblage de trois unités isoprènes) et renferment des composés acycliques ou cycliques (mono, bi, tri ou polycycliques) (**Fig. 15**). Comme les autres terpènes, les sesquiterpènes ont aussi divers fonctions, alcool (Exp : bisabol et farnésol), aldéhyde (Exp : sinensals), ester (Exp : acétate de cédryle) et autres (Bruneton, 1999).

III.2.4.2. Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (phénylpropanoïdes)

Une autre classe de composés volatils rencontrés dans les HE est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C6-C3). Ces composés sont moins fréquents que les terpènes et leur biosynthèse en est totalement différente. Cette classe chimique comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les HE d'*Apiaceae* (persil, anis, fenouil, ... etc.), on les retrouve aussi dans certaines autres familles botaniques (*Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*) (Bakkali, 2008).

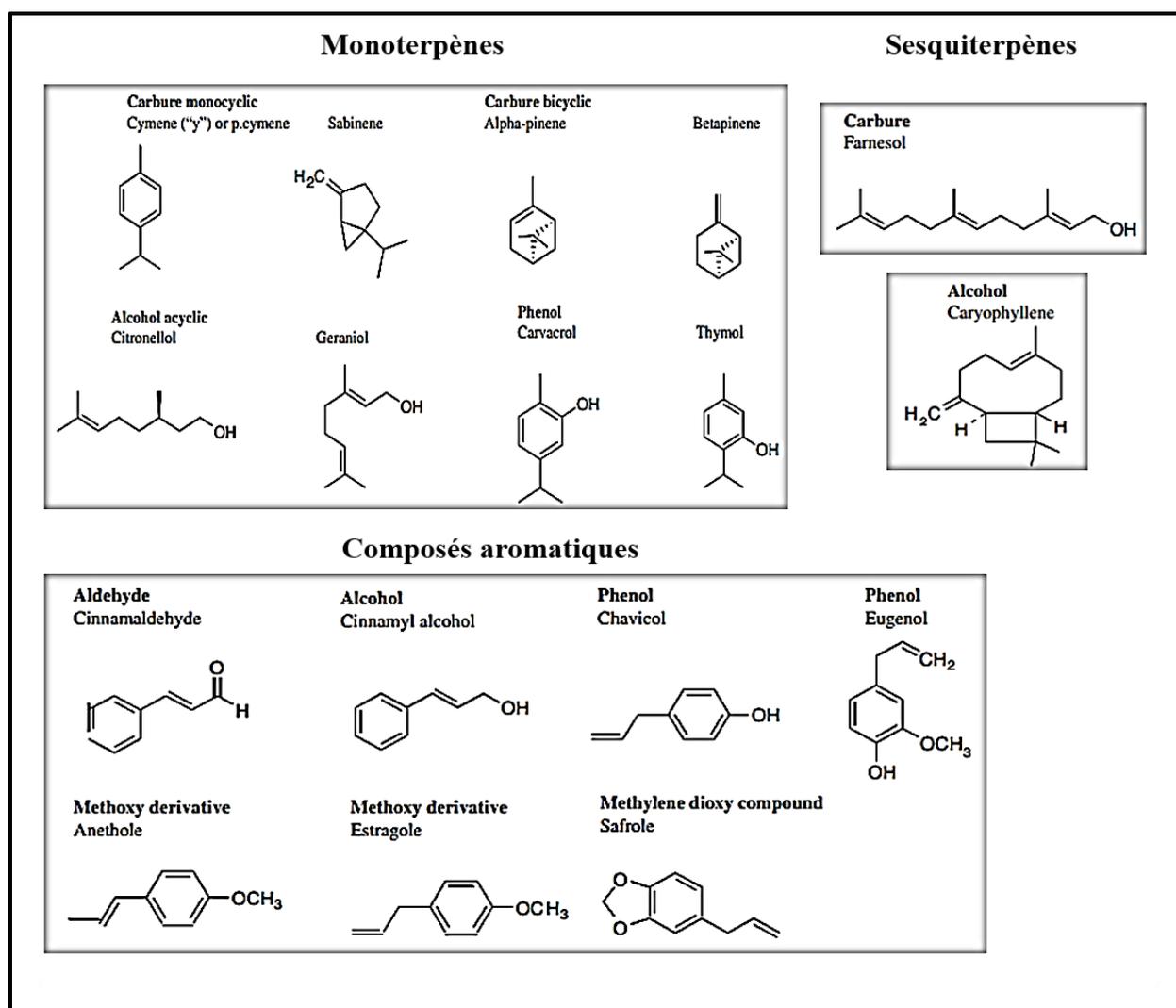


Figure 15. Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles (Bakkali et al., 2008).

III.2.5. Activités biologiques des huiles essentielles

III.2.5.1. Activité antimicrobienne

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour la recherche et le développement de nouveaux agents antimicrobiens à partir de diverses sources pour lutter contre la résistance microbienne. Par conséquent, une grande attention a été accordée au screening de l'activité antimicrobienne et à ses différentes méthodes d'évaluation (Chouhan et al., 2017). Les HE ont reçu un intérêt particulier dans ce domaine de recherche, car plusieurs études ont rapporté l'efficacité de ces composés comme agents antimicrobiens.

Les HE possèdent un large spectre d'activité antibactérienne, antifongique et même antivirale. Il a également été démontré que les HE inhibent la croissance de souches microbiennes résistantes aux antibiotiques conventionnels (Tariq et al., 2019). En ce qui concerne leur mode d'action, les HE perturbent l'assemblage de l'ATP et entraînent des dommages dans la paroi cellulaire des

agents pathogènes fongiques (Aleksic et Knezevic, 2014). Les HE peuvent également désintégrer la membrane mitochondriale en interférant avec le système de transport d'électrons (Tariq et al., 2019). Plusieurs HE ont montré des activités antivirales contre de nombreux virus à ARN et à ADN, tels que le virus de l'herpès simplex de type 1 et de type 2 (HSV-1 et HSV-2), le virus de la dengue de type 2, le poliovirus, le virus Junin et le coxsackievirus B1 (Allahverdiyev et al., 2004). Pour les bactéries, les HE déstabilisent principalement l'architecture cellulaire, entraînant une dégradation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique, perturbant ainsi, de nombreuses activités cellulaires, notamment la production d'énergie et le transport membranaire. La rupture de la membrane induite par les HE peut entraîner des fuites de composants cellulaires et une perte d'ions (Oussalah et al., 2006). Il convient de noter que l'effet des HE sur la croissance bactérienne dépendra du fait qu'il s'agisse de bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, car la couche de lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif agit comme une barrière pour les macromolécules et les composés hydrophobes tels que ceux présents dans les HE (Pandey et al., 2016). En plus du type de bactéries, la propriété antimicrobienne des HE dépend aussi de leurs compositions chimiques et de la quantité des composés majeures (Tarique et al., 2019).

Il existe un grand nombre d'articles publiés qui mettent en évidence l'action antimicrobienne d'une variété d'HE issues de différentes parties du monde. Okoh et al. (2010) ont rapporté que L'HE de *Rosmarinus officinalis* (romarin) présentait une activité antibactérienne contre des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et à Gram négatif (*E. coli* et *Klebsiella pneumoniae*). Les principaux composants de l'huile de romarin sont les monoterpènes tels que α -pinène, β -pinène, myrcène 1,8-cinéole, bornéol, camphre et verbinone (Santoyo et al., 2005; Okoh et al., 2010), qui possèdent une forte activité antimicrobienne, et agissent par perturbation de l'intégrité de la membrane bactérienne (Knobloch et al., 1989). Belhattab et al. (2004); Sari et al. (2006); Bejaoui et al. (2013) et Benbelaid et al. (2014) ont rapporté que l'HE de l'origan (*O. glandulosum*) avait une activité antimicrobienne contre des bactéries à Gram positif et négatif et aussi contre des champignons. Les principaux composés de l'HE de l'origan sont thymol, carvacrol, γ -terpinène et p -cymène. Le carvacrol, avec son isomère thymol sont parmi les constituants des HE les plus étudiés. Les HE riches en carvacrol auraient une remarquable activité antimicrobienne (Çetin et al., 2011; Magi et al., 2015). Bien que la membrane externe des bactéries soit affectée par le carvacrol, la membrane cytoplasmique serait son site d'action, provoquant un transport passif d'ions à travers la membrane. Les effets antimicrobiens des HE issues des plantes médicinales et aromatiques sont à la base de nombreuses applications, dans divers secteurs générateurs de revenus tels que les industries pharmaceutique, nutraceutique, cosmétique, parfumerie, agronomique et sanitaire.

III.2.5.2. Autres activités biologiques

- **Activité insecticide**

Les pesticides à base d'HE ou de leurs constituants ont démontré leur efficacité contre une série de ravageurs (Exp: insectes ravageurs des produits stockés, ravageurs domestiques, ravageurs hématophages, ravageurs agricoles,...etc). Ils peuvent être appliqués sous forme de fumigants, de formulations granulaires ou de pulvérisations directes avec une gamme d'effets allant de la toxicité létale à la répulsion et/ou à la dissuasion de la ponte chez les insectes (Isman et Machial, 2006). Parmi les HE bioactives contre les insectes et autres ravageurs figurent l'huile de clou de girofle (eugénol), de thym (thymol, carvacrol), de menthe (menthol, pulegone), de citronnelle (citronellal, citral), de cannelle (cinnamaldéhyde), de romarin (1,8-cinéole) et d'origan (carvacrol) (Isman et Machial, 2006). Les pesticides à base d'HE de plantes constitueront une meilleure solution alternative aux insecticides dangereux classiques qui sont retirés du marché. Les pesticides dérivés d'HE présentent plusieurs avantages importants. En raison de la volatilisation rapide de ces produits, le niveau de risque pour l'environnement est beaucoup plus faible que celui des pesticides synthétiques. En outre, bien que l'acquisition d'une résistance continue d'être un problème pour de nombreux pesticides synthétiques, il est probable que la résistance se développera plus lentement aux pesticides à base d'HE en raison des mélanges complexes de constituants qui caractérisent bon nombre de ces huiles (Isman et Machial, 2006).

- **Activité antioxydante**

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont de petites molécules qui dérivent de l'oxygène et qui sont impliquées dans la peroxydation des lipides, la glycation /oxydation/ nitration des protéines, l'inactivation des enzymes, les dommages à l'ADN et d'autres altérations cellulaires (Finkel 2003; Hadi et *al.*, 2007). Les antioxydants sont des substances qui peuvent retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques. Ces substances intéressent de plus en plus les scientifiques du secteur alimentaire, les professionnels de la santé et le grand public en raison de leur rôle protecteur dans les produits alimentaires contre la détérioration oxydative et dans l'organisme contre les processus pathologiques induits par le stress oxydatif (Zhong et Shahidi, 2015). Les industries de conservation alimentaire, des produits nutraceutiques et pharmaceutiques sont en recherche permanente pour de puissants antioxydants naturels. Les HE renferment plusieurs composés qui ont une structure imitant des composés phénoliques végétaux bien connus par leur remarquable activité antioxydante. Parmi ces principaux composés qu'on peut trouver dans les HE, le thymol et le carvacrol possèdent la plus forte activité antioxydante (Dapkevicius et *al.*, 1998). Les HE peuvent agir en tant qu'antioxydants par différents mécanismes, tels que le

piégeage des radicaux libres et la prévention de l'abstraction continue de l'hydrogène. Elles agissent aussi comme des agents réducteurs et des quenchers de la formation d'oxygène singulet (Yildirim et *al.*, 2000; Mao et *al.*, 2006). Avec toutes ces fonctions, les HE peuvent servir d'antioxydants naturels potentiels, qui peuvent être utilisées dans différents secteurs industriels tels que l'industrie alimentaire pour la conservation des aliments.

CHAPITRE IV
MATÉRIEL ET MÉTHODES

IV. Matériel et Méthodes

IV.1. Présentation des lieux de travail

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie, centre hospitalo-universitaire (CHU) Saadna Mohamed Abdenour de Sétif.

Le CHU de Sétif est une institution publique de 913 lits, comprenant les services médicaux et chirurgicaux suivants : médecine interne, pédiatrie, pneumophtisiologie, maladies infectieuses, hématologie, néphrologie, cardiologie, réanimation médicale, neurologie, chirurgie générale, urologie, neurochirurgie, orthopédie, ORL, ophtalmologie, maxillo-faciale, chirurgie infantile, urgences médicochirurgicales, gynéco obstétrique, médecine légale et médecine de travail. Chaque année, plus de 94 000 patients (enfants et adultes) sont hospitalisés dans le CHU. Le laboratoire de microbiologie reçoit les prélèvements cliniques provenant des différents services du CHU ainsi que des prélèvements de malades externes.

L'étude de la biologie moléculaire a été réalisée en collaboration avec deux laboratoires français, le laboratoire de bactériologie et de virologie, hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier et l'institut hospitalo-universitaire (IHU) méditerranée infection, Marseille.

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée dans le laboratoire de valorisation des ressources biologiques naturelles (LVRBN), université Ferhat Abbas Sétif-1 et la caractérisation chimique des huiles a été effectuée à l'école de pharmacie, université de Camerino, Italie.

IV.2. Matériel biologique

IV.2.1. Souches bactériennes

Souches d'*E. coli* isolées de prélèvements d'urine chez les patients hospitalisés et non hospitalisés présentant des signes d'infection urinaire. Ces souches incluses dans l'étude, ont été isolées au laboratoire de microbiologie entre Janvier 2015 et Février 2017.

IV.2.2. Matériel végétal

Les échantillons (parties aériennes) d'*O. glandulosum* Desf. ont été prélevés, en juin 2018, dans cinq différents sites, situés à l'Est et au Sud-Est de l'Algérie : Chirhom (Sétif), Sidi Aissa (M'sila), Ras El oued (Bordj Bou Arreridj), Bouslah (Mila) et Ben Guecha (El Oued). Les plantes ont été identifiées par les professeurs Laouar Hocine, université de Sétif-1 et Filippo Maggi, université de Camerino, Italie.

IV.3. Collecte des données

Les données démographiques et cliniques des patients ayant une infection urinaire à *E. coli*, ont été collectées à partir des fiches de renseignement accompagnant le prélèvement urinaire (**Annexe 1**, fiche de renseignements cliniques).

IV.4. Méthodes expérimentales

IV.4.1. Isolement et identification des souches bactériennes

Après homogénéisation et dilution, les échantillons d'urines ont été ensemencés sur boîtes de gélose nutritive (Bio-Rad) puis incubés à 37°C pendant 24 heures. L'identification bactérienne a été réalisée à l'aide des galeries API 20E (BioMérieux, France). Les souches d'*E. coli* ainsi identifiées sont conservées pour leur étude par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) afin de s'assurer de leur identification.

IV.4.1.1. Galerie API 20E

C'est un système d'identification standardisé, comportant 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. L'inoculation des microtubes avec une suspension bactérienne permet la reconstitution des substrats. Après une période d'incubation de 18-24 h à 37 C°, les réactions produites se traduisent par des virages colorés ou révélés par l'addition de réactifs chimiques. La galerie est lue et codée selon les indications du fabricant. La comparaison du code obtenu à ceux de référence permet l'identification du micro-organisme.

IV.4.1.2. MALDI-TOF MS

Cette technique spectrométrique permet l'identification rapide des microorganismes en se basant sur l'analyse de leurs protéines totales (Seng et *al.*, 2009). Elle consiste à déposer, sur une plaque métallique, l'échantillon (Exp : colonie bactérienne) à identifier avec une matrice, la plaque est ensuite, introduite dans le spectromètre de masse et soumise à l'action des rayons laser (**Fig. 16**). Le rôle de la matrice est d'absorber l'énergie provenant du laser ce qui provoque la vaporisation de l'échantillon avec formation d'ions de masses différentes. Les ions ainsi formés vont être mis en mouvement sous l'action d'un champ électrique, et un analyseur va les séparer en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Ils traversent ensuite un certain nombre de grilles d'extraction avant d'atteindre le « tube de vol » à l'extrémité duquel se trouve le détecteur. Les

ions sont séparés selon leur temps de vol (time of flight), ceux de petite taille atteignant les premiers le détecteur. Le temps de vol pour atteindre le détecteur est utilisé pour calculer la masse de chaque particule. La somme des ions analysés va former un spectre caractéristique de l'échantillon. Le spectre obtenu est ensuite comparé à une collection de spectres contenus dans des bases de données de façon à identifier la souche bactérienne (Carbonnelle et Nassif, 2011).

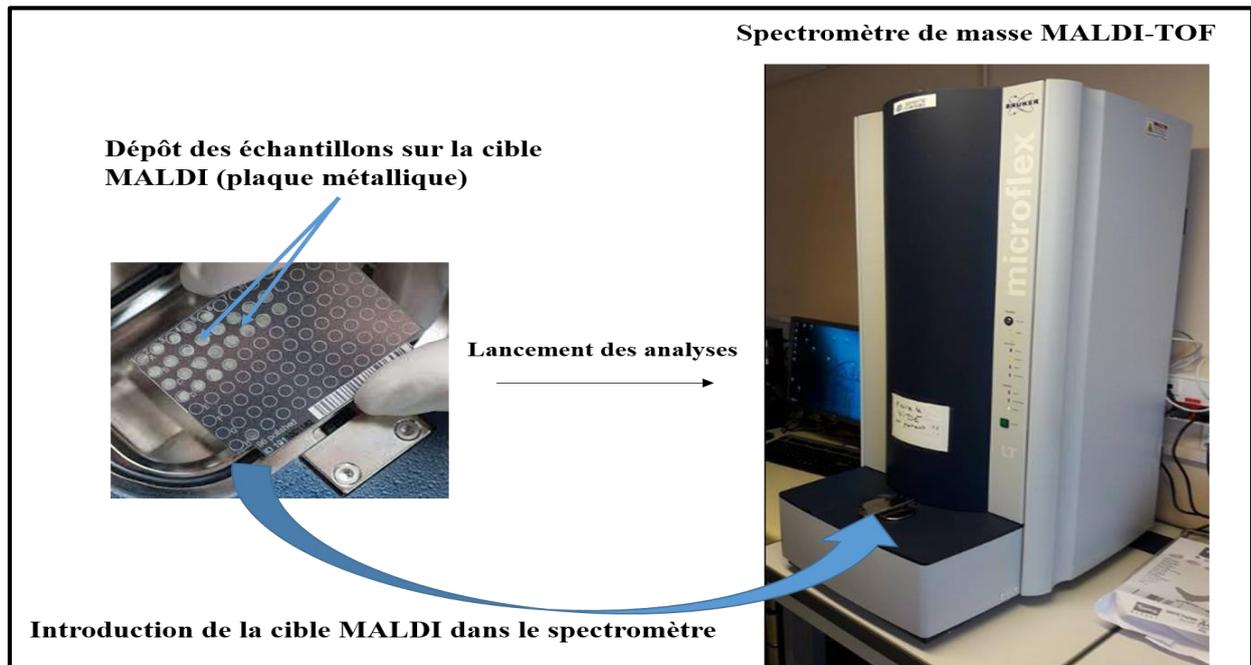


Figure 16. Spectromètre de masse MALDI-TOF.

- **Préparation de la matrice**

Elle se fait sous hotte chimique selon le protocole suivant : on dépose 2 pointes de spatules de poudre d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique dans un tube Eppendorf de 1.5 mL, on ajoute successivement les éléments suivants :

- 250 μ L d'acide trifluoroacétique (TFA) à 10%
- 250 μ L d' H_2O HPLC
- 500 μ L d'acétonitril HPLC

Le mélange est ensuite vortexé, soniqué pendant 10 min dans un bain à ultrasons et centrifugé pendant 5 min à 13000 g. Le surnageant, constituant la matrice prête à l'utilisation, est récupéré dans un nouveau tube Eppendorf. La matrice doit être conservée à 4 °C à l'abri de la lumière.

- **Réalisation des dépôts sur cible MALDI**

Le dépôt d'échantillons sur la cible (plaque métallique) doit être effectué sous un poste de sécurité microbiologique (PSM). Les échantillons (colonies bactériennes) sont déposés en fine couche homogène en deux exemplaires minimum (pour chaque échantillon) à l'aide d'une pointe

de cône de pipette 10 µL. Une fois tous les dépôts effectués, on dépose 1.5 µL de matrice sur chaque spot et on laisse sécher sous P S M pendant quelques minutes.

- **Lancement de l'analyse et lecture des résultats**

La cible à analyser est insérée délicatement dans le spectromètre (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Après réglage des différents paramètres, le programme MALDI Biotyper Compass (MBT compass) est lancé. Les résultats d'identification sont donnés, sous MBT compass, par un score (**Fig. 17**). L'identification du germe est validée lorsque le score obtenu est supérieur à 2.0 pour les 2 dépôts (même germe retrouvé).

Nom de l'échantillon	ID de l'échantillon	Organisme (meilleur candidat)	Score Valeur	Organisme (second candidat)	Score Valeur
E7 (+++)(A)	E7 (standard)	Escherichia coli	2.41	Escherichia coli	2.34
E8 (+++)(A)	E8 (standard)	Escherichia coli	2.37	Escherichia coli	2.36
E9 (+++)(A)	E9 (standard)	Escherichia coli	2.30	Escherichia coli	2.32
E10 (-)(C)	E10 (standard)	Aucune identification possible	1.59	Aucune identification possible	1.49
E11 (-)(C)	E11 (standard)	Aucune identification possible	1.32	Aucune identification possible	1.32
E12 (-)(C)	E12 (standard)	Aucune identification possible	1.46	Aucune identification possible	1.40

Figure 17. Exemple de résultats obtenus par MALDI-TOF MS.

IV.4.2. Étude de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion des disques en milieu solide. L'ensemencement des géloses Müller-Hinton (MH) a été réalisé par écouvillonnage, à partir de suspensions de colonies bactériennes de 18-24 heures, dans 5-10 mL de sérum physiologique stérile à 0.9 %. La densité optique de la suspension doit être de à 0.5 Mac Farland. Le dépôt des disques d'antibiotiques à la surface des géloses a été effectué à l'aide d'un distributeur automatique. Vingt et un antibiotiques (SirScan Discs, i2a, Montpellier, France) ont été testés, incluant : pénicillines [amoxicilline (25 µg), amoxicilline + acide clavulanique (20 +10 µg), ticarcilline (75 µg), mécillinam (10 µg)], céphalosporines [céfotaxime (5 µg), ceftriaxone (30 µg), cefpodoxime (10 µg), céfépime (30 µg), ceftazidime (10 µg), céfoxitine (30 µg), céfalexine (30 µg)], carbapénèmes [imipénème (10 µg), ertapénème (10 µg)], aminosides [amikacine (30 µg), gentamicine (10 µg)], quinolones [acide nalidixique (30 µg), ciprofloxacine (5 µg)], fosfomycine

(200 µg), nitrofurantoïne (100 µg), triméthoprime-sulfaméthoxazole (25 µg) et colistine (50 µg). Les boîtes ont été incubées pendant 24 h à 37 °C et les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés par un lecteur automatique (Scan 4000, interscience) (**Fig. 18**). Les résultats ont été interprétés selon les recommandations du comité européen de l'antibiogramme (EUCAST) (Version 7.1, 2017) (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/).

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'ertapénème ont été déterminées par E-test (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France). La résistance à la colistine a été étudiée en déterminant la CMI par méthode de dilution en milieu liquide selon les recommandations de l'EUCAST (www.eucast.org).



Figure 18. Lecteur automatisé des antibiogrammes (photo prise par Nabti, 2019).

IV.4.3. Détection phénotypique des mécanismes de résistance aux β -lactamines

IV.4.3.1. Test de synergie

La production des BLSE a été détectée à l'aide de test de synergie réalisé dans les conditions standard de l'antibiogramme. Des disques de C3G (céfotaxime, ceftazidime et ceftriaxone), et/ou d'aztréonam (ATM) ont été placés à une distance de 30 mm (centre à centre) d'un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (20 µg /10 µg) (AMC) (Jarlier et *al.*, 1988). La production d'une BLSE est caractérisée par l'apparition d'une image de synergie en bouchon de champagne entre les disques d'AMC et les C3G/ATM (Robin, 2012). La réduction de distance entre les disques

d'AMC et de C3G (Exp : à 20 mm) améliore considérablement la sensibilité de ce test (Drieux et *al.*, 2008).

IV.4.3.2. Test des disques combinés

Ce test consiste à comparer la zone d'inhibition obtenue autour des disques AMC + C3G, appliqués ensemble, par rapport à la zone obtenue autour d'un disque de C3G (du même type) appliqué seul. Le disque d'AMC est laissé diffuser à une température ambiante pendant une heure de temps avant de le remplacer par le disque de C3G. La souche bactérienne testée est considérée comme productrice de BLSE (test de disques combinés positif) lorsqu'il y a enregistrement d'une différence ≥ 5 mm, entre les diamètres des zones d'inhibition de l'AMC + C3G ensemble et du C3G seul (Drieux et *al.*, 2008).

IV.4.3.3. Test à la cloxacilline

Le test à la cloxacilline est effectué pour la mise en évidence de la production d'une céphalosporinase associée ou non à une BLSE. L'addition de la cloxacilline à une concentration de 250 $\mu\text{g/ml}$ dans une gélose Mueller-Hinton permet l'inhibition de toutes les céphalosporinases hyperproduite et la restauration de la sensibilité aux céphalosporines. L'apparition de l'image de synergie entre l'AMC et une C3G témoigne de la coproduction d'une BLSE et d'une céphalosporinase (Drieux et *al.*, 2008).

IV.4.4. Identification des gènes de résistance aux antibiotiques

IV.4.4.1. Extraction de l'ADN bactérien

Pour chaque souche, l'extraction de l'ADN a été réalisée à partir d'une colonie, dans un volume final de 200 μL d'eau distillée, par incubation à 95 °C pendant 10 min. L'ADN bactérien est récupéré après élimination des débris cellulaires (culot) par centrifugation à 10000 tours/min pendant 10 minutes, l'ADN a été ensuite conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation.

IV.4.4.2. Réaction de polymérisation en chaine en temps réel

Le principe de la PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification. L'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction (Poitras et Houde, 2002).

Les gènes codant pour la résistance aux C3G (*bla*_{CTX-M-groupe-A}, *bla*_{CTX-M-groupe-B}, *bla*_{TEM} et *bla*_{SHV}), aux carbapénèmes (*bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} et *bla*_{KPC}) et à la colistine (*mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* et *mcr-5*) ont été recherchés par qPCR en utilisant un lightcycleur de type CFX96 Reel-time PCR (Bio-Rad, Singapore). Toutes les amorces et sondes utilisées dans les différentes réactions d'amplification sont listées dans le **tableau 5**. Des témoins positifs et négatifs ont été utilisés dans les différentes réactions pour valider les résultats obtenus.

Le mélange (milieu) réactionnel de la qPCR est composé de : 10 µl de 2X qPCR Master Mix (Thermo Fisher, Vilnius, Lithuania), 1 µl de l'amorce forward, 1 µl de l'amorce reverse, 1 µl de la sonde TaqMan, 2 µl d'H₂O exempt de nucléase et 5 µl de l'ADN à amplifier. Les étapes de déroulement de la qPCR sont les suivantes :

- 50°C pendant 2 min, (étape d'activation)
- 95°C pendant 15 min, (dénaturation initiale)
- 35 cycles de : 95°C pendant 1 s et 65°C pendant 30 s (hybridation de la sonde et des amorces puis élongation et hydrolyse de la sonde)

IV.4.4.3. Réaction de polymérisation en chaîne standard (PCR-STD)

La PCR-STD est une méthode d'amplification qui permet de copier en grand nombre une séquence d'ADN connue présente dans un échantillon. Ce type de PCR nécessite l'implication d'autres techniques pour la détection des produits de PCR amplifiés.

Les gènes codant pour la résistance aux céphalosporines de type AmpC (*bla*_{ACT}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX}, *bla*_{DHA} et *bla*_{CMY}), aux aminosides (*armA*, *aac(6')*, *aac(3)*, *aad* et *aph*) et aux quinolones (*qnrA* et *qnrB*), ainsi que, tous les gènes détectés auparavant par qPCR, ont été recherchés par PCR-STD, en utilisant un thermocycleur de type (Thermo Fisher Scientific, USA).

Le mélange réactionnel de la PCR-STD est composé de : 12.5 µl de 2X qPCR Master Mix (Thermo Fisher, Vilnius, Lithuania), 0.5 µl de l'amorce forward, 0.5 µl de l'amorce reverse, 6.5 µl d'H₂O exempt de nucléase et 5 µl de l'ADN à amplifier. Les étapes de la PCR-STD sont les suivantes :

- 96°C pendant 15 min, (dénaturation initiale)
- 35 cycles de : 94°C pendant 1 min (dénaturation), 55°C pendant 50 s (hybridation des amorces) et 72°C pendant 2 min (élongation)
- 72°C pendant 7 min (élongation finale)

IV.4.4.4. Électrophorèse, révélation et séquençage des produits de PCR

Après amplification, les produits de PCR-STD sont soumis à une migration à 130 Volts pendant 30 min dans un gel d'agarose (1.5%). Le gel est préparé en mélangeant 1.5 g d'agarose dans 100 mL de tampon tris-borate-EDTA (TBE) 0.5X, le mélange est fondu au micro-ondes, après solubilisation, 4 µL du Syber-safe (agent intercalant remplaçant le bromure d'éthidium BET) sont ajoutés. Le gel est versé dans un support d'électrophorèse et laissé polymériser à température ambiante avant la migration. Le gel et son support sont ensuite, immergés dans la cuve de migration contenant du tampon TBE 0.5X. Tous les produits de PCR sont mélangés avec du bleu de charge (Blue juice loading buffer) avant d'être déposés dans les puits. Un marqueur de poids moléculaire 2 kb DNA Ladder a été aussi, déposé dans le gel en même temps que les produits de PCR. Après migration, la lecture se fait sous un transilluminateur UV.

Après révélation sous UV, tous les produits avec une réaction de PCR positive ont été soumis au séquençage, une opération qui consiste à déterminer la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN amplifié (Sanger et *al.*, 1977). L'opération de séquençage se déroule en plusieurs étapes :

✓ Purification des produits de PCR

Le produit de PCR est mélangé avec 150 µL d'H₂O distillée et, est déposé sur une plaque blanche à 96 puits (*Machery Nagel*). La plaque a été mise à une aspiration sous vide à l'aide d'une pompe pendant 20 min. Afin de récupérer les produits de PCR purifiés, 50 µL d'H₂O distillée sont ajoutées dans chaque puits et la plaque est soumise à l'agitation (400 tr/min pendant 20 min). Les produits de PCR purs, ont été ensuite, conservés à - 20 °C, dans des barrettes préalablement identifiées.

✓ PCR BigDye

Le mélange réactionnel de la PCR BigDye est composé de : 16 µL de Mix [2 µL de BigDye (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 3 µL tampon, 10 µL d'H₂O, 1 µL amorce F ou R] et 4 µL de l'ADN purifié. Les étapes de la PCR BigDye sont :

- 96°C pendant 5 min, (dénaturation initiale)
- 25 cycles de : 96°C pendant 10 s (dénaturation), 55°C pendant 5 s (hybridation) et 60°C pendant 3 min (élongation)

✓ Purification sur plaque de Séphadex

Les produits de PCR-BigDye ont été purifiés à l'aide d'une plaque de Séphadex préparée auparavant. Avant de transférer les produits de PCR dans la plaque de Séphadex, cette dernière est posée sur une plaque de séquençage (*MicroAmp N801-560*). Une étape de centrifugation, à 2500

rpm pendant 3 min à une température de 15 °C, est nécessaire pour récupérer les produits de PCR dans la plaque de séquençage.

✓ Séquençage

Les produits de PCR purifiés ont été séquencés à l'aide d'un séquenceur de type 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems/HITACHI, California, USA) en suivant les recommandations du fabricant. Après séquençage, les séquences nucléotidiques obtenues ont été assemblées à l'aide du logiciel CondonCode Aligner, et ont été analysées en utilisant les programme de BLAST d'ARG-ANNOT (Gupta et *al.*, 2014) et de l'NCBI disponible sur : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Tableau 5. Amorces utilisées pour les réactions de PCR et de séquençage.

Gène cible	Type de PCR	Amorce	Séquence 5'-3'	Taille de Produit (bp)
<i>bla_{CTX}</i>	qPCR	CTX-M_groupA_RT_F CTX-M_groupA_RT_R CTX-M_groupA_RT_Probe	CGGGCRATGGGCGCARAC TGCRC CGGTSGTATTGCC CCARCGGGCGCAGYTG GTGAC	105
		CTX-M_groupB_RT_F CTX-M_groupB_RT_R CTX-M_groupB_RT_Probe	ACCGAGCCSACGCTCAA CCGCTGCCGGTTTTATC CCCGCGYGATACCACCACGC	221
<i>bla_{CTX}</i> - Groupe 1	PCR-STD	CTX-M-1F CTX-M-1R	CCCATGGTTAAAAAATCACTGC CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG	944
<i>bla_{CTX}</i> - Groupe 9	PCR-STD	CTX-M-9F CTX-M-9R	ATGGTGACAAAGAGAGTGCAAC TTACAGCCCTTCGGCGATGATT	876
<i>bla_{SHV}</i>	qPCR	SHV_RT_F SHV_RT_R SHV_RT_Probe	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA TCCTGCTGGCGATAGTGGAT TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG	105
<i>bla_{TEM}</i>	qPCR	ALLTEM_RT_F ALLTEM_RT_R ALLTEM_RT_Probe	TTCTGCTATGTGGTGCGGTA GTCCTCCGATCGTTGTCAGA AACTCGGTCGCCGCATACACTATTC TCAGA	213
	PCR-STD	TEM-F TEM-R	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	861
<i>Bla_{CMY2}</i>	PCR-STD	CMY2-F CMY2-R	AACACACTGATTGCGTCTGA TCCTGGGCCTCATCGTCAGTTAT	1228
<i>Bla_{CMY1}</i>	PCR-STD	CMY1-F CMY1-R	TATTAGAGCGGTTTAGGCTG AATGTACCGCCCTCTTTC	1456
<i>Bla_{DHA}</i>	PCR-STD	DHA-F DHA-R	TGATGGCACAGCAGGATATTC GCTTTGACTCTTTCGGTATTTCG	997

<i>bla</i> _{OXA-48}	qPCR	OXA48_RT_F OXA48_RT_R OXA48_RT_Probe	TCTTAAACGGGCGAACCAAG GCGTCTGTCCATCCCCTTA AGCTTGATCGCCCTCGATTTGG	125
	PCR-STD	OXA48_STD_F OXA48_STD_R	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	744
<i>bla</i> _{NDM}	qPCR	NDM_RT_F NDM_RT_R NDM_RT_Probe	GCGCAACACAGCCTGACTTT CAGCCACCAAAGCGATGTC CAACCGCGCCCAACTTTGGC	155
	qPCR	KPC_RT_F KPC_RT_R KPC_RT_Probe	GATACCACGTTCCGTCTGGA GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC CGCGCGCCGTGACGGAAAGC	180
<i>bla</i> _{VIM}	qPCR	ALLVIM_RT_F ALLVIM_RT_R ALLVIM_RT_Probe	CACAGYGGCMCTTCTCGCGGAGA GCGTACGTYGCCACYCCAGCC AGTCTCCACGCACTT TCATGACGACCGCGTCCGGCG	132
	PCR-STD	QNR-A-F QNR-A-R	GATAAAGTTTTTTCAGCAAGAGG ATCCAGATCGGCAAAGGTTA	543
<i>qnrB</i>	PCR-STD	QNR-B-F QNR-B-R	GACAGAAACAGGTTACCGGT CAAGACGTTCCAGGAGCAACG	469
	qPCR	PE_F1 PE_R1 PE_Probe 1	GCAGCATACTTCTGTGTGGTAC ACAAAGCCGAGATTGTCCGCG GACCGCGACCGCCAATCTTACC	145
<i>mcr-1</i>	PCR-STD	PE_F1 PE_R3	GCAGCATACTTCTGTGTGGTAC TATGCACGCGAAAGAAACTGGC	554
	qPCR	MCR-1_RT_F MCR-1_RT_R MCR-1_RT_Probe	CTGTGCCGTGTATGTTTCAGC TTATCCATCACGCCTTTTGGAG TGACCGCTTGGGTGTGGGTA	151
<i>mcr-3</i>	qPCR	MCR-3_RT_F MCR-3_RT_R MCR-3_RT_Probe	TGAATCACTGGGAGCATTAGGGC TGCTGCAAACACGCCATATCAAC TGCACCGGATGATCAGACCCGT	144
	qPCR	MCR-4_RT_F MCR-4_RT_R MCR-4_RT_Probe	GCCAACCAATGCTCATACCCAAAA CCGCCCCATTCGTGAAAACATAC GCCACGGCGGTGTCTTACCC	112
<i>mcr-5</i>	qPCR	MCR-5_RT_F MCR-5_RT_R MCR-5_RT_Probe	TATCCCAGCAAGCTACCGACGC ACGGGCAAGCACATGATCGGT TGCGACACCACCGATCTGGCCA	126

IV.4.5. Développement d'une qPCR ciblant le gène *mcr-8* et screening pour des souches productrices de ce gène

Les séquences nucléotidiques des variants de gène *mcr* : *mcr-1.1*, *mcr-2.1*, *mcr-3.1*, *mcr-4.1*, *mcr-5.1*, *mcr-6.1*, *mcr-7.1*, *mcr-8.1*, *mcr-8.2*, *mcr-8.4* et *mcr-9* ont été collectées dans la base de données NCBI. À partir de l'alignement nucléotidique de toutes les séquences récupérées, une séquence spécifique aux variants du gène *mcr-8* a été identifiée et des amorces et sonde ont ensuite été conçues à partir de cette séquence en utilisant le logiciel Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>)

disponible en ligne. La spécificité des amorces et de la sonde conçues a d'abord été évaluée par PCR in silico (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) contre tous les variants des gènes *mcr* et également par des analyses BlastN effectuées dans la base de données NCBI. Après désignation des amorces et sonde, un screening des souches productrices du gène *mcr-8* a été réalisé.

IV.4.6. Détermination des groupes phylogénétiques

La détermination des groupes phylogénétiques (A, B1, B2, C, D, E, F et clade I) des souches d'*E. coli*, productrices ou non de BLSE, a été réalisée par la technique de PCR multiplex décrite par Clermont et al. (2013). Toutes les amorces utilisées dans cette technique sont listées dans le **tableau 6**.

Tableau 6. Amorces utilisées pour la détermination des groupes phylogénétiques (Clermont et al., 2013).

Réaction PCR	Gène cible	Amorce	Séquence	Taille de Produit (bp)
Quadruplex	<i>chuA</i>	chuA.1b chuA.2	5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3' 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	288
	<i>yjaA</i>	yjaA.1b yjaA.2b	5'-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3' 5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'	211
	<i>TspE4C2</i>	TspE4C2.1b TspE4C2.2b	5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3' 5'-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3'	152
	<i>arpA</i>	AceK.f ArpA1.r	5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3' 5'-TCTCCCATACCGTACGCTA-3'	400
Group E	<i>arpA</i>	ArpAgpE.f ArpAgpE.r	5'-GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3' 5'-GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG-3'	301
Group C	<i>trpA</i>	trpAgpC.1 trpAgpC.2	5'-AGTTTTATGCCAGTGCGAG-3' 5'-TCTGCGCCGGTCACGCC-3'	219
Contrôle interne	<i>trpA</i>	trpBA.f trpBA.r	5'-CGGCGATAAAGACATCTTAC-3' 5'-GCAACGCGCCTGGCGGAAG-3'	489

IV.4.7. Étude du transfert des gènes de résistance

IV.4.7.1 Conjugaison bactérienne

L'expérience de conjugaison a été réalisée pour toutes les souches productrices de BLSE, de carbapénèmes ainsi pour celles hébergeant des gènes de résistance à la colistine. La technique a été réalisée en utilisant la souche *E. coli* J-53, sensible à tous les antibiotiques et résistante à l'azide de sodium, comme souche réceptrice. Toutes les souches donneuses et la souche réceptrice ont été séparément mises en culture dans du bouillon Tryptone-Soja (TSB) (Oxoid, Wesel, Allemagne) pendant 24h sous agitation. Un mL de chaque souche donneuse est mélangé avec 3 ml de la souche

réceptrice, le mélange est ensuite incubé à 37° C pendant 48 h. La sélection des transconjugants a été faite dans des boîtes de gélose MacConkey (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) additionnées d'azide de sodium (140 µg/ml) et de :

- ✓ Ceftriaxone (4 µg/ml) pour la sélection de transconjugants résistants aux C3G
- ✓ Ertapénème (0.5 µg/ml) pour la sélection de transconjugants résistants à l'ertapénème
- ✓ Colistine (3 µg/ml) pour la sélection de transconjugants résistants à la colistine

Un antibiogramme et une analyse génotypique (qPCR et/ou PCR-STD) ont été réalisés pour tous les transconjugants obtenus après culture pour confirmer le transfert des gènes de résistance.

IV.4.7.2. Typage des plasmides

Tous les transconjugants obtenus dans les expériences de conjugaison ont fait l'objet d'une analyse génotypique par PCR-STD afin de déterminer les groupes d'incompatibilité permettant de caractériser les différents plasmides porteurs de gènes de résistance.

L'ADN total a été amplifié en utilisant des couples d'amorces qui permettent la détection des plasmides suivants : FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, et FIIA (Carattoli et *al.*, 2005). Toutes les amorces utilisées sont listées dans le **tableau 7**.

Les réactions d'amplification ont été déroulées dans les conditions suivantes :

- ✓ 1 cycle de dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min
- ✓ 30 cycles de : Dénaturation à 94°C pendant 1 min, Hybridation à 60°C pendant 30 S, Élongation à 72°C pendant 1 min
- ✓ 1 cycle d'élongation finale à 72 °C pendant 5 min

Tableau 7. Amorces utilisées pour le typage plasmidique (Carattoli *et al.*, 2005).

Gène cible	Amorce	Séquence	Taille de Produit (bp)
<i>parA-parB</i>	HI1-F	5'-GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC-3'	471
	HI1-R	5'-TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA-3'	
iterons	HI2-F	5'-TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC-3'	644
	HI2-R	5'-GGCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'	
<i>RNAI</i>	I1-F	5'-CGAAAGCCGGACGGCAGAA-3'	139
	I1-R	5'-TCGTTCGTTCCGCCAAGTTCGT-3'	
<i>ori y</i>	X-F	5'-AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT-3'	376
	X-R	5'-TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC-3'	
<i>repA,B,C</i>	L/M-F	5'-GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG-3'	785
	L/M-R	5'-CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG-3'	
<i>repA</i>	N-F	5'-GTCTAACGAGCTTACCGAAG-3'	559
	N-R	5'-GTTTCAACTCTGCCAAGTTC-3'	
iterons	FIA-F	5'-CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG-3'	462
	FIA-R	5'-GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG-3'	
<i>repA</i>	FIB-F	5'-GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG-3'	702
	FIB-R	5'-CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT-3'	
<i>repA</i>	W-F	5'-CCTAAGAACAACAAGCCCCCG-3'	242
	W-R	5'-GGTGCGCGGCATAGAACCGT-3'	
<i>repA</i>	Y-F	5'-AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG-3'	765
	Y-R	5'-GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT-3'	
iterons	P-F	5'-CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA-3'	534
	P-R	5'-TCACGCGCCAGGGCGCAGCC-3'	
<i>repA2</i>	FIC-F	5'-GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG-3'	262
	FIC-R	5'-TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT-3'	
<i>repA</i>	A/C-F	5'-GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA-3'	465
	A/C-R	5'-ACGACAAACCTGAATTGCCCTCCTT-3'	
<i>repA</i>	T-F	5'-TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT-3'	750
	T-R	5'-CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC-3'	
<i>repA</i>	FIIS-F	5'-CTGTTCGTAAGCTGATGGC-3'	270
	FIIS-R	5'-CTCTGCCACAAACTTCAGC-3'	
<i>RNAI</i>	K/B-F	5'-GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC-3'	160
	K-R	5'-TCTTTCACGAGCCC GCCAAA-3'	
<i>RNAI</i>	K/B-F	5'-GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC-3'	159
	B/O-R	5'-TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA-3'	

IV.4.8. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des HE a été réalisée par hydrodistillation, en employant, un extracteur de type Clevenger (**Fig. 19**). Le matériel végétal (100 g) est introduit dans un ballon en verre, puis une quantité suffisante d'eau distillée est ajoutée. Le mélange (plante/eau) est porté à ébullition à l'aide d'une chauffe ballon. L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition. Après évaporation, les vapeurs chargées d'HE traversent le tube vertical pour arriver au serpentín de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes d'HE (d'une densité faible) vont s'accumuler à la surface de l'eau. Les HE ainsi obtenues sont récupérées dans des petits flacons opaques et conservées au frigo jusqu'à l'utilisation.

Le rendement (R) en HE est le rapport entre le poids de l'HE obtenu et le poids sec de la plante utilisée. Il est calculé par la formule suivante : $R (\%) = P_{HE} / P_{plante} \times 100$ P : poids.

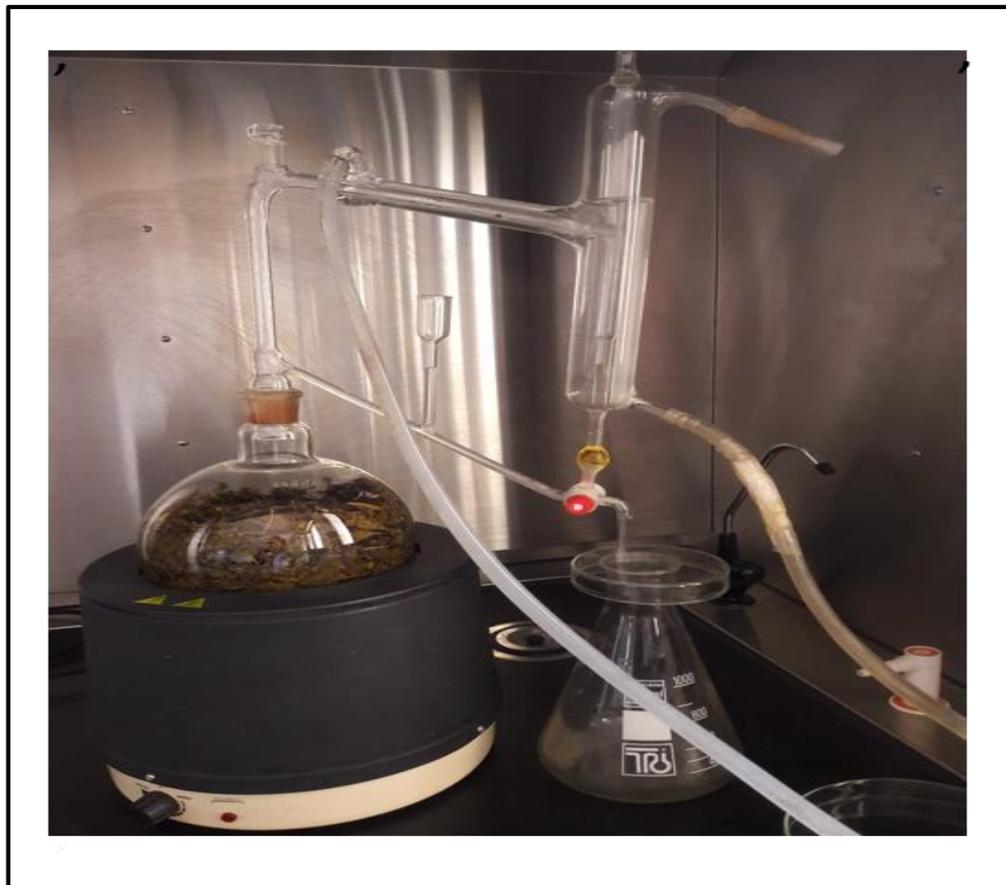


Figure 19. Appareil d'hydrodistillation type Clevenger (Photo prise par Nabti, 2018).

IV.4.9. Analyse chimique des Huiles essentielles

L'analyse chimique des cinq HE a été réalisée par CPG/SM, en utilisant un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890 N, couplé à un spectromètre de masse 5973 N, fonctionnant en mode impact d'électron (EI) à 70 eV. Le gaz chromatographe est équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (5% phénylméthylpolysiloxane, 30 m de longueur, 0.25 mm de diamètre, 0.1 μ m épaisseur du film) (J & W Scientific, Folsom, CA, USA). Le programme de température appliqué pour cette analyse était comme suit : 60 °C pendant 5 min, suivie d'une rampe de 4 °C/min à 220 °C, puis de 11 °C/min jusqu'à 280 °C, maintenu pendant 15 min et enfin 11 °C/min jusqu'à 300 °C, maintenu pendant 5 min. Le gaz vecteur était l'hélium, à un débit de 1,0 ml/min. La température de l'injecteur et de la ligne de transfert était de 280 °C, le volume d'injection était de 2 μ L et le rapport de division de 1:50. Le temps de balayage était de 75 min et la gamme d'acquisition des spectres de masse m/z de 29–400. L'identification des HE reposait sur la comparaison de leurs indices de rétention (IR)

et leurs spectres de masse (SM) avec ceux stockés dans les bibliothèques Adams, FFNSC2 et NIST17 (Adams, 2007; FFNSC 2, 2012; NIST 17, 2017).

IV.4.10. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

IV.4.10.1. Test de diffusion en milieu gélosé

La méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme) a été utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de cinq HE d'*O. glandulosum* contre huit souches d'*E. coli*, dont six souches uropathogènes multirésistantes (*E. coli* 734, 854, 292, 229, 667, 115) et deux souches de référence (*E. coli* ATCC 25922 et *E. coli* J-53). Une suspension bactérienne de 0,5 Mac Farland de chaque souche a été ensemencée sur gélose Muller Hinton (MH) à l'aide d'un écouvillon stérile. Des disques, en papier vierge stérile, de 6 mm de diamètre (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) ont été délicatement déposés sur les géloses MH. Les HE (15 µL) pures et diluées (1/2 et 1/10) dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) ainsi que, carvacrol, thymol, *p*-cymène et γ -terpinène (Sigma-Aldrich, Milan, Italie) (15 µL/14 mg) ont été pipetés sur les disques vierges. Des disques vierges imprégnés de 15 µL DMSO et des disques de gentamycine (15 µg) (SIRScan Discs, i2a, Montpellier, France) ont été utilisés comme témoins négatifs et positifs respectivement. Toutes les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 18-24 h et les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés. D'après, Ponce et *al.* (2003), la sensibilité des bactéries peut être classée comme suit : non sensible (diamètre <8 mm), sensible (diamètre de 9-14 mm), très sensible (diamètre de 15-19 mm) et extrêmement sensible (diamètre >20 mm).

IV.4.10.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) ont été déterminées dans des plaques à 96 puits (alignés en 8 rangées x 12 colonnes) (**Fig. 20**). Pour chaque HE, 10 concentrations ont été testées (70, 35, 17.5, 8.75, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL) (les colonnes de 12 à 3, respectivement) (**Fig. 20**). Un volume de 90 µL de milieu MH liquide est distribué dans chaque puits. Le même volume d'HE (90 µL) d'une concentration de 140 mg/mL est ajouté dans chaque puits de la colonne 12, pour avoir une concentration finale en HE de 70 mg/mL. Une série de dilution d'HE est ensuite préparée de colonne en colonne (**Fig. 20**). Pour chaque souche bactérienne testée, une suspension de 0,5 Mac Farland a été préparée. Cinq µL de la suspension sont mélangés avec 495 µL de milieu MH liquide. Dix µL de ce mélange sont ensuite déposés dans tous les puits. Un contrôle négatif (bouillon MH + DMSO) et un contrôle positif (bouillon MH + suspension bactérienne sans HE) ont été préparés pour chaque plaque, dans

les colonnes 1 et 2 respectivement. Une souche d'*E. coli* est testée par rangée (au total 8 souches ont été testées dans les 8 rangées de A à H). Les plaques ont été incubées pendant une nuit à 37 °C. Un révélateur de croissance (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) est utilisé pour faciliter la lecture des résultats. Les valeurs de CMI correspondaient au premier puits de chaque rangée où aucune croissance bactérienne visible n'a été détectée.

La CMB a été déterminée à partir des puits de chaque rangée qui n'ont montré aucune croissance visible après incubation. Pour cela, 10 µL à partir de chacun de ces puits ont été ensemencés sur des boîtes de gélose MacConkey (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Après une nuit d'incubation à 37 °C, la croissance bactérienne a été vérifiée. Les valeurs de CMB représentent les concentrations où aucune colonie bactérienne n'a été trouvée.

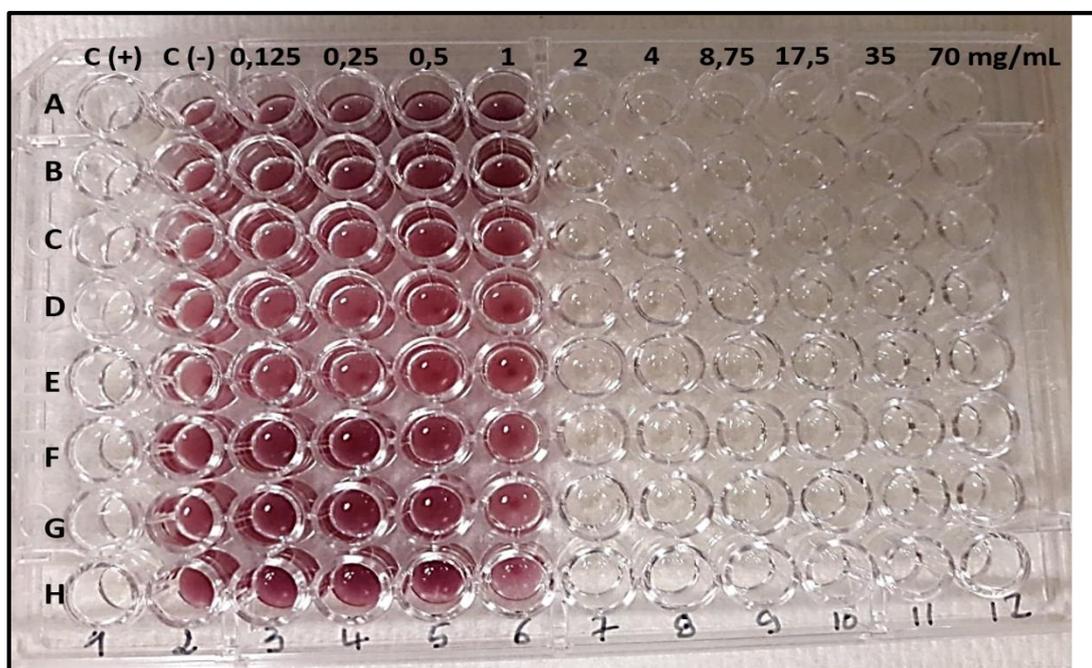


Figure 20. Plaque à 96 puits utilisée pour la détermination des CMI et CMB.

IV.4.11. Analyse statistique

Le test du khi carré (χ^2) et le test exact de Fisher ont été utilisés pour analyser les facteurs de risque (sexe, origine du prélèvement et utilisation antérieure d'antibiotiques), et un modèle de régression logistique multinomial a été utilisé pour l'âge. Les analyses ont été effectuées avec le logiciel IBM SPSS V24 pour Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative. Les tests de l'activité antibactérienne des HE ont été réalisés en duplicata. Les résultats de ces tests sont exprimés en moyenne \pm SD.

CHAPITRE V
RÉSULTATS ET DISCUSSION

V. Résultats et Discussions

V.1. Répartition des souches isolées d'infection urinaire

V.1.1. Répartition des souches isolées selon l'espèce bactérienne

Durant la période d'étude, 426 souches bactériennes ont été isolées à partir de 3 944 prélèvements d'urine reçus au laboratoire de microbiologie du CHU de Sétif, ce qui représente un pourcentage de positivité de 10.8 %.

La famille des entérobactéries (n = 363, 85.2 %) était le groupe prédominant (**Fig. 21**). Elle a été représentée par huit espèces, principalement, *Escherichia coli* (n = 215), *Klebsiella pneumoniae* (n = 87) et *Proteus mirabilis* (n = 42) (**Fig. 22**).

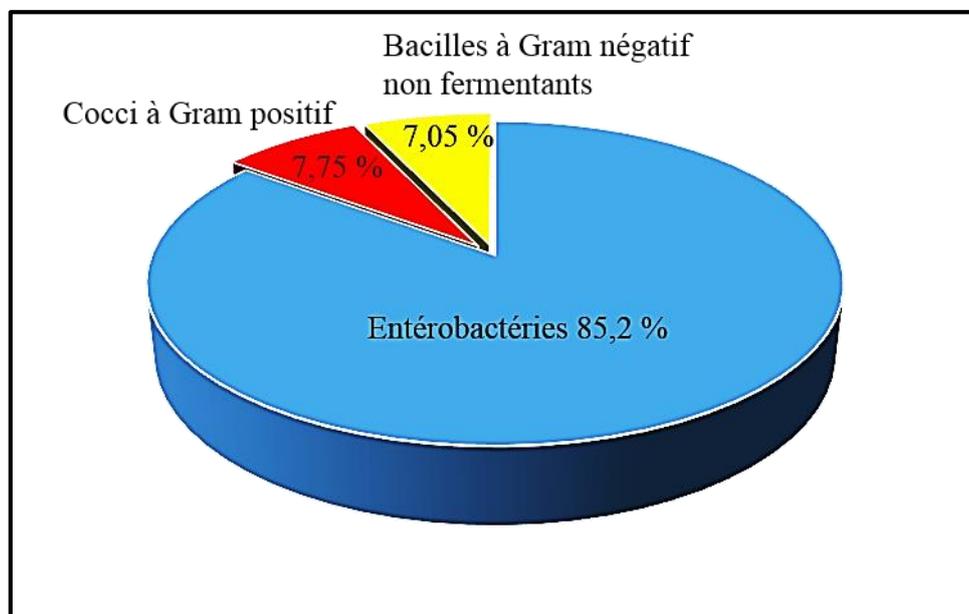


Figure 21 : Pourcentage (%) d'isolement des grands groupes de bactéries.

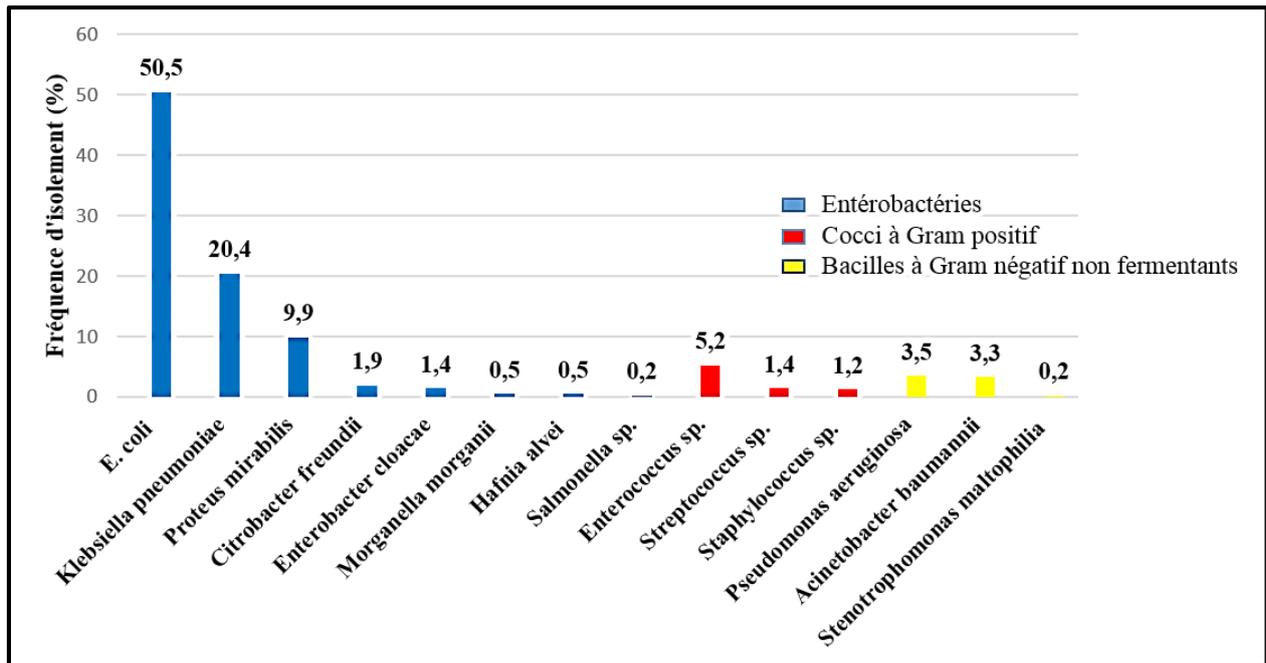


Figure 22 : Fréquence d'isolement (%) des différentes espèces responsables d'infection urinaire.

Conformément à d'autres études précédentes (Farrell *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2012; Magliano *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2014; Alanazi *et al.*, 2018), *E. coli* a été le germe le plus fréquemment isolé dans notre étude parmi toutes les entérobactéries. Cette espèce, dominante de la flore intestinale et, qui se trouve souvent parmi la flore des derniers centimètres de l'urètre distal, peut atteindre facilement, par la voie ascendante, le reste de l'appareil urinaire, en induisant ainsi, une IU (Bruyère *et al.*, 2008).

V.1.2. Répartition des souches d'*E. coli*

V.1.2.1. En fonction du sexe

Les 215 souches d'*E. coli* étaient isolées chez 162 patients de sexe féminin avec un pourcentage de 75.35 % et un âge moyen \pm SD de 34 ± 21.4 ans, et chez 53 patients de sexe masculin avec un pourcentage de 24.65 % et un âge moyen de 47 ± 21.3 ans. Le sexe ratio H/F est de 0.33.

Plus de 75 % des souches sont isolées chez les patients de sexe féminin. Les IU sont plus fréquentes chez la femme que chez l'homme. Environ 50 % des femmes connaîtront au moins un épisode d'UI au cours de leur vie. (Foxman, 2003). Un bon nombre de facteurs de risque, tels que la grossesse, la ménopause, la taille réduite de l'urètre féminin et sa proximité de l'anus, contribuent à la haute prévalence des IU chez la femme (Minardi *et al.*, 2011).

V.1.2.2. Selon la tranche d'âge

La répartition des souches d'*E. coli* selon de la tranche d'âge est résumée dans le **tableau 8**.

Tableau 8. Répartition des souches d'*E. coli* en fonction de la tranche d'âge.

Tranche d'âge (année)	Nombre de souches (%)
< 15	44 (20.5)
15 à < 60	135 (62.8)
≥ 60	36 (16.7)

Plus de 60 % des souches d'*E. coli* ont été enregistrées chez le groupe des patients ayant un âge entre 15 et < 60 ans. La grande majorité des patients appartenant à ce groupe était des femmes avec un taux de 85.9 % et un âge moyen de 35 ans.

Un pourcentage de 20.5 % de souches a été trouvé chez des patients de moins de 15 ans, dont 66 % (29 souches) appartenait au sexe féminin et 34 % (15 souches) au sexe masculin.

Enfin, pour les personnes de 60 ans ou plus, 18 (50 %) souches d'*E. coli* ont été enregistrées chez les sujets de sexe féminin.

Conformément à d'autres études précédentes (Foxman, 2003; Ulleryd, 2003; Rowe et Juthani-Mehta, 2014), la prévalence de l'IU est plus élevée chez les femmes que chez les hommes, dans presque tous les groupes d'âge. L'IU est plus fréquente chez les jeunes femmes sexuellement actives, habituellement entre 18 et 39 ans (Medina et Castillo-Pino, 2019). D'après l'étude de Foxman et al. (2000), plus de 10 % des femmes de plus de 65 ans ont déclaré avoir eu une infection urinaire au cours des 12 derniers mois. Ce chiffre passe à près de 30 % chez les femmes de plus de 85 ans (Eriksson et al., 2009).

Enfin, pour les personnes de plus de 60 ans un taux égale de souches a été enregistré entre les deux sexes. Cette augmentation enregistrée chez le sexe masculin, peut être expliquée par la haute fréquence des anomalies urologiques et de l'instrumentation comme le sondage urinaire chez cette catégorie de personnes.

V.1.2.3. Selon l'origine de l'isolat

Sur l'ensemble des souches d'*E. coli*, 114 (53 %) étaient isolées chez des patients externes et 101 (47 %) chez les patients hospitalisés dans les différents services du CHU. La répartition des souches selon le service d'hospitalisation est rapportée dans la **figure 23**.

La fréquence *E. coli* dans les IU est plus importante en pratique de ville qu'en milieu hospitalier. Concernant les souches hospitalières, plus de 40 % ont été isolées de prélèvements de patients du service des maladies infectieuses. Généralement, ces patients consultent pour une IU et sont hospitalisés quand ils présentent des facteurs de risque de complication comme la grossesse, le sexe masculin, l'immunodépression grave, l'âge avancé et/ou une anomalie de l'arbre urinaire : résidu vésical, reflux, lithiase ou corps étranger dans les voies urinaires. Ceci nous conduit à dire que la majorité de nos souches sont d'origine externe. Cependant certaines données manquent comme l'hospitalisation antérieure et donc nous ne pouvons pas confirmer avec certitude le caractère communautaire ou nosocomial des souches.

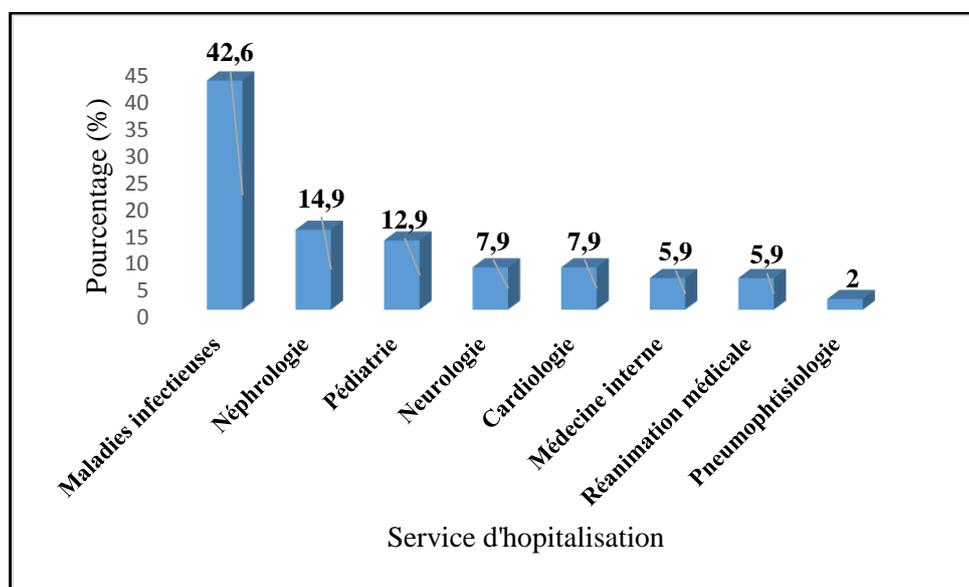


Figure 23. Répartition des souches d'*E. coli* selon le service d'hospitalisation.

V.2. Résistance des souches d'*E. coli* aux antibiotiques

V.2.1. Résistance aux β -lactamines

V.2.1.1. Phénotypes de résistance aux β -lactamines

L'analyse des profils de résistance aux β -lactamines des 215 souches cliniques d'*E. coli* ont permis de déterminer 37 (17.2 %) souches productrices de BLSE (EC-BLSE) (**Fig. 24**). Parmi ces souches, 27 (73 %) ont été isolées chez les patients hospitalisés et 10 (27 %) chez les patients externes. Les fréquences des EC-BLSE chez les patients hospitalisés et externes étaient de 26.7 % et 8.8 % respectivement.

Sur l'ensemble des EC-BLSE, trois souches ont présenté également un phénotype de type céphalosporinase (**Fig. 25 et 26**). L'hyperproduction de céphalosporinase (CASE) comme seul mécanisme de résistance a été observée chez une seule souche (*E. coli* 907) (**Fig. 27**).

Toutes les 215 souches étaient sensibles à l'imipénème et une seule souche, en même temps productrice de BLSE et de CASE (*E. coli* 667), était résistante à l'ertapénème. Sa CMI par E-test était de 0.5 µg/mL (**Fig. 28**).

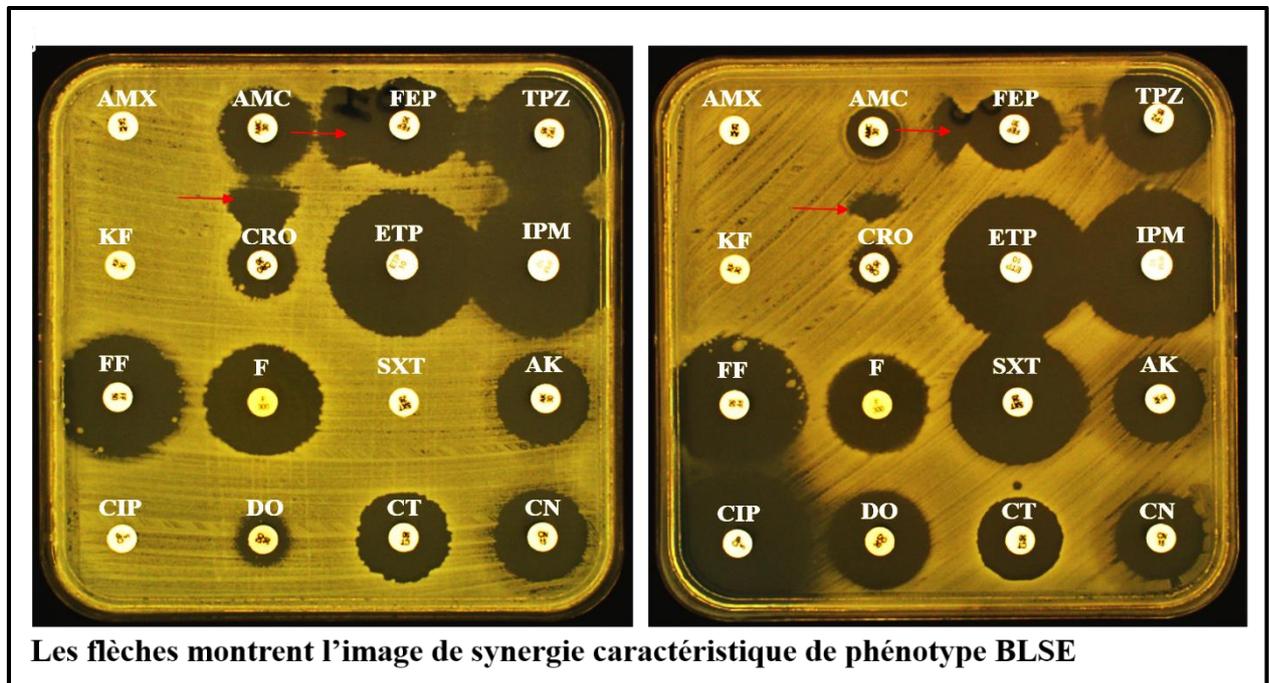


Figure 24. Antibiogramme de souches productrices de BLSE. AMX : amoxicilline, AMC : amoxicilline + acide clavulanique, KF : céfalexine, CRO : ceftriaxone, FEP : céfépime, TPZ : pipéracilline-tazobactam, IPM : imipénème, ETP : ertapénème, AK : amikacine, CN : gentamicine, CIP : ciprofloxacine, FF : fosfomycine, F : nitrofurantoïne, DO : doxycycline, SXT : triméthoprime-sulfaméthoxazole et CT : colistine.

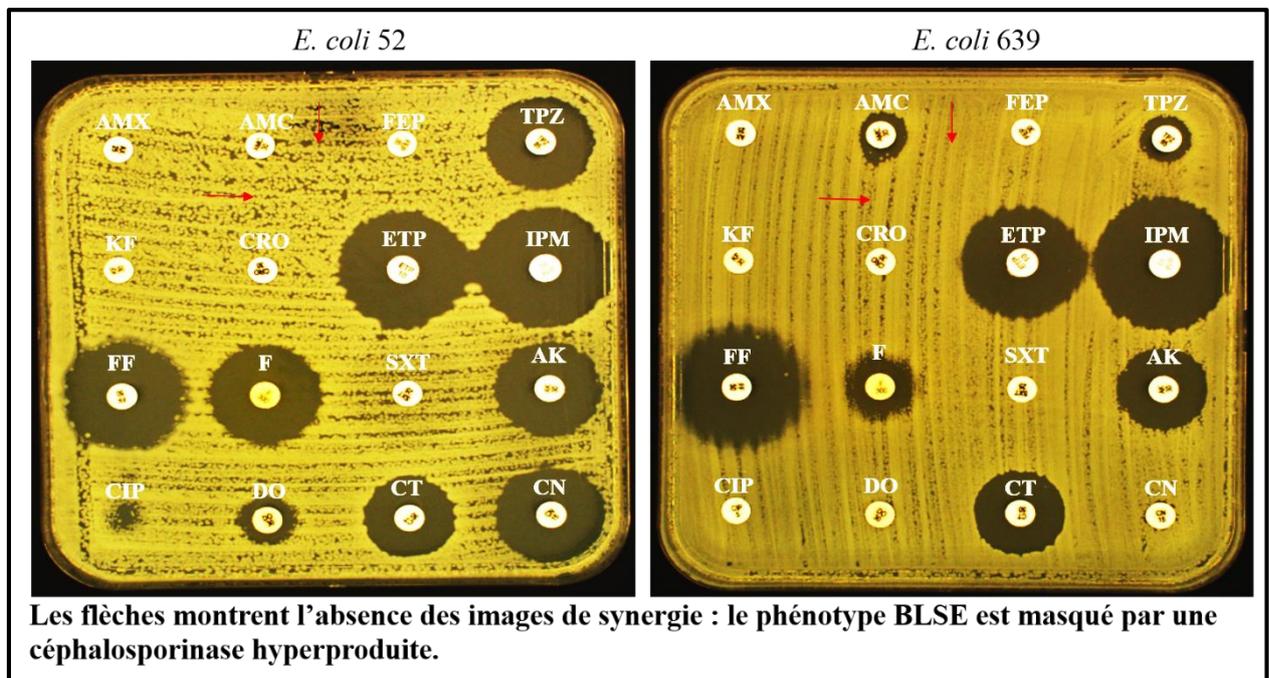


Figure 25. Phénotype BLSE masqué par phénotype HCASE. AMX : amoxicilline, AMC : amoxicilline + acide clavulanique, KF : céfalexine, CRO : ceftriaxone, FEP : céfépime, TPZ : pipéracilline-tazobactam, IPM : imipénème, ETP : ertapénème, AK : amikacine, CN : gentamicine, CIP : ciprofloxacine, FF : fosfomycine, F : nitrofurantoïne, DO : doxycycline, SXT : triméthoprime-sulfaméthoxazole et CT : colistine.

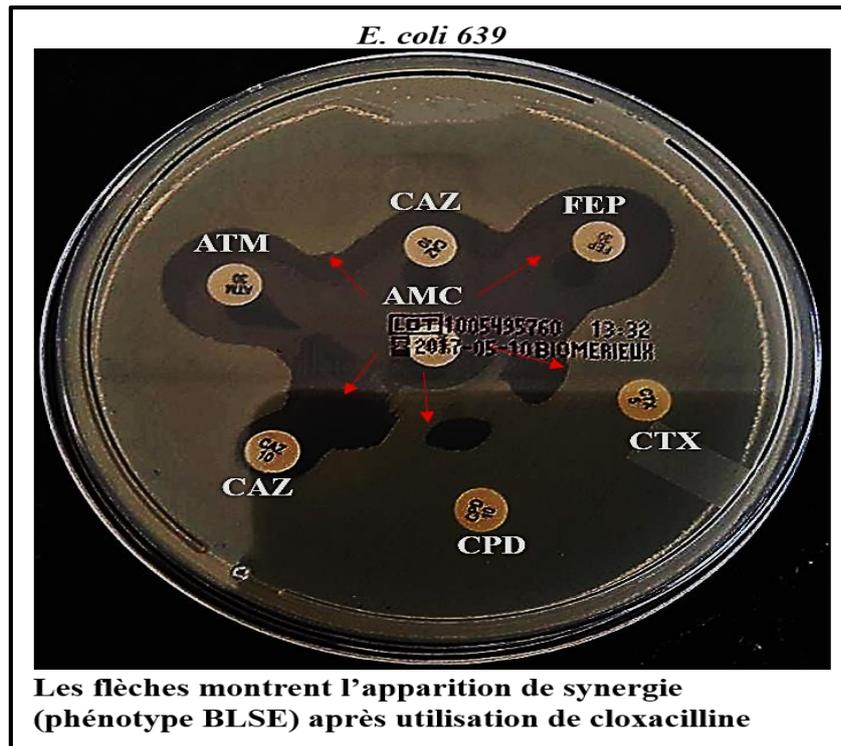


Figure 26. Test de synergie dans un milieu MH additionné de cloxacilline à 240 µg/mL pour une souche présentant les phénotypes BLSE + HCASE.
 AMC : amoxicilline + acide clavulanique, CTX : céfotaxime, CPD : cefpodoxime
 CAZ : ceftazidime, FEP : céfépime, ATM : aztréonam.

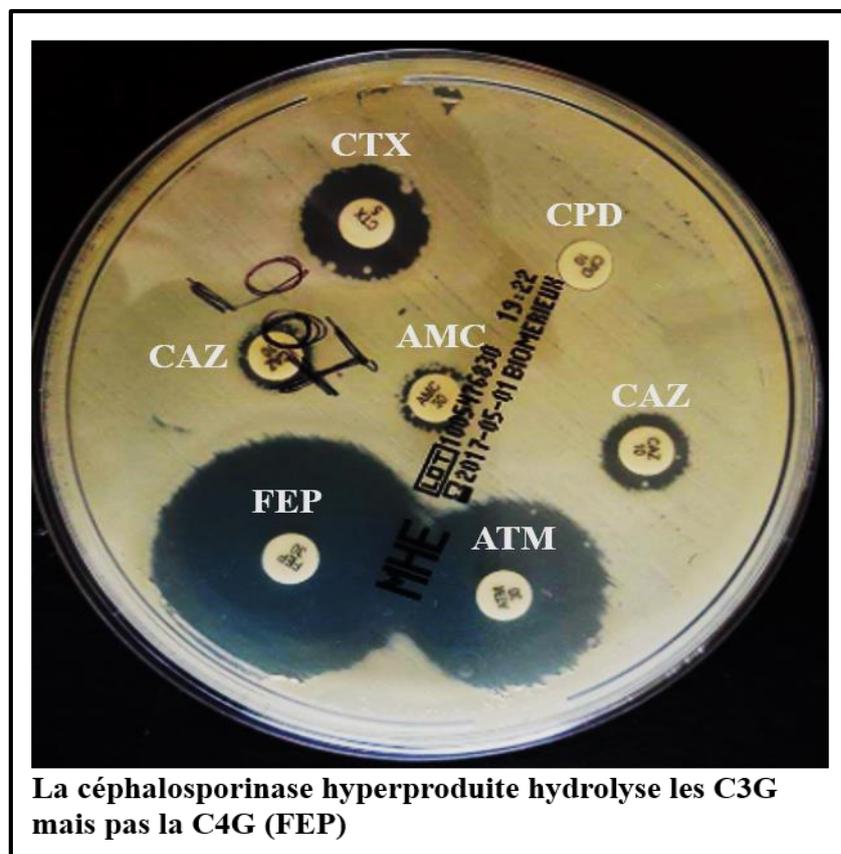


Figure 27. Phénotype HCASE. AMC : amoxicilline + acide clavulanique, CTX : céfotaxime, CPD : cefpodoxime CAZ : ceftazidime, FEP : céfépime, ATM : aztréonam.

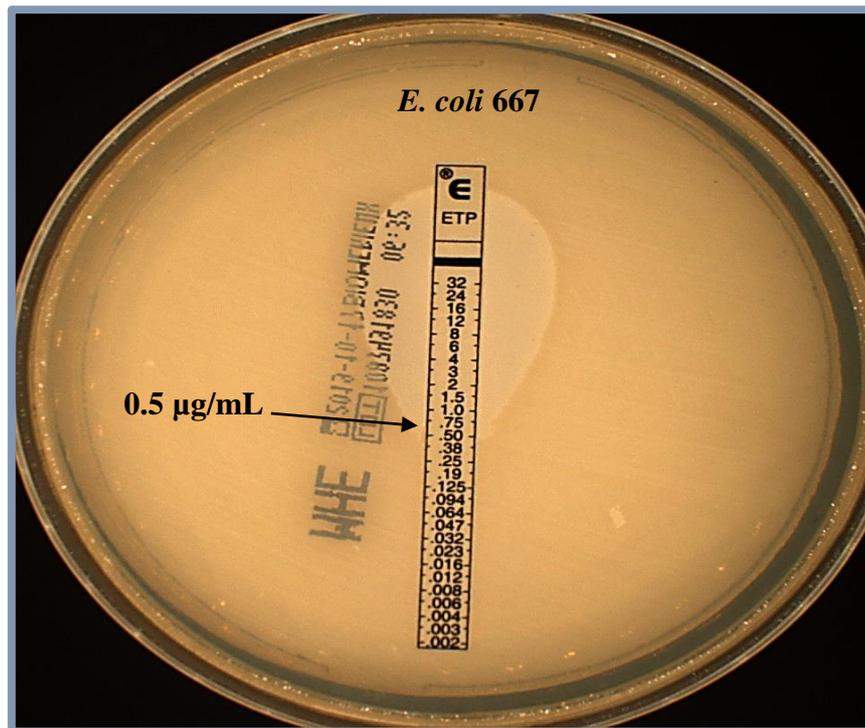


Figure 28. CMI par E-test à l'ertapénème de la souche *E. coli* 667.

À Madagascar, en 2017, Rakotovao-Ravahatra et *al.* ont rapporté un taux global de 22.5 % d'EC-BLSE dans les IU, taux supérieur au nôtre (17.2 %).

Zenati et *al.* ont trouvé un taux de 32.5 % d'EC-BLSE dans les IU chez les patients hospitalisés à l'hôpital universitaire de Tlemcen en 2019. En Jordanie, dans l'étude d'Al-Jamei et *al.* en 2019, ce taux a été de 62 % chez les patients hospitalisés. Ces taux sont supérieurs à celui de notre étude (26.7 %), ce qui peut être expliqué par l'origine communautaire de la majorité de nos souches.

Dans l'étude d'Alem et *al.* au CHU de Rabat au Maroc en 2015, le taux d'EC-BLSE dans les IU a été de 6.1 % avec des taux de 11.9 % et de 2.3 % chez les patients hospitalisés et les patients externes respectivement.

D'une manière générale, la prévalence des EC-BLSE varie selon les régions et les institutions. Elle varie aussi considérablement d'un pays à un autre. Cette disparité sur le plan géographique peut s'expliquer par la variabilité des facteurs épidémiologiques, des stratégies relatives à l'utilisation des agents antimicrobiens et des mesures d'hygiène hospitalière entre les différents établissements et pays (Mkaouar et *al.*, 2008).

Nous avons enregistré un faible taux d'*E. coli* productrice de céphalosporinase plasmidique (1.9 %). Iabadene et *al.* ont rapporté en 2009, dans trois hôpitaux d'Alger, un taux de 2.18 % d'entérobactéries cliniques productrices de céphalosporinase. Dans l'étude de Zenati et *al.* (2019), le pourcentage de souches productrices de céphalosporinase plasmidique a été de 2.4 % dans les

E. coli uropathogènes. Ces résultats sont proches des nôtres. D'autres études algériennes n'ont rapporté aucune souche productrice de céphalosporinases plasmidiques dans les *E. coli* uropathogènes (Yahiaoui et al., 2015).

Dans notre étude, une seule souche EC-BLSE (*E. coli* 667) était résistante à l'ertapénème. Un résultat similaire a été rapporté par Agabou et al. en 2014 à l'hôpital militaire de Constantine. Malgré le faible taux de résistance, cela représente un sérieux problème dans la mesure où ces antimicrobiens sont souvent considérés comme des antibiotiques de dernier recours et sont réservés pour le traitement des infections à bactéries multirésistantes, en particulier les entérobactéries productrices de BLSE (Gauzit et al., 2010).

V.2.1.2. Facteurs de risque liés à la production de BLSE

L'étude des facteurs de risque pouvant être liés à la production de BLSE est rapportée dans le **tableau 9** :

Tableau 9. Caractéristiques de la population étudiée, divisée selon la production ou non de bêta-lactamases à spectre étendu.

Facteurs	BLSE-positive n (%) (n= 37)	BLSE-négative n (%) (n= 178)	Odds ratio (95% CI)	p-valeur
Age (année)				
<15	9 (20.5)	35 (79.5)	1	0.042
15 à <60	17 (12.6)	118 (87.4)	0.56 (0.23–1.37)	
≥60	11 (30.6)	25 (69.4)	1.71 (0.62–4.74)	
Sexe				
Homme	12 (32,4)	41 (23.0)	1.6 (0.74–3.47)	0.227
Femme	25 (67.6)	137 (77.0)		
Origine de l'isolat				
Patients hospitalisés	27 (73)	74 (41,6)	3.79 (1.73–8.31)	<0.0001
Patients externes	10 (27)	104 (58,4)		
Utilisation antérieure d'antibiotiques (3 derniers mois)	26 (70.3)	66 (37.1)	4.011 (1.86–8.64)	<0.0001

IC : intervalle de confiance, BLSE : β-lactamases à spectre étendu, n : nombre

Nous n'avons pas retrouvé de différence statistiquement significative entre les taux d'EC-BLSE et le sexe ($p = 0.227$).

Inversement, la prévalence des EC-BLSE est significativement plus élevée, aussi bien, chez les sujets âgés de 60 ans ou plus par rapport aux sujets plus jeunes (odds ratio [OR] : 1.71, $p = 0.042$), que chez les patients hospitalisés par rapport aux patients externes (OR: 3.79, $p < 0.0001$), ainsi

que, chez les patients déclarant une utilisation antérieure d'antibiotiques par rapport aux non utilisateurs (OR: 4.011, $p < 0.0001$).

L'identification des facteurs de risque de la résistance aux antibiotiques concourt à mieux comprendre l'épidémiologie des infections et permet d'instaurer des mesures adéquates pour lutter contre cette résistance.

La grande prévalence des EC-BLSE enregistrée chez les patients de 60 ans ou plus ($p = 0,042$) est en accord avec des études précédentes (Khanfar et al., 2009; Koksall et al., 2019). Dans notre étude, 91 % de ces patients (≥ 60 ans) ont été hospitalisés. Le traitement et sur-traitement des IU chez les patients âgés représentent une part importante des prescriptions d'antibiotiques, ce qui favorise la prolifération des bactéries résistantes dans ce groupe (Cortes-Penfield et al., 2017). En outre, les patients âgés présentent plus de maladies sous-jacentes, ce qui constitue un facteur de risque supplémentaire pour l'infection par un germe producteur de BLSE (Colodner et al., 2004).

Le taux d'EC-BLSE a été significativement plus élevé chez les patients hospitalisés *versus* patients externes ($p < 0,0001$), ce qui est en accord avec des travaux précédents (Khanfar et al., 2009; Lee et al., 2010; Gholipour et al., 2014). Les patients hospitalisés sont plus exposés à une forte pression de sélection des antibiotiques et/ou à la transmission croisée de bactéries résistantes.

D'autre part, l'utilisation d'antibiotiques au cours des trois derniers mois a été identifiée comme un facteur de risque majeur pour le développement d'une infection par une EC-BLSE, comme cela avait été rapporté précédemment (Colodner et al., 2004; Calbo et al., 2006; Azap et al., 2010; Koksall et al., 2019). L'utilisation inappropriée ou excessive d'antibiotiques joue un rôle majeur dans la diffusion des souches productrices de BLSE. Ce problème pourrait être résolu ou limité par l'introduction de politiques visant à restreindre de manière drastique les traitements antibiotiques inappropriés, aussi bien, à l'hôpital qu'en ville, c'est-à-dire à une utilisation rationnelle des antibiotiques.

V.2.2. Résistances à l'ensemble des antibiotiques

Nous rapportons dans le **tableau 10** les pourcentages de résistance aux antibiotiques du total des souches d'*E. coli*, des souches d'EC-BLSE et des souches d'EC-non-BLSE.

Tableau 10. Pourcentages de résistance aux antibiotiques testés.

Antibiotiques	Taux de résistance		
	EC-BLSE n (%) (n = 37)	EC-non-BLSE n (%) (n = 178)	Total n (%)
amoxicilline	37 (100)	134 (75.3)	171 (79.5)
amoxicilline-acide clavulanique	34 (91.9)	120 (67.4)	154 (71.6)
ticarcilline	37 (100)	133 (74.7)	170 (79.1)
mécillinam	1 (2.7)	0 (0)	1 (0.5)
céfoxitine	7 (18.9)	2 (1.1)	9 (4.2)
céfalexine	37 (100)	22 (12.4)	59 (27.4)
cefprozoxime	37 (100)	6 (3.4)	43 (20)
céfotaxime	37 (100)	1 (0.6)	38 (17.7)
ceftazidime	37 (100)	1 (0.6)	38 (17.7)
ceftriaxone	37 (100)	1 (0.6)	38 (17.7)
céfépime	37 (100)	0 (0)	37 (17.2)
imipénème	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ertapénème	1 (2.7)	0 (0)	1 (0.5)
gentamicine	19 (51.4)	11 (6.2)	30 (14)
amikacine	1 (2.7)	0 (0)	1 (0.5)
acide nalidixique	28 (75.7)	45 (25.3)	73 (34)
ciprofloxacine	27 (73)	30 (16.9)	57 (26.5)
triméthoprim-sulfaméthoxazole	24 (64.9)	74 (41.6)	98 (45.6)
fosfomycine	0 (0)	0 (0)	0 (0)
colistine	0 (0)	1 (0.6)	1 (0.5)
nitrofurantoïne	2 (5.4)	4 (2.3)	6 (2.8)

n : nombre

D'une manière générale, nos souches d'*E. coli* ont montré des taux de résistance élevés à : amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique et ticarcilline mais également des taux de résistance non négligeables à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine. Ceci rend difficile l'utilisation de ces antibiotiques en empirique et le recours à l'antibiogramme s'avère indispensable pour une antibiothérapie adéquate.

Les résistances aux quinolones sont préoccupantes car l'accumulation de la résistance à ces antibiotiques augmente progressivement de pallier en pallier, ces antibiotiques doivent être réservés pour les infections graves à bactéries multirésistantes aux autres antibiotiques. Des résistances proches des nôtres ont été rapportées dans l'étude de Yahiaoui et *al.*, (2015), avec des taux de résistance à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine de 34.7 % et 22.7 % respectivement.

Les antibiotiques ayant montré une bonne activité sur les EC-non-BLSE et également sur les EC-BLSE ont été l'amikacine, la fosfomycine et le nitrofurantoïne avec des taux de résistance de l'ordre de 0.5 %, 0 % et 2.8 % respectivement.

Pour la colistine, 1 seule souche (*E. coli* 115) appartenant au groupe des EC-non-BLSE était phénotypiquement résistante : diamètre de la zone d'inhibition <15 mm et CMI par microdilution de 4 µg/mL (**Fig. 29**). Cela attire l'attention vu le regain d'intérêt pour cet antibiotique dans le traitement des infections à bactéries multirésistantes.

Les taux de résistance aux antibiotiques, autres que les β-lactamines, des souches d'EC-BLSE ont été plus élevés que ceux des souches d'EC-non-BLSE. Les EC-BLSE (n = 37) ont été plus fréquemment résistantes aux quinolones (75.7 % et 73 % pour l'acide nalidixique et la ciprofloxacine respectivement), au triméthoprim-sulfaméthoxazole (64.9 %) et à la gentamicine (51.4 %).

L'expression de résistances croisées aux aminosides et/ou à triméthoprim-sulfaméthoxazole et/ou aux quinolones, par les souches d'EC-BLSE, a déjà été rapportée dans plusieurs études précédentes (Paterson et Bonomo, 2005; Canton et Ruiz-Garbajosa 2011, Zurfluh et *al.*, 2014; Pereira et *al.*, 2019). Cela s'explique par le fait que la plupart des plasmides porteurs de gènes codant pour les BLSE sont souvent porteurs de gènes de résistance aux aminosides et/ou au triméthoprim-sulfaméthoxazole et/ou aux quinolones (Paterson et Bonomo, 2005; Basu et Mukherjee, 2018; Niero et *al.*, 2018). Notant aussi, que même en l'absence de plasmide codant pour une diminution de la sensibilité aux quinolones, il existe une forte association entre résistance aux quinolones et production de BLSE (Brisse et *al.*, 2000; Paterson et *al.*, 2000; Lautenbach et *al.*, 2001). La raison de cette association reste encore mal comprise (Paterson et Bonomo, 2005).

Même vis-à-vis des EC-BLSE, une très bonne activité a été enregistrée pour la colistine, l'amikacine, la fosfomycine et la nitrofurantoïne, en accord avec des études précédentes, nationales (Agabou et *al.*, 2014; Yahiaoui et *al.* 2015) et internationales (Marchese et *al.*, 2003; Falagas et *al.*, 2010; Cho et *al.*, 2015; Rossignol et *al.*, 2017; Seitz et *al.*, 2017). La rare utilisation de ces antibiotiques en milieu hospitalier comme en pratique de ville, pourrait expliquer la conservation de leur activité. Ces antibiotiques peuvent constituer des options appropriées pour le traitement des IU causées par des souches multirésistantes.

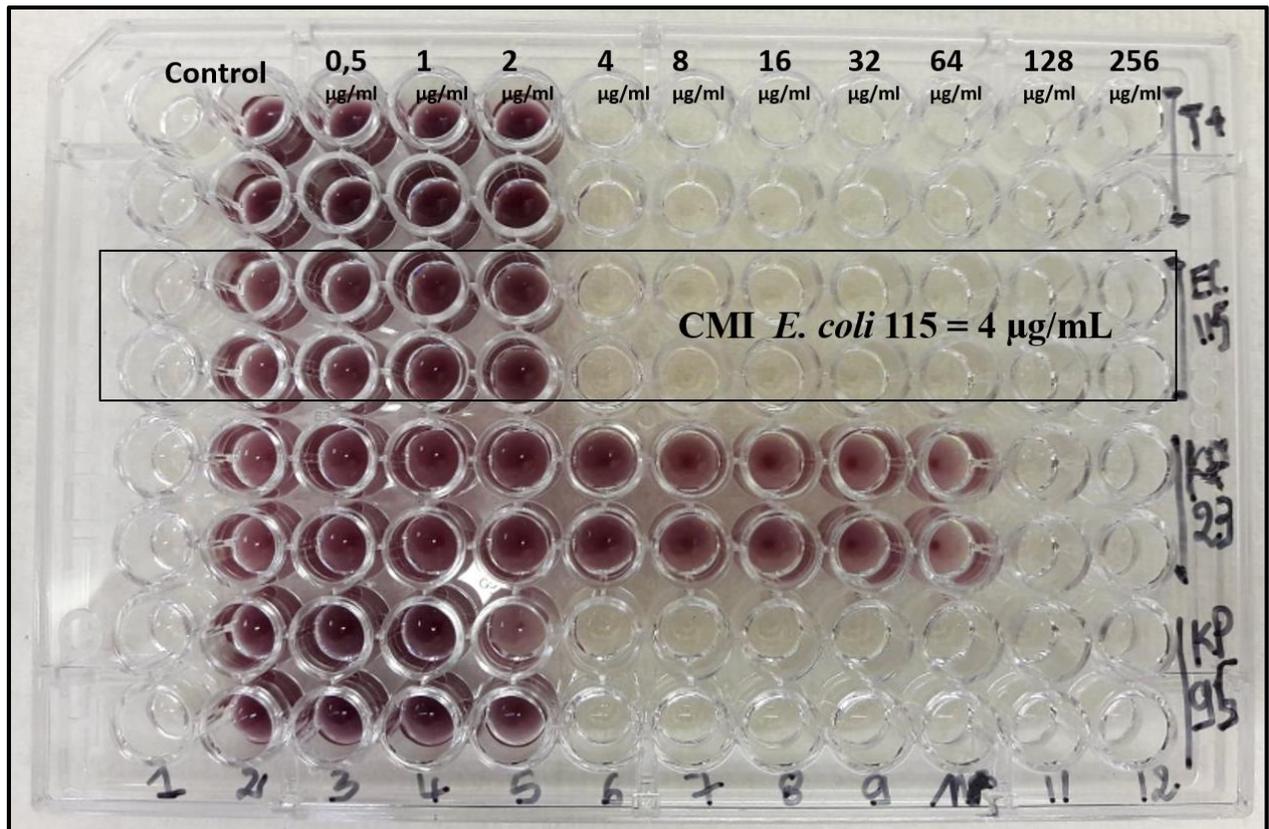


Figure 29. Détermination de la CMI de la colistine par microdilution.

V.3. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance aux antibiotiques

V.3.1. Gènes de résistance aux β -lactamines

Les résultats de la recherche des gènes de résistance aux β -lactamines par qPCR et PCR-STD sont illustrés dans les **figures 30** et **31** respectivement.

Dans le **tableau 11**, sont rapportés les résultats du séquençage des gènes de résistance aux β -lactamines et aussi de ceux de la résistance aux aminosides, aux quinolones et à la colistine.

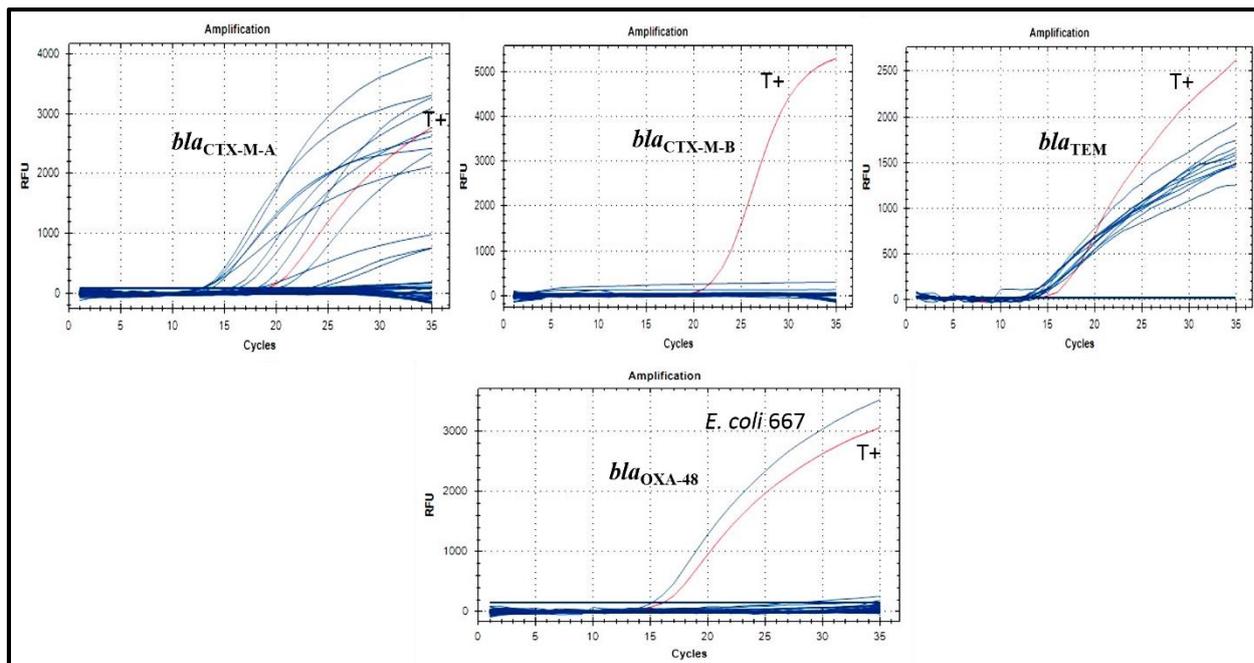


Figure 30. Résultats de la recherche des gènes de résistance aux β -lactamines par PCR quantitative.

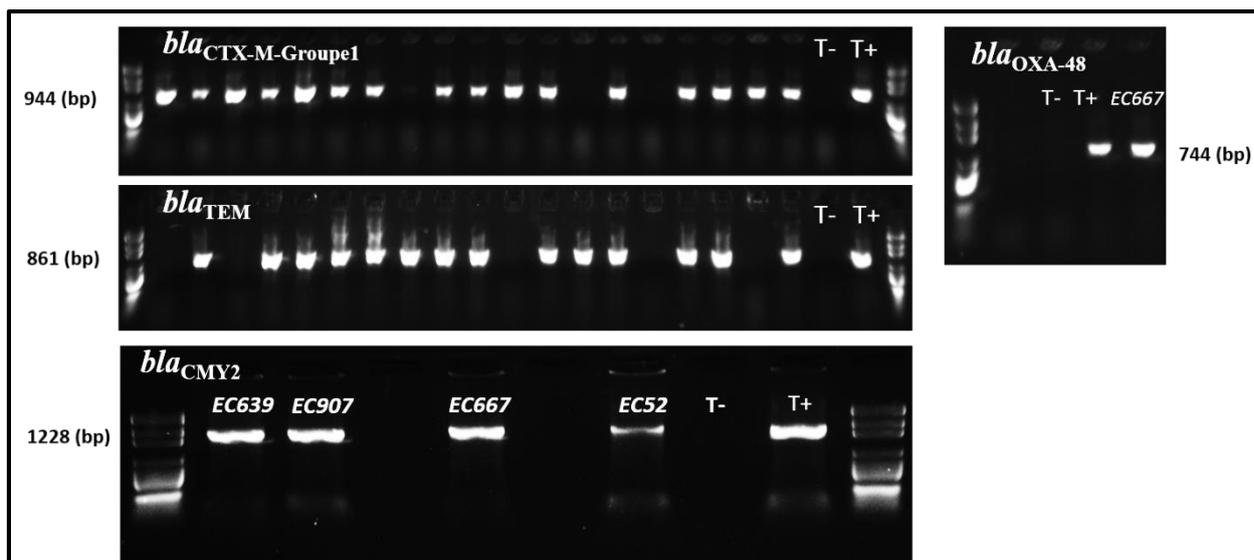


Figure 31. Détection des gènes de résistance aux β -lactamines par PCR standard.

Tableau 11. Gènes de résistance aux antibiotiques de 39 souches d'*E. coli* isolées de patients hospitalisés et externes.

Patients hospitalisés (n = 28)						Patients externes (n = 11)				
Isolat	Type BLSE	Type AmpC et/ou Carbapénémase	Autres β-lactamases	Gènes de R aux aminosides et/ou quinolones	Gènes de R à la Colistine	Isolat	Type BLSE	Type AmpC et/ou Carba	Autres β-lactamases	Gènes de R aux aminosides et/ou quinolones
EC 16 p	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	-	-	EC 627	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>
EC 275	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	-	EC 690	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	-
EC 529	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	-	-	EC 57	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>
EC 660	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	-	-	EC 178	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>
EC 827	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	-	EC 710	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>bla</i> _{TEM-1}	-
EC 194	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> , <i>qnrB</i>	-	EC 854	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>
EC 357	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	-	-	EC 69 p	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	-	<i>bla</i> _{TEM-1}	-
EC 409 p	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	-	EC 856	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>
EC 410	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>Bla</i> _{OXA-1}	-	-	EC 907	-	<i>Bla</i> _{CMY-2}	-	-
EC 482	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	-	EC 06	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>
EC 550	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	-	-	EC 265	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	-
EC 733	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	-					
EC 734	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	-	-	-	-					
EC 873	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	-	-					
EC 52	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>Bla</i> _{CMY-2}	<i>bla</i> _{TEM-1}	-	-					
EC 282	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	-					
EC 292	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	-					
EC 451	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aadA1</i> , <i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i> , <i>qnrB</i>	-					
EC 612	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	-	-					
EC 622	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>bla</i> _{TEM-1}	-	-					
EC 639	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>Bla</i> _{CMY-2}	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	-					
EC 667	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>Bla</i> _{CMY-2} , <i>Bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	-					
EC 149	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	-					
EC 153	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>Bla</i> _{OXA-1}	-	-					
EC 271	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	-	-					
EC 181	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	-	-					
EC 300	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>Bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	-					
EC 115	-	-	ND	-	<i>mcr-1</i>					

R : Résistance, Carba : carbapénémase, ND : Non déterminé.

Les résultats de la qPCR, de la PCR-STD et du séquençage ont révélé que sur l'ensemble des 215 souches d'*E. coli*, 37 (17.2 %) portaient des gènes codant pour des BLSE de type CTX-M. Dans ce groupe, 33 (89.2 %) souches produisaient des enzymes CTX-M du groupe 1 et portaient le gène *bla*_{CTX-M-15}, tandis que 4 (10.8 %) souches produisaient des CTX-M du groupe 9 et portaient exclusivement le gène *bla*_{CTX-M-14}.

Parmi les EC-BLSE (n = 37), 35 souches ont hébergé également d'autres gènes codant pour des β-lactamases de type TEM-1 et/ou OXA-1. Le gène *bla*_{SHV} n'a pas été détecté dans toute la collection.

Concernant les céphalosporinases plasmidiques, 4 souches productrices ont été détectées, dont 3, exprimant le gène *bla*_{CMY-2} associé à une BLSE et 1 (*E. coli* 907) hébergeant le gène *bla*_{CMY-2} uniquement.

Pour la production de carbapénémases, la seule souche d'*E. coli* (*E. coli* 667) phénotypiquement résistante à l'ertapénème s'est révélée positive pour une carbapénémase de type OXA-48. Cette enzyme a été co-exprimée avec une BLSE de type CTX-M-15, une céphalosporinase CMY-2 et autres β-lactamases (TEM-1 et OXA-1).

La prédominance des BLSE de type CTX-M-15 est en accord avec les études moléculaires effectuées précédemment dans différents hôpitaux en Algérie à Béjaïa, Alger, Tlemcen, Constantine, Sidi Belabes, Oran (Touati et al., 2006; Ramdani-Bougoussa et al., 2006; Touati et al., 2012; Gharout-Sait et al., 2012; Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2013; Agabou et al., 2014; Yahiaoui et al., 2015; Ayad et al., 2016; Medboua-Benbalagh et al., 2017; Zenati et al., 2019). Nos résultats concordent aussi avec d'autres études dans d'autres pays à travers le monde, tels que la Tunisie (Dahmen et al., 2010; Mnif et al., 2013), le Maroc (Barguigua et al., 2013), l'Egypte (Fam et al., 2011), le Burkina Faso (Ouedraogo et al., 2016), la France (Nicolas-Chanoine et al., 2008), la Roumanie (Maciucă et al., 2015), les Etats-Unis (Chen et al., 2014) et la Corée du Sud (Graham et al., 2016).

Les BLSE de type CTX-M-14 ont été produites par 4 souches (10.8 %). Les souches d'EC-BLSE de types CTX-M-14 sont, comme celles de type CTX-M-15, répandues dans le monde entier (Bajaj et al., 2016). Toutefois, en Algérie, seules trois études ont décrit la présence de CTX-M-14 chez des *E. coli* d'origines cliniques isolées à Tlemcen et Alger (Ayad et al., 2016; Medboua-Benbalagh et al., 2017; Zenati et al., 2019) et une étude a rapporté la présence de ces enzymes chez des *E. coli* isolées, à Alger, sur une viande hachée contaminée (Rebbah et al., 2018).

Un faible taux d'*E. coli* résistantes aux C3G, par production de céphalosporinase seule (0.5 %) ou associées à des BLSE (1.4 %), a été enregistré. Toutes ces souches ont produit la céphalosporinase CMY-2, qui est l'enzyme AmpC plasmidique la plus courante chez les souches d'*E. coli* (Bajaj et al., 2016). En Algérie, trois variants de l'enzyme CMY (CMY-2, CMY-4 et CMY-42) ont été rapportés chez *E. coli* (Iabadene et al., 2009; Robin et al., 2010; Gharout-Sait et al., 2015; Yousfi et al., 2016; Belmahdi et al., 2016; Yaici et al., 2016; Yaici et al., 2017; Zenati et al., 2019).

Une seule souche d'*E. coli* (0.5 %) était résistante à l'ertapénème mais sensible à l'imipénème. Cette souche a exprimé une carbapénémase de type OXA-48 en association avec des enzymes de type CTX-M-15, CMY-2 et d'autre β -lactamases. C'est la première description, en Algérie, d'une telle association chez une souche clinique d'*E. coli*. Plusieurs études faites en Algérie ont rapporté la prédominance des carbapénémases de type OXA-48 chez des *E. coli* de divers origines, humaine, animale et environnementale (Agabou et al., 2014; Yousfi et al., 2016; Yagoubat et al., 2016; Bouaziz et al., 2018; Tafoukt et al., 2017; Bourafa et al., 2018; Bachiri et al., 2018; Mairi et al., 2019).

Bien que la production de carbapénémases dans notre étude ait été limitée, cela représente un sérieux problème dans la mesure où les carbapénèmes sont souvent considérés comme antibiotiques de derniers recours pour le traitement des infections à bactéries productrices de BLSE (Paterson et Bonomo, 2005).

V.3.2. Gènes de résistance aux quinolones et aux aminosides

Les résultats de la détection des gènes de résistance aux aminosides et aux quinolones par PCR standard sont illustrés dans la **figure 32**.

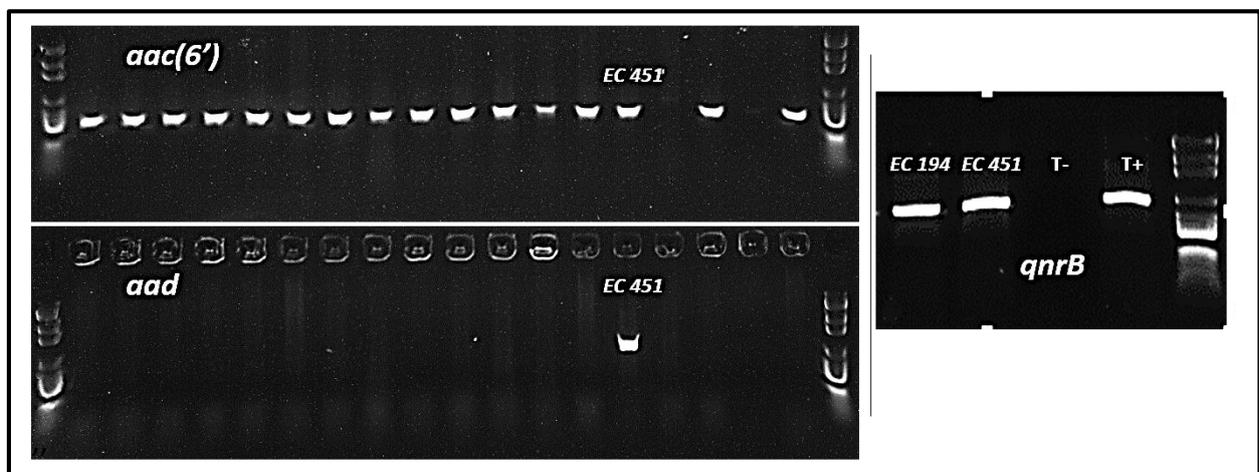


Figure 32. Détection des gènes de résistance aux aminosides et aux quinolones par PCR standard.

Pour la résistance aux quinolones, les analyses moléculaires ont permis l'identification du gène *aac(6')-Ib-cr* conférant aussi une résistance aux aminosides, chez 19 (51.3 %) souches d'EC-BLSE (**Tab. 11**). Ce gène a été exprimé, exclusivement, en association avec les BLSE de type CTX-M-15. Parmi ces 19 souches d'EC-BLSE, deux (*E. coli* 194 et *E. coli* 451) ont co-exprimé également le déterminant plasmidique de résistance aux quinolones *qnrB*. Le gène *qnrA* n'a pas été détecté.

La grande diffusion et la dominance du gène *aac(6')-Ib-cr* parmi les déterminants plasmidiques de résistance aux quinolones, ainsi que son association avec les BLSE CTX-M-15 ont été régulièrement signalées, tant en Algérie (Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2013; Yahiaoui et al., 2015; Agabou et al., 2016; Yanat et al., 2017; Yaici et al., 2017; Medboua-Benbalagh et al., 2017; Zenati et al., 2019) que dans d'autres pays du monde (Sabtcheva et al., 2009; Crémet et al., 2011; Shibl et al., 2012; Paltansing et al., 2013; Maciuca et al., 2015; Bado et al., 2016; Ahmed Alsharapy et al., 2018).

Un faible taux (5.4 %) d'EC-BLSE hébergeant le gène *qnrB* a été détecté. Ce variant *qnr* a déjà été rapporté dans plusieurs études réalisées en Algérie (Alouache et al., 2014; Yanat et al., 2014; Agabou et al., 2014; Brahmi et al., 2014; Yahiaoui et al., 2015; Anssour et al., 2016; Agabou et al., 2016; Yousfi et al., 2016; Yanat et al., 2017; Laarem et al., 2017; Rebbah et al., 2018; Yousfi et al., 2019; Messaili et al., 2019).

Généralement, si les déterminants plasmidiques de résistance aux quinolones (Exp : *aac(6')-Ib-cr* et *qnrB*) sont présents seuls, ils ne confèrent pas un niveau élevé de résistance aux quinolones dont la ciprofloxacine. La résistance peut donc passer inaperçue lors des tests phénotypiques. Cependant, ces déterminants pourront contribuer à la sélection de souches présentant des niveaux de résistance plus élevés grâce à des mécanismes chromosomiques supplémentaires, notamment des mutations dans les gènes codant pour l'ADN gyrase et/ou la topoisomérase IV (Park et al., 2006; Rodríguez-Martínez et al., 2016). Ce constat ainsi que les hauts niveaux de résistance à la ciprofloxacine observés dans notre étude, suggèrent que la résistance aux quinolones, est due principalement à des mutations dans les gènes chromosomiques de l'ADN gyrase et/ou la topoisomérase IV.

Concernant la résistance aux aminosides, en plus du gène *aac(6')-Ib-cr* détecté chez 19 EC-BLSE, le variant *aadA1* codant pour une aminoside nucléotidyltransférase a été identifié chez une seule souche (*E. coli* 451) représentant alors 2.7 % des souches d'EC-BLSE (**Tab. 11**). Les autres déterminants de résistance aux aminosides (*armA*, *aac(3)* et *aph*) ont été absents.

Le déterminant *aac(6')-Ib-cr* a été retrouvé exclusivement chez toutes les souches d'EC-BLSE qui ont été phénotypiquement résistantes à la gentamicine. Des résultats similaires ont été rapportés par des études précédentes (Park et al., 2006; Kim et al., 2009) confirmant la forte association entre le gène *aac(6')-Ib-cr* et la résistance à la gentamicine chez *E. coli*. Une association inattendue vu que le gène *aac(6')-Ib-cr* confère une résistance à la kanamycine mais pas à la gentamicine (Park et al., 2006).

Le gène *aadA1* confère une résistance à la spectinomycine et à la streptomycine chez *E. coli* (Magrini et al., 1998). En Algérie, des variants de ce gène ont été détectés chez des souches cliniques (Baba Ahmed-Kazi Tani et al., 2013; Sassi et al., 2014), des souches d'origine animale (Belmahdi et al., 2016) ou isolées dans les effluents hospitaliers (Anssour et al., 2016).

V.3.3. Gènes de résistance à la colistine

La **figure 33** illustre les résultats de la détection des gènes de résistance à la colistine par PCR quantitative et standard.

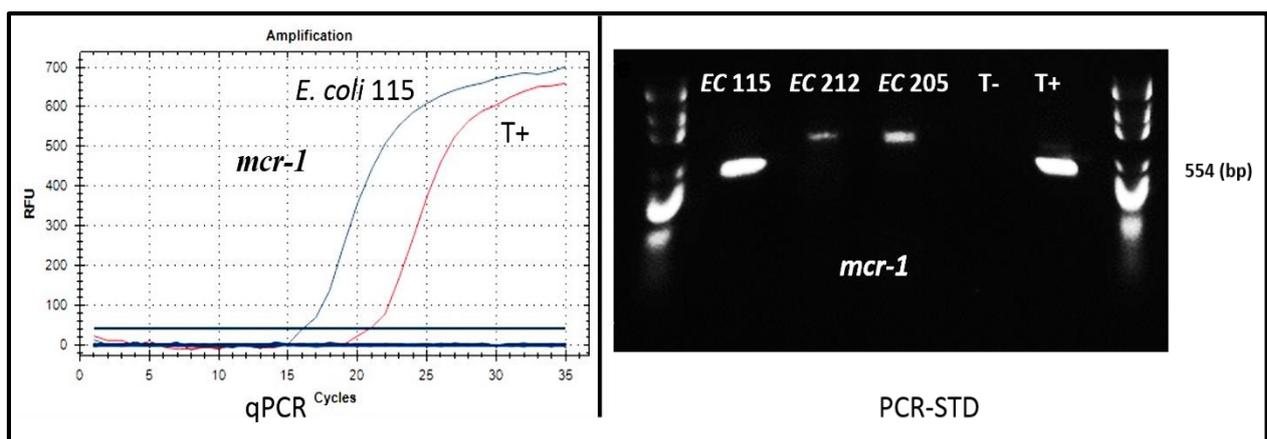


Figure 33. Détection des gènes de résistance à la colistine par PCR quantitative et standard.

Les analyses moléculaires réalisées sur l'ensemble des 215 souches d'*E. coli* ont révélé qu'une seule souche (*E. coli* 115) hébergeait le gène *mcr-1* conférant ainsi la résistance à la colistine (**Tab. 11**). Cette souche a été isolée à partir d'un échantillon d'urine d'un homme âgé de 69 ans et porteur d'une sonde urinaire. Ce patient n'avait pas reçu de colistine durant son séjour à l'hôpital et n'avait pas d'antécédents de voyage à l'étranger.

Les autres gènes de résistance à la colistine (*mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* et *mcr-5*) n'ont pas été détectés.

A notre connaissance, nous rapportons ici le premier cas autochtone d'une phosphoéthanolamine transférase MCR-1, détectée au CHU de Sétif. Cette enzyme a déjà été décrite à l'Ouest de l'Algérie chez deux souches cliniques d'*E. coli*, une à Sidi Bel Abbes (Berrazeg

et *al.*, 2016) et l'autre à Oran (Yanat et *al.*, 2016). Elle a été détectée aussi dans des échantillons provenant d'animaux (Bachiri et *al.*, 2018; Chabou *al.*, 2019), de l'eau de mer (Drali et *al.*, 2018) et du fumier (Touati et *al.*, 2019).

Dans la présente étude, l'origine de la souche d'*E. coli* uropathogène hébergeant le gène *mcr-1* et sa relation avec un éventuel réservoir animal restent inconnues. L'utilisation de la colistine dans certains élevages en Algérie suggère que ces exploitations pourraient être la principale source de transmission de la résistance à la colistine à l'homme.

V.4. Développement d'une qPCR ciblant le gène *mcr-8*

En se basant sur l'alignement des séquences nucléotidiques de tous les variants du gène *mcr* collectés, des amorces et sonde spécifiques ciblant 158-pb du gène *mcr-8* ont été conçues :

MCR-8_RT-F: 5'- TCCGGGATGCGTGACGTTGC-3';

MCR-8_RT-R: 3'-TGCTGCGCGAATGAAGACGA-5';

MCR-8_RT-Probe: FAM-TCATGGAGAATCGCTGGGGGAAAGC-TAMRA.

L'analyse de ces séquences par BlastN avec la base de données NCBI a montré une homologie et une couverture de 100 % avec les variants du gène *mcr-8* uniquement. L'analyse effectuée par PCR *in silico*, sur tous les variants *mcr*, a révélé également une spécificité de 100 % pour les séquences *mcr-8* uniquement.

Les résultats des tests de sensibilité et de reproductibilité de la qPCR sont illustrés dans la **Figure 34**.

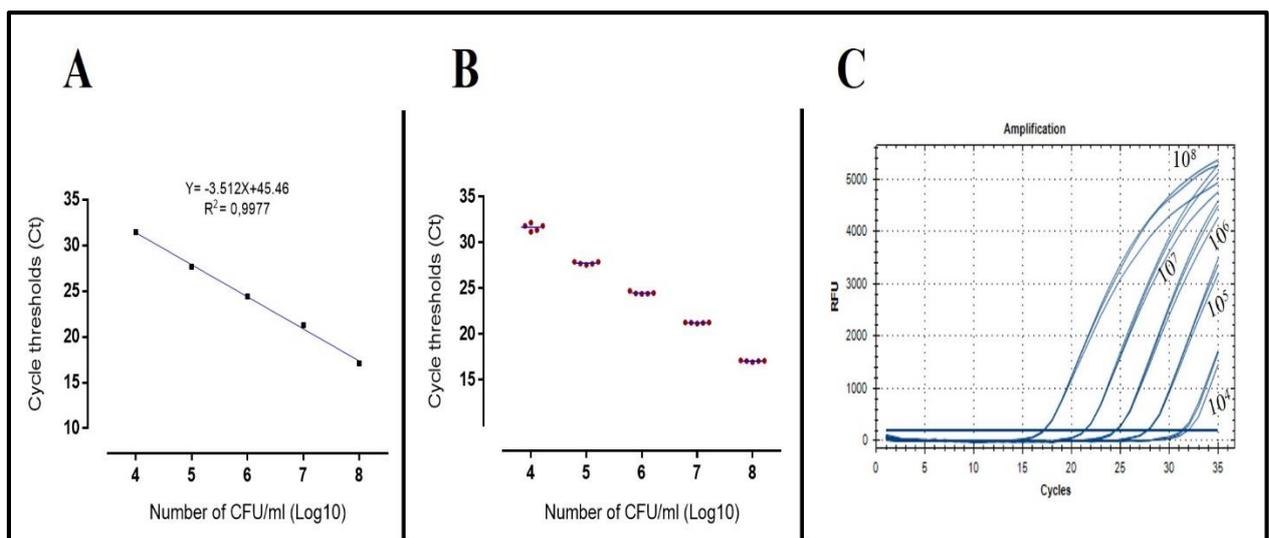


Figure 34. Test de sensibilité et de reproductibilité de la qPCR-*mcr-8*. (A) : Sensibilité analytique de la qPCR testée sur une série de dilution de l'ADN génomique (de 10^8 à 10^4 UFC/mL). (B) : Reproductibilité de la qPCR testée en cinq répétitions sur le même ADN génomique et la même série de dilution. (C) : Graphe d'amplification montrant les courbes en triple exemplaires pour chaque dilution testée (les dilutions 10^3 , 10^2 et 10^1 n'avaient pas de signal positif).

La sensibilité de la qPCR (**Fig. 34 A et C**) était excellente avec une bonne courbe de corrélation entre le nombre d'UFC/mL et les valeurs de cycle thresholds (Ct) qui était linéaire de 10^4 à 10^8 UFC/mL correspondant à 32 à 17 valeurs de Ct ($R^2 = 0.9977$; pente = -3.512). L'efficacité et la limite de détection de la qPCR étaient de 92.64 % et 55 UFC/mL respectivement. La reproductibilité évaluée en cinq répétitions sur le même ADN génomique de la souche *K. pneumoniae* KP95 (hébergeant le gène *mcr-8*) était également excellente (**Fig. 34 B**).

En outre, la spécificité de la qPCR a été démontrée, *in vitro*, sur l'ADN génomique d'un panel de 290 bactéries à Gram négatif (BGN) (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *P. rettgeri*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*) et sur l'ADN métagénomique extrait de 250 échantillons de selles humaines. Les résultats de la qPCR-*mcr-8* étaient négatifs pour tous les ADN génomiques et métagénomiques testés, à l'exception de 2 souches de *K. pneumoniae* utilisées ici comme témoins positifs.

Appliquée sur les 215 souches cliniques uropathogènes d'*E. coli*, la nouvelle qPCR s'est révélée négative pour toutes les souches, montrant l'absence du gène *mcr-8* dans notre collection.

En 2018, un nouveau type d'enzyme phosphoéthanolamine (PEtN) transférase, appelé MCR-8, conférant une résistance à la colistine, a été identifié chez une souche de *K. pneumoniae* isolée en Chine, à partir de la matière fécale de porc (Wang et al., 2018). Récemment, le gène *mcr-8* a également été détecté en Chine dans deux souches de *Raoultella ornithinolytica* isolées du cloaque de poulet (Wang et al., 2019), une souche de *Stenotrophomonas* spp. isolée des eaux usées (Li et al., 2019) et une souche de *Klebsiella quasipneumoniae* isolée de déjections porcines (Yang et al., 2019). La nouvelle enzyme MCR-8 était différente des enzymes PEtN transférases identifiées précédemment (MCR-1, MCR-2, MCR-3, MCR-4, MCR-5, MCR-6 et MCR-7) et présentait moins de 40 % d'homologie avec toutes ces dernières (Yang et al., 2018), ce qui a justifié la nécessité de développer un test PCR spécifique pour la meilleure détection du gène codant pour cette nouvelle enzyme.

Dans cette étude, nous avons développé et rapporté le premier test qPCR (PCR en temps réel) ciblant le nouveau gène de résistance à la colistine à médiation plasmidique, *mcr-8*. Testé *in vitro* contre la collection des 215 *E. coli* uropathogènes, ce nouveau test qPCR était négatif. Toutefois, appliquée sur d'autres BGN isolées au CHU de Sétif, la nouvelle qPCR nous a permis de décrire la première souche clinique de *K. pneumoniae* portant le gène *mcr-8* (Nabti et al., 2020).

Des tests qPCR simplex et multiplex ont été conçus jusqu'à présent pour identifier les gènes *mcr* (Osei Sekyere et al., 2019). Nous présentons ici le premier test qPCR ciblant le gène *mcr-8*.

Ce nouveau test qPCR présente de multiples avantages, notamment une sensibilité, une reproductibilité et une spécificité plus élevées. Ce système peut détecter rapidement le gène *mcr-8* dans tout échantillon d'ADN, y compris les échantillons d'ADN génomique ou métagénomique en moins de 2 h. Nous pensons que ce nouveau test moléculaire serait un outil intéressant et efficace qui pourrait être facilement mis en œuvre dans tout laboratoire de microbiologie clinique disposant d'installations moléculaires, pour la détection rapide de tout isolat résistant à la colistine et hébergeant le gène *mcr-8*.

V.5. Groupes phylogénétiques

Les résultats des analyses phylogénétiques des 215 souches d'*E. coli* (37 EC-BLSE et 178 EC-non-BLSE) sont résumés dans le **tableau 12**.

Tableau 12. Groupage phylogénétique des souches d'*E. coli*.

Groupe phylogénétique	EC-BLSE (n =37) n, (%)	EC-non-BLSE (n =178) n, (%)	Total (n= 215) n, (%)
A	6 (16.2)	21 (11.8)	27 (12.6)
B1	1 (2.7)	27 (15.2)	28 (13)
B2	20 (54.1)	86 (48.3)	106 (49.3)
C	3 (8.1)	13 (7.3)	16 (7.4)
D	5 (13.5)	10 (5.6)	15 (7)
E	-	-	-
F	1 (2.7)	18 (10.1)	19 (8.8)
Clade I	-	1 (0.6)	1 (0.5)
Inconnue	1 (2.7)	2 (1.1)	3 (1.4)

EC-BLSE : *E. coli* productrice de β -lactamases à spectre étendu, EC-non-BLSE : *E. coli* non-productrice de β -lactamases à spectre étendu, n : nombre.

L'analyse a révélé la présence de sept groupes phylogénétiques : A, B1, B2, C, D, F et clade I. Le groupe phylogénétique B2 était prédominant avec 106 (49.3 %) souches (54.1 % des EC-BLSE et 48.3 % des EC-non-BLSE), suivi des groupes B1 (13 %) et A (12.6 %). Trois souches (1 EC-BLSE et 2 EC-non-BLSE) n'appartenaient à aucun groupe phylogénétique connu.

Dans une étude réalisée sur une collection de 265 souches d'*E. coli* uropathogènes, Toval et al. (2014) ont rapporté des taux de 49.4 % de B2, 16.2 % A, 15.5 % B1, 6.8 % C, 6.4 % D, 4.1 % F et 0.4 % Clade V. Ces fréquences sont proches de celles obtenues dans notre étude. Par ailleurs, la prédominance du groupe phylogénétique B2 (106/215, 49.3 %) est en accord avec de nombreuses études antérieures, montrant une forte prévalence de ce groupe parmi les souches d'*E. coli*

responsables d'infections extra-intestinales (Coque et *al.*, 2008; Molina-Lopez et *al.*, 2011; Toval et *al.*, 2014; Lee et *al.*, 2016; Munkhdelger et *al.*, 2017).

Nous notons que les EC-BLSE ont été présentes dans presque tous les principaux groupes phylogénétiques (surtout dans les groupes B2, A et D), reflétant la large diffusion des enzymes BLSE au sein du monde très diversifié des *E. coli*. En outre, les groupes phylogénétiques F et B1 ont été plus représentés par les souches d'EC-non-BLSE (10.1 % et 15.2 %, respectivement) que par les EC-BLSE (2.7 % et 2.7 %), suggérant que les souches d'*E. coli* de ces deux groupes phylogénétiques hébergent rarement des enzymes comme les BLSE conférant une multi-résistance aux antibiotiques.

Enfin, les trois souches qui n'ont pas pu être classées, selon cette nouvelle méthode de phylogroupage, pourraient constituer un nouveau groupe phylogénétique.

V.6. Transfert des gènes de résistance aux antibiotiques

V.6.1. Conjugaison bactérienne

Les résultats des tests de conjugaison et de typage plasmidique sont rapportés dans le **tableau 13**. Les phénotypes de résistance des souches donatrices de gènes de résistance et de leurs transconjugants sont illustrés dans la **figure 35**.

Tableau 13. Résultats des tests de conjugaison et de typage plasmidique.

Souche	Phénotype de résistance aux β -lactamines	Résistances associées	Gènes de résistance	Phénotype de résistance aux β -lactamines du TC	Résistance co-transférée	Gènes de résistance du TC (*)	Groupe d'incompatibilité (Plasmide)
<i>E. coli</i> 16 p	BLSE	/	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	BLSE	/	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	IncFIB
<i>E. coli</i> 529	BLSE	NA, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	BLSE	SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncFIB, IncFIA
<i>E. coli</i> 827	BLSE	GN, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	BLSE	GN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncI1
<i>E. coli</i> 194	BLSE	GN, NA, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>qnrB</i>	BLSE	GN, NA, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncHI2
<i>E. coli</i> 410	BLSE	NA, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}	BLSE	/	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncI1
<i>E. coli</i> 550	BLSE	NA, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	BLSE	SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncFIB, IncFIA
<i>E. coli</i> 733	BLSE	GN, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	BLSE	GN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncI1
<i>E. coli</i> 873	BLSE	NA, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	BLSE	SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncFIB, IncFIA
<i>E. coli</i> 52	BLSE + CASE	SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-2}	BLSE + CASE	/	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	IncFIB
<i>E. coli</i> 282	BLSE	GN, NA, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	BLSE	GN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncI1
<i>E. coli</i> 292	BLSE	GN, NA, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	BLSE	GN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncI1
<i>E. coli</i> 451	BLSE	GN, NA, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aadA1</i> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>qnrB</i>	BLSE	GN, NA, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncFIB
<i>E. coli</i> 612	BLSE	/	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	BLSE	/	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ND
<i>E. coli</i> 667	BLSE + CASE + CARBA	GN, NA, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	BLSE + CASE	/	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncFIB, IncFIA
<i>E. coli</i> 181	BLSE	NA, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	BLSE	/	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncI1
<i>E. coli</i> 627	BLSE	GN, NA, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	BLSE	GN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ND
<i>E. coli</i> 690	BLSE	NA, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	BLSE	/	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncI1
<i>E. coli</i> 57	BLSE	GN, NA, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	BLSE	GN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncI1
<i>E. coli</i> 178	BLSE	GN, NA, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	BLSE	GN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncI1
<i>E. coli</i> 69 p	BLSE	/	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	BLSE	/	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	IncFIB

TC : transconjugant, GN : Gentamicine, NA : Acide nalidixique, CIP : Ciprofloxacine, SXT : Triméthoprim-sulfaméthoxazole, ND : non déterminé. (*) : Seules les PCR de détection de gènes codant pour BLSE ont été réalisées chez Les transconjugants.

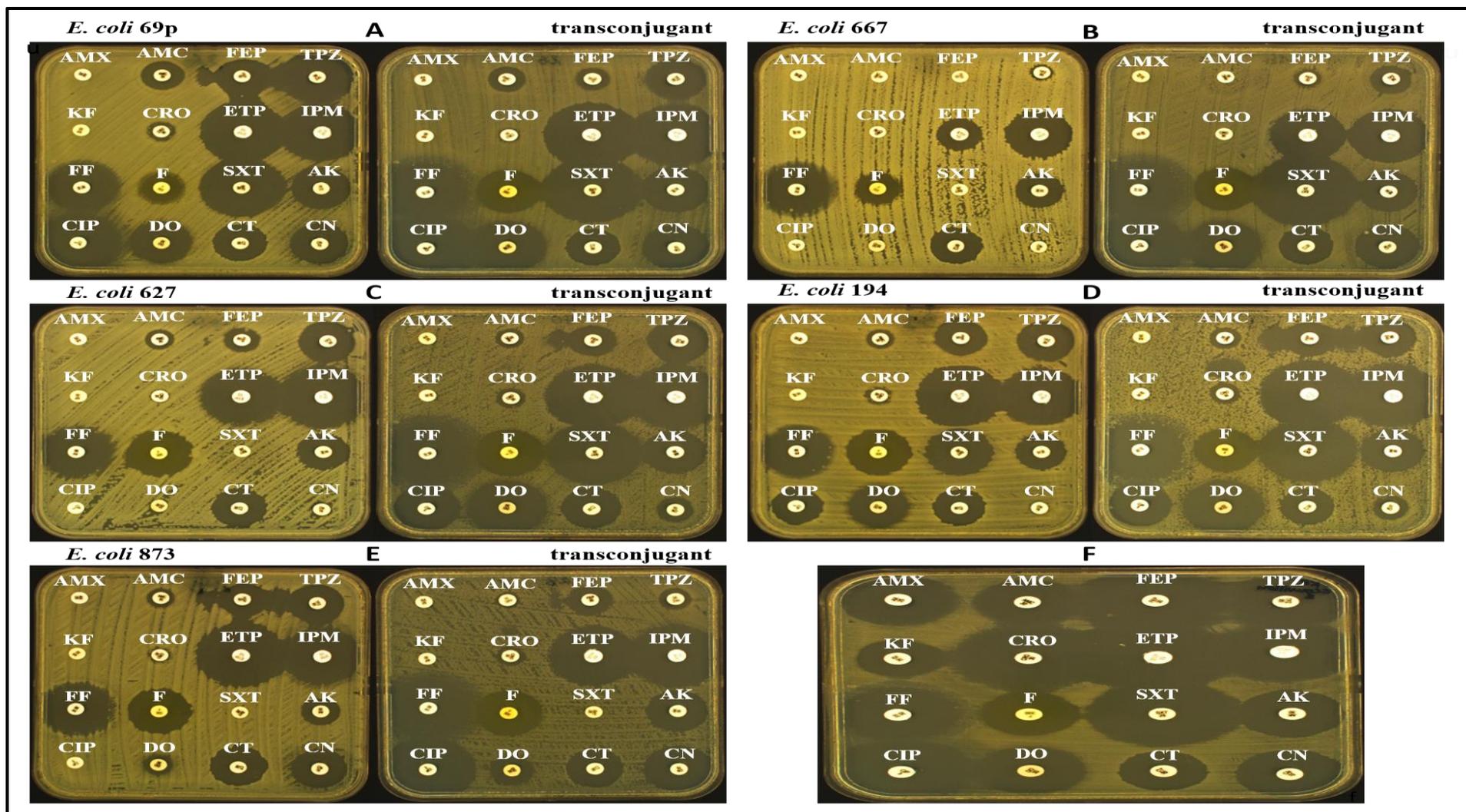


Figure 35. Transfert des gènes de résistance par conjugaison. (A) : Phénotype BLSE, (B) : Phénotype BLSE + CASE, (C) : Phénotype BLSE + phénotype de résistance aux aminosides (gentamicine), (D) : Phénotype BLSE associé à la résistance aux aminosides et aux quinolones, (E) : Phénotype BLSE associé à la résistance au triméthoprine-sulfaméthoxazole, (F) : AntibioGramme de la souche réceptrice *E. coli* J-53. AMX : amoxicilline, AMC : amoxicilline + acide clavulanique, KF : céfalexine, CRO : ceftriaxone, FEP : céfépime, TPZ : pipéracilline-tazobactam, IPM : imipénème, ETP : ertapénème, AK : amikacine, CN : gentamicine, CIP : ciprofloxacine, FF : fosfomycine, F : nitrofurantoïne, DO : doxycycline, SXT : triméthoprine-sulfaméthoxazole et CT : colistine.

Sur l'ensemble des 37 souches d'EC-BLSE, 20 soit 54 % ont transféré leurs gènes de résistance. Le phénotype BLSE a été transféré seul et/ou associé avec d'autres phénotypes de résistance, comme suit :

- ✓ Phénotype BLSE seul : 6 souches,
- ✓ Phénotype BLSE associé à un phénotype CASE : 2 souches,
- ✓ Phénotype BLSE associé à la résistance aux aminosides (gentamicine) : 7 souches,
- ✓ Phénotype BLSE associé à la résistance aux aminosides et aux quinolones : 2 souches,
- ✓ Phénotype BLSE associé à la résistance au triméthoprime-sulfaméthoxazole : 3 souches.

Une souche sur les 3 productrices de phénotype BLSE + CASE n'a pas transféré ses gènes de résistance. De plus, le transfert des gènes *bla_{OXA-48}* (codant pour une carbapénémase) de la souche *E. coli* 667 et *mcr-1* (conférant la résistance à la colistine) de la souche *E. coli* 115 n'a pas fonctionné.

La PCR de détection des gènes BLSE de tous les transconjugants a confirmé le transfert des gènes *bla_{CTX-M-15}* et *bla_{CTX-M-14}* (**Tab. 13**).

Les gènes de résistance peuvent être disséminés rapidement grâce à des mécanismes de transfert horizontal de gènes tel que la conjugaison. Un taux important de transfert des gènes de BLSE (54 %) a été observé dans notre étude. Des taux de transfert similaires ou encore plus élevés ont été rapportés dans plusieurs études (Franciczek et *al.*, 2005; Franciczek et Krzyżanowska, 2014; Shin et *al.*, 2017; Guzmán et *al.*, 2019).

La diffusion des β -lactamases telles que les BLSE par le biais des plasmides est une préoccupation majeure qui contribue à l'énorme propagation de ce type d'enzymes dans le monde microbien (Navarro, 2006). Dans notre étude, le transfert des gènes *bla_{CTX-M}* a été souvent associé avec le transfert de phénotype de résistance à d'autres classes d'antibiotiques comme les aminosides, les quinolones et le triméthoprime-sulfaméthoxazole. Ceci est en accord avec d'autres études, indiquant le transfert simultané des gènes codant pour BLSE avec les gènes codant pour la résistance aux aminosides et aux quinolones, ces gènes sont souvent portés sur le même plasmide (Carattoli, 2009; Dolejska et *al.*, 2013).

D'autre part, bien que l'expérience de conjugaison ait été menée en triplicata, les gènes *bla_{OXA-48}* et *mcr-1* n'ont pas été transférés, suggérant la localisation de ces gènes sur des plasmides non conjugatifs ou sur le chromosome, comme rapporté dans d'autres études (Skalova et *al.*, 2017; Zhou et *al.*, 2017; Hamprecht et *al.*, 2019; Lu et *al.*, 2019; Zając et *al.*, 2019).

V.6.2. Typage des plasmides

Le typage des plasmides a été effectué chez tous les transconjugants afin de déterminer les différents groupes d'incompatibilité des plasmides. Les résultats obtenus (Tab 13, Fig. 36) montrent la présence des plasmides de 4 groupes d'incompatibilité (IncI1, IncFIB, IncFIA et IncHI2) avec prédominance des plasmides IncI1.

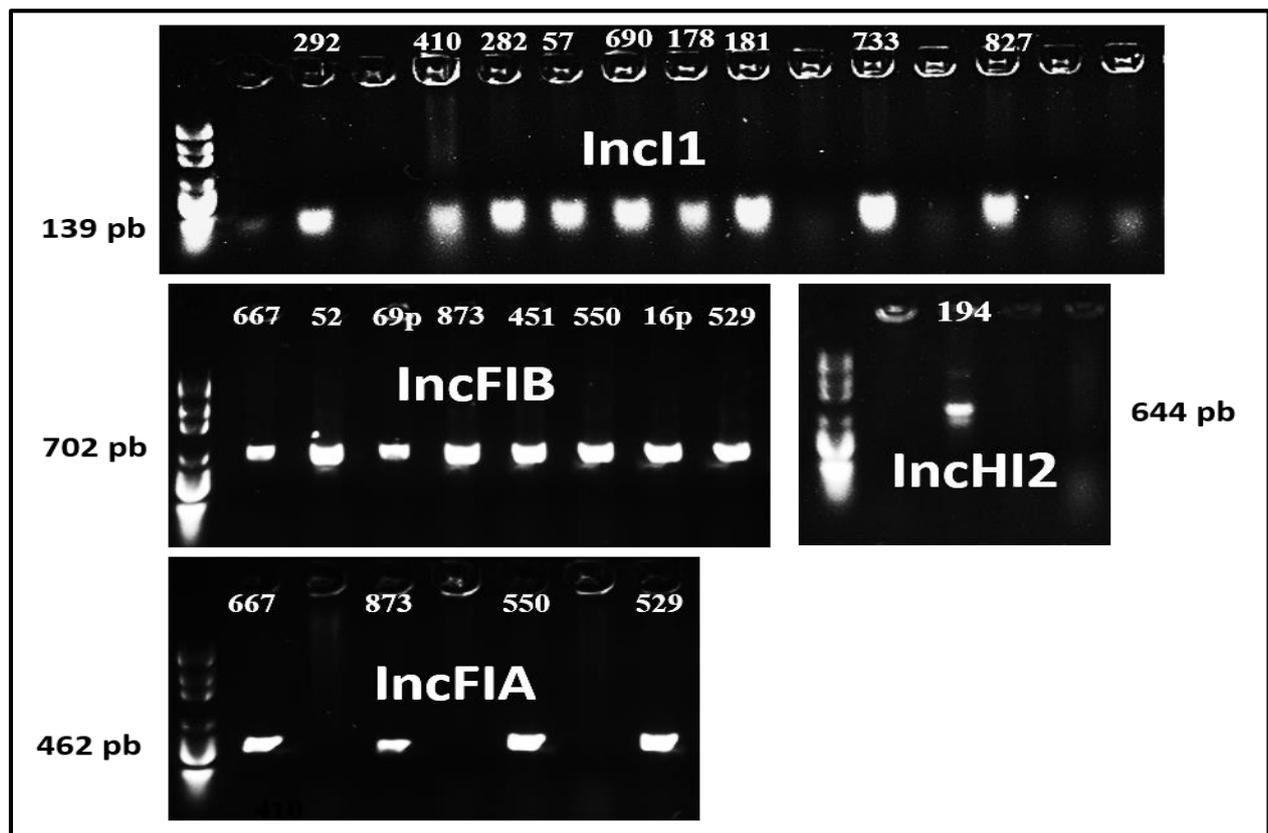


Figure 36. Résultats des PCR de typage plasmidique.

Pour les souches dont les transconjugants obtenus contiennent un seul groupe d'incompatibilité de plasmides, des suppositions ont été suggérées. Le gène *bla*_{CTX-M-15} chez les souches EC292, EC410, EC282, EC57, EC690, EC178, EC181, EC733 et EC827 est porté par un plasmide IncI1. Le gène *bla*_{CTX-M-15} chez la souche EC451 et le gène *bla*_{CTX-M-14} chez les souches EC16p, EC52 et EC69p sont portés par un plasmide IncFIB et le gène *bla*_{CTX-M-15} chez la souche EC194 est porté par un plasmide IncHI2. Les supports des gènes de résistance des deux souches EC612 et EC627 n'ont pas été identifiés.

La détermination des types de plasmides circulant dans les populations bactériennes est indispensable pour comprendre la dynamique épidémiologique et pour établir des stratégies d'intervention visant à stopper la dissémination de plasmides particuliers (Zurfluh et al., 2015).

Parmi 11 souches productrices du gène *bla*_{CTX-M-15}, 9 (81.8 %) ont transféré ce gène en association avec des plasmides du groupe IncI1, une souche en association avec un plasmide IncFIB et une avec un plasmide IncHI2.

L'association entre *bla*_{CTX-M-15} et IncI1 a été rapportée dans plusieurs études, chez des souches d'*E. coli* de divers origines (Zong et al., 2008; Zhang et al., 2013; Fischer et al., 2014; Zong et al., 2015; Zurfluh et al., 2015; Arvand et al., 2015). Cette association a été également rapportée en Algérie chez des *E. coli* isolées de l'eau de mer (Alouache et al., 2012) et d'une viande hachée contaminée (Rebbah et al., 2018). Notre étude décrit pour la première fois en Algérie cette association chez des souches d'*E. coli* d'origine humaine.

L'association entre *bla*_{CTX-M-15} et IncFIB a été rapportée récemment en Algérie chez des souches de *K. pneumoniae* isolées de fruits et de légumes frais (Mesbah Zekar et al., 2020).

L'association entre *bla*_{CTX-M-15} et IncHI2 a été rapportée dans certaines études (Kariuki et al., 2015; Ribeiro et al., 2016). Cependant, à notre connaissance, notre étude est la première à la rapporter en Algérie.

Le gène *bla*_{CTX-M-14} a été lié au plasmide IncFIB chez toutes les souches (n =3) contenant ce gène. Zhang et al. (2015) ont démontré que la majorité des *bla*_{CTX-M-G9}, incluant *bla*_{CTX-M-14}, étaient associés avec les plasmides IncFIB. Cette association (*bla*_{CTX-M-14}/IncFIB) a été rapportée en Algérie chez des souches d'*E. coli* isolées de viande hachée contaminée (Rebbah et al., 2018). Notre étude c'est la première description en Algérie de l'association *bla*_{CTX-M-14}/IncFIB chez des souches cliniques d'*E. coli*.

Enfin, pour deux souches, le type de plasmide porteur du gène *bla*_{CTX-M-15} n'a pas été identifié, suggérant que ces souches pourraient être porteurs de nouveaux types de plasmides non testés dans les précédentes expériences de typage.

V.7. Rendement des huiles essentielles

Le rendement en % (m/m) des HE d'*O. glandulosum* de 5 localités d'Algérie est rapporté dans la **figure 37**.

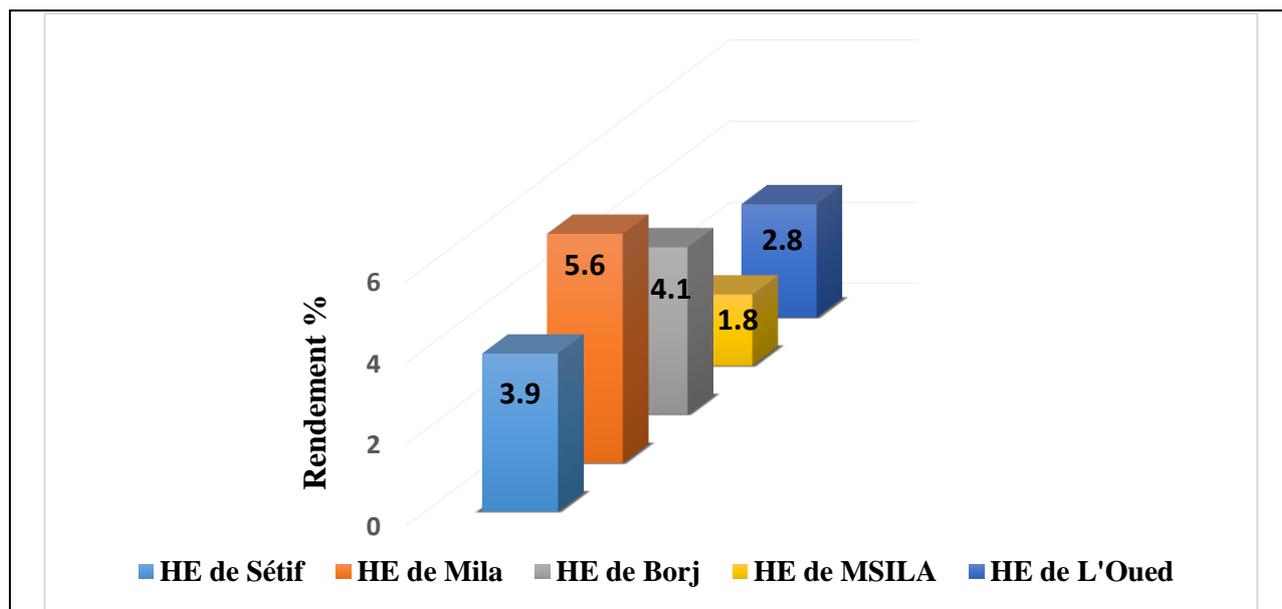


Figure 37. Rendement en % (m/m) des huiles essentielles d'*O. glandulosum* de 5 localités d'Algérie.

L'hydrodistillation pendant 3 h des parties aériennes d'*O. glandulosum* provenant de 5 différentes localités, a donné des rendements variant entre 1.8 et 5.6 % (m/m).

Une étude menée par Sari et *al.* (2006), sur des collections d'*O. glandulosum* issues de différentes régions algériennes, a rapporté des taux (v/m) de 1.2 % pour la collection de Bordj, 0.8 à 3.0 % pour celle de Sétif et 2.5 % pour celle de M'sila. Les rendements des collections de Bordj et Sétif sont inférieurs à ceux trouvés dans notre étude qui sont de 4.1 % et 3.9 % respectivement. Cependant, le rendement obtenu pour l'HE de M'sila est supérieur au nôtre qui est de 1.8 %. Ruberto et *al.* (2002), ont travaillé sur des échantillons d'*O. glandulosum* récoltés dans quatre différentes régions appartenant toutes à la wilaya de Sétif. Ils ont trouvé des rendements (v/m) de 2.3 % pour l'échantillon de Ouled Iyiche, 2.3 % pour celui de Djebel Megriss, 3.1 % pour celui de Anini et 5.0 % pour celui de Tafat.

D'autres études faites sur la même espèce, originaire aussi des régions de Sétif, ont rapporté des taux de 2.7 % (v/m) (Belhattab et *al.*, 2005) et 2.5 % (Khalfi et *al.*, 2008). Tous ces rendements, à l'exception de celui de l'échantillon de Tafat, sont nettement inférieurs au résultat obtenu dans notre étude pour l'HE de la région de Chirhom à Sétif.

Berrehal et *al.* (2010) ont rapporté un rendement en HE de 2 %, obtenu à partir d'*O. glandulosum* récoltée dans deux régions de l'Est Algérien, Constantine et Jijel. Ces rendements sont nettement inférieurs au rendement obtenu dans notre étude pour l'HE de Mila (5.6 %), qui est limitrophe avec les deux villes précédentes.

Dans l'Ouest algérien, deux équipes ont déterminé le rendement d'*O. glandulosum* récoltée à Tlemcen, les valeurs obtenues étaient de 4.8 % (Bendahou et al., 2008) et 3.53 à 3.95 % (Bekhechi et al., 2008).

Dans une étude menée sur des collections d'*O. glandulosum* provenant de Tunisie, Méchergui et al. (2010) ont obtenu des rendements de 2.5, 3.0 et 4.6 % (v/m) pour des échantillons récoltés dans trois différentes localités au Nord de la Tunisie (Krib, Bargou et Nefza respectivement). Ces valeurs sont proches de celles des nôtres des régions de M'sila, El Oued et Bordj respectivement. Une autre étude tunisienne sur des échantillons d'*O. glandulosum* récoltés pendant différents stades de croissance, a donné des rendements (m/m) de l'ordre de 2 % en fin de végétation, 1.7 % en début de végétation et 0.6 % en floraison (Béjaoui et al., 2013). Ces valeurs sont nettement inférieures aux nôtres, sachant que tous nos échantillons ont été récoltés pendant le stade de floraison.

Les rendements en HE étaient différents d'une région à une autre. Cette variabilité peut être attribuée à plusieurs facteurs naturels tels que le climat et la température, le type de sol, le relief, la période de cueillette des plantes et la partie de la plante utilisée dans l'extraction : feuilles, tiges, fleurs, etc. Les conditions expérimentales, telles que la méthode d'extraction employée et la durée d'extraction choisie, peuvent aussi influencer les rendements d'extraction (Bohra et al., 1994; Asbahani et al., 2015; Macedo da Silva et al., 2019).

V.8. Composition chimique des Huiles essentielles

La composition chimique des HE des 5 populations d'*O. glandulosum* Desf. est détaillée dans le **tableau 14**.

Les pourcentages de détection des principales familles de composés chimiques des cinq HE sont relatés dans la **figure 38**.

Les structures chimiques des composés majeurs des HE sont indiquées dans la **figure 39**.

Les pourcentages des composés chimiques de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* de chaque région sont rapportés dans les **figures 40-44**.

Tableau 14. Composition chimique des huiles essentielles des 5 populations d'*O. glandulosum* Desf.

Composés ^a	HE %						
	IR calc. ^b	IR lit. ^c	Sétif	Mila	Bordj	M'sila	El Oued
(2E)-Hexenal	846	846	^d tr	-	0.1	0.1	-
3-Heptanone	883	890	tr	-	-	tr	-
α-Thujene	918	924	1.2	1.0	0.7	0.5	0.4
α-Pinene	923	932	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4
Camphene	936	946	tr	tr	tr	tr	-
Sabinene	962	969	tr	tr	tr	-	-
β-Pinene	965	974	0.1	0.1	0.1	0.1	tr
1-Octen-3-ol	972	974	0.1	0.2	0.2	0.4	0.2
3-Octanone	982	979	tr	0.1	0.1	0.1	tr
Myrcene	985	988	1.4	1.2	0.8	1.0	0.7
3-Octanol	994	988	-	-	-	tr	-
α-Phellandrene	1000	1002	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
δ-3-Carene	1005	1008	tr	tr	tr	tr	-
α-Terpinene	1011	1014	2.6	2.2	1.2	1.7	1.4
p-Cymene	1019	1025	9.7	10.3	8.5	13.9	11.6
Sylvestrene	1022	1032	0.4	0.3	0.2	0.3	0.2
(Z)-β-Ocimene	1034	1032	tr	tr	tr	tr	-
(E)-β-Ocimene	1044	1044	tr	tr	tr	tr	-
γ-Terpinene	1053	1054	21.8	19.4	9.8	14.2	13.4
cis-Sabinene hydrate	1061	1065	tr	tr	tr	tr	-
(2Z)-Hexenal diethyl acetal	1079	1081	-	tr	-	tr	-
Terpinolene	1082	1086	tr	tr	tr	tr	-
p-Cymenene	1084	1089	-	-	tr	tr	-
trans-Sabinene hydrate	1093	1098	tr	tr	tr	tr	-
Linalool	1097	1095	0.6	0.7	0.6	0.7	0.3
Borneol	1158	1165	tr	tr	0.1	0.1	tr
Terpinen-4-ol	1170	1174	0.3	0.2	0.3	0.4	0.1
p-Cymen-8-ol	1182	1179	tr	tr	tr	0.1	-
α-Terpineol	1185	1186	0.3	0.3	0.4	0.4	0.1

<i>cis</i> -Dihydro carvone	1192	1191	-	-	tr	tr	-
<i>trans</i> -Dihydro carvone	1200	1200	-	-	tr	-	-
Thymol, methyl ether	1231	1232	0.1	0.1	tr	0.2	0.1
Carvacrol, methyl ether	1240	1241	tr	tr	0.2	0.1	0.1
Carvenone	1258	1255	tr	-	-	tr	-
Thymol	1295	1289	56.3	51.0	15.1	40.1	25.3
Carvacrol	1301	1298	2.8	10.9	59.6	23.4	45.1
Thymol acetate	1350	1349	tr	-	-	tr	-
Carvacrol acetate	1367	1370	-	-	-	tr	-
(<i>E</i>)-Caryophyllene	1403	1417	1.2	0.8	0.6	0.7	0.3
<i>trans</i> - α -Bergamotene	1424	1432	-	-	-	tr	-
α -Humulene	1436	1452	tr	tr	tr	tr	-
β -Bisabolene	1495	1505	0.1	0.1	0.2	0.4	tr
δ -Cadinene	1507	1522	-	-	-	tr	-
β -Sesquiphellandrene	1509	1521	0.2	0.2	0.3	0.1	-
Caryophyllene oxide	1562	1582	tr	0.1	0.1	0.2	-
<hr/>							
Composés groupés (%)							
Monoterpènes hydrocarbonés			37.9	35.1	21.9	32.2	28.2
Monoterpènes oxygénés			60.4	63.2	76.2	65.2	71.1
Sesquiterpènes hydrocarbonés			1.4	1.1	1.2	1.3	0.3
Sesquiterpènes oxygénés			tr	0.1	0.1	0.2	-
Autres			0.3	0.4	0.6	0.9	0.4
<hr/>							
Nombre de composés identifiés			37	34	37	43	21
Total identifié (%)			99.9	99.9	99.9	99.8	100.0

^a Composés énumérés dans l'ordre de leur élution. ^b IR calc. : indice de rétention calculé. ^c IR lit.: indice de rétention reporté dans la littérature. ^d tr: trace.

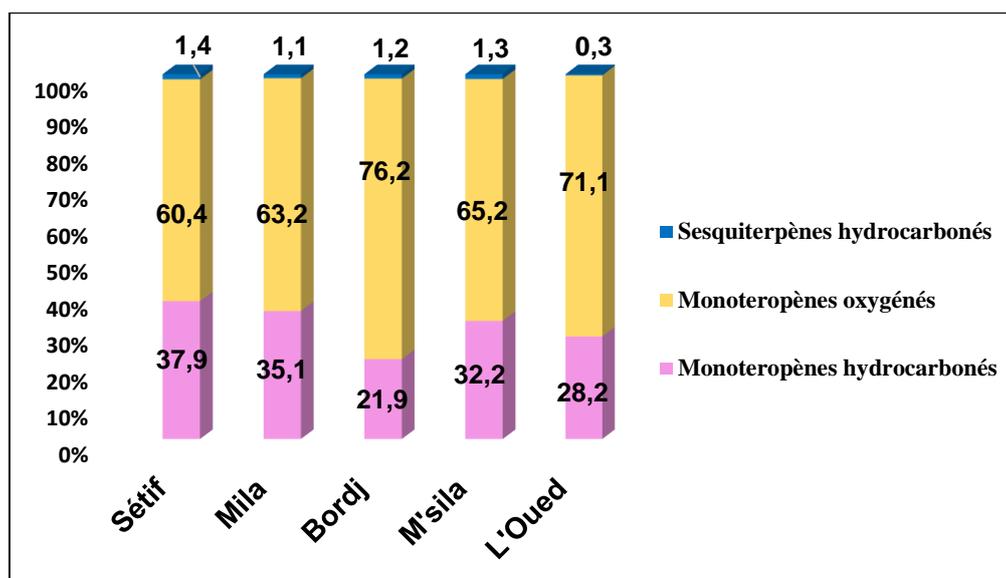


Figure 38. Pourcentage de détection des principales familles de composés chimiques dans les cinq huiles essentielles d'*O. glandulosum*.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) a permis l'identification de 43 composés dans les HE de M'sila, 37 dans les HE de Sétif, 37 dans les HE de Bordj, 34 dans les HE de Mila et 21 dans les HE d'El Oued, ce qui représente 99.8 à 100 % de la composition totale des HE.

La composition des HE est caractérisée par un taux élevé en monoterpènes oxygénés (60.4–76.2 %) et hydrocarbonés (21.9–37.9 %), qui, ensemble, représentent presque la totalité des huiles. À l'inverse, les sesquiterpènes (oxygénés ou hydrocarbonés) sont présents en faibles quantités.

Quatre composés majeurs ont été détectés dans toutes les 5 HE, thymol (15.1–56.3 %), carvacrol (2.8–59.6 %), γ -terpinène (9.8–21.8 %) et *p*-cymène (8.5–13.9 %). Le thymol était prédominant dans Les HE de Sétif (56.3 %), Mila (51.0 %) et M'sila (40.1 %), tandis que le carvacrol était le principal constituant des HE de Bordj (59.6 %) et d'El Oued (45.1 %).

D'un point de vue qualitatif, nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature par Ruberto *et al.* (2002); Belhattab *et al.* (2005); Sari *et al.* (2006) et Bendahou *et al.* (2008), où les monoterpènes oxygénés et hydrocarbonés sont prédominants et thymol, carvacrol, γ -terpinène et *p*-cymène sont les composés majeurs. Cependant, les concentrations relatives des composés diffèrent d'une HE à l'autre. Trois études réalisées sur des HE d'*O. glandulosum*, dont deux algériennes (Ruberto *et al.*, 2002; Belhattab *et al.*, 2005) et une tunisienne (Béjaoui *et al.*, 2013) ont indiqué la prédominance du carvacrol présent avec des taux de 53.2–63.7 %, 45.0–47.0 % et 61.1–83.4 % respectivement. Les taux de carvacrol obtenus dans notre étude dans les HE des

régions de Bordj (59.6 %) et d'El-Oued (45.1 %) sont relativement proches de ceux rapportés précédemment en Algérie mais inférieurs à ceux de la Tunisie.

D'autres études réalisées sur la même espèce récoltée dans d'autres localités ont montré que le thymol était le composant prédominant. Ces études ont rapporté des taux de thymol de 36.7-37.8 % (Ruberto *et al.*, 2002), 41.0-49.5 % (Bekhechi *et al.*, 2008), 41.6 % (Bendahou *et al.*, 2008) et 41.6 % (Benbelaïd *et al.*, 2014). Ces résultats sont proches des nôtres concernant l'HE de M'sila (40.1 %). Cependant, les taux de thymol, obtenus dans notre étude pour les HE de Sétif (56.3 %) et de Mila (51.0 %) sont supérieurs aux résultats précédents. Dans une autre étude, Khalfi *et al.* (2008) ont rapporté des quantités comparables des deux composés thymol (38.8 %) et carvacrol (32.9 %). Inversement, Méchergui *et al.* (2010) ont révélé que le *p*-cymène (36.0 %, 40.0 % et 46.0 %) suivi du thymol (32.0 %, 39.0 % et 18.0 %) étaient les principaux composants détectés dans les HE d'*O. glandulosum* provenant de trois localités : Nefza, Bargou et Krib respectivement, dans le nord de la Tunisie.

Bien que toutes les études précédentes (y compris la nôtre) aient porté sur la même espèce végétale, *O. glandulosum* Desf., nous avons observé des différences dans la composition chimique, en particulier dans la quantité des principaux composants des HE. Cela pourrait être dû à des variations dans de nombreux facteurs; génétiques : du fait de l'existence de chimiotypes très fréquents chez les plantes à HE; physiologiques : le métabolisme secondaire de la plante diffère d'un stade de développement à un autre; pédologiques et climatiques relatifs au type du sol et son acidité, la chaleur, l'hygrométrie, la photopériode, etc. Le métabolisme secondaire de la plante est directement influencé par ces derniers. Ces différences dans la composition chimique sont également le fait des variations analytiques comme l'existence de différents procédés d'extraction d'HE (Regnault-Roger *et al.*, 2008).

Dans notre étude, les cinq échantillons ont été collectés au cours de la même période (même stade de développement). De plus, les mêmes parties de plantes et le même procédé d'extraction ont été utilisés pour l'obtention des HE. Cependant, des différences climatiques et pédologiques ont été observées entre les différents sites de collection. Les régions de M'sila et d'El-Oued sont caractérisées par des températures élevées et de faibles taux de précipitation. En outre, les échantillons de Sétif, Mila et Bordj ont été collectés dans des sites rocheux, situés à de hautes altitudes.

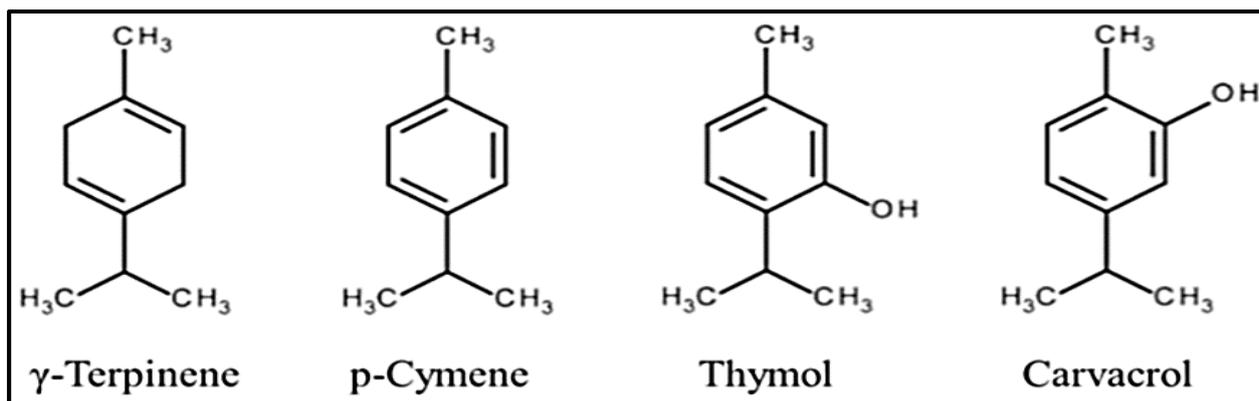


Figure 39. Structure chimique des composés majoritaires des huiles essentielles d'*O. glandulosum*.

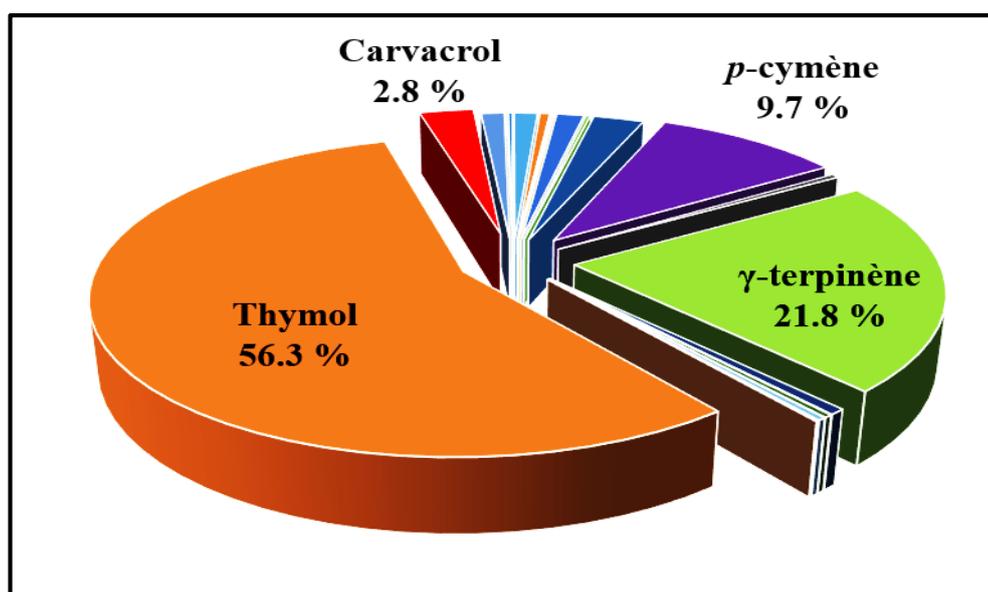


Figure 40. Pourcentage des composés chimiques de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* (Sétif).

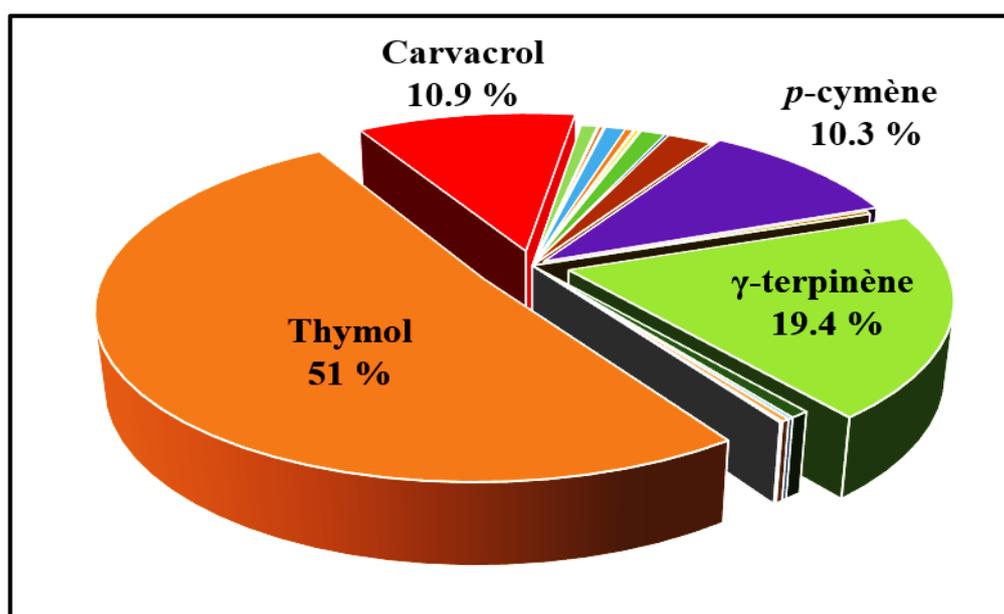


Figure 41. Pourcentage des composés chimiques de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* (Mila).

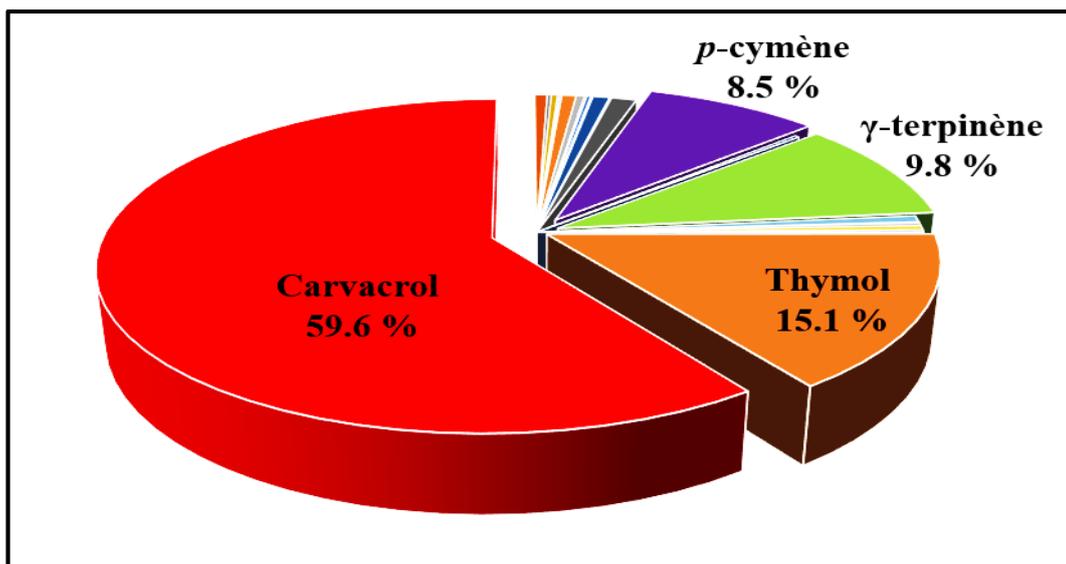


Figure 42. Pourcentage des composés chimiques de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* (Bordj).

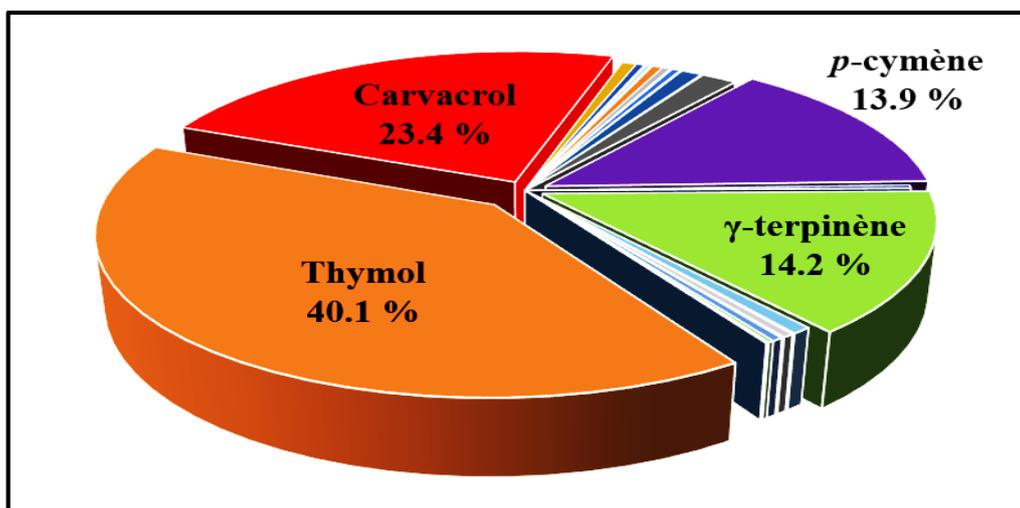


Figure 43. Pourcentage des composés chimiques de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* (M'sila).

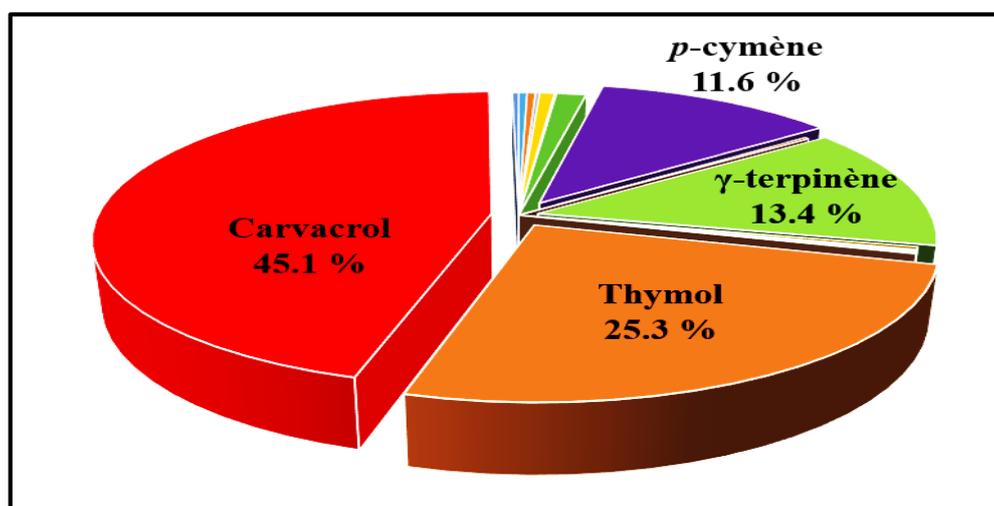


Figure 44. Pourcentage des composés chimiques de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* (L'Oued).

V.9. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Les résultats du test de diffusion des disques sont rapportés dans le **tableau 15** et illustrés dans la **figure 45**, ceux des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) sont détaillés dans le **tableau 16**.

Toutes les HE présentaient une bonne activité antibactérienne à la fois sur les souches de référence *E. coli* ATCC 25922 et *E. coli* J53 et sur les souches multirésistantes. À la dilution 1/2, toutes les HE ont généré des zones d'inhibition d'un diamètre ≥ 23 mm. Les diamètres des zones d'inhibition de la gentamicine (antibiotique de référence) étaient inférieurs à 23 mm pour les souches les plus sensibles dont les souches de référence, ils étaient nuls pour les autres souches multirésistantes.

L'HE de Bordj, contenant la plus grande quantité de monoterpènes oxygénés (76.2 %) et de carvacrol (59.6 %), a montré la plus forte activité antibactérienne (diamètres de 12 à 24.5 mm à la dilution 1/10).

Concernant l'activité des composés purs, le carvacrol et le thymol ont été les plus actifs et ont montré une bonne activité antibactérienne (valeurs des CMI et CMB variant de 0.25 à 0.5 mg/mL). Le *p*-cymène a été moins actif avec des diamètres des zones d'inhibition entre 10 et 12.5 mm, à la dilution 1/2, et des valeurs de CMI et CMB > 2 mg/mL.

Le γ -terpinène a été totalement inactif contre toutes les souches. En outre, Les associations *p*-cymène plus carvacrol et *p*-cymène plus thymol ont donné des résultats très similaires avec des diamètres des zones d'inhibition entre 28 et 32 mm.

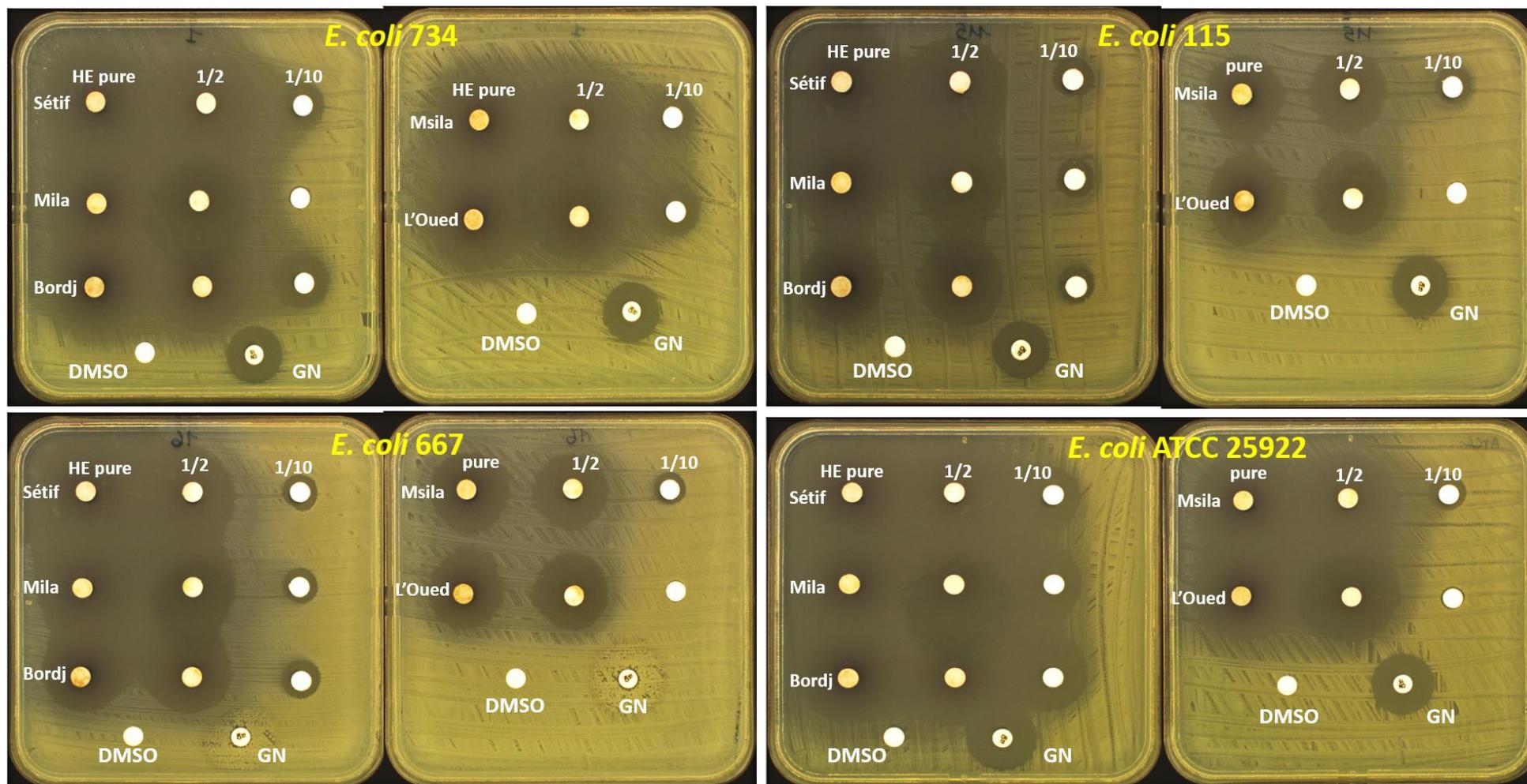
Tableau 15. Activité antibactérienne des huiles essentielles de 5 populations d'*O. glandulosum* exprimée en diamètre des zones d'inhibition.

Ville de collection	Dilutions	Diamètres d'inhibition (mm) ± SD							
		Souches bactériennes testées (phénotypes de résistance)							
		<i>E. coli</i> 734 (BLSE)	<i>E. coli</i> 854 (BLSE)	<i>E. coli</i> 292 (BLSE)	<i>E. coli</i> 229 (BLSE)	<i>E. coli</i> 667 (BLSE+CRB)	<i>E. coli</i> 115 (COL R)	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> J53
Sétif	Pure	39.6 ±0.77	34.8 ±0.56	36 ±1.34	31.2 ±0.56	31 ± 1.41	32.1 ±0.98	38.4 ±0.84	38.2 ±0.28
	1/2	36.7 ±0.56	33.5 ±0.98	35.4 ±0.63	31 ±1.34	27.9 ±0.56	30.7 ±1.55	37.1 ±0.98	36.4 ±1.97
	1/10	14.6 ±0.28	15.4 ±0.28	15.6 ±0.14	13.9 ±0.0	12.0 ±0.0	13.9 ±0.56	17.9 ±1.41	22.0 ± 0.0
Mila	Pure	38.5 ±2.12	36.3 ±0.7	34.9 ±0.56	30.6 ±2.47	32.6 ±1.27	30.9 ±0.42	39.6 ±1.97	38.4 ±1.69
	1/2	37.4 ±0.84	35.4 ±0.28	33.1 ±0.63	29.5 ±0.56	30.9 ±0.56	28.9 ±0.98	37.4 ±0.0	37.6 ±0.28
	1/10	-	15.4 ±0.84	-	-	11.9 ±0.42	12.4 ±0.28	18.6 ±0.0	22.8 ±0.84
Bordj	Pure	37.7 ±0.56	35.5 ±1.83	35.1 ±0.98	32.6 ±0.28	27.1 ±0.0	26.3 ±0.84	38.4 ±0.84	37.6 ±0.77
	1/2	36.9 ±0.0	34 ±0.0	33.7 ±0.56	30.1 ±2.12	24.4 ±0.28	25.6 ±1.41	38.2 ±0.0	35.6 ±0.28
	1/10	17.2 ±1.13	16.4 ±0.56	17.3 ±0.84	16.2 ±0.0	12.1 ±0.98	12 ±0.28	21.8 ±0.84	24.5 ±1.83
M'sila	Pure	36.3 ±1.55	35.5 ±0.0	35.1 ±0.98	32.1 ±0.63	28.2 ±0.28	24.6 ±1.27	32 ±0.28	36.2 ±0.56
	1/2	35.9 ±1.27	32.3 ±0.84	33.8 ±0.0	29.9 ±0.28	24.9 ±0.42	23.6 ±0.42	31 ±0.28	32.4 ±0.56
	1/10	15.0 ±0.14	14.7 ±0.28	15.5 ±0.84	12.9 ±0.0	10.8 ±1.13	12.8 ±0.0	12.8 ±0.84	17.3 ±0.84
El Oued	Pure	36.8 ±0.28	32.6 ±1.41	36.2 ±0.0	30.4 ±0.56	26.7 ±0.56	26.3 ±0.7	35.7 ±1.55	34.6 ±1.27
	1/2	34.8 ±0.84	32.3 ±0.98	35.4 ±0.56	28.5 ±1.69	24.8 ±0.28	23 ±1.55	32.4 ±0.0	32.7 ±0.56
	1/10	14.8 ±0.0	13.1 ±0.98	16.7 ±0.56	-	-	-	-	-
Composés purs									
carvacrol	Pure	36.0 ±0.0	34.0 ±0.7	34.5 ±0.7	30.0 ±0.0	31.5 ±0.7	32.5 ±0.7	36.5 ±0.7	36.5 ±0.7
	1/2	30.5 ±0.7	30.5 ±0.7	31.0 ±0.0	28.5 ±0.7	30.0 ±0.0	30.5 ±0.7	31.0 ±0.0	30.5 ±0.7
	1/10	28.0 ±0.0	27.0 ±0.0	28.5 ±0.7	26.0 ±0.0	26.0 ±0.0	27.0 ±0.0	28.0 ±0.0	28.0 ±0.0
thymol	Pure	34.5 ±0.7	33.0 ±0.0	34.0 ±0.0	29.0 ±0.0	30.0 ±0.0	32.0 ±0.0	35.0 ±0.0	36.0 ±0.0
	1/2	30.0 ±0.0	30.0 ±0.0	30.0 ±0.7	28.0 ±0.0	29.0 ±0.0	30.0 ±0.0	30.5 ±0.7	31.0 ±0.0
	1/10	27.0 ±0.0	27.0 ±0.0	28.0 ±0.7	26.5 ±0.7	26.0 ±0.0	27.0 ±0.0	28.0 ±0.0	28.0 ±0.0
<i>p</i> -cymène	Pure	14.0 ±0.0	14.0 ±0.0	14.5 ±0.7	12.0 ±0.0	13.5 ±0.7	14.0 ±0.0	14.0 ±0.0	14.0 ±0.0
	1/2	12.5 ±0.7	12.0 ±0.0	11.5 ±0.7	10.0 ±0.0	10.0 ±0.0	12.0 ±0.0	12.0 ±0.0	11.5 ±0.7
	1/10	10.0 ±0.0	9.0 ±0.0	10.0 ±0.0	-	-	8.0 ±0.0	10.0 ±0.0	10.0 ±0.0
γ -terpinène	Pure	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/2 1/10	-	-	-	-	-	-	-	-
carvacrol + <i>p</i> -cymène	50/50 (%) (v/v)	30.0 ±0.0	30.0 ±0.0	30.0 ±0.0	29.0 ±0.0	30.0 ±0.0	30.0 ±0.0	30.5 ±0.7	31.0 ±0.0
thymol + <i>p</i> -cymène	50/50 (%) (v/v)	30.0 ±0.0	30.0 ±0.0	30.0 ±0.0	28.0 ±0.0	29.0 ±0.0	30.0 ±0.0	32.0 ±0.0	31.0 ±0.0
Gentamicine (C +)		18.7 ±0.21	-	-	17.3 ±0.84	-	18.6 ±0.63	21.4 ±0.77	22.7 ±0.91
DMSO (C-)		-	-	-	-	-	-	-	-

BLSE: β -lactamase à spectre étendu, CRB: productrice de carbapénémase, COL R: résistante à la colistine, DMSO: diméthyl sulfoxyde, SD: standard déviation, C : contrôle, v: volume, (-): aucune activité observée.

Tableau 16. Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) des huiles essentielles d'*O. glandulosum* et des principaux composés actifs purs.

Ville de collection d' <i>O. glandulosum</i>	CMI (CMB) mg/mL							
	<i>E. coli</i> 734	<i>E. coli</i> 854	<i>E. coli</i> 292	<i>E. coli</i> 229	<i>E. coli</i> 667	<i>E. coli</i> 115	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> J53
Sétif	1 (1)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	1 (1)	1 (1)
Mila	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	1 (1)	2 (2)
Bordj	1 (2)	2 (2)	1 (1)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	1 (1)	1 (1)
M'sila	1 (1)	1 (1)	1 (1)	2 (2)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
El Oued	1 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	1 (2)	2 (2)	1 (1)	2 (2)
Composés bioactifs majeurs								
carvacrol	0.25 (0.25)	0.5 (0.5)	0.25 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)
thymol	0.25 (0.25)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)
<i>p</i> -cymène	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
Gentamicine mg/L	2	> 4	> 4	2	> 4	2	1	1



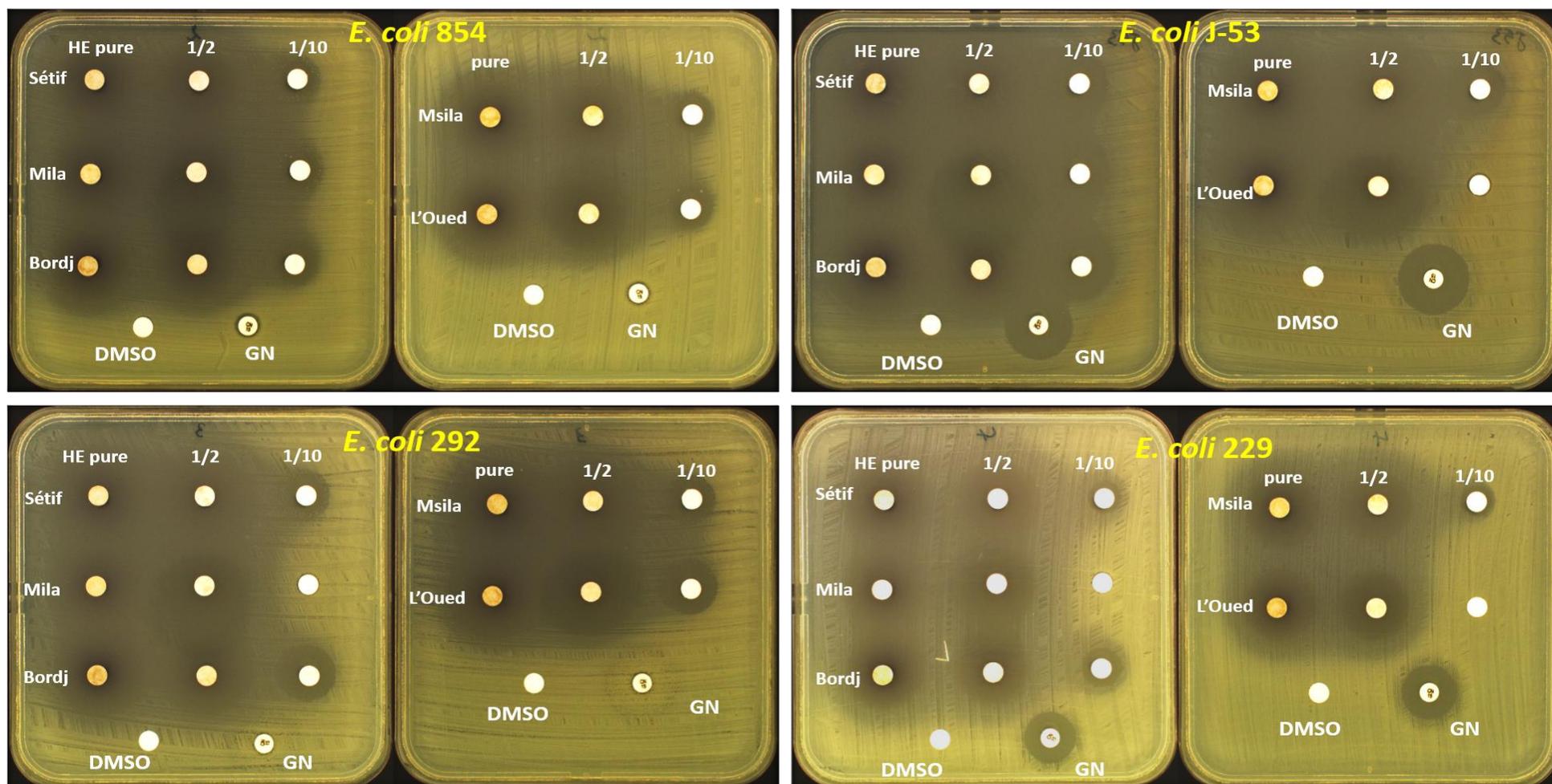


Figure 45. Photos de l'activité antibactérienne des différentes huiles essentielles.

À notre connaissance, il s'agit de la première description des propriétés antibactériennes des HE d'*O. glandulosum* sur des souches uropathogènes multirésistantes.

Dans une étude réalisée sur l'HE d'*O. glandulosum* en Tunisie, Béjaoui et al. (2013) ont observé une bonne activité sur la souche de référence *E. coli* ATCC 8739. Une bonne activité des HE d'*O. glandulosum* algérien a également été observée sur la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 (Sari et al., 2006) et sur trois souches cliniques (E1, E2 et E3) (Bendahou et al., 2008).

Les HE contenant de grandes quantités de monoterpènes phénoliques, tels que le carvacrol et le thymol, sont largement reconnues pour leurs remarquables propriétés antibactériennes (Chouhan et al., 2017). Ces composés sont capables de s'aligner entre les chaînes d'acides gras pour former une sorte de canal à travers la membrane et sont également capables d'interagir avec les protéines transmembranaires, affectant ainsi la perméabilité des cellules microbiennes. Ils sont également capables de désintégrer la membrane externe des bactéries à Gram négatif en libérant les lipopolysaccharides (LPS) et en augmentant la perméabilité de la membrane cytoplasmique (Hyldgaard et al., 2012). Un autre effet microbien important attribué à ces monoterpènes phénoliques est leur interférence avec le système de génération de l'ATP (Hyldgaard et al., 2012).

Étant donné que nos cinq HE étaient riches en thymol et/ou en carvacrol, nous suggérons que les activités antibactériennes obtenues sont liées à la forte concentration de ces deux constituants. Il est supposé que ces composés agissent en endommageant la structure et la fonction de la membrane cytoplasmique (Sikkema et al., 1995). Cependant, il a également été rapporté que l'activité antibactérienne des HE pourrait être affectée par d'autres composants mineurs, ainsi que par une interaction possible entre différents composés (Béjaoui et al., 2013). Par exemple, le *p*-cymène, précurseur biologique du carvacrol, peut synergiser l'efficacité des monoterpènes phénoliques tels que le thymol et le carvacrol (Burt, 2004). Le *p*-cymène est hautement hydrophobe et provoque un certain gonflement de la membrane cytoplasmique, facilitant ainsi le transport de composés actifs à travers la bicouche lipidique. Nos résultats contredisent les études précédentes sur l'activité antibactérienne du *p*-cymène (Burt, 2004) rapportant qu'il s'agit d'un agent actif sur les souches uropathogènes multirésistantes et qu'il pourrait éventuellement être utilisé dans des mélanges synergiques avec des monoterpènes phénoliques.

Enfin, selon les résultats de notre étude, les HE d'*O. glandulosum* pourraient être suggérées pour traiter ou prévenir certaines infections à bactéries multirésistantes comme les infections urinaires. D'autres études sont encore nécessaires pour établir les modalités d'instauration de ces HE et évaluer la sécurité en matière d'utilisation clinique.

CONCLUSION

Conclusion

Escherichia coli, l'agent causal principal des infections urinaires, est devenu plus résistante à de nombreux antibiotiques disponibles, y compris les céphalosporines de troisième génération, les carbapénèmes et à moindre degré à la colistine avec des mécanismes de résistance qui ne cessent d'évoluer et dont la détection revêt un intérêt épidémiologique majeur. Les infections causées par de telles bactéries multirésistantes sont devenues un problème de santé publique majeur dans le monde entier.

Actuellement, il y a un grand besoin de rechercher de nouvelles molécules naturelles comme les huiles essentielles (HE) qui ont des effets antibactériens et qui peuvent agir contre ces souches multirésistantes.

Cette étude, la première au CHU de Sétif, a révélé la présence d'un taux élevé de 17.2 % de souche d'*E. coli* productrices de BLSE dans les infections urinaires. Des taux de résistance marquée ont été également enregistrés pour les quinolones, le triméthoprim-sulfaméthoxazole et la gentamicine.

La caractérisation moléculaire des gènes de résistance a permis de détecter divers gènes de résistance aux β -lactamines (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY-2} et *bla*_{OXA-48}) avec prédominance des *bla*_{CTX-M-15}. Nous avons isolé pour la première fois en Algérie, une souche clinique d'*E. coli* co-exprimant une BLSE de type CTX-M-15 en association avec une céphalosporinase plasmidique CMY-2, une carbapénémase OXA-48 et une pénicillinase TEM-1. L'émergence de souches hébergeant plusieurs β -lactamases simultanément (BLSE, OXA-48 et AmpC) représente un problème de santé publique majeur. Cette étude nous a permis aussi de détecter des gènes de résistance aux aminosides (*aadA1*), aux quinolones (*qnrB* et *aac(6')-Ib-cr*) et pour la première fois à l'Est algérien, nous avons isolé une souche clinique d'*E. coli* hébergeant le gène *mcr-1* codant pour la résistance à la colistine.

La présente étude décrit le développement d'un nouveau test de PCR en temps réel (qPCR) dédié à la recherche du nouveau gène *mcr-8* impliqué dans la résistance à la colistine. Ce test peut détecter rapidement le gène *mcr-8* dans tout échantillon d'ADN, y compris les échantillons d'ADN génomique ou métagénomique, en moins de 2 heures. Ce système présente une sensibilité, une reproductibilité et une spécificité élevées ce qui en fait un outil intéressant pouvant être facilement appliqué dans tout laboratoire de microbiologie clinique disposant d'installations moléculaires.

Le groupage phylogénétique et le typage plasmidique ont révélé la prédominance du phylogroupe B2 dans 49.3 % des souches et la présence de plasmides de différents groupes d'incompatibilité (Inc11, IncFIB, IncHI2).

L'extraction des HE des parties aériennes de 5 populations d'*O. glandulosum* par hydrodistillation a donné des rendements variant entre 1.8 et 5.6 % (m/m). L'analyse chimique par CPG/SM a permis l'identification de 43, 37, 37, 34 et 21 composés pour les HE de M'sila, Sétif, Bordj Bou Arreridj, Mila et El Oued respectivement. Quatre composés majeurs ont été détectés dans toutes les 5 HE, thymol (15.1–56.3 %), carvacrol (2.8–59.6 %), γ -terpinène (9.8–21.8 %) et *p*-cymène (8.5–13.9 %).

Les tests d'activité antibactérienne ont montré que toutes les HE avaient une bonne activité antibactérienne sur toutes les souches de référence et les souches multirésistantes d'*E. coli*. À la dilution 1/2, toutes les HE ont généré des zones d'inhibition d'un diamètre ≥ 23 mm. L'HE de Bordj, contenant la plus grande quantité de monoterpènes oxygénés (76.2 %) et de carvacrol (59.6 %), était le plus actif.

Enfin, cette étude souligne l'augmentation de la résistance aux antibiotiques au CHU de Sétif. Il est indispensable aujourd'hui de prendre certaines mesures strictes comme l'utilisation rationnelle des antibiotiques disponibles, le renforcement des mesures d'hygiène hospitalière et la mise en place des réseaux locaux et nationaux de surveillance de la résistance aux antibiotiques afin de limiter la dissémination des souches multirésistantes.

Les HE d'*O. glandulosum* pourraient représentées un bon alternatif pour le traitement des infections à bactéries multirésistantes. D'autres études sont encore nécessaires pour établir les modalités d'instauration de ces HE et évaluer la sécurité en matière d'utilisation clinique.

En perspective à cette étude, il serait intéressant de compléter :

- L'analyse épidémiologique par le typage MLST (multilocus sequence typing) des souches et des plasmides,
- L'étude du potentiel de virulence chez les souches multirésistantes,
- L'évaluation de la cytotoxicité des HE d'*O. glandulosum*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Adams, R. P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectrometry. 4th, ed, *Allured Publishing Corporation*, 804p.
- Agabou, A., Lezzar, N., Ouchenane, Z., Khemissi, S., Satta, D., Sotto, A., Lavigne, J.-P., & Pantel, A. (2016). Clonal relationship between human and avian ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates in North-Eastern Algeria. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **35**(2), 227–234.
- Agabou, A., Pantel, A., Ouchenane, Z., Lezzar, N., Khemissi, S., Satta, D., Sotto, A., & Lavigne, J.-P. (2014). First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **33**(9), 1641–1646.
- Alanazi, M. Q., Alqahtani, F. Y., & Aleanizy, F. S. (2018). An evaluation of *E. coli* in urinary tract infection in emergency department at KAMC in Riyadh, Saudi Arabia: retrospective study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **17**(1), 3.
- Albert, X., Huertas, I., Pereiro, I. I., Sanfelix, J., Gosalbes, V., & Perrota, C. (2004). Antibiotics for preventing recurrent urinary tract infection in non-pregnant women. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3), CD001209.
- Aleksic, V., & Knezevic, P. (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, **169**(4), 240–254.
- Alem, N., Frikh, M., Srfi, A., Maleb, A., Chadli, M., Sekhsokh, Y., Louzi, L., Ibrahim, A., Lemnouer, A., & Elouennass, M. (2015). Evaluation of antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated in Rabat University Hospital (Morocco). *BMC Research Notes*, **8**, 392.
- Al-Jamei, S. A., Albsoul, A. Y., Bakri, F. G., & Al-Bakri, A. G. (2019). Extended-spectrum β -lactamase producing *E. coli* in urinary tract infections: A two-center, cross-sectional study of prevalence, genotypes and risk factors in Amman, Jordan. *Journal of Infection and Public Health*, **12**(1), 21–25.
- Allahverdiyev, A., Duran, N., Ozguven, M., & Koltas, S. (2004). Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytomedicine*, **11**(7–8), 657–661.
- Allegranzi, B., Bagheri Nejad, S., Combescure, C., Graafmans, W., Attar, H., Donaldson, L., & Pittet, D. (2011). Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)*, **377**(9761), 228–241.
- Alos, J. I. (2005). [Epidemiology and etiology of urinary tract infections in the community. Antimicrobial susceptibility of the main pathogens and clinical significance of resistance]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, **23 Suppl 4**, 3–8.

- Alouache, S., Estepa, V., Messai, Y., Ruiz, E., Torres, C., & Bakour, R. (2014). Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **20**(1), 30–38.
- Alouache, S., Kada, M., Messai, Y., Estepa, V., Torres, C., & Bakour, R. (2012). Antibiotic resistance and extended-spectrum β -lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). *Microbes and Environments*, **27**(1), 80–86.
- Alsharapy, S. A., Yanat, B., Lopez-Cerero, L., Nasher, S. S., Díaz-De-Alba, P., Pascual, Á., Rodríguez-Martínez, J.-M., & Touati, A. (2018). Prevalence of ST131 Clone Producing Both ESBL CTX-M-15 and AAC(6')Ib-cr Among Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Yemen. *Microbial Drug Resistance*, **24**(10), 1537–1542.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **289**(1036), 321–331.
- Andriole, V. T. (2005). The quinolones: past, present, and future. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, **41** Suppl 2, S113-9.
- Anssour, L., Messai, Y., Derkaoui, M., Alouache, S., Estepa, V., Somalo, S., Torres, C., & Bakour, R. (2014). ESBL, plasmidic AmpC, and associated quinolone resistance determinants in coliforms isolated from hospital effluent: first report of qnrB2, qnrB9, qnrB19, and blaCMY-4 in Algeria. *Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)*, **26**(2), 74–79.
- Anssour, L., Messai, Y., Estepa, V., Torres, C., & Bakour, R. (2016). Characteristics of ciprofloxacin-resistant Enterobacteriaceae isolates recovered from wastewater of an Algerian hospital. *Journal of Infection in Developing Countries*, **10**(7), 728–734.
- Aquilini, E., Merino, S., Knirel, Y. A., Regué, M., & Tomás, J. M. (2014). Functional identification of *Proteus mirabilis* eptC gene encoding a core lipopolysaccharide phosphoethanolamine transferase. *International Journal of Molecular Sciences*, Department Microbiology and Parasitology, Faculty Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain. eaquilini@ub.edu, pp. 6689–6702.
- Arvand, M., Bettge-Weller, G., Fruth, A., Uphoff, H., & Pfeifer, Y. (2015). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (stx1)-positive *Escherichia coli* O91:H14 carrying blaCTX-M-15 on an IncI1-ST31 plasmid isolated from a human patient in Germany. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, **305**(3), 404–407.
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., & Elaissari, A. (2015). Essential Oils: From Extraction to Encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, **483**(1), 220–243.
- Ayad, A., Drissi, M., de Curraize, C., Dupont, C., Hartmann, A., Solanas, S., Siebor, E., Amoureux, L., & Neuwirth, C. (2016). Occurrence of ArmA and RmtB Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methylases in Extended-Spectrum beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* in Algerian Hospitals. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1409.

- Azap, O. K., Arslan, H., Serefhanoglu, K., Colakoglu, S., Erdogan, H., Timurkaynak, F., & Senger, S. S. (2010). Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase positivity in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **16**(2), 147–151.
- Baba Ahmed, Z., Ayad, A., Mesli, E., Messai, Y., Bakour, R., & Drissi, M. (2012). CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in the intensive care unit of Tlemcen Hospital, Algeria. *Eastern Mediterranean Health Journal = La Revue de Sante de La Mediterranee Orientale = Al-Majallah Al-Sihhiyah Li-Sharq Al-Mutawassit*, **18**(4), 382–386.
- Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., Decre, D., Genel, N., Boucherit-Otmani, Z., Arlet, G., & Drissi, M. (2013). Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010). *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **19**(3), 185–190.
- Bachiri, T., Bakour, S., Ladjouzi, R., Thongpan, L., Rolain, J. M., & Touati, A. (2017). High rates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in wild boars and Barbary macaques in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **8**, 35–40.
- Bachiri, T., Bakour, S., Lalaoui, R., Belkebla, N., Allouache, M., Rolain, J. M., & Touati, A. (2018). Occurrence of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Isolates in the Wildlife: First Report of OXA-48 in Wild Boars in Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **24**(3), 337–345.
- Bachiri, T., Lalaoui, R., Bakour, S., Allouache, M., Belkebla, N., Rolain, J. M., & Touati, A. (2018). First Report of the Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-1* in *Escherichia coli* ST405 Isolated from Wildlife in Bejaia, Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **24**(7), 890–895.
- Bado, I., Gutierrez, C., Garcia-Fulgueiras, V., Cordeiro, N. F., Araujo Pirez, L., Seija, V., Bazet, C., Rieppi, G., & Vignoli, R. (2016). CTX-M-15 in combination with *aac(6')-Ib-cr* is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **6**, 5–9.
- Bajaj, P., Singh, N. S., & Viridi, J. S. (2016). *Escherichia coli* β -Lactamases: What Really Matters. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 417.
- Bakkali, F., Averbek, S., Averbek, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, **46**(2), 446–475.
- Bakour, S., Touati, A., Bachiri, T., Sahli, F., Tiouit, D., Naim, M., Azouaou, M., & Rolain, J.-M. (2014). First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo-beta-lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, **20**(11), 696–701.
- Barguigua, A., El Otmani, F., Talmi, M., Reguig, A., Jamali, L., Zerouali, K., & Timinouni, M. (2013). Prevalence and genotypic analysis of plasmid-mediated β -lactamases among

- urinary *Klebsiella pneumoniae* isolates in Moroccan community. *The Journal of Antibiotics*, **66**(1), 11–16.
- Basu, S., & Mukherjee, M. (2018). Incidence and risk of co-transmission of plasmid-mediated quinolone resistance and extended-spectrum β -lactamase genes in fluoroquinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli*: a first study from Kolkata, India. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **14**, 217–223.
- Batah, R., Loucif, L., Olaitan, A. O., Boutefnouchet, N., Allag, H., & Rolain, J.-M. (2015). Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing ArmA and CTX-M-15 Mediated High Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **21**(4), 470–476.
- Bauernfeind, A., Grimm, H., & Schweighart, S. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, **18**(5), 294–298.
- Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A., & Boussaid, M. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at different phenological stages. *Journal of Medicinal Food*, **16**(12), 1115–1120.
- Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., & Abdelouahid, D. E. (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, **6**(3), 153–159.
- Belbel, Z., Chettibi, H., Dekhil, M., Ladjama, A., Nedjai, S., & Rolain, J.-M. (2014). Outbreak of an armA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian Hospital. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **20**(4), 310–315.
- Belhattab, R., Larous, L., Figueiredo, A. C., Santos, P. A. G., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2005). *Origanum glandulosum* Desf. grown wild in Algeria: essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, **20**(2), 209–212.
- Belhattab, R., Larous, L., Kalantzakis, G., Boskou, D., & Exarchou, V. (2004). Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *Journal of Food, Agriculture & Environment (JFAE)*.
- Belmahdi, M., Bakour, S., Al Bayssari, C., Touati, A., & Rolain, J.-M. (2016). Molecular characterisation of extended-spectrum beta-lactamase- and plasmid AmpC-producing *Escherichia coli* strains isolated from broilers in Bejaia, Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **6**, 108–112.
- Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Benklaouz, M. B., Rahal, K., & Ben-Mahdi, M.-H. (2018). Characterization of quinolone-resistant Enterobacteriaceae strains isolated from poultry in Western Algeria: First report of qnrS in an *Enterobacter cloacae*. *Veterinary World*, **11**(4), 469–473.
- Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Rahal, K., & Ben-Mahdi, M.-H. (2019). Detection of multidrug resistant *Escherichia coli* in the ovaries of healthy broiler breeders with emphasis on extended-spectrum β -lactamases producers. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **64**, 163–167.

- Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Tahrat, N., Aggoune, N., Rahal, K., & Ben-Mahdi, M.-H. (2018). Isolation of *Escherichia coli* carrying the bla(CTX-M-1) and qnrS1 genes from reproductive organs of broiler breeders and internal contents of hatching eggs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **80**(10), 1540–1543.
- Benbelaid, F., Khadir, A., Abdoune, M. A., Bendahou, M., Muselli, A., & Costa, J. (2014). Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **4**(6), 463–472.
- Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J.-M., Bernardini, A.-F., & Costa, J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, **106**(1), 132–139.
- Benedict, R. G., & Langlykke, A. F. (1947). Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. *Journal of Bacteriology*, **54**(1), 24.
- Berrazeg, M., Hadjadj, L., Ayad, A., Drissi, M., & Rolain, J.-M. (2016). First Detected Human Case in Algeria of mcr-1 Plasmid-Mediated Colistin Resistance in a 2011 *Escherichia coli* Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, United States, pp. 6996–6997.
- Berrehal, D., Boudiar, T., Hichem, L., Khalfallah, A., Kabouche, A., Al-Freihat, A., Ghannadi, A., Sajjadi, E., Mehrabani, M., Safaei-Ghomi, J., & Kabouche, Z. (2010). Comparative composition of four essential oils of *Oregano* used in Algerian and Jordanian folk medicine. *Natural Product Communications*, **5**(6), 957–960.
- Bleibtreu, A. (2016). Déterminants de la virulence extra-intestinale de *Escherichia coli* : de la microbiologie à la clinique. *Journal Des Anti-Infectieux*, **18**(2), 45–51.
- Bohra, P. M., Vaze, A. S., Pangarkar, V. G., & Taskar, A. (1994). Adsorptive recovery of water soluble essential oil components. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **60**(1), 97–102.
- Bouaziz, A., Loucif, L., Ayachi, A., Guehaz, K., Bendjama, E., & Rolain, J.-M. (2018). Migratory White Stork (*Ciconia ciconia*): A Potential Vector of the OXA-48-Producing *Escherichia coli* ST38 Clone in Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **24**(4), 461–468.
- Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., & Ruberto, G. (2013). Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): an ethnopharmacology survey. *Journal of Ethnopharmacology*, **148**(2), 395–402.
- Bourafa, N., Chaalal, W., Bakour, S., Lalaoui, R., Boutefnouchet, N., Diene, S. M., & Rolain, J.-M. (2018). Molecular characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli clinical isolates in Algeria. *Infection and Drug Resistance*, **11**, 735–742.
- Bouzidi, N., Aoun, L., Dekhil, M., Granier, S. A., Poirel, L., Brisabois, A., Nordmann, P., & Millemann, Y. (2011). Co-occurrence of aminoglycoside resistance gene armA in non-Typhi *Salmonella* isolates producing CTX-M-15 in Algeria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, England, pp. 2180–2181.

- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**(4), 933–951.
- Brahmi, S., Touati, A., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Pantel, A., & Lavigne, J.-P. (2018). High Prevalence of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Wild Fish from the Mediterranean Sea in Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **24**(3), 290–298.
- Brisse, S., Milatovic, D., Fluit, A. C., Verhoef, J., & Schmitz, F. J. (2000). Epidemiology of quinolone resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **19**(1), 64–68.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales*, Éditions médicales internationales, *Editions Technique & Documentation*, 1120p.
- Bruyère, F., Cariou, G., Boiteux, J.-P., Hoznek, A., Mignard, J.-P., Escaravage, L., Bernard, L., Sotto, A., Soussy, C.-J., & Coloby, P. (2008). Généralités. *Progrès En Urologie*, **18**, 4–8.
- Bryan, L. E., & Van den Elzen, H. M. (1976). Streptomycin accumulation in susceptible and resistant strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **9**(6), 928–938.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**(3), 223–253.
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**(6), 1211–1233.
- Calbo, E., Romaní, V., Xercavins, M., Gómez, L., Vidal, C. G., Quintana, S., Vila, J., & Garau, J. (2006). Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **57**(4), 780–783.
- Cantón, R., & Coque, T. M. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, **9**(5), 466–475.
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., & Coque, T. M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **14 Suppl 1**, 144–153.
- Canton, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current Opinion in Pharmacology*, **11**(5), 477–485.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**(6), 2227–2238.

- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, **63**(3), 219–228.
- Carbonnelle, É., & Nassif, X. (2011). Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *Med Sci (Paris)*, **27**(10), 882–888.
- Caron, F. (2003). Physiopathologie des infections urinaires nosocomiales. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **33**(9), 438–446.
- Caron, F., Galperine, T., Flateau, C., ... Etienne, M. (2018). Practice guidelines for the management of adult community-acquired urinary tract infections. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **48**(5), 327–358.
- Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldemann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible Salmonella enterica Serotype Typhimurium Isolate. *MBio*, **10**(3). doi:10.1128/mBio.00853-19
- Cattoir, V. (2012). Quinolones: de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. *Revue Francophone Des Laboratoires*, **2012**(445), 79–87.
- Cavallo, J.-D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., & Garrabé, E. (2004). Bêtalactamines. *EMC - Maladies Infectieuses*, **1**(3), 129–202.
- Çetin, B., Çakmakçi, S., & Çakmakçi, R. (2011). The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, TÜBİTAK, pp. 145–154.
- Chabou, S., Leulmi, H., & Rolain, J.-M. (2019). Emergence of mcr-1-mediated colistin resistance in Escherichia coli isolates from poultry in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, Netherlands, pp. 115–116.
- Chemat, F., Lucchesi, M. E., Smadja, J., Favretto, L., Colnaghi, G., & Visinoni, F. (2006). Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta*, **555**(1), 157–160.
- Chemlal, A., Ismaili, F. A., Karimi, I., Elharraqui, R., Benabdellah, N., Bekaoui, S., Haddiya, I., & Bentata, Y. (2015). [Urinary tract infections in chronic renal failure patients hospitalized in nephrology department: bacteriological profile and risk factors]. *The Pan African medical journal*, **20**, 100.
- Chen, L. F., Freeman, J. T., Nicholson, B., ... Anderson, D. J. (2014). Widespread Dissemination of CTX-M-15 Genotype Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae among Patients Presenting to Community Hospitals in the Southeastern United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**(2), 1200–1202.
- Cho, Y. H., Jung, S. Il, Chung, H. S., Yu, H. S., Hwang, E. C., Kim, S.-O., Kang, T. W., Kwon, D. D., & Park, K. (2015). Antimicrobial susceptibilities of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in health care-associated

- urinary tract infection: focus on susceptibility to fosfomycin. *International Urology and Nephrology*, **47**(7), 1059–1066.
- Choe, H.-S., Lee, S.-J., Yang, S. S., Hamasuna, R., Yamamoto, S., Cho, Y.-H., & Matsumoto, T. (2018). Summary of the UAA-AAUS guidelines for urinary tract infections. *International Journal of Urology : Official Journal of the Japanese Urological Association*, **25**(3), 175–185.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils- Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel, Switzerland)*, **4**(3), 58.
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environmental Microbiology Reports*, **5**(1), 58–65.
- Colodner, R., Rock, W., Chazan, B., Keller, N., Guy, N., Sakran, W., & Raz, R. (2004). Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **23**(3), 163–167.
- Coque, T. M., Novais, Â., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Cantón, R., & Nordmann, P. (2008). Dissemination of Clonally Related Escherichia coli Strains Expressing Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases*, pp. 195–200.
- Cortes-Penfield, N. W., Trautner, B. W., & Jump, R. L. P. (2017). Urinary Tract Infection and Asymptomatic Bacteriuria in Older Adults. *Infectious Disease Clinics of North America*, **31**(4), 673–688.
- Crémet, L., Caroff, N., Dauvergne, S., Reynaud, A., Lepelletier, D., & Corvec, S. (2011). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL Enterobacteriaceae clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. *Pathologie Biologie*, **59**(3), 151–156.
- Dahmen, S., Bettaieb, D., Mansour, W., Boujaafar, N., Bouallegue, O., & Arlet, G. (2010). Characterization and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in a Tunisian University Hospital. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **16**(2), 163–170.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., van Beek, T. A., & Linszen, J. P. H. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **77**(1), 140–146.
- Dason, S., Dason, J. T., & Kapoor, A. (2011). Guidelines for the diagnosis and management of recurrent urinary tract infection in women. *Canadian Urological Association Journal = Journal de l'Association Des Urologues Du Canada*, **5**(5), 316–322.
- Davies, J., & Wright, G. D. (1997). Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends in Microbiology*, **5**(6), 234–240.

- Davis, B. B. (1988). The lethal action of aminoglycosides. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **22**(1), 1–3.
- Davis, N. F., & Flood, H. D. (2011). The Pathogenesis of Urinary Tract Infections, Clinical Management of Complicated Urinary Tract Infection. In A. Nikibakhsh, ed., *IntechOpen*. Disponible sur: <https://www.intechopen.com/books/clinical-management-of-complicated-urinary-tract-infection/the-pathogenesis-of-urinary-tract-infections>.
- Deris, Z. Z., Akter, J., Sivanesan, S., Roberts, K. D., Thompson, P. E., Nation, R. L., Li, J., & Velkov, T. (2014). A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *The Journal of Antibiotics*, **67**(2), 147–151.
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines (Basel, Switzerland)*, **3**(4), 25.
- Dhiman, P., Arora, N., Thanikachalam, P. V., & Monga, V. (2019). Recent advances in the synthetic and medicinal perspective of quinolones: A review. *Bioorganic Chemistry*, **92**, 103291.
- Dixon, R. A., & Chopra, I. (1986). Leakage of periplasmic proteins from Escherichia coli mediated by polymyxin B nonapeptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **29**(5), 781–788.
- Dolejska, M., Villa, L., Hasman, H., Hansen, L., & Carattoli, A. (2013). Characterization of IncN plasmids carrying bla CTX-M-1 and qnr genes in Escherichia coli and Salmonella from animals, the environment and humans. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**(2), 333–339.
- Donnet-Hughes, A., Perez, P. F., Dore, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., & Schiffrin, E. J. (2010). Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *The Proceedings of the Nutrition Society*, **69**(3), 407–415.
- Drali, R., Berrazeg, M., Zidouni, L. L., Hamitouche, F., Abbas, A. A., Deriet, A., & Mouffok, F. (2018). Emergence of mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant Escherichia coli isolates from seawater. *The Science of the Total Environment*, **642**, 90–94.
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., & Jarlier, V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, **14**, 90–103.
- Duplessis, C., & Crum-Cianflone, N. F. (2011). Ceftaroline: A New Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Clinical Medicine Reviews in Therapeutics*, **3**. doi:10.4137/CMRT.S1637
- El bouamri, M. C., Aarsalane, L., Kamouni, Y., Yahyaoui, H., Bennouar, N., Berraha, M., & Zouhair, S. (2014). Profil actuel de résistance aux antibiotiques des souches d'Escherichia coli uropathogènes et conséquences thérapeutiques. *Progrès En Urologie*, **24**(16), 1058–1062.

- Eriksson, I., Gustafson, Y., Fagerström, L., & Olofsson, B. (2010). Prevalence and factors associated with urinary tract infections (UTIs) in very old women. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, **50**(2), 132–135.
- Falagas, M. E., & Kasiakou, S. K. (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, **40**(9), 1333–1341.
- Falagas, M. E., Maraki, S., Karageorgopoulos, D. E., Kastoris, A. C., Mavromanolakis, E., & Samonis, G. (2010). Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) Enterobacteriaceae isolates to fosfomycin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **35**(3), 240–243.
- Fam, N., Leflon-Guibout, V., Fouad, S., Aboul-Fadl, L., Marcon, E., Desouky, D., El-Defrawy, I., Abou-Aitta, A., Klena, J., & Nicolas-Chanoine, M.-H. (2011). CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Cairo (Egypt), including isolates of clonal complex ST10 and clones ST131, ST73, and ST405 in both community and hospital settings. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **17**(1), 67–73.
- Farrell, D. J., Morrissey, I., De Rubeis, D., Robbins, M., & Felmingham, D. (2003). A UK multicentre study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. *The Journal of Infection*, **46**(2), 94–100.
- Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave ‘dry’ distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, **22**(6), 494–504.
- FFNSC 2. (2012). Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds; Mass Spectral Database. *Shimadzu Corps: Kyoto, Japan*.
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology*, **15**(2), 247–254.
- Fischer, J., Rodríguez, I., Baumann, B., Guiral, E., Beutin, L., Schroeter, A., Kaesbohrer, A., Pfeifer, Y., Helmuth, R., & Guerra, B. (2014). blaCTX-M-15-carrying *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from livestock and food in Germany. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**(11), 2951–2958.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews. Microbiology*, **13**(5), 269–284.
- Foxman, B. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-Month: DM*, **49**(2), 53–70.
- Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews. Urology*, **7**(12), 653–660.
- Foxman, B., Barlow, R., D’Arcy, H., Gillespie, B., & Sobel, J. D. (2000). Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Annals of Epidemiology*, **10**(8), 509–515.

- Franiczek, R., Krzyżanowska, B., Dolna, I., Mokracka, G., & Szufnarowski, K. (2005). Extended-spectrum beta-lactamase-conferring transferable resistance to different antimicrobial agents in Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections. *Folia Microbiologica*, **50**(2), 119–124.
- Franiczek, R., & Krzyżanowska, B. (2014). ESBL-producing Escherichia coli isolated from bloodstream infections--antimicrobial susceptibility, conjugative transfer of resistance genes and phylogenetic origin. *Advances in Clinical and Experimental Medicine : Official Organ Wroclaw Medical University*, **23**(6), 865–870.
- Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P., & Lambert, T. (2005). Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**(7), 2949–2953.
- Galimand, M., Courvalin, P., & Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**(8), 2565–2571.
- Gauzit, R., Gutmann, L., Brun-Buisson, C., Jarlier, V., & Fantin, B. (2010). Recommandations de bon usage des carbapénèmes. *Antibiotiques*, **12**(4), 183–189.
- Gharout-Sait, A., Touati, A., Benallaoua, S., Guillard, T., Brasme, L., Madoux, J. (2012). CTX-M from community-acquired urinary tract infections in Algeria. *Afr J Microbiol Res*, **6**, 5306–13.
- Gharout-Sait, A., Touati, A., Guillard, T., Brasme, L., & de Champs, C. (2015). Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes from hospitalized and non-hospitalized patients in Algeria: description of new sequence type in Klebsiella pneumoniae isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases : An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, **19**(2), 187–195.
- Gholipour, A., Soleimani, N., Shokri, D., Mobasherizadeh, S., Kardi, M., & Baradaran, A. (2014). Phenotypic and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase Produced by Escherichia coli, and Klebsiella pneumoniae Isolates in an Educational Hospital. *Jundishapur Journal of Microbiology*, **7**(10), e11758.
- Girlich, D., Bouihat, N., Poirel, L., Benouda, A., & Nordmann, P. (2014). High rate of faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at a university hospital in Morocco. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **20**(4), 350–354.
- Graham, S. E., Zhang, L., Ali, I., Cho, Y. K., Ismail, M. D., Carlson, H. A., & Foxman, B. (2016). Prevalence of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and sequence type 131 in Korean blood, urine, and rectal Escherichia coli isolates. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, **41**, 292–295.
- Griffey, R. H., Hofstadler, S. A., Sannes-Lowery, K. A., Ecker, D. J., & Croke, S. T. (1999). Determinants of aminoglycoside-binding specificity for rRNA by using mass spectrometry.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(18), 10129–10133.
- Gupta S. K., Padmanabhan B. R., Diene S. M., Lopez-Rojas R., Kempf M., Landraud L., & Rolain, J. M. (2014). ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother*, **58**,212–20.
- Guzmán, M., Salazar, E., Cordero, V., Castro, A., Villanueva, A., Rodulfo, H., & De Donato, M. (2019). Multidrug resistance and risk factors associated with community-acquired urinary tract infections caused by *Escherichia coli* in Venezuela. *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, **39**(s1), 96–107.
- Hadi, S. M., Bhat, S. H., Azmi, A. S., Hanif, S., Shamim, U., & Ullah, M. F. (2007). Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. *Seminars in Cancer Biology*, **17**(5), 370–376.
- Hamprecht, A., Sommer, J., Willmann, M., Göttig, S. (2019). Pathogenicity of Clinical OXA-48 Isolates and Impact of the OXA-48 IncL Plasmid on Virulence and Bacterial Fitness. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 2509.
- Hickling, D. R., Sun, T.-T., & Wu, X.-R. (2015). Anatomy and Physiology of the Urinary Tract: Relation to Host Defense and Microbial Infection. *Microbiology Spectrum*, **3**(4). doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0016-2012
- Hopkins, K. L., Davies, R. H., & Threlfall, E. J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **25**(5), 358–373.
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, **51**, 72–80.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, **3**, 12.
- Iabadene, H., Messai, Y., Ammari, H., Alouache, S., Verdet, C., Bakour, R., & Arlet, G. (2009). Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among Enterobacteriaceae in Algiers hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **34**(4), 340–342.
- Ietswaart, J. H. (1980). *A Taxonomic Revision of the Genus Origanum (Labiatae): (Labiatae)*, Springer Netherlands.
- Ifergan, J., Pommier, R., Brion, M.-C., Glas, L., Rocher, L., & Bellin, M.-F. (2012). Imagerie des infections du haut appareil urinaire. *Journal de Radiologie Diagnostique et Interventionnelle*, **93**(6), 539–550.
- Isman, M. B., & Machial, C. M. (2006). Chapter 2 Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. eds., *Naturally Occurring Bioactive Compounds*, Vol. **3**, Elsevier, pp. 29–44.

- Jaffe, A., Chabbert, Y. A., & Semonin, O. (1982). Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **22**(6), 942–948.
- Jalali-Heravi, M., & Parastar, H. (2011). Recent trends in application of multivariate curve resolution approaches for improving gas chromatography-mass spectrometry analysis of essential oils. *Talanta*, **85**(2), 835–849.
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, **10**(4), 867–878.
- Jiang, S.-S., Liu, M.-C., Teng, L.-J., Wang, W.-B., Hsueh, P.-R., & Liaw, S.-J. (2010). Proteus mirabilis pmrI, an RppA-Regulated Gene Necessary for Polymyxin B Resistance, Biofilm Formation, and Urothelial Cell Invasion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**(4), 1564 LP – 1571.
- Kariuki, S., Okoro, C., Kiiru, J., Njoroge, S., Omuse, G., Langridge, G., Kingsley, R. A., Dougan, G., & Revathi, G. (2015). Ceftriaxone-resistant Salmonella enterica serotype typhimurium sequence type 313 from Kenyan patients is associated with the blaCTX-M-15 gene on a novel IncHI2 plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59**(6), 3133–3139.
- Kaye, K. S., Gales, A. C., & Dubourg, G. (2017). Old antibiotics for multidrug-resistant pathogens: from in vitro activity to clinical outcomes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **49**(5), 542–548.
- Khalfi, O., Sahraoui, N., Bentahar, F., & Boutekedjiret, C. (2008). Chemical composition and insecticidal properties of Origanum glandulosum (Desf.) essential oil from Algeria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **88**(9), 1562–1566.
- Khan, I. U., Mirza, I. A., Ikram, A., Afzal, A., Ali, S., Hussain, A., Fayyaz, M., & Ghafoor, T. (2014). Antimicrobial susceptibility pattern of bacteria isolated from patients with urinary tract infection. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*, **24**(11), 840–844.
- Khanfar, H. S., Bindayna, K. M., Senok, A. C., & Botta, G. A. (2009). Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: trends in the hospital and community settings. *Journal of Infection in Developing Countries*, **3**(4), 295–299.
- Khennouchi, N. C. el H., Loucif, L., Boutefnouchet, N., Allag, H., & Rolain, J.-M. (2015). MALDI-TOF MS as a Tool To Detect a Nosocomial Outbreak of Extended-Spectrum-beta-Lactamase- and ArmA Methyltransferase-Producing Enterobacter cloacae Clinical Isolates in Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59**(10), 6477–6483.
- Kim, E. S., Jeong, J.-Y., Jun, J.-B., Choi, S.-H., Lee, S.-O., Kim, M.-N., Woo, J. H., & Kim, Y. S. (2009). Prevalence of aac(6⁺)-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme among Enterobacteriaceae blood isolates in Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**(6), 2643–2645.

- Kliebe, C., Nies, B. A., Meyer, J. F., Tolxdorff-Neutzling, R. M., & Wiedemann, B. (1985). Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **28**(2), 302–307.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., & Weis, N. (1989). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components. *Journal of Essential Oil Research*, **1**(3), 119–128.
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., & Mitsuhashi, S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, **11**(6), 315–317.
- Koksal, E., Tulek, N., Sonmezer, M. C., Temocin, F., Bulut, C., Hatipoglu, C., Erdinc, F. S., & Ertem, G. (2019). Investigation of risk factors for community-acquired urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Investigative and Clinical Urology*, **60**(1), 46–53.
- Laarem, M., Barguigua, A., Nayme, K., Akila, A., Zerouali, K., El Mdaghri, N., & Timinouni, M. (2017). Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance and virulence genes in avian *Escherichia coli* isolates from Algeria. *Journal of Infection in Developing Countries*, **11**(2), 143–151.
- Lautenbach, E., Strom, B. L., Bilker, W. B., Patel, J. B., Edelstein, P. H., & Fishman, N. O. (2001). Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, **33**(8), 1288–1294.
- Lee, D. S., Lee, C. B., & Lee, S.-J. (2010). Prevalence and Risk Factors for Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Uropathogens in Patients with Urinary Tract Infection. *Korean Journal of Urology*, pp. 492–497.
- Lee, J. H., Subhadra, B., Son, Y.-J., Kim, D. H., Park, H. S., Kim, J. M., Koo, S. H., Oh, M. H., Kim, H.-J., & Choi, C. H. (2016). Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Letters in Applied Microbiology*, **62**(1), 84–90.
- Leshner, G. Y., Froelich, E. J., Gruett, M. D., Bailey, J. H., & Brundage, R. P. (1962). 1,8-naphthyridine derivatives. a new class of chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, **91**, 1063–1065.
- Leulmi, Z., Kandouli, C., Mihoubi, I., Benlabed, K., Lezzar, A., & Rolain, J.-M. (2019). First report of blaOXA-24 carbapenemase gene, armA methyltransferase and aac(6⁷)-Ib-cr among multidrug-resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis* in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **16**, 125–129.
- Li, J., Nation, R. L., Milne, R. W., Turnidge, J. D., & Coulthard, K. (2005). Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **25**(1), 11–25.

- Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Milne, R. W., Coulthard, K., Rayner, C. R., & Paterson, D. L. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet. Infectious Diseases*, **6**(9), 589–601.
- Li, D., & Liu, S. (2019). Chapter 10 - Drinking Water Detection. In D. Li & S. B. T.-W. Q. M. and M. Liu, eds., Academic Press, pp. 251–267.
- Li, J., Liu, S., Fu, J., Yin, J., Zhao, J., Zhong, C., & Cao, G. (2019). Co-Occurrence of Colistin and Meropenem Resistance Determinants in a *Stenotrophomonas* Strain Isolated from Sewage Water. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*. doi:10.1089/mdr.2018.0418
- Lin, Q. Y., Tsai, Y.-L., Liu, M.-C., Lin, W.-C., Hsueh, P.-R., & Liaw, S.-J. (2014). *Serratia marcescens* arn, a PhoP-Regulated Locus Necessary for Polymyxin B Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**(9), 5181 LP – 5190.
- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., ... Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet. Infectious Diseases*, **16**(2), 161–168.
- Livermore, D. M. (2008). Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **14 Suppl 1**, 3–10.
- Lu, X., Xiao, X., Liu, Y., Li, Y., Li, R., & Wang, Z. (2019). Chromosome-mediated mcr-1 in *Escherichia coli* strain L73 from a goose. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Netherlands, pp. 99–101.
- Macedo da Silva, R. O., Gonçalves Castro, J. W., de Menezes Dantas Junior, O., ... Coutinho, H. D. M. (2019). Photoinduced Antibacterial Activity of the Essential Oils from *Eugenia brasiliensis* Lam and *Piper mosenii* C. DC. by Blue Led Light. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, **8**(4). doi:10.3390/antibiotics8040242
- Maciucă, I. E., Williams, N. J., Tuchilus, C., Dorneanu, O., Guguianu, E., Carp-Carare, C., Rimbu, C., & Timofte, D. (2015). High Prevalence of *Escherichia coli*-Producing CTX-M-15 Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Poultry and Human Clinical Isolates in Romania. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **21**(6), 651–662.
- Magi, G., Marini, E., & Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A *Streptococci*. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 165.
- Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., ... Fridkin, S. K. (2014). Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *The New England Journal of Medicine*, **370**(13), 1198–1208.
- Magliano, E., Grazioli, V., Deflorio, L., Leuci, A. I., Mattina, R., Romano, P., & Cocuzza, C. E. (2012). Gender and Age-Dependent Etiology of Community-Acquired Urinary Tract Infections. *The Scientific World Journal*, **2012**, 349597.

- Magrini, V., Creighton, C., White, D., Hartzell, P. L., & Youderian, P. (1998). The *aadA* gene of plasmid R100 confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, **180**(24), 6757–6760.
- Mairi, A., Pantel, A., Ousalem, F., Sotto, A., Touati, A., & Lavigne, J.-P. (2019). OXA-48-producing Enterobacterales in different ecological niches in Algeria: clonal expansion, plasmid characteristics and virulence traits. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **74**(7), 1848–1855.
- Mao, L.-C., Pan, X., Que, F., & Fang, X.-H. (2006). Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze-dried daylily flowers. *European Food Research and Technology*, **222**(3), 236–241.
- Marcadé, G., Deschamps, C., Boyd, A., Gautier, V., Picard, B., Branger, C., Denamur, E., & Arlet, G. (2009). Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **63**(1), 67–71.
- Marchese, A., Gualco, L., Debbia, E. A., Schito, G. C., & Schito, A. M. (2003). In vitro activity of fosfomycin against gram-negative urinary pathogens and the biological cost of fosfomycin resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **22 Suppl 2**, 53–59.
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, **13**, 833–839.
- Mechergui, K., Coelho, J. A., Serra, M. C., Lamine, S. B., Boukhchina, S., & Khouja, M. L. (2010). Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**(10), 1745–1749.
- Medboua-Benbalagh, C., Touati, A., Kermas, R., Gharout-Sait, A., Brasme, L., Mezhoud, H., Touati, D., Guillard, T., & de Champs, C. (2017). Fecal Carriage of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Strains Is Associated with Worse Outcome in Patients Hospitalized in the Pediatric Oncology Unit of Beni-Messous Hospital in Algiers, Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **23**(6), 757–763.
- Medina, M., & Castillo-Pino, E. (2019). An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Therapeutic Advances in Urology*, **11**. doi:10.1177/1756287219832172
- Meguenni, N., Le Devendec, L., Jouy, E., Le Corvec, M., Bounar-Kechih, S., Rabah Bakour, D., & Kempf, I. (2015). First Description of an Extended-Spectrum Cephalosporin- and Fluoroquinolone- Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* Clone in Algeria. *Avian Diseases*, **59**(1), 20–23.
- Meradi, L., Djahoudi, A., Abdi, A., Bouchakour, M., Perrier Gros Claude, J.-D., & Timinouni, M. (2011). [Qnr and *aac* (6')-Ib-cr types quinolone resistance among Enterobacteriaceae isolated in Annaba, Algeria]. *Pathologie-biologie*, **59**(4), e73-8.
- Mesbah Zekar, F., Granier, S. A., Touati, A., & Millemann, Y. (2020). Occurrence of Third-Generation Cephalosporins-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Fresh Fruits and Vegetables

- Purchased at Markets in Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **26**(4), 353–359.
- Messai, Y., Benhassine, T., Naim, M., Paul, G., & Bakour, R. (2006). Prevalence of beta-lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. *Revista Espanola de Quimioterapia: Publicacion Oficial de La Sociedad Espanola de Quimioterapia*, **19**(2), 144–151.
- Messaili, C., Messai, Y., & Bakour, R. (2019). Virulence gene profiles, antimicrobial resistance and phylogenetic groups of fecal *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens in Algeria. *Veterinaria Italiana*, **55**(1), 35–46.
- Mezhoud, H., Boyen, F., Touazi, L.-H., Garmyn, A., Moula, N., Smet, A., Haesbrouck, F., Martel, A., Iguer-Ouada, M., & Touati, A. (2015). Extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in broiler breeding roosters: Presence in the reproductive tract and effect on sperm motility. *Animal Reproduction Science*, **159**, 205–211.
- Minardi, D., d’Anzeo, G., Cantoro, D., Conti, A., & Muzzonigro, G. (2011). Urinary tract infections in women: etiology and treatment options. *International Journal of General Medicine*, **4**, 333–343.
- Mkaouar, D., Mahjoubi, F., Mezghani, S., Znazen, A., Ktari, S., & Hammami, A. (2008). [Resistance to third generation cephalosporins in Sfax hospitals, Tunisia (1999-2005)]. *Medecine et maladies infectieuses*, **38**(6), 293–298.
- Mnif, B., Harhour, H., Jdidi, J., Mahjoubi, F., Genel, N., Arlet, G., & Hammami, A. (2013). Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Tunisia and characterization of their virulence factors and plasmid addiction systems. *BMC Microbiology*, **13**, 147.
- Molina-Lopez, J., Aparicio-Ozores, G., Ribas-Aparicio, R. M., Gavilanes-Parra, S., Chavez-Berrolcal, M. E., Hernandez-Castro, R., & Manjarrez-Hernandez, H. A. (2011). Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *Journal of Infection in Developing Countries*, **5**(12), 840–849.
- Munkhdelger, Y., Gunregjav, N., Dorjpurev, A., Juniichiro, N., & Sarantuya, J. (2017). Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *Journal of Infection in Developing Countries*, **11**(1), 51–57.
- Mysorekar, I. U., Mulvey, M. A., Hultgren, S. J., & Gordon, J. I. (2002). Molecular regulation of urothelial renewal and host defenses during infection with uropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**(9), 7412–7419.
- Naas, T., Bentchouala, C., Cuzon, G., Yaou, S., Lezzar, A., Smati, F., & Nordmann, P. (2011). Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **38**(2), 135–139.

- Nabti, L. Z., Sahli, F., Hajdadj, L., Ngaiganam, E. P., Lupande-Mwenebitu, D., Rolain, J.-M., & Diene, S. M. (2019). Autochthonous case of mobile colistin resistance mcr-1 gene from uropathogenic *Escherichia coli* isolate in Setif hospital, Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **19**, 356–357.
- Nabti, L. Z., Sahli, F., Ngaiganam, E. P., Radji, N., Mezaghcha, W., Lupande-Mwenebitu, D., Baron, S. A., Rolain, J.-M., & Diene, S. M. (2020). Development of real-time PCR assay allowed describing the first clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate harboring plasmid-mediated colistin resistance mcr-8 gene in Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **20**, 266–271.
- Navarro, F. (2006). Acquisition and horizontal diffusion of beta-lactam resistance among clinically relevant microorganisms. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, Switzerland, pp. 79–81.
- Nicolas-Chanoine, M.-H., & Jarlier, V. (2008). Extended-spectrum beta-lactamases in long-term-care facilities. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **14 Suppl 1**, 111–116.
- Niero, G., Bortolaia, V., Vanni, M., Intorre, L., Guardabassi, L., & Piccirillo, A. (2018). High diversity of genes and plasmids encoding resistance to third-generation cephalosporins and quinolones in clinical *Escherichia coli* from commercial poultry flocks in Italy. *Veterinary Microbiology*, **216**, 93–98.
- NIST 17. (2017). Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH). *National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD, USA*.
- Okoh, O. O., Sadimenko, A. P., & Afolayan, A. J. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, **120**(1), 308–312.
- Osei Sekyere, J. (2019). Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *MicrobiologyOpen*, **8**(4). doi:10.1002/mbo3.682
- Ouedraogo, A.-S., Sanou, M., Kissou, A., ... Godreuil, S. (2016). High prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing enterobacteriaceae among clinical isolates in Burkina Faso. *BMC Infectious Diseases*, **16**, 326.
- Ouelbani, R., Bensari, S., Mouas, T. N., & Khelifi, D. (2016). Ethnobotanical investigations on plants used in folk medicine in the regions of Constantine and Mila (North-East of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology*, **194**, 196–218.
- Oussalah, M., Caillet, S., & Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **69**(5), 1046–1055.
- Padilla, I. M. G., & Burgos, L. (2010). Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects on in vitro plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Reports*, **29**(11), 1203–1213.

- Paltansing, S., Kraakman, M. E. M., Ras, J. M. C., Wessels, E., & Bernards, A. T. (2013). Characterization of fluoroquinolone and cephalosporin resistance mechanisms in Enterobacteriaceae isolated in a Dutch teaching hospital reveals the presence of an Escherichia coli ST131 clone with a specific mutation in parE. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**(1), 40–45.
- Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., & Bajpai, V. K. (2017). Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 2161.
- Paré, J. J. R., Michel, S., & Lapointe, J. (1990). Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. *Brevet Européen*, (EP 398798).
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D., & Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**(11), 3953 LP – 3955.
- Paterson, D. L., Mulazimoglu, L., Casellas, J. M., Ko, W. C., Goossens, H., Von Gottberg, A., Mohapatra, S., Trenholme, G. M., Klugman, K. P., McCormack, J. G., & Yu, V. L. (2000). Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in Klebsiella pneumoniae isolates causing bacteremia. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, **30**(3), 473–478.
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, **18**(4), 657 LP – 686.
- Pereira, J. L., Volcão, L. M., Klafke, G. B., Vieira, R. S., Gonçalves, C. V., Ramis, I. B., da Silva, P. E. A., & von Groll, A. (2019). Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamases of Escherichia coli and Klebsiella spp. Isolates from Urinary Tract Infections in Southern Brazil. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **25**(2), 173–181.
- Philippon, A., & Arlet, G. (2005). Les bêta-lactamases chez les bacilles à Gram-négatif : que de nouveautés en 15 ans ! *Antibiotiques*, **7**(4), 247–259.
- Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**(1), 1–11.
- Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, **30**(2), 557–596.
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*, pp. 289–316.
- Poirel, L., Potron, A., & Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67**(7), 1597–1606.

- Poitras, E., & Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, **2**(2), 2–11.
- Ponce, A. G., Fritz, R., del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Science and Technology*, **36**(7), 679–684.
- Pushpangadan, P., & George, V. (2012). 4 - Basil. In K. V. B. T.-H. of H. and S. (Second E. Peter, ed., *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, Woodhead Publishing, pp. 55–72.
- Quézel, P., & Santa, S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tomme II*. Ed, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- Rakotovao-Ravahatra, Z. D., Randriatsarafara, F. M., Rasoanandrasana, S., Raverohanta, L., & Rakotovao, A. L. (2017). [Resistant phenotypes of Escherichia coli strains responsible for urinary tract infection in the laboratory of the University Hospital Joseph Raseta Befelatanana, Antananarivo]. *The Pan African medical journal*, **26**, 166.
- Ramdani-Bougoussa, N., Mendonça, N., Leitão, J., Ferreira, E., Tazir, M., & Caniça, M. (2006). CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in isolates of Escherichia coli from a hospital in Algiers, Algeria. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**(12), 4584–4586.
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, **13**(6), 151–171.
- Rebbah, N., Messai, Y., Chatre, P., Haenni, M., Madec, J. Y., & Bakour, R. (2018). Diversity of CTX-M Extended-Spectrum beta-Lactamases in Escherichia coli Isolates from Retail Raw Ground Beef: First Report of CTX-M-24 and CTX-M-32 in Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **24**(7), 896–908.
- Regnault-Roger, C., Phylogène, B. J., & Vincent, C. (2008). *Biopesticides d'origine végétale (2e éd.)*, Lavoisier, 576p.
- Ribeiro, T. G., Novais, Â., Peixe, L., & Machado, E. (2016). Atypical epidemiology of CTX-M-15 among Enterobacteriaceae from a high diversity of non-clinical niches in Angola. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **71**(5), 1169–1173.
- Robin, F., Aggoune-Khinache, N., Delmas, J., Naim, M., & Bonnet, R. (2010). Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of Enterobacteriaceae from Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**(1), 466–470.
- Robin, F., Gibold, L., & Bonnet, R. (2012). Résistances naturelles et acquises aux β -lactamines chez les entérobactéries: comment les identifier en pratique quotidienne? *Revue Francophone Des Laboratoires*, **2012**(445), 47–58.
- Rodriguez-Martinez, J. M., Machuca, J., Cano, M. E., Calvo, J., Martinez-Martinez, L., & Pascual, A. (2016). Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resistance*

- Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, **29**, 13–29.
- Rossignol, L., Vaux, S., Maugat, S., Blake, A., Barlier, R., Heym, B., Le Strat, Y., Blanchon, T., Hanslik, T., & Coignard, B. (2017). Incidence of urinary tract infections and antibiotic resistance in the outpatient setting: a cross-sectional study. *Infection*, **45**(1), 33–40.
- Rossolini, G. M., D'Andrea, M. M., & Mugnaioli, C. (2008). The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **14 Suppl 1**, 33–41.
- Rowe, T. A., & Juthani-Mehta, M. (2013). Urinary tract infection in older adults. *Aging Health*, **9**(5). doi:10.2217/ahe.13.38
- Ruberto, G., Baratta, M. T., Sari, M., & Kaâbeche, M. (2002). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*, **17**(4), 251–254.
- Ruppé, E. (2010). Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques*, **12**(1), 3–16.
- Sabtcheva, S., Kaku, M., Saga, T., Ishii, Y., & Kantardjiev, T. (2009). High Prevalence of the aac(6)-Ib-cr Gene and Its Dissemination among Enterobacteriaceae Isolates by CTX-M-15 Plasmids in Bulgaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**(1), 335–336.
- Saïdani, M., Hammami, S., Kammoun, A., Slim, A., & Boutiba-Ben Boubaker, I. (2012). Emergence of carbapenem-resistant OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Tunisia. *Journal of Medical Microbiology*, **61**(Pt 12), 1746–1749.
- Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F. J., & Reglero, G. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, **68**(4), 790–795.
- Sari, M., Biondi, D. M., Kaâbeche, M., Mandalari, G., D'Arrigo, M., Bisignano, G., Saija, A., Daquino, C., & Ruberto, G. (2006). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*, **21**(6), 890–898.
- Sassi, A., Loucif, L., Gupta, S. K., Dekhil, M., Chettibi, H., & Rolain, J.-M. (2014). NDM-5 carbapenemase-encoding gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* from Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**(9), 5606–5608.
- Seitz, M., Stief, C., & Waidelich, R. (2017). Local epidemiology and resistance profiles in acute uncomplicated cystitis (AUC) in women: a prospective cohort study in an urban urological ambulatory setting. *BMC Infectious Diseases*, **17**(1), 685.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.-E., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious*

- Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, **49**(4), 543–551.
- Shibl, A. M., Al-Agamy, M. H., Khubnani, H., Senok, A. C., Tawfik, A. F., & Livermore, D. M. (2012). High prevalence of acquired quinolone-resistance genes among Enterobacteriaceae from Saudi Arabia with CTX-M-15 beta-lactamase. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **73**(4), 350–353.
- Shin, S. W., Jung, M., Won, H. G., Belaynehe, K. M., Yoon, I. J., & Yoo, H. S. (2017). Characteristics of Transmissible CTX-M- and CMY-Type β -Lactamase-Producing Escherichia coli Isolates Collected from Pig and Chicken Farms in South Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**(9), 1716–1723.
- Sikkema, J., de Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, **59**(2), 201–222.
- Singsaas, E. L., Lerda, M., Winter, K., & Sharkey, T. D. (1997). Isoprene Increases Thermotolerance of Isoprene-Emitting Species. *Plant Physiology*, **115**(4), 1413 LP – 1420.
- Sirot, D., Sirot, J., Labia, R., Morand, A., Courvalin, P., Darfeuille-Michaud, A., Perroux, R., & Cluzel, R. (1987). Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **20**(3), 323–334.
- Skalova, A., Chudejova, K., Rotova, V., ... Hrabak, J. (2017). Molecular Characterization of OXA-48-Like-Producing Enterobacteriaceae in the Czech Republic and Evidence for Horizontal Transfer of pOXA-48-Like Plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61**(2). doi:10.1128/AAC.01889-16
- Sneddon, J., Masuram, S., & Richert, J. C. (2007). Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Basic Principles, Instrumentation and Selected Applications for Detection of Organic Compounds. *Analytical Letters*, **40**(6), 1003–1012.
- Sobel, J. D. (1997). Pathogenesis of urinary tract infection. Role of host defenses. *Infectious Disease Clinics of North America*, **11**(3), 531–549.
- Solé, M., Pitart, C., Roca, I., Fàbrega, A., Salvador, P., Muñoz, L., Oliveira, I., Gascón, J., Marco, F., & Vila, J. (2011). First description of an Escherichia coli strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**(9), 4402–4404.
- SPILF. (2015). DIAGNOSTIC ET ANTIBIOTHÉRAPIE DES INFECTIONS URINAIRES BACTÉRIENNES COMMUNAUTAIRES DE L'ADULTE. Disponible Sur : <https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/infections-urinaires-spilf-argumentaire.pdf>, 122p.
- Stamm, W. E., & Norrby, S. R. (2001). Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *The Journal of Infectious Diseases*, **183** Suppl 1, S1-4.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of Lippia alba (Mill.) N.E. Brown,

- grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, **1025**(1), 93–103.
- Stauffer, E., Dolan, J. A., & Newman, R. (2008). CHAPTER 8 - Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. In E. Stauffer, J. A. Dolan, & R. Newman, - Fire Debris Analysis, eds., Burlington: Academic Press, pp. 235–293.
- Tafoukt, R., Touati, A., Leangapichart, T., Bakour, S., & Rolain, J.-M. (2017). Characterization of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae isolated from river water in Algeria. *Water Research*, **120**, 185–189.
- Tandogdu, Z., & Wagenlehner, F. M. E. (2016). Global epidemiology of urinary tract infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **29**(1), 73–79.
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, **134**, 103580.
- Taur, Y., & Smith, M. A. (2007). Adherence to the Infectious Diseases Society of America guidelines in the treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, **44**(6), 769–774.
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). (1) Tongnuanchan, P.; Benjakul, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of food science* 2014, **79** (7), R1231-49. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>. Essential oils: extraction, bioactivities, and thei. *Journal of Food Science*, **79**(7), R1231-49.
- Touati, A., Medboua, C., Touati, D., Denine, R., Brasme, L., and de Champs, C. (2012). CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates causing bloodstream infections at the Beni-Messous hospital in Algiers (Algeria). *Int Res J Microbiol*, **3**, 181–5.
- Touati, A., Benallaoua, S., Djoudi, F., Madoux, J., Brasme, L., & De Champs, C. (2007). Characterization of CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli strains isolated from hospital environments in Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **13**(2), 85–89.
- Touati, A., Benallaoua, S., Forte, D., Madoux, J., Brasme, L., & de Champs, C. (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bejaia, Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **27**(5), 397–402.
- Touati, M., Hadjadj, L., Berrazeg, M., Baron, S., & Rolain, J. M. (2019). Emergence of Escherichia coli harboring mcr-1 and mcr-3 gene in North West Algerian farmlands. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, S2213-7165(19)30255–3.
- Toval, F., Köhler, C.-D., Vogel, U., Wagenlehner, F., Mellmann, A., Fruth, A., Schmidt, M. A., Karch, H., Bielaszewska, M., & Dobrindt, U. (2014). Characterization of Escherichia coli isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, **52**(2), 407–418.

- Ulleryd, P. (2003). Febrile urinary tract infection in men. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **22**, 89–93.
- Valdivieso-Ugarte, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., & Gil, Á. (2019). Antimicrobial, Antioxidant, and Immunomodulatory Properties of Essential Oils: A Systematic Review. *Nutrients*. doi:10.3390/nu11112786
- Vian, M. A., Fernandez, X., Visinoni, F., & Chemat, F. (2008). Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *Journal of Chromatography A*, **1190**(1), 14–17.
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., Zhang, S., Shen, J., Shen, Z., & Wang, Y. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes & Infections*, **7**(1), 122.
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Wang, Z., Wang, Y., Zhang, S., & Shen, Z. (2019). Emergence of Colistin Resistance Gene mcr-8 and Its Variant in *Raoultella ornithinolytica*. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 228.
- Wright, G. D., & Thompson, P. R. (1999). Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, **4**, D9-21.
- Yagoubat, M., Ould El-Hadj-Khelil, A., Malki, A., Bakour, S., Touati, A., & Rolain, J.-M. (2017). Genetic characterisation of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria isolated from the University Hospital Mohamed Boudiaf in Ouargla, southern Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **8**, 55–59.
- Yahiaoui, M., Robin, F., Bakour, R., Hamidi, M., Bonnet, R., & Messai, Y. (2015). Antibiotic Resistance, Virulence, and Genetic Background of Community-Acquired Uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **21**(5), 516–526.
- Yaici, L., Haenni, M., Métayer, V., Saras, E., Mesbah Zekar, F., Ayad, M., Touati, A., & Madec, J.-Y. (2017). Spread of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the community through ready-to-eat sandwiches in Algeria. *International Journal of Food Microbiology*, **245**, 66–72.
- Yaici, L., Haenni, M., Saras, E., Boudehouche, W., Touati, A., & Madec, J.-Y. (2016). blaNDM-5-carrying IncX3 plasmid in *Escherichia coli* ST1284 isolated from raw milk collected in a dairy farm in Algeria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, England, pp. 2671–2672.
- Yanat, B., Dali Yahia, R., Yazı, L., Machuca, J., Díaz-De-Alba, P., Touati, A., Pascual, Á., & Rodríguez-Martínez, J.-M. (2016). Occurrence of the Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance qepA1 Gene in Two Clonal Clinical Isolates of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* from Algeria. *Microbial Drug Resistance*, **23**(4), 497–499.
- Yanat, B., Machuca, J., Diaz-De-Alba, P., Mezhoud, H., Touati, A., Pascual, A., & Rodriguez-Martinez, J.-M. (2017). Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in High-Level Quinolone-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from the

- Community: First Report of qnrD Gene in Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **23**(1), 90–97.
- Yanat, B., Machuca, J., Yahia, R. D., Touati, A., Pascual, A., & Rodriguez-Martinez, J.-M. (2016). First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-1 in a clinical *Escherichia coli* isolate in Algeria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Netherlands, pp. 760–761.
- Yanat, B., Vinuesa, T., Vinas, M., & Touati, A. (2014). Determinants of quinolone resistance in *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in Bejaia, Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **7**(6), 462–467.
- Yang, X., Liu, L., Wang, Z., Bai, L., & Li, R. (2019). Emergence of mcr-8.2-bearing *Klebsiella quasipneumoniae* of animal origin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **74**(9), 2814–2817.
- Yang, Y.-Q., Li, Y.-X., Lei, C.-W., Zhang, A.-Y., & Wang, H.-N. (2018). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **73**(7), 1791–1795.
- Yildirim, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A. A., Algur, O. F., & Bilaloglu, V. (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC), sage (*Salvia triloba* L.), and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**(10), 5030–5034.
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**(12), 5046–5054.
- Yousfi, K., Touati, A., Lefebvre, B., Garneau, P., Brahmi, S., Gharout-Sait, A., Harel, J., & Bekal, S. (2019). Characterization of multidrug-resistant Gram-negative bacilli isolated from hospitals effluents: first report of a blaOXA-48-like in *Klebsiella oxytoca*, Algeria. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, **50**(1), 175–183.
- Yousfi, M., Mairi, A., Bakour, S., Touati, A., Hassissen, L., Hadjadj, L., & Rolain, J.-M. (2015). First report of NDM-5-producing *Escherichia coli* ST1284 isolated from dog in Bejaia, Algeria. *New Microbes and New Infections*, **8**, 17–18.
- Yousfi, M., Mairi, A., Touati, A., Hassissene, L., Brasme, L., Guillard, T., & De Champs, C. (2016). Extended spectrum beta-lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, **22**(7), 431–435.
- Yousfi, M., Touati, A., Mairi, A., Brasme, L., Gharout-Sait, A., Guillard, T., & De Champs, C. (2016). Emergence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Companion Animals in Algeria. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **22**(4), 342–346.

- Zajac, M., Sztromwasser, P., Bortolaia, V., Leekitcharoenphon, P., Cavaco, L. M., Zietek-Barszcz, A., Hendriksen, R. S., & Wasyl, D. (2019). Occurrence and Characterization of mcr-1-Positive Escherichia coli Isolated From Food-Producing Animals in Poland, 2011-2016. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 1753.
- Zenati, F., Barguigua, A., Nayme, K., Benbelaid, F., Khadir, A., Bellahsene, C., Bendahou, M., Hafida, H., & Timinouni, M. (2019). Characterization of uropathogenic ESBL-producing Escherichia coli isolated from hospitalized patients in western Algeria. *Journal of Infection in Developing Countries*, **13**(4), 291–302.
- Zenati, K., Sahli, F., Garcia, V., Bakour, S., Belhadi, D., Rolain, J. M., & Touati, A. (2017). Occurrence and clonal diversity of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae recovered from inanimate surfaces in Algerian hospital environment: First report of armA, qnrB and aac(6')-Ib-cr genes. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **10**, 148–153.
- Zhang, L., Lü, X., & Zong, Z. (2013). The emergence of blaCTX-M-15-carrying Escherichia coli of ST131 and new sequence types in Western China. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **12**, 35.
- Zhang, W.-H., Ren, S.-Q., Gu, X.-X., Li, W., Yang, L., Zeng, Z.-L., Liu, Y.-H., & Jiang, H.-X. (2015). High frequency of virulence genes among Escherichia coli with the blaCTX-M genotype from diarrheic piglets in China. *Veterinary Microbiology*, **180**(3–4), 260–267.
- Zhong, Y., & Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. This chapter is reproduced to a large extent from an article in press by the authors in the Journal of Functional Foods. ed., *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, Woodhead Publishing, pp. 287–333.
- Zhou, H.-W., Zhang, T., Ma, J.-H., Fang, Y., Wang, H.-Y., Huang, Z.-X., Wang, Y., Wu, C., & Chen, G.-X. (2017). Occurrence of Plasmid- and Chromosome-Carried mcr-1 in Waterborne Enterobacteriaceae in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61**(8). doi:10.1128/AAC.00017-17
- Zong, Z., Ginn, A. N., Dobiasova, H., Iredell, J. R., & Partridge, S. R. (2015). Different IncII plasmids from Escherichia coli carry ISEcp1-blaCTX-M-15 associated with different Tn2-derived elements. *Plasmid*, **80**, 118–126.
- Zong, Z., Partridge, S. R., Thomas, L., & Iredell, J. R. (2008). Dominance of blaCTX-M within an Australian Extended-Spectrum β -Lactamase Gene Pool. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**(11), 4198 LP – 4202.
- Zurfluh, K., Abgottspon, H., Hächler, H., Nüesch-Inderbilen, M., & Stephan, R. (2014). Quinolone Resistance Mechanisms among Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Producing Escherichia coli Isolated from Rivers and Lakes in Switzerland. *PLoS ONE*, **9**(4). doi:10.1371/journal.pone.0095864
- Zurfluh, K., Glier, M., Hächler, H., & Stephan, R. (2015). Replicon typing of plasmids carrying blaCTX-M-15 among Enterobacteriaceae isolated at the environment, livestock and human interface. *The Science of the Total Environment*, **521–522**, 75–78.

ANNEXES

LISTE DES PUBLICATIONS

ARTICLE 1

High Prevalence of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Urine Samples from Inpatients and Outpatients at a Tertiary Care Hospital in Sétif, Algeria

Larbi Zakaria Nabti,^{1,2} Farida Sahli,^{1,3,4} Nadia Radji,^{3,4} Wahiba Mezaghcha,^{3,4} Lounis Semara,¹ Salim Aberkane,^{5,6} Manon Lounnas,^{5,6} Jérôme Solassol,⁷ Marie-Noëlle Didelot,⁵ Hélène Jean-Pierre,^{5,6} Yann Dumont,^{5,6} and Sylvain Godreuil^{5,6}

The worldwide dissemination of multidrug-resistant (MDR) Enterobacteriaceae is a major public health issue. The aim of this study was to investigate the prevalence of MDR *Escherichia coli* (MDR-EC) isolates, in inpatients/outpatients with urinary tract infections at Sétif University Hospital (Algeria). Bacterial cultures were obtained from 426 of the 3,944 urine samples collected from January 2015 to February 2017. Among these cultures, 215 *E. coli* isolates were identified by mass spectrometry, and 38 (17.7%) were MDR-EC (disk diffusion method): 36 produced only extended-spectrum β -lactamases (ESBL), one ESBL and a carbapenemase, and one only a cephalosporinase (double-disk synergy test). Multiplex PCR and sequencing analyses showed that 37 ESBL-producing isolates harbored genes encoding CTX-M enzymes (CTX-M-15 in 33 isolates, 89.19%; and CTX-M-14 group in four isolates, 10.81%). One CTX-M-15-producing isolate co-expressed also an OXA-48-like carbapenemase. Phylogenetic group analysis of the 37 ESBL-producing and 178 non-ESBL-producing isolates indicated that the most common phylogenetic group was B2 (54.05% of ESBL-producing and 48.31% of non-ESBL-producing isolates), followed by A and D for ESBL-, and by B1, A, and F for non-ESBL-producing isolates. This is the first report highlighting the presence of MDR-EC isolates that produce both CTX-M and OXA-48-like enzymes in Sétif, Algeria.

Keywords: multidrug resistant, ESBL, *E. coli*, urinary tract infections

Introduction

URINARY TRACT INFECTIONS (UTI) represent a major public health problem. They are one of the most common bacterial infections, and they can be community acquired, or nosocomial. *Escherichia coli*, the common commensal resident of the gastrointestinal tract, is the main UTI cause.^{1,2}

Over the years, *E. coli*, such as any other Enterobacteriaceae member, has become increasingly resistant to antibiotics. The production of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) is one of the primary mechanisms conferring resistance to β -lactam antibiotics, including first- and third-generation cephalosporins.³ Several reports showed that *bla*_{CTX-M}-type genes have replaced *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} as the most common ESBL

genes.^{4,5} Since the first description of *bla*_{CTX-M} expression in an *E. coli* isolate in Germany in 1990, CTX-M-producing isolates have been described worldwide.⁶ Such global and rapid dissemination of CTX-M-type ESBL has primarily been attributed to their presence on plasmids.^{3,7} CTX-M-type enzymes were first identified in clinical Enterobacteriaceae isolates from Algerian patients in two hospitals of Béjaïa (North Algeria) in 2006.⁸

Recently, A, B, and D class carbapenem-hydrolyzing β -lactamases in Enterobacteriaceae have been described worldwide.⁹ OXA-48-like carbapenemases (class D) were first detected in *Klebsiella pneumoniae* in Turkey, in 2001. Since then, these enzymes have been observed mainly in India, the Middle East, and North African countries,¹⁰ such as Morocco,¹¹ Tunisia,¹² and recently Algeria.¹³ OXA-48

¹Laboratoire de Valorisation des Ressources Biologiques et Naturelles, FSNV, Université de Sétif 1, Sétif, Algérie.

²Département des Sciences Naturelles, École Normale Supérieure Assia Djebar, Constantine, Algérie.

³Faculté de Médecine, Université de Sétif 1, Sétif, Algérie.

⁴Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Sétif, Sétif, Algérie.

⁵CHU de Montpellier, Laboratoire de Bactériologie, Université de Montpellier, Montpellier, France.

⁶UMR MIVEGEC IRD-CNRS-Université de Montpellier, IRD, Montpellier, France.

⁷Département Bio-pathologie cellulaire et tissulaire des tumeurs, CHU de Montpellier, Université de Montpellier, Montpellier, France.

enzymes show high activity against penicillins and weak activity against carbapenems and extended-spectrum cephalosporins.¹⁰

The aim of this study was to investigate the prevalence of multidrug-resistant (MDR) *E. coli* (MDR-EC) isolates that produce ESBL, AmpC beta-lactamases and carbapenemases, in patients with UTI in Sétif University Hospital (Northeast Algeria).

Materials and Methods

Study setting

Between January 2015 and February 2017, all consecutive urinary samples from hospitalized and nonhospitalized patients with UTI sent to the microbiology laboratory of Sétif University Hospital (Algeria) were investigated. Sétif University Hospital is the major health care and referral center for the Northeast of Algeria. This hospital has 614 beds and intensive care units that are used for surgical, medical, and trauma emergencies. Annually, >72,000 inpatients (children and adults) are admitted to the hospital.

Specimen collection, identification, and antimicrobial susceptibility testing

During these 26 months, 3,944 urinary samples were sent to the microbiology laboratory for bacteriologic investigations. Species identification was performed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).¹⁴ Antimicrobial susceptibility was tested with the disk diffusion method on Müller–Hinton agar only in *E. coli* clinical isolates for this study. The following antibiotics were tested: penicillins (amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, ticarcillin, and mecillinam), cephalosporins (cefotaxime, cefpodoxime, ceftazidime, and cephalixin), carbapenems (imipenem), aminoglycosides (amikacin and gentamicin), quinolones (nalidixic acid and ciprofloxacin), fosfomycin, nitrofurantoin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. Results were interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) clinical breakpoints (Version 7.1) (www.eucast.org/clinical_breakpoints).¹⁵ ESBL production was detected by using the combined double-disk synergy method.¹⁶ In the case of high-level cephalosporinase production, the combined double-disk synergy test was performed using cloxacillin-supplemented medium. Ertapenem and temocillin minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined for all MDR-EC isolates, using the Etest (bioMérieux).

Molecular identification of ESBL, AmpC, and carbapenemase genes

DNA was extracted from one single colony for each isolate in a final volume of 100 μ L of distilled water by incubation at 95°C for 10 min followed by a centrifugation step. The presence of *bla*_{CTX-M} (CTX-M group 1, 2, 8, 9, and 25), *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{OXA}-like, AmpC-type (*bla*_{ACC}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX}, *bla*_{DHA}, *bla*_{CMY}, and *bla*_{MIR}), and the most prevalent carbapenemase-encoding genes was assessed by multiplex PCR analysis, according to a previously published method.¹⁷ DNA from ESBL, AmpC, and carbapenemase-positive strains

(positive control) was also amplified. PCR products were visualized after electrophoresis (100 V for 80 min) on 1.5% agarose gels containing ethidium bromide. A 100 bp DNA ladder (Promega) was used as marker size. PCR products were purified using the ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (GE Healthcare, Piscataway, NJ) and sequenced bidirectionally on a 3100 ABI Prism Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Nucleotide sequence alignment and analyses were performed using the BLAST program available at the National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

PCR detection of *E. coli* phylogenetic groups

The phylogenetic group (A, B1, B2, C, D, E, F, and clade I) of ESBL-producing *E. coli* (ESBL-EC) and non-ESBL-EC isolates was determined using the PCR-based method described by Clermont *et al.*¹⁸

Statistical analysis

The chi-square test and Fisher's exact test were used to test risk factors (gender, isolate origin, and previous use of antibiotics), whereas a multinomial logistic regression model was used for age. Analyses were performed with the IBM SPSS 24 software. A *p*-value <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Isolates and patients' characteristics

Over the study period, bacterial cultures could be obtained from 426 of the 3,944 urine samples from hospitalized and nonhospitalized patients with UTI. Enterobacteriaceae (*n*=363, 85.2%) was the most common family and was represented by eight species: *E. coli* (*n*=215, 59.2%), *K. pneumoniae* (*n*=87, 24%), *Proteus mirabilis* (*n*=42, 11.6%), *Citrobacter freundii* (*n*=8, 2.2%), *Enterobacter cloacae* (*n*=6, 1.7%), *Morganella morganii* (*n*=2, 0.5%), *Hafnia alvei* (*n*=2, 0.5%), and *Salmonella sp.* (*n*=1, 0.3%). Gram-positive cocci (*n*=33, 7.7%) were represented by *Enterococcus sp.* (*n*=22, 66.7%), *Streptococcus sp.* (*n*=6, 18.2%), and *Staphylococcus sp.* (*n*=5, 15.1%). Non-fermenting Gram-negative bacilli (*n*=30, 7%) were also detected in several samples, and were represented by *Pseudomonas aeruginosa* (*n*=15, 50%), *Acinetobacter baumannii* (*n*=14, 46.7%), and *Stenotrophomonas maltophilia* (*n*=1, 3.3%).

Among the 215 *E. coli* isolates, 114 were from outpatients and 101 from inpatients hospitalized in the following services: infectious diseases (*n*=43), nephrology (*n*=15), pediatric (*n*=13), neurology (*n*=8), cardiology (*n*=8), internal medicine (*n*=6), intensive care unit (*n*=6), and pneumology (*n*=2). Among these 215 patients, 162 were women (75.35%) with a mean age \pm standard deviation of 34 \pm 21.4 years, and 53 were men (24.65%) with a mean age of 47 \pm 21.3 years.

MDR-producing *E. coli* isolates

Among the 215 *E. coli* isolates, 38 (17.7%) were identified by antimicrobial susceptibility testing as MDR-EC: 36

produced only ESBL, one ESBL and a carbapenemase, and one cephalosporinase. PCR analysis confirmed that all MDR-EC isolates carried resistance genes encoding ESBL, carbapenemase and/or cephalosporinase. The risk factor analysis showed no significant difference in ESBL-EC and non-ESBL-EC rate between genders ($p=0.227$). Conversely, ESBL-EC prevalence was significantly higher among older patients (≥ 60 years of age) (odds ratio [OR]: 1.71, $p=0.042$), in hospitalized patients compared with outpatients (OR: 3.79, $p<0.0001$), and in people who reported previous antibiotic use (OR: 4.011, $p<0.0001$) (Table 1).

Antibiotic resistance patterns

Analysis of the antibiotic resistance profile of the 215 *E. coli* isolates (Fig. 1) showed that ESBL-EC isolates ($n=37$) were more frequently resistant to quinolones/fluoroquinolones (75.7% and 73% for nalidixic acid and ciprofloxacin, respectively), sulfamethoxazole–trimethoprim (64.9%), and gentamycin (51.4%). Conversely, non-ESBL-EC isolates showed low resistance rates to all tested antibiotics, except for sulfamethoxazole–trimethoprim (41.6%). Among the ESBL-EC isolates, 26 (70.3%) were susceptible to temocillin (MIC ≤ 8 mg/L) (Table 2) and three (8.1%) were susceptible to amoxicillin-clavulanic acid. All 215 isolates, but for one ESBL-EC isolate, were susceptible to ertapenem.

Molecular characterization of ESBL-, AmpC-, and OXA-48-encoding genes

Among the MDR-EC isolates, most of the ESBL-producing isolates ($n=37$, 97.4%) were confirmed by PCR and sequencing analysis. In this group, 33 (89%) were CTX-M group 1 producers and carried the *bla*_{CTX-M-15} gene, whereas 4 (11%) were CTX-M group 9 producers and carried exclusively the *bla*_{CTX-M-14} gene. The *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} group 2, 8, and 25 genes were not detected. ESBL genes were detected alone in 4 (10.8%) of samples, and in association with one or two other β -lactamase-encoding genes (*bla*_{OXA} and *bla*_{TEM}) in 33 (89.2%) of samples. One CTX-M-15-producing isolate co-expressed an OXA-48-like en-

zyme (*E. coli* 667), and one non-ESBL-EC isolate harbored only the gene encoding the AmpC enzyme CMY-2 (*E. coli* 907) (Table 2).

E. coli phylogenetic groups

The phylogenetic group assignment of the 37 ESBL-EC and 178 non-ESBL-EC isolates is summarized in Table 3. The most common phylogenetic group was B2 (54.1% of ESBL-EC isolates and 48.3% of non-ESBL-EC isolates), followed by A (16.2%) and D (13.5%) for ESBL-EC isolates, and by B1 (15.2%), A (11.8%), and F (10.1%) for non-ESBL-EC isolates. One ESBL-EC and two non-ESBL-EC isolates did not belong to any known phylogenetic group. The AmpC- (*E. coli* 907) and the carbapenemase-producing (*E. coli* 667) isolates belonged to the B1 and C phylogenetic groups, respectively.

Discussion

This study was carried out to investigate the prevalence of MDR-EC among patients with UTI in Sétif University Hospital (Northeast Algeria). *E. coli* was the main UTI-causing pathogen (59.2%) among all the Enterobacteriaceae isolates, in accordance with previous studies.^{19,20} Among the 215 *E. coli* isolates, 162 (75.35%) were from women with a mean age of 34 ± 21.4 years. About 50% of all women will experience at least one UTI during their lifetime, and almost one-third will have more than one UTI episode that will require antibiotic treatment by the age of 24 years.²¹ A number of risk factors, such as pregnancy, menopause, and the shortness of the urethra and its close relationship with the anus, contribute to the higher UTI prevalence in women.²²

In this study, we found that the prevalence of ESBL-EC isolates (17%) in Sétif University Hospital was lower than that reported by Ayad *et al.* in Oran, Tlemcen, and Sidi Bel Abbes (28%), three hospitals from Northwestern Algeria, in 2016,²³ but, higher than that reported by Alem *et al.* in Rabat University Hospital in Morocco (6.1%), in 2015.²⁴ Moreover, ESBL-EC rate was significantly higher in inpatients compared with outpatients (27/101, 27% vs. 10/114,

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE STUDY POPULATION DIVIDED ACCORDING TO THE EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASE-PRODUCTION OR NOT OF THEIR *ESCHERICHIA COLI* ISOLATE

Factors	ESBL-positive (n=37), n (%)	ESBL-negative (n=178), n (%)	Odds ratio (95% CI)	p
Age (years)				0.042
<15	9 (20.5)	35 (79.5)	1	
15 to <60	17 (12.6)	118 (87.4)	0.56 (0.23–1.37)	
≥ 60	11 (30.6)	25 (69.4)	1.71 (0.62–4.74)	
Gender				0.227
Male	12 (32.4)	41 (23.0)	1.6 (0.74–3.47)	
Female	25 (67.6)	137 (77.0)		
Isolate origin				<0.0001
Inpatients	27 (73)	74 (41.6)	3.79 (1.73–8.31)	
Outpatients	10 (27)	104 (58.4)		
Previous use of antibiotics (past 3 months)	26 (70.3)	66 (37.1)	4.011 (1.86–8.64)	<0.0001

CI, confidence interval; ESBL, extended-spectrum β -lactamase; n, number.

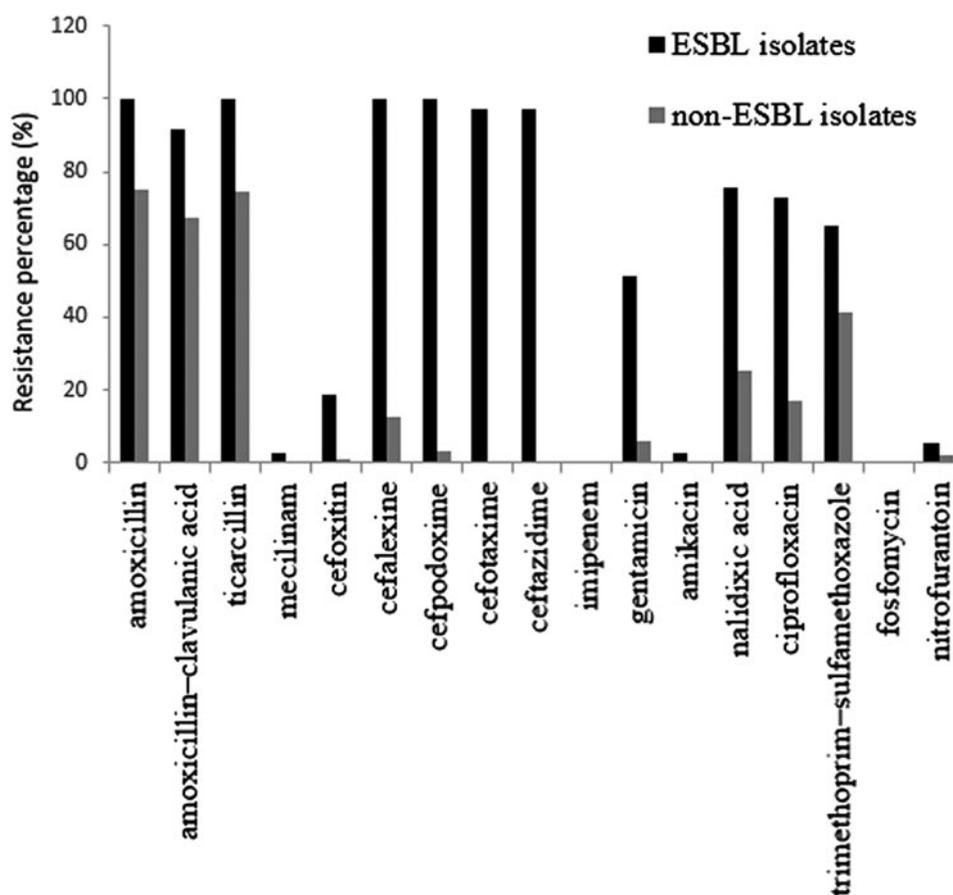


FIG. 1. Antibiotic resistance profile of the 37 ESBL-EC and 178 non-ESBL-EC isolates. ESBL-EC, extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli*.

9%, $p < 0.0001$), in accordance with previous works.^{25,26} This indicates that inpatients are more exposed to high antibiotic selective pressure, or bacterial cross-transmission. ESBL-EC prevalence was significantly higher among patients who were ≥ 60 years of age (OR: 1.71, $p = 0.042$). Among these older patients, 91% were hospitalized. UTI treatment and overtreatment in older patients represent a significant proportion of antibiotic prescriptions, favoring the proliferation of resistant bacteria in this group.²⁷ Furthermore, we found that ESBL-EC prevalence was significantly higher in patients previously treated with antibiotics ($p < 0.0001$), as previously reported.²⁵ The inappropriate or excessive use of antibiotics plays a major role in ESBL-EC diffusion. We think that this problem could be solved or limited by introducing policies to drastically restrict inappropriate antibiotic therapies.

ESBL-producing isolates showed high rates of resistance to quinolones/fluoroquinolones and aminoglycosides (except amikacin), confirming other reports.^{28,29} Most plasmids carrying ESBL-encoding genes are also responsible for resistance to other antibiotics, such as aminoglycosides and fluoroquinolones.³⁰ High rates of resistance to sulfamethoxazole-trimethoprim were observed in both ESBL-EC (64.9%) and non-ESBL-EC isolates (41.6%). This result can be explained by the easy access to this antibiotic and its massive and uncontrolled use in Algeria.

Among the 37 ESBL-EC isolates, 26 (70.3%) were still susceptible to temocillin and 3 (8.1%) to amoxicillin-clavulanic acid. Therefore, temocillin might constitute a good alternative to treat UTI caused by ESBL-EC. The combination of clavulanic acid and amoxicillin might be useful for the treatment of some cases of uncomplicated UTI caused by ESBL-EC. No resistance was observed for fosfomycin, and a low rate of resistance was found for nitrofurantoin, mecillinam, and amikacin. These antibiotics may constitute also reasonable treatment options for UTI caused by ESBL-EC isolates.

The molecular analysis showed that ESBL-EC isolates mostly produced CTX-M-15 (33/37, 89%). This is in agreement with previous molecular studies done in Algeria, thus confirming the predominance of CTX-M-15 enzymes among ESBL-EC in Algeria,^{23,31,32} and in other countries, such as Tunisia,^{33,34} Egypt,³⁵ Burkina Faso,³⁶ France,³⁷ Romania,³⁸ United States,³⁹ and South Korea.⁴⁰ The four remaining isolates (11%) were CTX-M-14 ESBL producers. CTX-M-14 and CTX-M-15 ESBL-EC strains are spread worldwide.⁷ However, in Algeria, only two studies described the presence of CTX-M-14 in *E. coli* strains.^{23,41} The CTX-M-15-producing isolate with the highest ertapenem MIC (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) co-expressed OXA-48-like, OXA-1 and TEM-1 enzymes. Very few studies on OXA-48-producing strains isolated from Algerian hospitals have been

TABLE 2. MOLECULAR CHARACTERIZATION AND MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION FOR ERTAPENEM AND TEMOCILLIN FOR THE 38 MULTIDRUG-RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES FROM INPATIENTS AND OUTPATIENTS

Isolate	Inpatients (n = 27)											Outpatients (n = 11)										
	ESBL type	Carbapenemases	Other β -lactamases	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			Isolates	ESBL TYPE	AmpC type	Other β -lactamases	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)											
				Ert	Temo	Temo					Ert	Temo	Ert	Temo								
<i>E. coli</i> 16 p	CTX-M-14	—	OXA-1	0.006	4	<i>E. coli</i> 627	CTX-M-15	—	OXA-1	0.006	4											
<i>E. coli</i> 275	CTX-M-15	—	OXA-1	0.016	4	<i>E. coli</i> 690	CTX-M-15	—	OXA-1	0.125	32											
<i>E. coli</i> 529	CTX-M-15	—	OXA-1	0.19	6	<i>E. coli</i> 57	CTX-M-15	—	TEM-1, OXA-1	0.016	6											
<i>E. coli</i> 660	CTX-M-15	—	OXA-1	0.032	4	<i>E. coli</i> 178	CTX-M-15	—	OXA-1	0.016	4											
<i>E. coli</i> 827	CTX-M-15	—	TEM-1	0.023	4	<i>E. coli</i> 710	CTX-M-15	—	TEM-1	0.004	6											
<i>E. coli</i> 194	CTX-M-15	—	TEM-1, OXA-1	0.012	4	<i>E. coli</i> 854	CTX-M-15	—	OXA-1	0.016	6											
<i>E. coli</i> 357	CTX-M-15	—	OXA-1	0.125	12	<i>E. coli</i> 69 p	CTX-M-14	—	TEM-1	0.016	6											
<i>E. coli</i> 409 p	CTX-M-15	—	OXA-1	0.012	4	<i>E. coli</i> 856	CTX-M-15	—	OXA-1	0.016	4											
<i>E. coli</i> 410	CTX-M-15	—	TEM-1, OXA-1	0.25	128	<i>E. coli</i> 907	—	CMY-2	—	—	6											
<i>E. coli</i> 482	CTX-M-15	—	OXA-1	0.008	6	<i>E. coli</i> 06	CTX-M-15	—	OXA-1	0.032	8											
<i>E. coli</i> 550	CTX-M-15	—	OXA-1	0.016	6	<i>E. coli</i> 265	CTX-M-15	—	OXA-1	0.004	3											
<i>E. coli</i> 733	CTX-M-15	—	TEM-1	0.012	4																	
<i>E. coli</i> 734	CTX-M-14	—	—	0.012	6																	
<i>E. coli</i> 873	CTX-M-15	—	OXA-1	0.008	12																	
<i>E. coli</i> 52	CTX-M-14	—	TEM-1	0.125	12																	
<i>E. coli</i> 282	CTX-M-15	—	TEM-1, OXA-1	0.047	4																	
<i>E. coli</i> 292	CTX-M-15	—	TEM-1, OXA-1	0.094	12																	
<i>E. coli</i> 451	CTX-M-15	—	TEM-1, OXA-1	0.047	8																	
<i>E. coli</i> 612	CTX-M-15	—	—	0.008	4																	
<i>E. coli</i> 622	CTX-M-15	—	TEM-1	0.032	8																	
<i>E. coli</i> 639	CTX-M-15	—	TEM-1, OXA-1	0.125	128																	
<i>E. coli</i> 667	CTX-M-15	OXA-48	TEM-1, OXA-1	0.5	>1,024																	
<i>E. coli</i> 149	CTX-M-15	—	OXA-1	0.25	12																	
<i>E. coli</i> 153	CTX-M-15	—	OXA-1	0.064	4																	
<i>E. coli</i> 271	CTX-M-15	—	—	0.023	24																	
<i>E. coli</i> 181	CTX-M-15	—	—	0.008	8																	
<i>E. coli</i> 300	CTX-M-15	—	TEM-1, OXA-1	0.016	6																	

Ert, ertapenem ; MIC, minimal inhibitory concentration; Temo, temocillin.

TABLE 3. PHYLOGENETIC GROUP ASSIGNMENT OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES

Phylogenetic group	ESBL-EC (n=37), n (%)	Non-ESBL-EC (n=178), n (%)	Total (n=215), n (%)
A	6 (16.2)	21 (11.8)	27 (12.6)
B1	1 (2.7)	27 (15.2)	28 (13)
B2	20 (54.1)	86 (48.3)	106 (49.3)
C	3 (8.1)	13 (7.3)	16 (7.4)
D	5 (13.5)	10 (5.6)	15 (7)
E	—	—	—
F	1 (2.7)	18 (10.1)	19 (8.8)
Clade I	—	1 (0.6)	1 (0.5)
Unknown	1 (2.7)	2 (1.1)	3 (1.4)

ESBL-EC: extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli*, non-ESBL-EC: nonextended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli*.

published.^{13,42,43} This is the first study that reports the identification of an OXA-48-like and CTX-M-producing *E. coli* isolate in Algeria. Although carbapenemase production in our *E. coli* isolates was limited ($n=1$, 0.005%), this constitutes a serious problem because carbapenems are in many cases considered as the last line of therapy. Moreover, one isolate (*E. coli* 907) harbored the CMY-2 enzyme that is the most common AmpC in *E. coli* strains.⁷ Low prevalence of AmpC in uropathogenic *E. coli* was previously reported in Algeria⁴⁴ and France.⁴⁵

The phylogenetic group analysis of the 215 *E. coli* isolates revealed the presence of seven phylogenetic groups: A, B1, B2, C, D, F, and clade I. The most common phylogenetic group was B2 (106/215, 49.3%), in agreement with many previous studies showing a high prevalence of this group in extraintestinal pathogenic *E. coli* strains.^{46–49} The 37 ESBL-EC isolates were distributed in different groups, mainly B2 (20), A (6), and D (5). The presence of ESBL-EC in all major phylogenetic groups reflects the spread of such enzymes across *E. coli* strains. Moreover, the F and B1 phylogenetic groups were more represented among non-ESBL-EC (10.1% and 15.2%) than among ESBL-EC isolates (2.7% and 2.7%), suggesting that *E. coli* strains of the F and B1 phylogenetic groups rarely harbor multidrug resistance. Finally, the three isolates that could not be classified according to the new Clermont phylotyping method might represent a new phylogenetic group.

In conclusion, our study demonstrated that ESBLs, CTX-M-type, and B2 phylogenetic group are prevalent in *E. coli* isolates from patients with UTI in Algeria. We identified the first CTX-M-type ESBL-EC that co-expresses OXA-48, OXA-1, and TEM-1 enzymes in Sétif University Hospital. The emergence of strains harboring several beta-lactamases simultaneously (ESBLs, OXA-48, and AmpC) is a major problem. Additional studies are needed to monitor the dissemination of such MDR pathogens in the Algerian population.

Acknowledgments

The Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria supported this work with the collaboration of the Bacteriology-Virology Department, Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Montpellier, France. We

thank Elisabetta Andermarcher for assistance in preparing and editing the article.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Foxman, B. 2010. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* 7:653–660.
2. Vila, J., E. Saez-Lopez, J.R. Johnson, U. Romling, U. Dobrindt, R. Canton, C.G. Giske, T. Naas, A. Carattoli, M. Martinez-Medina, J. Bosch, P. Retamar, J. Rodriguez-Bano, F. Baquero and S.M. Soto. 2016. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol. Rev.* 40:437–463.
3. Rahal, J.J. 2017. Extended-spectrum beta-lactamases: how big is the problem? *Clin. Microbiol. Infect.* 6:2–6.
4. Yu, Y., S. Ji, Y. Chen, W. Zhou, Z. Wei, L. Li, and Y. Ma. 2007. Resistance of strains producing extended-spectrum beta-lactamases and genotype distribution in China. *J. Infect.* 54:53–57.
5. D'Andrea, M.M., F. Arena, L. Pallecchi, and G.M. Rosolini. 2013. CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* 303: 305–317.
6. Naseer, U., and A. Sundsfjord. 2011. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb. Drug Resist.* 17:83–97.
7. Bajaj, P., N.S. Singh, and J.S. Virdi. 2016. *Escherichia coli* β -lactamases: what really matters. *Front. Microbiol.* 7:417.
8. Touati, A., S. Benallaoua, D. Forte, J. Madoux, L. Brasme, and C. de Champs. 2006. First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bejaia, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27:397–402.
9. Nordmann, P., T. Naas, and L. Poirel. 2011. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1791–1798.
10. Poirel, L., A. Potron, and P. Nordmann. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:1597–1606.
11. Girlich, D., N. Bouihat, L. Poirel, A. Benouda, and P. Nordmann. 2014. High rate of faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at a university hospital in Morocco. *Clin. Microbiol. Infect.* 20:350–354.
12. Saidani, M., S. Hammami, A. Kammoun, A. Slim, and I. Boutiba-Ben Boubaker. 2012. Emergence of carbapenem-resistant OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Tunisia. *J. Med. Microbiol.* 61: 1746–1749.
13. Agabou, A., A. Pantel, Z. Ouchenane, N. Lezzar, S. Khemissi, D. Satta, A. Sotto and J.P. Lavigne. 2014. First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33:1641–1646.
14. Seng, P., M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P.-E. Fournier, J.M. Rolain, and D. Raoult. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49:543–551.
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2017. Breakpoint tables for interpre-

- tation of MICs and Zone Diameters. Version 7.1 April 2017. Available at www.eucast.org. (Online.)
16. Jarlier, V., M.H. Nicolas, G. Fournier, and A. Philippon. 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10:867–878.
 17. Dallenne, C., A. Da Costa, D. Decre, C. Favier, and G. Arlet. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:490–495.
 18. Clermont, O., J.K. Christenson, E. Denamur, and D.M. Gordon. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5:58–65.
 19. Farrell, D.J., I. Morrissey, D. De Rubeis, M. Robbins, and D. Felmingham. 2003. A UK multicentre study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. *J. Infect.* 46:94–100.
 20. Lu, P.L., Y.C. Liu, H.S. Toh, Y.L. Lee, Y.M. Liu, C.M. Ho, C.C. Huang, C.E. Liu, W.C. Ko, J.H. Wang, H.J. Tang, K.W. Yu, Y.S. Chen, Y.C. Chuang, Y. Xu, Y. Ni, Y.H. Chen, and P.R. Hsueh. 2012. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: 2009–2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Int. J. Antimicrob. Agents* 40 Suppl:S37–S43.
 21. Foxman, B. 2002. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am. J. Med.* 113 Suppl 1A:5S–13S.
 22. Minardi, D., G. d'Anzeo, D. Cantoro, A. Conti, and G. Muzzonigro. 2011. Urinary tract infections in women: etiology and treatment options. *Int. J. Gen. Med.* 4:333–343.
 23. Ayad, A., M. Drissi, C. de Curraize, C. Dupont, A. Hartmann, S. Solanas, E. Sieber, L. Amoureux, and C. Neuwirth. 2016. Occurrence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in extended-spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* in Algerian hospitals. *Front. Microbiol.* 7:1409.
 24. Alem, N., M. Frikh, A. Srfifi, A. Maleb, M. Chadli, Y. Sekhsokh, L. Louzi, A. Ibrahim, A. Lemnouer, and M. Elouennass. 2015. Evaluation of antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated in Rabat University Hospital (Morocco). *BMC Res. Notes* 8:392.
 25. Lee, D.S., C.B. Lee, and S.-J. Lee. 2010. Prevalence and risk factors for extended spectrum beta-lactamase-producing uropathogens in patients with urinary tract infection. *Korean J. Urol.* 51:492–497.
 26. Gholipour, A., N. Soleimani, D. Shokri, S. Mobasherizadeh, M. Kardi, and A. Baradaran. 2014. Phenotypic and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase produced by *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates in an educational hospital. *Jundishapur J. Microbiol.* 7:e11758.
 27. Cortes-Penfield, N.W., B.W. Trautner, and R.L.P. Jump. 2017. Urinary tract infection and asymptomatic bacteriuria in older adults. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 31:673–688.
 28. Canton, R., and P. Ruiz-Garbajosa. 2011. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11:477–485.36.
 29. Zurfluh, K., H. Abgottsporn, H. Hächler, M. Nüesch-Inderbinen, and R. Stephan. 2014. Quinolone resistance mechanisms among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from rivers and lakes in Switzerland. *PLoS One* 9:e95864.
 30. Yu, H.S., J.C. Lee, H.Y. Kang, Y.S. Jeong, E.Y. Lee, C.H. Choi, S.H. Tae, Y.C. Lee, S.Y. Seol, and D.T. Cho. 2004. Prevalence of dfr genes associated with integrons and dissemination of dfrA17 among urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:445–450.
 31. Ramdani-Bouguessa, N., N. Mendonça, J. Leitão, E. Ferreira, M. Tazir, and M. Caniça. 2006. CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *J. Clin. Microbiol.* 44:4584–4586.
 32. Baba Ahmed-Kazi Tani, Z., D. Decre, N. Genel, Z. Boucherit-Otmani, G. Arlet, and M. Drissi. 2013. Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). *Microb. Drug Resist.* 19:185–190.
 33. Dahmen, S., D. Bettaieb, W. Mansour, N. Boujaafar, O. Bouallegue, and G. Arlet. 2010. Characterization and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in a Tunisian University Hospital. *Microb. Drug Resist.* 16: 163–170.
 34. Mnif, B., H. Harhour, J. Jdidi, F. Mahjoubi, N. Genel, G. Arlet, and A. Hammami. 2013. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Tunisia and characterization of their virulence factors and plasmid addiction systems. *BMC Microbiol.* 13:147.
 35. Fam, N., V. Leflon-Guibout, S. Fouad, L. Aboul-Fadl, E. Marcon, D. Desouky, I. El-Defrawy, A. Abou-Aitta, J. Klena, and M.-H. Nicolas-Chanoine. 2011. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Cairo (Egypt), including isolates of clonal complex ST10 and clones ST131, ST73, and ST405 in both community and hospital settings. *Microb. Drug Resist.* 17:67–73.
 36. Ouedraogo, A.-S., M. Sanou, A. Kissou, S. Sanou, H. Solaré, F. Kaboré, A. Poda, S. Aberkane, N. Bouzinbi, I. Sano, B. Nacro, L. Sangaré, C. Carrière, D. Decré, R. Ouégraogo, H. Jean-Pierre, and S. Godreuil. 2016. High prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae among clinical isolates in Burkina Faso. *BMC Infect. Dis.* 16:326.
 37. Nicolas-Chanoine, M.-H., and V. Jarlier. 2008. Extended-spectrum beta-lactamases in long-term-care facilities. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 Suppl 1:111–116.
 38. Maciucă, I.E., N.J. Williams, C. Tuchilus, O. Dorneanu, E. Guguianu, C. Carp-Carare, C. Rimbu, and D. Timofte. 2015. High prevalence of *Escherichia coli*-producing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in poultry and human clinical isolates in Romania. *Microb. Drug Resist.* 21:651–662.
 39. Chen, L.F., J.T. Freeman, B. Nicholson, A. Keiger, S. Lancaster, M. Joyce, C.W. Woods, E. Cook, L. Adcock, S. Louis, A.L. Cromer, D.J. Sexton, and D.J. Anderson. 2014. Widespread dissemination of CTX-M-15 genotype extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae among patients presenting to community hospitals in the South-eastern United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58: 1200–1202.
 40. Graham, S.E., L. Zhang, I. Ali, Y.K. Cho, M.D. Ismail, H.A. Carlson, and B. Foxman. 2016. Prevalence of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and sequence type 131

- in Korean blood, urine, and rectal *Escherichia coli* isolates. *Infect. Genet. Evol.* 41:292–295.
41. Medboua-Benbalagh, C., A. Touati, R. Kermas, A. Gharout-Sait, L. Brasme, H. Mezhoud, D. Touati, T. Guillard, and C. de Champs. 2017. Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae strains is associated with worse outcome in patients hospitalized in the pediatric oncology unit of Beni-Messous Hospital in Algiers, Algeria. *Microb. Drug Resist.* 23:757–763.
 42. Cuzon, G., C. Bentchouala, A. Vogel, M. Héry, A. Lezzar, F. Smati, L. Dortet, and T. Naas. 2015. First outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Constantine, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46:725–727.
 43. Mellouk, F.Z., S. Bakour, S. Meradji, C. Al-Bayssari, M.C. Bentakouk, F. Zouyed, A. Djahoudi, N. Boutefnouchet, and J.M. Rolain. 2017. First detection of VIM-4-producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria. *Microb. Drug Resist.* 23:335–344.
 44. Yahiaoui, M., F. Robin, R. Bakour, M. Hamidi, R. Bonnet, and Y. Messai. 2015. Antibiotic resistance, virulence, and genetic background of community-acquired uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. *Microb. Drug Resist.* 21: 516–526.
 45. Fabre, R., A. Mérens, F. Lefebvre, G. Epifanoff, F. Cerutti, H. Pupin, D. Tardif, J.-D. Cavallo, and I. Ternois. 2010. Susceptibility to antibiotics of *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections. *Médecine Mal. Infect.* 40:555–559. (In French.)
 46. Coque, T.M., Á. Novais, A. Carattoli, L. Poirel, J. Pitout, L. Peixe, F. Baquero, R. Cantón, and P. Nordmann. 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* 14:195–200.
 47. Molina-Lopez, J., G. Aparicio-Ozores, R.M. Ribas-Aparicio, S. Gavilanes-Parra, M.E. Chavez-Berrocal, R. Hernandez-Castro, and HÁ. Manjarrez-Hernández. 2011. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J. Infect. Dev. Ctries.* 5:840–849.
 48. Lee, J.H., B. Subhadra, Y.-J. Son, D.H. Kim, H.S. Park, J.M. Kim, S.H. Koo, M.H. Oh, H.J. Kim, and C.H. Choi. 2016. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Lett. Appl. Microbiol.* 62: 84–90.
 49. Munkhdelger, Y., N. Gunregjav, A. Dorjpurev, N. Ju-niichiro, and J. Sarantuya. 2017. Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *J. Infect. Dev. Ctries.* 11:51–57.

Address correspondence to:

Larbi Zakaria Nabti, MS
 Département des Sciences Naturelles
 École Normale Supérieure Assia djebbar, Constantine
 Ville Universitaire
 Ain El Bey Ali Mendjeli
 Constantine 25000
 Algérie

E-mail: nature_zak@hotmail.com

ARTICLE 2



Letter to the Editor

Autochthonous case of mobile colistin resistance gene *mcr-1* from a uropathogenic *Escherichia coli* isolate in Sétif Hospital, Algeria


Sir,

Urinary tract infections (UTIs) are considered one of the most common bacterial infections occurring both in community and hospital settings [1]. *Escherichia coli* is the most prevalent pathogen known to cause UTIs [1]. As with any other species of Enterobacteriaceae, *E. coli* has become more resistant to the action of antibiotics such as third-generation cephalosporins and carbapenems [1]. The re-introduction of colistin in some clinical situations to treat carbapenem-resistant Enterobacteriaceae was quickly followed by the emergence of resistance to this antibiotic [2]. Currently, nine mobile colistin resistance genes (*mcr-1* to *mcr-9*) have been described [3]. The aim of this study was to screen for uropathogenic colistin-resistant *E. coli* strains at Sétif Hospital in Northeastern Algeria and to investigate the molecular mechanisms conferring colistin resistance.

A total of 237 non-duplicate uropathogenic *E. coli* isolates were obtained between January 2015 and October 2017 from urine samples received at the microbiology laboratory of CHU de Sétif

(Sétif, Algeria). Isolates were identified by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS). Real-time and standard PCR were performed for all 237 isolates to screen for *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* and *mcr-8* plasmid-mediated colistin resistance genes. Positive standard PCR products were purified and were sequenced using a 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi, Foster City, CA, USA). The nucleotide sequences obtained were assembled using CodonCode Aligner software and were analysed using the ARG-ANNOT database.

Molecular analysis revealed that one isolate (*E. coli* strain 115) harboured the *mcr-1* gene. This isolate was recovered from a urine sample of a 69-year-old man with a urinary catheter hospitalised at Sétif Hospital. This patient had not received colistin during his hospital stay and had no history of travel abroad. Broth micro-dilution revealed that *E. coli* 115 had a colistin minimum inhibitory concentration (MIC) of 4 mg/L and was also resistant to amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefalotin, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole and ciprofloxacin, but remained susceptible to ceftriaxone, cefepime, piperacillin/tazobactam, imipenem, ertapenem, gentamicin, amikacin, nitrofurantoin and fosfomycin. A conjugation experiment conducted in triplicate was unsuccessful, suggesting that the *mcr-1* gene was located on a non-transferable plasmid or on the chromosome, as previously reported [4–6].

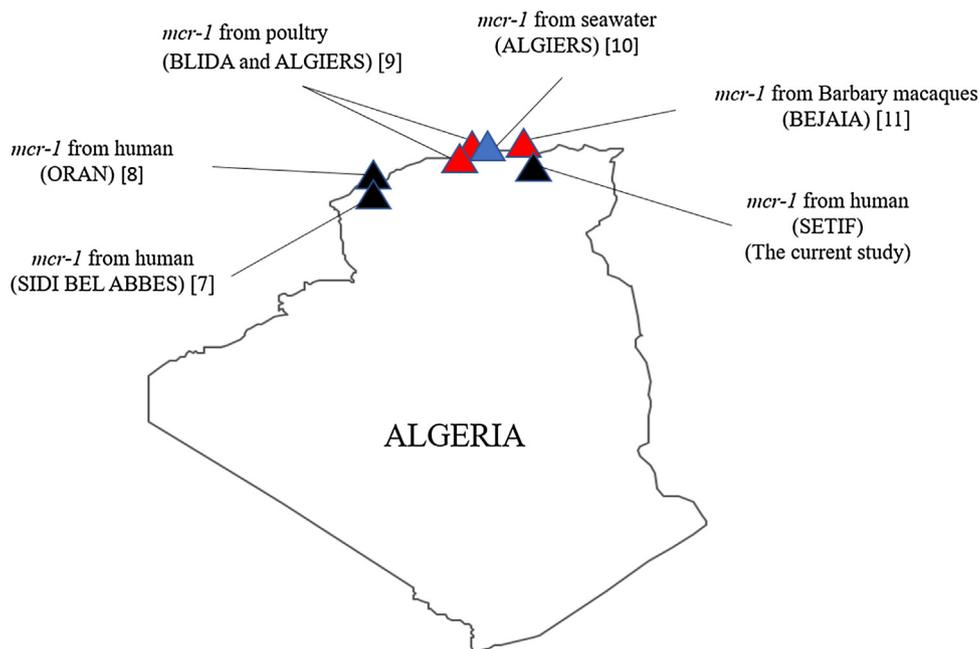


Fig. 1. Geographic distribution of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* isolated from humans, animals and the environment in Algeria.

Real-time PCR assay targeting the *mcr-2* to *mcr-8* genes was negative for all 237 isolates tested. Other molecular analyses performed for the 237 isolates are summarised in Supplementary Table S1.

To the best of our knowledge, here we report the first autochthonous case of a phosphoethanolamine transferase *mcr-1* gene isolated from a uropathogenic *E. coli* isolate in Sétif Hospital (Northeast Algeria). To date, *mcr-1* is the only plasmid-mediated colistin resistance mechanism reported in Algeria (Fig. 1). This gene was described previously from two clinical isolates from the west of Algeria, one in Sidi Bel Abbes [7] and the second in Oran [8] (Fig. 1). In the current study, the origin of the uropathogenic *E. coli* strain harbouring the *mcr-1* gene and its relationship with a possible animal reservoir remain unknown. Use of colistin in some livestock in Algeria suggests that these farms may be the main source of transmission of colistin resistance to humans. As shown on Fig. 1, reported *mcr-1* cases from humans and the environment in Algeria has been highlighted [9,10,11].

Screening for *mcr-1* and other colistin resistance genes in further clinical isolates and samples should be immediately investigated in order to estimate their prevalence and to understand the mechanisms of dissemination of these genes in the clinical setting.

Funding

This work was supported by the French Government under the 'Investissements d'avenir' [reference: Méditerranée Infection 10-IAHU-03] and by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

Competing interests

None declared.

Ethical approval

Not required.

Acknowledgment

The authors thank the IHU Méditerranée Infection (Marseille, France) for financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.10.006>.

References

- [1] Nabti LZ, Sahli F, Radji N, Mezaghcha W, Semara L, Aberkane S, et al. High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* in urine samples from inpatients and outpatients at a tertiary care hospital in Sétif, Algeria. *Microb Drug Resist* 2019;25:386–93.
- [2] Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev* 2017;30:557–96.
- [3] Carroll LM, Gaballa A, Guldimann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. *mBio* 2019;10: pii: e00853-19.
- [4] Lu X, Xiao X, Liu Y, Li Y, Li R, Wang Z. Chromosome-mediated *mcr-1* in *Escherichia coli* strain L73 from a goose. *Int J Antimicrob Agents* 2019;54:99–101.
- [5] Zhou H, Zhang T, Fang Y, Wang H, Huang Z, Wang Y, et al. Occurrence of plasmid- and chromosome-carried *mcr-1* in waterborne Enterobacteriaceae in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61: pii: e00017-17.
- [6] Zajac M, Sztromwasser P, Bortolaia V, Leekitcharoenphon P, Cavaco LM, Ziętek-Barszcz A, et al. Occurrence and characterization of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Poland, 2011–2016. *Front Microbiol* 2019;10:1753.
- [7] Berrazeg M, Hadjadj L, Ayad A, Drissi M, Rolain J-M. First detected human case in Algeria of *mcr-1* plasmid-mediated colistin resistance in a 2011 *Escherichia coli* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:6996–7.
- [8] Yanat B, Machuca J, Yahia RD, Touati A, Pascual A, Rodriguez-Martinez J-M. First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate in Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 2016;48:760–1.
- [9] Chabou S, Leulmi H, Rolain J-M. Emergence of *mcr-1*-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* isolates from poultry in Algeria. *J Glob Antimicrob Resist* 2019;16:115–6.
- [10] Drali R, Berrazeg M, Zidouni LL, Hamitouche F, Abbas AA, Deriet A, et al. Emergence of *mcr-1* plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from seawater. *Sci Total Environ* 2018;642:90–4.
- [11] Bachiri T, Lalaoui R, Bakour S, Allouache M, Belkebla N, Rolain JM, et al. First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* ST405 isolated from wildlife in Bejaia, Algeria. *Microb Drug Resist* 2017;24:890–5.

Larbi Zakaria Nabti^{a,b,c}

^aUniversité de Sétif 1, Faculté de Médecine, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Sétif, Laboratoire de Microbiologie, Sétif, Algeria

^bDépartement des Sciences Naturelles, École Normale Supérieure Assia DJEBAR, Constantine, Algeria

^cAix-Marseille Université, IRD, APHM, MEPHI, IHU Méditerranée Infection, 19–21 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

Farida Sahli

Université de Sétif 1, Faculté de Médecine, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Sétif, Laboratoire de Microbiologie, Sétif, Algeria

Linda Hadjadj^{a,b}

^aAix-Marseille Université, IRD, APHM, MEPHI, IHU Méditerranée Infection, 19–21 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

^bIHU Méditerranée Infection, Marseille, France

Edgarthe Priscilla Ngaiganam^{a,b}

David Lupande-Mwenebitu^{a,b}

^aDépartement des Sciences Naturelles, École Normale Supérieure Assia DJEBAR, Constantine, Algeria

^bAix-Marseille Université, IRD, APHM, MEPHI, IHU Méditerranée Infection, 19–21 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

Jean-Marc Rolain^{a,b}

Seydina M. Diene^{a,b,*}

^aAix-Marseille Université, IRD, APHM, MEPHI, IHU Méditerranée Infection, 19–21 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

^bIHU Méditerranée Infection, Marseille, France

* Corresponding author. Present address: Aix-Marseille Université, MEPHI, IHU Méditerranée Infection, 19–21 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France.
E-mail address: seydina.diene@univ-amu.fr (S. Diene).

Received 21 August 2019

Available online 9 November 2019

ARTICLE 3



Development of real-time PCR assay allowed describing the first clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate harboring plasmid-mediated colistin resistance *mcr-8* gene in Algeria



Larbi Zakaria Nabti^{a,b,c}, Farida Sahli^a, Edgarthe Priscilla Ngaiganam^{c,d}, Nadia Radji^a, Wahiba Mezaghcha^a, David Lupande-Mwenebitu^{c,d}, Sophie Alexandra Baron^{c,d}, Jean-Marc Rolain^{c,d}, Seydina M. Diene^{c,d,*}

^a Université de Sétif 1, Faculté de Médecine, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Sétif, Laboratoire de Microbiologie, Sétif, Algeria

^b Département des Sciences Naturelles, École Normale Supérieure Assia DJEBAR, Constantine, Algeria

^c Aix-Marseille Univ., IRD, APHM, MEPHI, IHU-Mediterranee Infection, 19-21 boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France

^d IHU-Mediterranee Infection, Marseille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 June 2019

Received in revised form 20 August 2019

Accepted 22 August 2019

Available online 30 August 2019

Keywords:

Colistin resistance

mcr-8 gene

Real-time-PCR assay

Diagnostic tool

TaqMan probe

ABSTRACT

Objectives: We aimed to develop here a specific real-time PCR assay with TaqMan[®] probe to detect efficiently bacterial strains harboring the new plasmid mediated-colistin resistance *mcr-8* gene.

Methods: Specific primers and probe for *mcr-8* gene were designed from sequences alignment of all *mcr* genes variants. Specificity of the designed primers and probe were first checked par BlastN analysis and by *in silico* PCR. The analytical sensitivity and specificity tests were performed *in vitro* on a panel of 290 genomic DNA of Gram-negative bacteria and 250 metagenomic DNA from human stool samples. Whole genome sequencing (WGS) was performed here using MiSeq technology.

Results: Designed primers and probe were 100% specific to *mcr-8* gene by BlastN and *in silico* PCR analysis. Real-time PCR screening of a collection of clinical isolates resulted to one positive *Klebsiella pneumoniae* isolate (KP95). WGS confirmed that this isolate harbored the *mcr-8* gene and other resistance genes such as *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M-15} β-lactamases. Our real-time PCR was highly sensitive on a 10-fold dilution serie from a calibrated inoculum at 10⁸ CFU/mL with a limit of detection at 55 CFU/mL.

Conclusion: To the best of our knowledge, we propose here, the first real-time PCR assay targeting *mcr-8* gene with high specificity and sensitivity, able to detect *mcr-8* gene in less than 2 h from any DNA sample. This real-time PCR assay allowed the first description of a clinical *K. pneumoniae* strain harboring the *mcr-8* gene in Algeria.

© 2019 International Society for Antimicrobial Chemotherapy. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

The emergence of carbapenems resistance is one of the leading causes of colistin reintroduction in the 1990s for the treatment of infections caused by multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria [1]. However, increasing resistance to colistin has been reported worldwide, in both hospital and non-hospital settings [2]. This colistin resistance has become a major concern since the 2015 description of the plasmid-mediated *mcr-1* colistin resistance gene [3]. Moreover, since the *mcr-1* description, six others mobile colistin resistance genes, including *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*,

mcr-6 (the new name of *mcr-2.2*) and *mcr-7*, have been reported from different countries around the world in both humans and animals [4–9]. In 2018, a new variant of this gene, named *mcr-8*, has been described in China in an animal origin *Klebsiella pneumoniae* strain [10]. Very recently, *mcr-9*, the latest variant of *mcr*-genes was described from a clinical *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strain [11]. Most of these *mcr*-variants are investigated in research and diagnostic laboratories by molecular tools, such as standard PCR and/or real-time PCR assays and have been reported in the literature. The implementation of molecular tools allows real-time monitoring and control of the spread of MDR bacteria or antibiotic resistance genes. Such systems should be implemented as soon as new genes for antibiotic resistance emerge.

Since the new MCR-8 enzyme was different from previously identified MCR enzymes, we aimed in this study: (i) to develop a

* Corresponding author at: Aix Marseille Univ, IRD, APHM, MEPHI, IHU Mediterranean Infection, Faculte de Pharmacie, Marseille, France.
E-mail address: seydina.diene@univ-amu.fr (S.M. Diene).

specific real-time PCR assay with TaqMan[®] probe targeting the new mobile colistin resistance *mcr-8* gene for its accurate and efficient detection in any suspected bacterial strains and in any biological samples; and (ii) to screen for the presence of the *mcr-8* gene in a local collection of clinical Gram-negative bacteria (GNB).

2. Methods

2.1. Specific primers and probe design

Nucleotide sequences of *mcr* variant genes *mcr-1.1*, *mcr-2.1*, *mcr-3.1*, *mcr-4.1*, *mcr-5.1*, *mcr-6.1*, *mcr-7.1*, *mcr-8.1*, *mcr-8.2*, *mcr-8.4*, and *mcr-9* were collected from the NCBI database. From the nucleotide alignment of all the recovered sequences, a specific sequence to the *mcr-8* variants was identified and primers and probe were then designed from these sequences using the Primer3 online software (<http://primer3.ut.ee/>). Specificity of the designed primers and probe were first evaluated by *in silico* PCR (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) against all *mcr* variant genes and also by BlastN analysis against the no redundant NCBI database.

2.2. Screening for *mcr-8* producing isolates

A collection of 120 clinical GNB isolated in 2018 from different wards at the university hospital of Sétif, Algeria was used to screen blindly (i.e. independently to their resistance phenotypes) for the *mcr-8* gene by real-time PCR using the new designed TaqMan probe and primers. One *mcr-8*-producing *K. pneumoniae* strain, isolated from Laos, was used as a positive control [37]. For real-time PCR positive isolates, colistin minimal inhibitory concentration (MIC) was determined according to the EUCAST guidelines, using the broth microdilution method.

2.3. Whole genome sequencing of the *mcr-8*-producing isolate

The genomic DNA was extracted from isolate showing a positive *mcr-8* real-time PCR, using EZ1 Advanced xL robot (Qiagen BioRobot EZ1, Tokyo, Japan), following the manufacturer's instructions. WGS was performed using MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) technology. SPAdes [12] and RAST [13] were used for genome assembly and genome annotation respectively. Genome analysis was performed using tools available from the Center for Genomic Epidemiology website (<http://www.genomicepidemiology.org/>). The antibiotic resistance genes content were investigated using ResFinder [14] and ARG-ANNOT databases [15].

Multilocus sequence typing (MLST) was carried out using an MLST database [16]. To identify the genetic environment of *mcr-8* gene, a Blastx was performed on NCBI database to investigate all genes present around *mcr-8*. The results were compared with the genetic environments of *mcr-8*-harboring *K. pneumoniae* isolated in China from pig feces [10] (1 isolate) and *Raoultella ornithinolytica* from chicken cloaca (2 isolates) [17].

2.4. Specificity and sensitivity test

In order to evaluate the specificity and the sensitivity of our real-time PCR system, genomic DNA of a total of 290 Gram-negative bacterial strains, including *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Providencia rettgeri*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* were tested. These isolates were mostly obtained from clinical samples analyzed at the microbiology laboratory of Sétif university hospital, Algeria. Species identification was performed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) method (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). To extend the assessment of the specificity of our system, the whole DNA extracted from 250 human stool samples, representative of a variety of metagenomic DNA, were tested. Characteristics of all strains and used samples in this study are summarized on Table 1. The sensitivity and reproducibility of the new developed real-time PCR was performed using 10-fold dilution series of an initial calibrated inoculum at 10⁸ colony forming units/mL (CFU/mL) of a *K. pneumoniae* isolate carrying the *mcr-8* gene. For reproducibility test, each dilution was tested five times. The quantitative PCR was performed in triplicate. A standard curve based on the concordance between cycle threshold (Ct) values obtained and number of log CFU/mL was established and PCR efficiency was calculated. The limit of detection was obtained by standard bacterial count on trypticase soy agar (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) plates grown overnight at 37 °C and was based on the final dilution detected by the real-time PCR. The real-time PCR run was performed from a DNA extracted from a single colony for each isolate in a final volume of 200 µL of distilled water. For stool samples, DNA extraction was performed using EZ1 Advanced xL robot (Qiagen BioRobot EZ1, Tokyo, Japan), following the manufacturer's instructions. Quantification of the *mcr-8* gene was conducted in a CFX96 RT-PCR system (Bio-Rad, Singapore). The real-time PCR system contained the following: 10 µL of 2X qPCR Master Mix (Thermo Fisher, Vilnius, Lithuania), 1 µL of forward primer

Table 1

Strains and samples used in this study to test specificity and sensitivity of the novel real-time PCR assay.

Strains/samples tested	Number of strains/samples	Colistin MIC (mg/L)	Mechanism of colistin resistance	CT value	Isolates source	Origins (Reference)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	8	<i>mcr-8</i>	20–25	Human	Algeria (this study)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	32	<i>mcr-8</i>	20–25	Human	Laos [37]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	32	<i>mcr-3</i>	No Ct	Human	Laos [37]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	128	<i>mcrB</i> truncated by IS10R	No Ct	Human	Algeria (this study)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	44	<2	Susceptible to colistin	No Ct	Human	Algeria (this study)
<i>Escherichia coli</i>	1	4	<i>mcr-2</i>	No Ct	Animal	Belgium [4]
<i>Escherichia coli</i>	2	4	<i>mcr-1</i>	No Ct	Human	Algeria (this study), [35] ^a
<i>Escherichia coli</i>	214	<2	Susceptible to colistin	No Ct	Human	Algeria [36]
<i>Proteus mirabilis</i>	5	>256	Intrinsic resistance	No Ct	Human	Algeria (this study)
<i>Serratia marcescens</i>	4	> 256	Intrinsic resistance	No Ct	Human	Algeria (this study)
<i>Providencia rettgeri</i>	1	>256	Intrinsic resistance	No Ct	Human	Algeria (this study)
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	< 2	Susceptible to colistin	No Ct	Human	Algeria (this study)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	<2	Susceptible to colistin	No Ct	Human	Algeria (this study)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	7	<2	Susceptible to colistin	No Ct	Human	Algeria (this study)
Stool samples	250	–	–	No Ct	Human	France (this study)

^a One of the two strains is already published.

(20 μ M), 1 μ l of reverse primer (20 μ M), 1 μ l of TaqMan probe (20 μ M), 2 μ l of nuclease-free H₂O and 5 μ l DNA. The real-time PCR assay conditions were as follows: 50 °C for 2 min, 95 °C for 15 min, 35 cycles of 95 °C for 1 s and 65 °C for 30 s.

3. Results

3.1. Primers and probe design

According to the nucleotide sequence alignment of all collected *mcr* gene variants, specific primers and probe sequences targeting 158-bp of *mcr-8* gene were designed: MCR-8_RT-F: 5'-TCCGGGATGCGTGACGTTGC-3'; MCR-8_RT-R: 3'-TGCTGCGCGAATGAAGACGA-5'; MCR-8_RT-Probe: FAM-TCATGGAGAATCGCTGGGG-GAAAGC-TAMRA. BlastN analysis of these sequences against the NCBI database showed a 100% homology and 100% coverage with the *mcr-8* variant genes only. The performed *in silico* PCR analysis against all *mcr* variants reveals also 100% of specificity to *mcr-8* sequences only.

3.2. Screening *mcr-8* from clinical bacterial isolates

To look for putative clinical isolates harboring this colistin resistance *mcr-8* gene, our designed real-time PCR was applied to extracted genomic DNA samples of a total of 120 clinical strains isolated at the university hospital of Sétif, Algeria. Interestingly, the performed real-time PCR assay was positive for one *K. pneumoniae* isolate (KP95) with cycle thresholds (Ct) value at 20.26. Antibiotic susceptibility testing by broth microdilution reveals that this KP95 isolate was resistant to colistin with MIC of 8 μ g/mL. The KP95 isolate was isolated from sample of oral cavity pus from a 25-year-old man with lymphoma who was hospitalized in October 2018 in a medical unit at the University Hospital in Sétif, Algeria. The patient has no history of travel abroad and has never received colistin treatment before.

3.3. Whole genome sequence (WGS) analysis

Performed WGS of the KP95 isolate revealed that it is assigned to ST336 sequence type group, which belong to the clonal complex CC17. KP95 harbored different antibiotic resistance genes including: *mcr-8*-mediated colistin resistance gene, carbapenemase *bla*_{OXA-48} gene, extended spectrum- β -lactamase *bla*_{CTX-M-15} gene, and other antibiotic resistance genes (Table 2). KP95 isolate also carried several virulence genes, including *ybtAEPQSTUX*, *irp1*, *irp2* and *fyuA*. Moreover, as shown on Fig. 1,

the genetic environment of 15849-bp surrounding *mcr-8* gene of our KP95 isolate was identical to that described from *K. pneumoniae* plasmid pKP91 (MG736312) and from two *R. ornithinolytica* (QWIX00000 and QWIW00000).

3.4. Sensitivity and specificity of the real-time PCR assay

Thanks to two *mcr-8*-producing *K. pneumoniae* isolates including KP95, the specificity and sensitivity of our new real-time PCR was evaluated. As shown on Fig. 2A and Fig. 2C, the sensitivity of the real-time PCR assay was excellent with a good correlation curve between number of CFU/ml and Ct values that was linear from 10⁴ to 10⁸ CFU/mL corresponding to 32 to 17 Ct values ($R^2 = 0.9977$; slope, -3.512). PCR efficiency was 92.64%. The limit of detection of this real-time PCR was 55 CFU/ml. The reproducibility evaluated with five replicates on the same genomic DNA of *K. pneumoniae* KP95 strain was also excellent (Fig. 2B). Furthermore, the specificity of the real-time PCR has been demonstrated *in vitro* on genomic DNA from a panel of 290 different GNB and on metagenomic DNA extracted from 250 different human stool samples. As expected, the *mcr-8* real-time PCR was negative for all tested genomic and metagenomic DNA except for the two *mcr-8* -producing *K. pneumoniae* isolates used here as positive controls (Table 1).

4. Discussion

In 2018, a new type of phosphoethanolamine (PEtN) transferase enzyme, named MCR-8, conferring resistance to colistin, has been identified in a *K. pneumoniae* strain isolated from a swine fecal sample in China. Recently, the *mcr-8* gene was also detected in China in 2 *R. ornithinolytica* strains isolated from chicken cloaca [17], in 1 *Stenotrophomonas* spp. isolated from sewage water [18] and in 1 *K. quasipneumoniae* from swine feces [19]. The new MCR-8 enzyme was different from previously identified PEtN transferase enzymes (MCR-1, MCR-2, MCR-3, MCR-4, MCR-5, MCR-6, and MCR-7) and exhibited less than 40% of homology with all these latter [9] indicating the necessity to develop a specific PCR assays for the best detection of the gene coding for this enzyme.

In this study, we developed and reported the first real-time PCR test targeting the newly reported plasmid-mediated *mcr-8* colistin resistance gene. Tested *in vitro* using 120 GNB, this new real-time PCR assay allowed the detection of 1 positive clinical *K. pneumoniae* (KP95) isolate. To our knowledge, this is the first

Table 2
Characteristics of all reported *mcr-8* -producing strains.

Strains	Sampling origin	Province (or city), country of isolation	CST MIC (mg/ L)	Antibiotic resistance genes	References
<i>K. pneumoniae</i> KP95	Oral cavity pus (Human)	Sétif, Algeria	8	<i>mcr-8</i> , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-94} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Ib</i> , <i>oqxAB</i> , <i>oqxA</i> , <i>fosA</i> , <i>catB3</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA14</i>	This study
<i>K. pneumoniae</i> KP91	Swine feces (Animal)	Shandong, China	16	<i>mcr-8</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>armA</i> , <i>aph(4)-Ia</i> , <i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i> , <i>oqxA</i> and <i>qnrB4</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(34)</i> , <i>dfrA12</i>	[10]
<i>R. ornithinolytica</i> QDRO1	Chicken cloaca (Animal)	Shandong, China	16	<i>mcr-8.4</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{DHA-1} <i>aadA1</i> , <i>aph(3')Ia</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>armA</i> , <i>fosA</i> , <i>mph(E)</i> , <i>floR</i> , <i>cml</i> , <i>qnrB4</i> , <i>sul</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(34)</i> ,	[17]
<i>R. ornithinolytica</i> QDRO2	Chicken cloaca (Animal)	Shandong, China	8	<i>mcr-8</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{SHV-73} <i>aac(3)-IVa</i> , <i>aph(4)-Ia</i> , <i>aadA2</i> , <i>fosA</i> , <i>mph(A)</i> , <i>mph(E)</i> , <i>cat</i> , <i>floR</i> , <i>cml</i> , <i>QnrS4</i> , <i>oqxAB</i> , <i>nrB52</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(34)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>tet(B)</i>	[18]
<i>Stenotrophomonas</i> sp. G4	Sewage water (Environment)	Jinan, China	160	<i>mcr-8.2</i> , <i>mcr-5.3</i> , <i>blaL1</i> , <i>blaL2</i> , <i>blaA1</i>	[18]
<i>K. quasipneumoniae</i> D120-1	Swine feces (Animal)	Sichuan, China	4	<i>smeDEF</i> , <i>smeMN</i> , <i>smeGH</i> , <i>smeP</i> , <i>mdtA</i> , <i>smeZ</i> , <i>oqxAB</i> <i>mcr-8.2</i> , <i>tet(D)</i> , <i>qnrS1</i> , <i>catA2</i> , <i>dfrA14</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i>	[19]

CST: Colistin, MIC: Minimum inhibitory concentration.

at DDBJ/ENA/GenBank under the accession VDEL00000000. The version described in this paper is version VDEL01000000.

Funding

This work was supported by the French Government under the «Investissements d'avenir» (reference: Fondation Mediterranee Infection 10-IAHU-03).

Competing interests

No conflicts of Interest for all authors

Ethical approval

Not required.

CRedit authorship contribution statement

Larbi Zakaria Nabti: Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Farida Sahli:** Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Edgarthe Priscilla Ngaiganam:** Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Nadia Radji:** Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Wahiba Mezaghcha:** Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing. **David Lupande-Mwenebitu:** Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Sophie Alexandra Baron:** Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Jean-Marc Rolain:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Seydina M. Diene:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing.

Acknowledgments

The authors thank Prof. Surbhi Malhotra-Kumar (University of Antwerp, Wilrijk, Belgium) for the gift of a *mcr-2*-producing *E. coli* strain and thank Linda Hadjadj for technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.018>.

References

- [1] Kaye KS, Gales AC, Dubourg G. Old antibiotics for multidrug-resistant pathogens: from in vitro activity to clinical outcomes. *Int J Antimicrob Agents* 2017;49:542–8, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.020>.
- [2] Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev* 2017;30:557–96, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00064-16>.
- [3] Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;16:161–8, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
- [4] Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill* 2016;21, doi:<http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280>.
- [5] Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio* 2017;8, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00543-17>.
- [6] Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill* 2017;22, doi:<http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>.
- [7] Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphotransferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:3317–24, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx327>.
- [8] AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, et al. *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:2904, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dky272>.
- [9] Yang Y-Q, Li Y-X, Lei C-W, Zhang A-Y, Wang H-N. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:1791–5, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dky111>.
- [10] Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect* 2018;7:122, doi:<http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z>.
- [11] Carroll LM, Gaballa A, Guldemann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolate. *MBio* 2019;10, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00853-19>.
- [12] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012;19:455–77, doi:<http://dx.doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- [13] Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 2008;9:75, doi:<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
- [14] Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2640–4, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks261>.
- [15] Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:212–20, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01310-13>.
- [16] Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 2012;50:1355–61, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06094-11>.
- [17] Wang X, Wang Y, Zhou Y, Wang Z, Wang Y, Zhang S, et al. Emergence of colistin resistance gene *mcr-8* and its variant in *Raoultella ornithinolytica*. *Front Microbiol* 2019;10:228, doi:<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00228>.
- [18] Yin J, Li J, Liu S, Fu J, Zhao J, Zhong C, et al. Co-occurrence of colistin and meropenem resistance determinants in a *Stenotrophomonas* strain isolated from sewage water. *Microb Drug Resist* 2019, doi:<http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2018.0418>.
- [19] Yang X, Liu L, Wang Z, Bai L, Li R. Emergence of *mcr-8.2*-bearing *Klebsiella quasipneumoniae* of animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2019, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkz213>.
- [20] Yanat B, Machuca J, Yahia RD, Touati A, Pascual A, Rodriguez-Martinez J-M. First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate in Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 2016;48:760–1, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.003>.
- [21] Berrazeg M, Hadjadj L, Ayad A, Drissi M, Rolain J-M. First detected human case in Algeria of *mcr-1* plasmid-mediated colistin resistance in a 2011 *Escherichia coli* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:6996–7, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01117-16>.
- [22] Bachiri T, Lalaoui R, Bakour S, Allouache M, Belkebla N, Rolain JM, et al. First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* ST405 isolated from wildlife in Bejaia, Algeria. *Microb Drug Resist* 2018;24:890–5, doi:<http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2017.0026>.
- [23] Chabou S, Leulmi H, Rolain J-M. Emergence of *mcr-1*-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* isolates from poultry in Algeria. *J Glob Antimicrob Resist* 2018;16:115–6, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2018.12.012>.
- [24] Drali R, Berrazeg M, Zidouni LL, Hamitouche F, Abbas AA, Deriet A, et al. Emergence of *mcr-1* plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from seawater. *Sci Total Environ* 2018;642:90–4, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.387>.
- [25] Yousfi H, Hadjadj L, Dandachi I, Lalaoui R, Merah A, Amoura K, et al. Colistin- and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates: Algeria. *Microb Drug Resist* 2019;25:258–63, doi:<http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2018.0147>.
- [26] Belbel Z, Lalaoui R, Bakour S, Nedjai S, Djahmi N, Rolain J-M. First report of colistin resistance in an OXA-48- and a CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Algeria due to PmrB protein modification and mgrB inactivation. *J Glob Antimicrob Resist* 2018;14:158–60, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2018.06.014>.
- [27] Saoudi S, Bakour S, Olaitan AO, Ammari H, Touati A, Saoudi K, et al. Emergence of colistin- and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clinical isolate in Algeria: first case report. *Microb Drug Resist* 2015;21:279–85, doi:<http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2014.0214>.
- [28] Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. *Int J Antimicrob Agents* 2016;47:1–3, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.11.009>.
- [29] Osei Sekyere J. Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *Microbiologopen* 2019;8:e00682, doi:<http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.682>.
- [30] Nijhuis RHT, Veldman KT, Schelfaut J, Van Essen-Zandbergen A, Wessels E, Claas ECJ, et al. Detection of the plasmid-mediated colistin-resistance gene *mcr-1* in clinical isolates and stool specimens obtained from hospitalized

- patients using a newly developed real-time PCR assay. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:2344–6, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkw192>.
- [31] Dona V, Bernasconi OJ, Kasraian S, Tinguely R, Endimiani A. A SYBR((R)) Green-based real-time PCR method for improved detection of mcr-1-mediated colistin resistance in human stool samples. *J Glob Antimicrob Resist* 2017;9:57–60, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.01.007>.
- [32] Bontron S, Poirel L, Nordmann P. Real-time PCR for detection of plasmid-mediated polymyxin resistance (mcr-1) from cultured bacteria and stools. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:2318–20, doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkw139>.
- [33] Chabou S, Leangapichart T, Okdah L, Le Page S, Hadjadj L, Rolain J-M. Real-time quantitative PCR assay with Taqman((R)) probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance. *New Microbes New Infect* 2016;13:71–4, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.nmni.2016.06.017>.
- [34] Li J, Shi X, Yin W, Wang Y, Shen Z, Ding S, et al. A multiplex SYBR green real-time PCR assay for the detection of three colistin resistance genes from cultured Bacteria, feces, and environment samples. *Front Microbiol* 2017;8:2078, doi:<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02078>.
- [35] Leangapichart T, Gautret P, Brouqui P, Memish ZA, Raoult D, Rolain J-M. Acquisition of mcr-1 Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during Hajj 2013 and 2014. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:6998–9, doi:<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01486-16>.
- [36] Nabti LZ, Sahli F, Radji N, Mezaghcha W, Semara L, Aberkane S, et al. High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* in urine samples from inpatients and outpatients at a tertiary care hospital in Setif, Algeria. *Microb Drug Resist* 2019, doi:<http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2018.0314>.
- [37] Hadjadj L, Baron S, Olaitan A, Rolain J-M. Co-occurrence of variants of mcr-3 and mcr-8 genes in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Laos. P1390, 29TH ECCMID Congress. . p. 13–6. . . (Accessed 13 August 2019) <https://www.eccmidlive.org/#!resources/co-occurrence-of-variants-of-mcr-3-and-mcr-8-genes-in-a-klebsiella-pneumoniae-isolate-from-laos-2e55b377-cfd4-4222-81d5-578f3a4c692e>.

ARTICLE 4

Article

Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from the Algerian Endemic *Origanum glandulosum* Desf. against Multidrug-Resistant Uropathogenic *E. coli* Isolates

Larbi Zakaria Nabti ^{1,2,*} , Farida Sahli ¹, Hocine Laouar ¹, Ahmed Olowo-okere ³ ,
Joice Guileine Nkuimi Wandjou ⁴ and Filippo Maggi ^{4,*} 

¹ Laboratoire de Valorisation des Ressources Biologiques Naturelles (LVRBN), Université de Sétif 1, Sétif 19000, Algeria; sahlmicrobio@yahoo.fr (F.S.); h-laouar@gmail.com (H.L.)

² Département des Sciences Naturelles, École Normale Supérieure Assia DJEBAR, Constantine 25000, Algeria

³ Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Microbiology, Usmanu Danfodiyo University Sokoto, Sokoto 840244, Nigeria; olowoahmed@gmail.com

⁴ School of Pharmacy, University of Camerino, 62032 Camerino, Italy; joice.nkuimiwandjou@unicam.it

* Correspondence: nature_zak@hotmail.com (L.Z.N.); filippo.maggi@unicam.it (F.M.);

Tel.: +213-558-007-726 (L.Z.N.); +39-3470-786-878 (F.M.)

Received: 3 December 2019; Accepted: 12 January 2020; Published: 15 January 2020



Abstract: Antibiotics are becoming ineffective against resistant bacteria. The use of essential oils (EOs) may constitute an alternative solution to fight against multidrug-resistant bacteria. This study aims to determine the chemical composition of EOs from five populations of the endemic Algerian *Origanum glandulosum* Desf. and to investigate their potential antibacterial activity against multidrug-resistant uropathogenic *E. coli* strains. The EOs were obtained by hydrodistillation and their composition was investigated by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The antibacterial activity was evaluated by the disc diffusion method against eight *E. coli* strains (six uropathogenic resistant and two referenced susceptible strains). Minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC/MBC) were obtained by the broth microdilution method. The main EO components were thymol (15.2–56.4%), carvacrol (2.8–59.6%), γ -terpinene (9.9–21.8%) and *p*-cymene (8.5–13.9%). The antibacterial tests showed that all the EOs were active against all the strains, including the multidrug-resistant strains. The EO from the Bordj location, which contained the highest amount of carvacrol (59.6%), showed the highest antibacterial activity (inhibition diameters from 12 to 24.5 mm at a dilution of 1/10). To our knowledge, this is the first description of the activity of *O. glandulosum* EOs against resistant uropathogenic strains. Our study suggests that *O. glandulosum* EO could be used in some clinical situations to treat or prevent infections (e.g., urinary tract infections) with multidrug-resistant strains.

Keywords: multidrug-resistant *E. coli*; *Origanum glandulosum* Desf.; essential oil; GC-MS; antibacterial activity

1. Introduction

Urinary tract infections (UTIs) are ones of the main hospital- and community-acquired bacterial infections [1]. *Escherichia coli*, the microorganism that is the most frequent cause of UTIs, has become resistant to many available antibiotics, including third generation cephalosporins, carbapenems and colistin [1,2]. Infections caused by multidrug-resistant (MDR) bacteria have become a major healthcare problem worldwide [3,4]. Currently, there is a great need to search for new, natural molecules that have antibacterial effects and that can act against these MDR strains. Essential oils (EOs), also known

as volatile oils, are one of the main natural bioactive substances extracted from plants, and have been used as alternative medicines, especially as antimicrobial agents [5]. Among them, the EOs obtained from the genus *Origanum* L. have attracted the attention of microbiologists due to their widespread use as natural food preserving agents [6].

O. glandulosum Desf. (synonymous with *O. vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart) is a member of the *Lamiaceae* family and an endemic plant in two African-Mediterranean countries, namely, Algeria and Tunisia [7,8]. Local populations use this plant for its medicinal properties to treat different diseases such as cough, fever and bronchitis [8]. Several studies have reported the chemical composition of Algerian [7–12] and Tunisian [13,14] *O. glandulosum* EOs and showed that thymol, carvacrol, γ -terpinene and *p*-cymene were the main components. However, the antibacterial properties of *O. glandulosum* EOs have only been examined in a few studies, mainly, against reference strains of the American Type Culture Collection (ATCC) [7,14,15]. To the best of our knowledge, there have been no reports on the antibacterial properties of *O. glandulosum* EOs against MDR-uropathogenic *E. coli* strains. Thus, the aims of this study were: (i) to determine the chemical composition of EOs extracted from five different populations of *O. glandulosum* growing in Algeria, and (ii) to investigate the potential antibacterial activity of these EOs against MDR-uropathogenic *E. coli* strains.

2. Results

2.1. Yield and Chemical Composition of the Essential Oils

The obtained EO yields were 3.9, 5.6, 4.1, 1.8 and 2.8% (w/w) for accessions from Sétif, Mila, Bordj, M'sila and El Oued, respectively. As shown in Table 1, the gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis identified 43 (EO from M'sila), 37 (EO from Sétif), 37 (EO from Bordj), 34 (EO from Mila) and 21 (EO from El Oued) components, respectively, which accounted for 99.8–100% of the total composition of the EOs. For all the EOs, the four main detected components were thymol (15.1–56.3%), carvacrol (2.8–59.6%), γ -terpinene (9.8–21.8%) and *p*-cymene (8.5–13.9%). Thymol was predominant in EOs from Sétif (56.3%), Mila (51.0%) and M'sila (40.1%), while carvacrol was the major component in EOs from Bordj (59.6%) and El Oued (45.1%).

2.2. Antibacterial Activity

The disc diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) results (Tables 2 and 3) showed that all the EOs exhibited good antibacterial activity against both reference (*E. coli* ATCC 25922 and *E. coli* J53) and MDR *E. coli* strains. The MDR *E. coli* 229, *E. coli* 667 and *E. coli* 115 strains were less susceptible than the other strains, while the standard *E. coli* ATCC 25922 strain was the most susceptible. When the EOs were diluted at 1/2, the inhibition zones of all the EOs were ≥ 23 mm, while the positive control gentamycin (disc charge = 15 μ g) was less effective, and there were no inhibition zones against some strains or halos produced with diameters < 23 mm. Carvacrol and thymol were the most active components, and showed good antibacterial activity (the MIC/MBC ranged from 0.25 to 0.5 mg/mL) (Tables 2 and 3). *p*-Cymene was less active (inhibition zone diameters between 10 and 12.5 mm at a dilution of 1/2 and MIC/MBC > 2 mg/mL), while γ -terpinene was totally inactive against all the strains (Table 2). Combinations of *p*-cymene + carvacrol and *p*-cymene + thymol showed very similar results (inhibition zone diameters between 28 and 32 mm).

Table 1. Chemical composition of the EOs from five populations of the Algerian endemic *O. glandulosum* Desf.

Component ^a	RI Calc. ^b	RI Lit. ^c	EO %				
			Sétif	Mila	Bordj	M'sila	El Oued
(2E)-Hexenal	846	846	^d tr	-	0.1	0.1	-
3-Heptanone	883	890	tr	-	-	tr	-
α -Thujene	918	924	1.2	1.0	0.7	0.5	0.4
α -Pinene	923	932	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4
Camphene	936	946	tr	tr	tr	tr	-
Sabinene	962	969	tr	tr	tr	-	-
β -Pinene	965	974	0.1	0.1	0.1	0.1	tr
1-Octen-3-ol	972	974	0.1	0.2	0.2	0.4	0.2
3-Octanone	982	979	tr	0.1	0.1	0.1	tr
Myrcene	985	988	1.4	1.2	0.8	1.0	0.7
3-Octanol	994	988	-	-	-	tr	-
α -Phellandrene	1000	1002	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
δ -3-Carene	1005	1008	tr	tr	tr	tr	-
α -Terpinene	1011	1014	2.6	2.2	1.2	1.7	1.4
<i>p</i> -Cymene	1019	1025	9.7	10.3	8.5	13.9	11.6
Sylvestrene	1022	1032	0.4	0.3	0.2	0.3	0.2
(Z)- β -Ocimene	1034	1032	tr	tr	tr	tr	-
(E)- β -Ocimene	1044	1044	tr	tr	tr	tr	-
γ -Terpinene	1053	1054	21.8	19.4	9.8	14.2	13.4
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1061	1065	tr	tr	tr	tr	-
(2Z)-Hexenal diethyl acetal	1079	1081	-	tr	-	tr	-
Terpinolene	1082	1086	tr	tr	tr	tr	-
<i>p</i> -Cymenene	1084	1089	-	-	tr	tr	-
<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1093	1098	tr	tr	tr	tr	-
Linalool	1097	1095	0.6	0.7	0.6	0.7	0.3
Borneol	1158	1165	tr	tr	0.1	0.1	tr
Terpinen-4-ol	1170	1174	0.3	0.2	0.3	0.4	0.1
<i>p</i> -Cymen-8-ol	1182	1179	tr	tr	tr	0.1	-
α -Terpineol	1185	1186	0.3	0.3	0.4	0.4	0.1
<i>cis</i> -Dihydro carvone	1192	1191	-	-	tr	tr	-
<i>trans</i> -Dihydro carvone	1200	1200	-	-	tr	-	-
Thymol, methyl ether	1231	1232	0.1	0.1	tr	0.2	0.1
Carvacrol, methyl ether	1240	1241	tr	tr	0.2	0.1	0.1
Carvenone	1258	1255	tr	-	-	tr	-
Thymol	1295	1289	56.3	51.0	15.1	40.1	25.3
Carvacrol	1301	1298	2.8	10.9	59.6	23.4	45.1
Thymol acetate	1350	1349	tr	-	-	tr	-
Carvacrol acetate	1367	1370	-	-	-	tr	-
(E)-Caryophyllene	1403	1417	1.2	0.8	0.6	0.7	0.3
<i>trans</i> - α -Bergamotene	1424	1432	-	-	-	tr	-
α -Humulene	1436	1452	tr	tr	tr	tr	-
β -Bisabolene	1495	1505	0.1	0.1	0.2	0.4	tr
δ -Cadinene	1507	1522	-	-	-	tr	-
β -Sesquiphellandrene	1509	1521	0.2	0.2	0.3	0.1	-
Caryophyllene oxide	1562	1582	tr	0.1	0.1	0.2	-
Grouped compounds (%)							
Monoterpene hydrocarbons			37.9	35.1	21.9	32.2	28.2
Oxygenated monoterpenes			60.4	63.2	76.2	65.2	71.1
Sesquiterpene hydrocarbons			1.4	1.1	1.2	1.3	0.3
Oxygenated sesquiterpenes			tr	0.1	0.1	0.2	-
Others			0.3	0.4	0.6	0.9	0.4
Number of identified compounds			37	34	37	43	21
Total identified (%)			99.9	99.9	99.9	99.8	100.0

^a Order of components according to their elution from a HP-5MS column. ^b RI calc.: calculated retention index. ^c RI lit.: retention index reported from the literature. ^d tr: trace.

Table 2. Antibacterial activity of the EOs from five populations of the endemic Algerian *O. glandulosum* expressed as diameter inhibition zones.

City of Collection	EO Dilution	Inhibition Diameters (mm) ± SD							
		Bacterial Strains Tested (Resistance Phenotypes)							
		<i>E. coli</i> 734 (ESBL)	<i>E. coli</i> 854 (ESBL)	<i>E. coli</i> 292 (ESBL)	<i>E. coli</i> 229 (ESBL)	<i>E. coli</i> 667 (ESBL + CRB)	<i>E. coli</i> 115 (COL R)	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> J53
Sétif	Pure	39.6 ± 0.77	34.8 ± 0.56	36.0 ± 1.34	31.2 ± 0.56	31.0 ± 1.41	32.1 ± 0.98	38.4 ± 0.84	38.2 ± 0.28
	1/2	36.7 ± 0.56	33.5 ± 0.98	35.4 ± 0.63	31.0 ± 1.34	27.9 ± 0.56	30.7 ± 1.55	37.1 ± 0.98	36.4 ± 1.97
	1/10	14.6 ± 0.28	15.4 ± 0.28	15.6 ± 0.14	13.9 ± 0.00	12.0 ± 0.00	13.9 ± 0.56	17.9 ± 1.41	22.0 ± 0.00
Mila	Pure	38.5 ± 2.12	36.3 ± 0.7	34.9 ± 0.56	30.6 ± 2.47	32.6 ± 1.27	30.9 ± 0.42	39.6 ± 1.97	38.4 ± 1.69
	1/2	37.4 ± 0.84	35.4 ± 0.28	33.1 ± 0.63	29.5 ± 0.56	30.9 ± 0.56	28.9 ± 0.98	37.4 ± 0.00	37.6 ± 0.28
	1/10	-	15.4 ± 0.84	-	-	11.9 ± 0.42	12.4 ± 0.28	18.6 ± 0.00	22.8 ± 0.84
Bordj	Pure	37.7 ± 0.56	35.5 ± 1.83	35.1 ± 0.98	32.6 ± 0.28	27.1 ± 0.00	26.3 ± 0.84	38.4 ± 0.84	37.6 ± 0.77
	1/2	36.9 ± 0.00	34.0 ± 0.00	33.7 ± 0.56	30.1 ± 2.12	24.4 ± 0.28	25.6 ± 1.41	38.2 ± 0.00	35.6 ± 0.28
	1/10	17.2 ± 1.13	16.4 ± 0.56	17.3 ± 0.84	16.2 ± 0.00	12.1 ± 0.98	12.0 ± 0.28	21.8 ± 0.84	24.5 ± 1.83
M'sila	Pure	36.3 ± 1.55	35.5 ± 0.00	35.1 ± 0.98	32.1 ± 0.63	28.2 ± 0.28	24.6 ± 1.27	32.0 ± 0.28	36.2 ± 0.56
	1/2	35.9 ± 1.27	32.3 ± 0.84	33.8 ± 0.00	29.9 ± 0.28	24.9 ± 0.42	23.6 ± 0.42	31.0 ± 0.28	32.4 ± 0.56
	1/10	15.0 ± 0.14	14.7 ± 0.28	15.5 ± 0.84	12.9 ± 0.00	10.8 ± 1.13	12.8 ± 0.00	12.8 ± 0.84	17.3 ± 0.84
El Oued	Pure	36.8 ± 0.28	32.6 ± 1.41	36.2 ± 0.00	30.4 ± 0.56	26.7 ± 0.56	26.3 ± 0.7	35.7 ± 1.55	34.6 ± 1.27
	1/2	34.8 ± 0.84	32.3 ± 0.98	35.4 ± 0.56	28.5 ± 1.69	24.8 ± 0.28	23.0 ± 1.55	32.4 ± 0.00	32.7 ± 0.56
	1/10	14.8 ± 0.00	13.1 ± 0.98	16.7 ± 0.56	-	-	-	-	-
Pure compounds									
carvacrol	Pure	36.0 ± 0.00	34.0 ± 0.7	34.5 ± 0.7	30.0 ± 0.00	31.5 ± 0.7	32.5 ± 0.7	36.5 ± 0.7	36.5 ± 0.7
	1/2	30.5 ± 0.7	30.0 ± 0.00	31.0 ± 0.00	28.5 ± 0.7	30.0 ± 0.00	30.5 ± 0.7	31.0 ± 0.00	30.5 ± 0.7
	1/10	28.0 ± 0.00	27.0 ± 0.00	28.5 ± 0.7	26.0 ± 0.00	26.0 ± 0.00	27.0 ± 0.00	28.0 ± 0.00	28.0 ± 0.00
thymol	Pure	34.5 ± 0.7	33.0 ± 0.00	34.0 ± 0.00	29.0 ± 0.00	30.0 ± 0.00	32.0 ± 0.00	35.0 ± 0.00	36.0 ± 0.00
	1/2	30.0 ± 0.00	30.0 ± 0.00	30.0 ± 0.7	28.0 ± 0.00	29.0 ± 0.00	30.0 ± 0.00	30.5 ± 0.7	31.0 ± 0.00
	1/10	27.0 ± 0.00	27.0 ± 0.00	28.0 ± 0.7	26.5 ± 0.7	26.0 ± 0.00	27.0 ± 0.00	28.0 ± 0.00	28.0 ± 0.00
<i>p</i> -cymene	Pure	14.0 ± 0.00	14.0 ± 0.00	14.5 ± 0.7	12.0 ± 0.00	13.5 ± 0.7	14.0 ± 0.00	14.0 ± 0.00	14.0 ± 0.00
	1/2	12.5 ± 0.7	12.0 ± 0.00	11.5 ± 0.7	10.0 ± 0.00	10.0 ± 0.00	12.0 ± 0.00	12.0 ± 0.00	11.5 ± 0.7
	1/10	10.0 ± 0.00	9.0 ± 0.00	10.0 ± 0.00	-	-	8.0 ± 0.00	10.0 ± 0.00	10.0 ± 0.00
γ -terpinene	Pure	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/2	-	-	-	-	-	-	-	-
	1/10	-	-	-	-	-	-	-	-
carvacrol + <i>p</i> -cymene	50/50 (%) (v/v)	30.0 ± 0.00	30.0 ± 0.00	30.0 ± 0.00	29.0 ± 0.00	30.0 ± 0.00	30.0 ± 0.00	30.5 ± 0.7	31.0 ± 0.00
thymol + <i>p</i> -cymene	50/50 (%) (v/v)	30.0 ± 0.00	30.0 ± 0.00	30.0 ± 0.00	28.0 ± 0.00	29.0 ± 0.00	30.0 ± 0.00	32.0 ± 0.00	31.0 ± 0.00
Gentamycin (+control)		18.7 ± 0.21	-	-	17.3 ± 0.84	-	18.6 ± 0.63	21.4 ± 0.77	22.7 ± 0.91
DMSO (-control)		-	-	-	-	-	-	-	-

ESBL: extended spectrum β -lactamase, CRB: carbapenemase producer, COL R: colistin resistant, DMSO: dimethyl sulfoxide, SD: standard deviation, v: volume, (-): no activity observed.

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *O. glandulosum* EOs and main active pure compounds.

<i>O. glandulosum</i> Collection Site	MIC (MBC) mg/mL							
	<i>E. coli</i> 734	<i>E. coli</i> 854	<i>E. coli</i> 292	<i>E. coli</i> 229	<i>E. coli</i> 667	<i>E. coli</i> 115	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> J53
Sétif	1 (1)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	1 (1)	1 (1)
Mila	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	1 (1)	2 (2)
Bordj	1 (2)	2 (2)	1 (1)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	1 (1)	1 (1)
M'sila	1 (1)	1 (1)	1 (1)	2 (2)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
El Oued	1 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	1 (2)	2 (2)	1 (1)	2 (2)
Major bioactive components								
carvacrol	0.25 (0.25)	0.5 (0.5)	0.25 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)
thymol	0.25 (0.25)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)
<i>p</i> -cymene	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2
Gentamycin mg/L	2	>4	>4	2	>4	2	1	1

3. Discussion

In this study, we investigated the chemical composition and the antibacterial activity of *O. glandulosum* EOs obtained from five different Algerian locations. The five EOs shared a similar qualitative composition, which was mainly characterized by four major components (thymol, carvacrol, γ -terpinene and *p*-cymene). Our findings were qualitatively in agreement with those reported in the literature [7–10]. However, the composition of our five EOs differed quantitatively. Thymol was the major component in three EOs (Sétif, Mila, M'sila), while carvacrol was predominant in the two remaining ones (Bordj, El Oued). Several studies have reported that carvacrol [7–10,14] was the major component in *O. glandulosum* EOs, while other studies on the chemical composition of *O. glandulosum* EOs collected from other localities, showed that thymol was the predominant component [7,10,15]. In another study, Khalfi et al. [12] reported comparable amounts of both compounds (thymol 38.8% and carvacrol 32.9%). Conversely, Mechergui et al. [13] found that *p*-cymene (36%, 40% and 46%) followed by thymol (32%, 39% and 18%) were the major components detected in *O. glandulosum* EOs obtained from three localities (Nefza, Bargou and Krib, respectively) in the north of Tunisia.

Although all the previous studies (including our study) involved the same plant species (*O. glandulosum*), we observed differences in the chemical composition, especially in the quantity of the main EO components. This might be due to variations in many factors that affect the investigated accessions, such as climate and temperature, type of soil, relief, period of plant collection and the part of the plant (e.g., leaves, stems and flowers) [16]. In our study, all the five accessions were collected during the same period. Moreover, the same parts of plants were used to obtain the EOs. However, with regard to the climate, the M'sila and El-Oued areas are characterized by high temperatures and low precipitation rates whereas Sétif and Mila are located in rocky regions and at higher altitude.

The evaluation of the antibacterial activity of the five EOs against six uropathogenic MDR and two standard *E. coli* strains revealed that all the five EOs were active against all the tested strains, showing similar inhibition zone diameters as well as MIC and MBC values. The EO from Bordj contained the highest amount of carvacrol (59.6%) and showed the highest antibacterial activity (diameters from 12 to 24.5 mm at dilution of 1/10). To our knowledge, this is the first description of the antibacterial properties of *O. glandulosum* EOs against MDR uropathogenic *E. coli* strains. Béjaoui et al. [14] reported the good activity of Tunisian *O. glandulosum* EOs tested at different phenological stages against a standard *E. coli* strain (*E. coli* ATCC 8739). Similar results (good growth inhibition) were also obtained when testing different Algerian *O. glandulosum* EOs against *E. coli* ATCC 25922 (standard strain) [7] and three other clinical strains (E_1 , E_2 and E_3) [9].

EOs containing high amounts of phenolic monoterpenes, such as carvacrol and thymol are widely reported to have remarkable antibacterial properties [17]. These compounds are capable of aligning between the fatty acid chains to form a sort of channel through the membrane, and are able to interact with transmembrane proteins, thus affecting the microbial cell permeability. They also exert detrimental effects on the outer membrane of Gram-negative bacteria [18]. Another important microbial effect reported for these phenolic monoterpenes is their interference with the ATP generation system [18].

Since our five EOs were rich in thymol and/or carvacrol, we suggest that the obtained antibacterial activities were related to the high concentration of these two constituents. It is assumed that these compounds act by damaging the structure and function of the cytoplasmic membrane [19]. However, it has also been reported that the antibacterial activity of EOs could be affected by other minor components, together with a possible interaction between different compounds [14]. For example, *p*-cymene may synergize the efficacy of phenolic monoterpenes such as thymol and carvacrol [20]. *p*-Cymene is highly hydrophobic and causes swelling of the cytoplasmic membrane, thus facilitating the transport of effective active compounds across the lipid bilayer. Our results counteract previous reports on the antibacterial activity of *p*-cymene [20], proving that it is an effective agent against uropathogenic MDR strains, and could possibly be used in synergistic blends together with phenolic monoterpenes. These are relatively cheap, available on the market and easy to prepare, thus making

it possible to produce formulations against multidrug-resistant uropathogenic *E. coli* strains where cultivation of *O. glandulosum* and production of its EOs is not feasible.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

The *O. glandulosum* Desf. samples were collected on June 2018 from 5 different locations situated in the east and southeast of Algeria: Chirhom (Sétif city), Sidi Aissa (M'sila city), Ras El oued (Bordj-Boarriridj city), Bouslah (Mila city) and Ben Guecha (El Oued city). The plants were identified by Prof. Laouar Hocine, University of Sétif-1, Algeria and confirmed by Prof. Filippo Maggi.

4.2. Essential Oil Extraction

The air-dried aerial parts (stems, leaves, and flowers) of *O. glandulosum* Desf. were submitted to hydrodistillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus. The obtained EOs were collected in amber glass vials and stored at 4 °C until used for analysis.

4.3. GC/MS Analysis

The chemical analysis of the different EOs was carried out using an Agilent 6890 N gas chromatograph, coupled with a 5973 N mass spectrometer, operating in the EI mode at 70 eV, using a HP-5MS capillary column (5% phenylmethylpolysiloxane, 30 m, 0.25 mm i.d., 0.1 µm film thickness) (J & W Scientific, Folsom, CA, USA). The temperature schedule that was applied for this analysis was as follows: 60 °C for 5 min, followed by a 4 °C/min ramp to 220 °C, then 11 °C/min up to 280 °C, hold for 15 min and finally 11 °C/min up to 300 °C, hold for 5 min. The carrier gas used was helium, at a flow rate of 1.0 mL/min. The temperature of the injector and transfer line was 280 °C with an injection volume of 2 µL and a split ratio of 1:50. The scan time was 75 min and the acquisition range mass spectra m/z 29–400. The identification relied on the combination of linear retention indices (RIs) and mass spectra (MS) with those stored in Adams, FFNSC2 and NIST17 libraries [21–23]. Relative peak area percentages were extracted for each peak from the total area in the chromatograms without using correction factors.

4.4. Bacterial Strains

The *E. coli* strains were isolated at the microbiology laboratory of Sétif University Hospital, Algeria from patients with urinary tract infections. Identification of the strains was performed by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Four *E. coli* strains (*E. coli* 734, 854, 292, 229) were resistant to 3rd and 4th generation cephalosporins and produce extended spectrum β -lactamase (ESBL) enzymes [1]. One strain (*E. coli* 667) was resistant to both cephalosporins and carbapenems (ertapenem) by producing ESBL and OXA-48 enzymes [1], and one other strain (*E. coli* 115) was resistant to colistin, which is considered as the last resort treatment of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* [2]. Two reference strains (*E. coli* ATCC 25922 and *E. coli* J-53) were also used for the antibacterial tests.

4.5. Screening for Antibacterial Activity

The disc-diffusion method was used to investigate the potential antibacterial activity of the EOs against six uropathogenic MDR and two reference susceptible *E. coli* strains. A culture of 0.5 McFarland from each strain was seeded on Muller Hinton (MH) agar plates using a sterile swab. Sterile blank paper discs of 6 mm diameter (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) were gently pressed onto the MH agar plates. EOs (15 µL) and pure components (carvacrol, thymol, *p*-cymene and γ -terpinene, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) (15 µL/14 mg) were pipetted onto the blank discs and each EO was tested pure and at two other dilutions (1/2 and 1/10) in DMSO. Blank discs impregnated with DMSO and discs of gentamycin (15 µg; SIRScan Discs, i2a, Montpellier, France) were used as negative

and positive controls, respectively. Plates were incubated for 18–24 h at 37 °C and the diameter of the inhibition zones was measured. According to Ponce et al. [24], sensitivity was classified as: not sensitive (diameter <8 mm), sensitive (diameter of 9–14 mm), very sensitive (diameter of 15–19 mm) and extremely sensitive (diameter >20 mm).

4.6. Determination of MIC and MBC

The MIC and MBC were determined in 96-well plates (12 columns and 8 rows). For each EO, 10 different concentrations were tested (70, 35, 17.5, 8.75, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL) (columns 12 to 3, respectively). Negative (MH broth and DMSO) and positive (MH broth and bacterial inoculum, without essential oils) controls were prepared for each plate in columns 1 and 2, respectively. One *E. coli* strain was tested in each row (8 strains tested from row A to H). The plates were incubated overnight at 37 °C. The MIC values corresponded to the first well of each row where no visible bacterial growth was detected. The MBC was determined from the first three wells of each row that showed no bacterial growth after plate incubation. For that, 10 µL from the corresponding wells were seeded on MacConkey agar (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) plates. After overnight incubation at 37 °C, any bacterial growth was checked. The MBC values represent the concentrations from plates where no bacterial colonies were found.

4.7. Statistical Analysis

All experiments were performed in duplicate and data were expressed as mean values ± standard deviation (SD).

5. Conclusions

In summary, thymol, carvacrol, γ -terpinene and *p*-cymene were the main components found in the different *O. glandulosum* EOs, with a predomination of thymol in EOs from Sétif, Mila and M'sila and carvacrol in EOs from Bordj and El Oued. All EOs were active against all *E. coli* strains including the MDR ones. The EO from the Bordj location contained the highest amount of carvacrol (59.6%), and showed the highest antibacterial activity (diameters from 12 to 24.5 mm at dilution of 1/10). *O. glandulosum* EOs have potential use as natural antibacterial agents to treat or prevent infections (e.g., urinary tract infections) with MDR strains. The effectiveness of the *O. glandulosum* EOs has been shown to strictly depend on the content of carvacrol, thymol and *p*-cymene. Thus, where it is not possible to cultivate the plant in order to obtain active EOs, the possibility of manufacturing artificial blends containing carvacrol, thymol and *p*-cymene could be considered. Further studies are still necessary to assess the safety of these EOs for clinical use.

Author Contributions: Conceptualization, L.Z.N. and F.M.; methodology, L.Z.N., F.S., H.L., A.O.-o., J.G.N.W. and F.M.; formal analysis, L.Z.N., F.S., H.L., A.O.-o., J.G.N.W. and F.M.; data curation, L.Z.N., F.S., H.L., A.O.-o., J.G.N.W. and F.M.; writing—original draft preparation, L.Z.N.; writing—review and editing, L.Z.N., F.M.; supervision, F.S. and F.M.; project administration, H.L. and F.S.; funding acquisition, F.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

Acknowledgments: The authors thank Abderahim Benslama and Tahar Sedrati for their help in plant collection.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Nabti, L.Z.; Sahli, F.; Radji, N.; Mezaghcha, W.; Semara, L.; Aberkane, S.; Lounnas, M.; Solassol, J.; Didelot, M.-N.; Jean-Pierre, H.; et al. High Prevalence of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Urine Samples from Inpatients and Outpatients at a Tertiary Care Hospital in Sétif, Algeria. *Microb. Drug Resist.* **2019**, *25*, 386–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Nabti, L.Z.; Sahli, F.; Hadjadj, L.; Ngaiganam, E.P.; Lupande-Mwenebitu, D.; Rolain, J.-M.; Diene, S.M. Autochthonous case of mobile colistin resistance gene *mcr-1* from a uropathogenic *Escherichia coli* isolate in Sétif Hospital, Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2019**, *19*, 356–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rai, J.; Randhawa, G.K.; Kaur, M. Recent advances in antibacterial drugs. *Int. J. Appl. Basic Med. Res.* **2013**, *3*, 3–10. [[PubMed](#)]
4. Nabti, L.Z.; Sahli, F.; Ngaiganam, E.P.; Radji, N.; Mezaghcha, W.; Lupande-Mwenebitu, D.; Baron, S.; Rolain, J.-M.; Diene, S.M. Development of real-time PCR assay allowed describing the first clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate harboring plasmid-mediated colistin resistance *mcr-8* gene in Algeria. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Man, A.; Santacroce, L.; Jacob, R.; Mare, A.; Man, L. Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study. *Pathogens* **2019**, *8*, 15. [[CrossRef](#)]
6. Stefanakis, M.K.; Touloupakis, E.; Anastasopoulos, E.; Ghanotakis, D.; Katerinopoulos, H.E.; Makridis, P. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control* **2013**, *34*, 539–546. [[CrossRef](#)]
7. Sari, M.; Biondi, D.M.; Kaâbeche, M.; Mandalari, G.; D'Arrigo, M.; Bisignano, G.; Saija, A.; Daquino, C.; Ruberto, G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour Fragr. J.* **2006**, *21*, 890–898. [[CrossRef](#)]
8. Belhattab, R.; Larous, L.; Figueiredo, A.C.; Santos, P.A.G.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G. *Origanum glandulosum* Desf. grown wild in Algeria: Essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 209–212. [[CrossRef](#)]
9. Bendahou, M.; Muselli, A.; Grignon-Dubois, M.; Benyoucef, M.; Desjobert, J.-M.; Bernardini, A.-F.; Costa, J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* **2008**, *106*, 132–139. [[CrossRef](#)]
10. Ruberto, G.; Baratta, M.T.; Sari, M.; Kaâbeche, M. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour Fragr. J.* **2002**, *17*, 251–254. [[CrossRef](#)]
11. Berrehal, D.; Boudiar, T.; Hichem, L.; Khalfallah, A.; Kabouche, A.; Al-Freihat, A.; Ghannadi, A.; Sajjadi, E.; Mehrabani, M.; Safaei-Ghomi, J.; et al. Comparative composition of four essential oils of Oregano used in Algerian and Jordanian folk medicine. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 957–960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Khalfi, O.; Sahraoui, N.; Bentahar, F.; Boutekedjiret, C. Chemical composition and insecticidal properties of *Origanum glandulosum* (Desf.) essential oil from Algeria. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 1562–1566. [[CrossRef](#)]
13. Mechergui, K.; Coelho, J.A.; Serra, M.C.; Lamine, S.B.; Boukhchina, S.; Khouja, M.L. Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Jetswaart from Tunisia: Chemical composition and antioxidant activity. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 1745–1749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Béjaoui, A.; Chaabane, H.; Jemli, M.; Boulila, A.; Boussaid, M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at different phenological stages. *J. Med. Food* **2013**, *16*, 1115–1120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Benbelaid, F.; Khadir, A.; Abdoune, M.A.; Bendahou, M.; Muselli, A.; Costa, J. Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, *4*, 463–472. [[CrossRef](#)]
16. Macedo da Silva, R.O.; Gonçalves Castro, J.W.; de Menezes Dantas Junior, O.; Justino de Araújo, A.C.; do Nascimento Silva Leandro, M.K.; Oliveira Costa, R.J.; Leite Pinto, L.; Garcia Leandro, L.M.; da Silva, L.E.; do Amaral, W.; et al. Photoinduced Antibacterial Activity of the Essential Oils from *Eugenia brasiliensis* Lam and *Piper moseni* C. DC. by Blue Led Light. *Antibiotics* **2019**, *8*, 242. [[CrossRef](#)]
17. Chouhan, S.; Sharma, K.; Guleria, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines* **2017**, *4*, 58. [[CrossRef](#)]
18. Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R.L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 12. [[CrossRef](#)]
19. Sikkema, J.; de Bont, J.A.; Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 201–222. [[CrossRef](#)]
20. Burt, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223–253. [[CrossRef](#)]

21. Adams, R. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed.; Allured Publishing Corp: Carol Stream, IL, USA, 2007.
22. FFNSC 2. *Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds*; Mass Spectral Database; Shimadzu Corps: Kyoto, Japan, 2012.
23. NIST 17. *Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH)*; National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD, USA, 2017.
24. Ponce, A.G.; Fritz, R.; del Valle, C.; Roura, S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT Food Sci. Technol.* **2003**, *36*, 679–684. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

تعتبر البكتيريا *Escherichia coli* العامل الرئيسي المسؤول عن عدوى المسالك البولية المرتبطة بالرعاية الصحية أو المكتسبة من المجتمع. يمثل ظهور وانتشار مقاومة المضادات الحيوية عند هذا النوع مشكلاً رئيسياً للصحة العمومية. تتمثل أهداف هذا العمل في دراسة الحساسية للمضادات الحيوية لسلاسل *E. coli* معزولة من عدوى المسالك البولية وتقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية الـ 5 عينات من نبتة *Origanum glandulosum* وذلك ضد سلاسل *E. coli* المقاومة. في الفترة الممتدة بين جانفي 2015 وفبري 2017، تم جمع 215 سلالة *E. coli* من عينات البول التي تم تلقيها في مختبر علم الأحياء الدقيقة للمركز الاستشفائي الجامعي لمدينة سطيف. أدت دراسة مقاومة المضادات الحيوية من نوع البيتا-لاكتامين إلى تحديد 37 (17.2%) سلالة منتجة لإنزيمات بيتا-لاكتاماز واسعة الطيف (BLSE). تم تحديد كل من العمر (≤ 60 عاماً)، الاستشفاء والاستخدام السابق للمضادات الحيوية كعوامل خطر للإصابة بسلاسل *E. coli* منتجة لـ BLSE (EC-BLSE). بالإضافة إلى البيتا-لاكتامينات، تم تسجيل مقاومة ملحوظة للكينولونات (حمض الناليديكسيك وسبير وفلوكساسين، 34% و 26.5% على الترتيب)، التريميثوبريم-سلفاميثوكسازول (45.6%) والجنتاميسين (14%). كما تم تسجيل مستويات منخفضة من المقاومة للأميكاسين، الفوسفومييسين، النيتروفورانثونين والكولستين. تم الكشف عن جينات مختلفة لمقاومة البيتا-لاكتامين (*bla*_{CTX-M-15}، *bla*_{CTX-M-14}، *bla*_{TEM}، *bla*_{CMY-2}، *bla*_{OXA-48}) مع هيمنة جينات *bla*_{CTX-M-15}. كما تم الكشف عن جينات مقاومة للأمينوزيدات (*aadA1*)، الكينولونات (*qnrB* و *aac(6')-Ib-cr*) والكولستين (*mcr-1*). تم تطوير اختبار جديد لتفاعل البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي (PCR en temps réel) والذي يستهدف البحث عن جين مقاومة الكولستين الجديد *mcr-8*. أظهر الاختبار غياب هذا الجين في كامل سلاسل *E. coli*. أظهر تحليل مجموعات النشوء والتطور عن هيمنة المجموعة B2 وذلك بـ 106 (49.3%) سلالة. تمكنت 20 (54%) سلالة EC-BLSE من نقل جينات المقاومة عن طريق عملية الاقتران. هذه الجينات كانت محمولة بواسطة بلازميدات مختلفة (IncII، IncFIB، IncHI2). أعطت عملية التقطير المائي للأجزاء الهوائية لـ 5 عينات من نبتة *Origanum glandulosum* كميات من الزيت الأساسي تتراوح بين 1.8 و 5.6% (وزن / وزن). سمح إجراء التحليل الكيميائي للزيوت الأساسية بواسطة كروماتوغرافيا الطور الغازي المرفقة بمطيافية الكتلة (CPG/SM) بتحديد 43، 37، 34 و 21 مركب في كل من الزيوت الأساسية لـ مسيلة، سطيف، برج بوعريج، ميلة والوادي على الترتيب. كما تم الكشف عن أربع مركبات رئيسية في جميع الـ 5 زيوت الأساسية وهي: thymol (15.1-56.3%)، carvacrol (2.8-59.6%)، γ -terpinène (9.8-21.8%) و *p*-cymène (8.5-13.9%). أظهرت اختبارات النشاطية المضادة للبكتيريا أن جميع الزيوت الأساسية لها نشاط جيد ضد كل من سلاسل *E. coli* المرجعية والسلاسل ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية. عند التخفيف 1/2، أعطت جميع الزيوت الأساسية مناطق تثبيط نمو بقطر ≥ 23 مم. الزيت الأساسي الذي يحتوي على أكبر كمية من *monoterpènes oxygénés* (76.2%) ومن carvacrol (59.6%) (عينة البرج) كان الأكثر نشاطاً. أظهرت هذه الدراسة زيادة نسبة المقاومة للمضادات الحيوية لدى سلاسل *E. coli* المسببة لعدوى المسالك البولية في المركز الاستشفائي الجامعي لمدينة سطيف. تشير النتائج المتحصل عليها إلى إمكانية استخدام الزيوت الأساسية لنبتة *O. glandulosum* في بعض الحالات السريرية للعلاج أو الوقاية من بعض أنواع العدوى التي تسببها البكتيريا ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية مثل عدوى المسالك البولية.

الكلمات المفتاحية: عدوى المسالك البولية، *E. coli*، مقاومة المضادات الحيوية، *O. glandulosum*، الزيوت الأساسية، النشاط المضاد للبكتيريا.

Résumé

Escherichia coli est le principal agent responsable d'infection urinaire (IU) associée aux soins ou d'origine communautaire. L'émergence et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez cette espèce, représente un problème majeur de santé publique. Les objectifs de ce travail sont l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches d'*E. coli* isolées d'IU et l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles (HE) de 5 populations d'*Origanum glandulosum* contre les souches résistantes. Un total de 215 souches d'*E. coli* a été collecté, entre janvier 2015 et février 2017, à partir de prélèvements d'urine reçus au laboratoire de microbiologie du CHU de Sétif. L'analyse des profils de résistance aux β -lactamines a permis l'identification de 37 (17.2%) souches productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE). L'âge (≥ 60 ans), l'hospitalisation et l'utilisation antérieure d'antibiotiques ont été identifiés comme facteurs de risque d'infection par une souche d'*E. coli* productrice de BLSE (EC-BLSE). Outre les β -lactamines, une résistance marquée a été observée à l'égard des quinolones (acide nalidixique et ciprofloxacine, 34% et 26.5% respectivement), du triméthoprim-sulfaméthoxazole (45.6%) et de la gentamicine (14%). Des taux de résistance faibles ont été observés pour l'amikacine, la fosfomycine, le nitrofurantoïne et la colistine. Différents gènes de résistance aux β -lactamines ont été détectés (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY-2} et *bla*_{OXA-48}) avec prédominance des *bla*_{CTX-M-15}. D'autres gènes de résistance aux aminosides (*aadA1*), aux quinolones (*qnrB* et *aac(6')-Ib-cr*) et à la colistine (*mcr-1*) ont été également détectés. Un nouveau test de PCR en temps réel ciblant le nouveau gène de résistance à la colistine *mcr-8* a été développé. Le test a révélé l'absence de ce gène dans toute la collection. L'analyse des groupes phylogénétiques a révélé la prédominance du groupe B2 avec 106 (49.3%) souches. Vingt (54%) souches d'EC-BLSE ont transféré leurs gènes de résistance par conjugaison. Le transfert a été assuré par des plasmides de différents groupes d'incompatibilité (IncII, IncFIB, IncHI2). L'hydrodistillation des parties aériennes de 5 populations d'*O. glandulosum* a donné des rendements en HE qui varient entre 1.8 et 5.6% (m/m). La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) a permis l'identification de 43 (HE de M'sila), 37 (HE de Sétif), 34 (HE de Bordj Bou Arreridj), 34 (HE de Mila) et 21 (HE d'El Oued) composés. Quatre composés majeurs ont été détectés dans toutes les 5 HE, thymol (15.1-56.3%), carvacrol (2.8-59.6%), γ -terpinène (9.8-21.8%) et *p*-cymène (8.5-13.9%). Les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne ont montré que toutes les HE avaient une bonne activité antibactérienne à la fois sur les souches de référence d'*E. coli* et les souches multirésistantes. À la dilution 1/2, toutes les HE ont généré des zones d'inhibition d'un diamètre ≥ 23 mm. L'HE de Bordj, contenant la plus grande quantité de monoterpènes oxygénés (76.2%) et de carvacrol (59.6%), était le plus actif. Cette étude a fait le point sur l'augmentation de la fréquence des souches d'*E. coli* multirésistantes dans les IU au CHU de Sétif. Les résultats obtenus suggèrent que les HE d'*O. glandulosum* pourraient être utilisées dans certaines situations cliniques pour traiter ou prévenir certaines infections à bactéries multirésistantes comme les infections urinaires.

Mots clés : infection urinaire, *E. coli*, résistance aux antibiotiques, *O. glandulosum*, huiles essentielles, activité antibactérienne.

Abstract

Escherichia coli is the main agent responsible for healthcare-associated and community acquired urinary tract infections (UTI). The emergence and spread of antibiotic resistance in this species represent a major public health problem. The aims of this work are the study of the antibiotic sensitivity of *E. coli* strains isolated from UTI and the evaluation of the antibacterial activity of essential oils (EO) from 5 populations of *Origanum glandulosum* against *E. coli* resistant strains. A total of 215 *E. coli* strains were collected, between January 2015 and February 2017, from urine samples received at the microbiology laboratory of Sétif university hospital. The analysis of resistance profiles to β -lactams led to the identification of 37 (17.2%) extended-spectrum β -lactamases (ESBL)-producing strains. Age (≥ 60 years), hospitalisation and previous antibiotic use were identified as risk factors for infection with ESBL-producing *E. coli* strains (ESBL-EC). In addition to β -lactam antibiotics, marked resistance was observed to quinolones (nalidixic acid and ciprofloxacin, 34% and 26.5% respectively), trimethoprim-sulfamethoxazole (45.6%) and gentamicin (14%). Low levels of resistance were observed for amikacin, fosfomycin, nitrofurantoin and colistin. Different β -lactam resistance genes were detected (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY-2} and *bla*_{OXA-48}) with predominance of *bla*_{CTX-M-15}. Other resistance genes to aminoglycosides (*aadA1*), quinolones (*qnrB* and *aac(6')-Ib-cr*) and colistin (*mcr-1*) were also detected. A new real-time PCR assay targeting the novel colistin resistance gene *mcr-8*, has been developed. The test revealed the absence of this gene throughout the collection. Phylogenetic group analysis revealed the predominance of group B2 with 106 (49.3%) strains. Twenty (54%) strains of ESBL-EC transferred their resistance genes by conjugation. The transfer was carried out by plasmids of different incompatibility groups (IncII, IncFIB, IncHI2). Hydrodistillation of the aerial parts of 5 *O. glandulosum* populations gave EO yields ranging from 1.8 to 5.6% (w/w). Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) allowed for the identification of 43 (M'sila EO), 37 (Sétif EO), 37 (Bordj EO), 34 (Mila EO) and 21 (El Oued EO) compounds. Four major compounds were detected in all 5 EO, thymol (15.1-56.3%), carvacrol (2.8-59.6%), γ -terpinene (9.8-21.8%) and *p*-cymene (8.5-13.9%). Antibacterial activity tests showed that all EO had good antibacterial activity against both reference and multidrug-resistant strains. At the dilution 1/2, all EO generated inhibition zones with a diameter ≥ 23 mm. Bordj's EO, containing the highest amount of oxygenated monoterpenes (76.2%) and carvacrol (59.6%), was the most active. This study investigated the increased frequency of multi-drug resistant *E. coli* strains in UTI at Sétif university hospital. The results obtained suggest that *O. glandulosum* EO could be used in some clinical situations to treat or prevent some infections caused by multi-drug resistant bacteria such as UTI.

Key words: urinary tract infection, *E. coli*, antibiotic resistance, *O. glandulosum*, essential oils, antibacterial activity.