



**HAL**  
open science

# Lutte contre l'antibiorésistance : intérêt des oligonucleotides modifiés chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu

Léa Bientz

## ► To cite this version:

Léa Bientz. Lutte contre l'antibiorésistance : intérêt des oligonucleotides modifiés chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02937996

**HAL Id: dumas-02937996**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02937996>**

Submitted on 14 Sep 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

Année 2020

Thèse n°73

MEMOIRE du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES

de BIOLOGIE MEDICALE

THESE POUR L'OBTENTION DU

**DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement

Par Léa BIENTZ

Née le 28 janvier 1992 à Bordeaux

Le Mardi 07 Juillet 2020

**LUTTE CONTRE L'ANTIBIORESISTANCE : INTERET DES  
OLIGONUCLEOTIDES MODIFIES CHEZ LES ENTEROBACTERIES  
PRODUCTRICES DE BETA-LACTAMASES A SPECTRE ETENDU**

Sous la direction de : Madame le Professeur Corinne ARPIN

Membres du jury :

Mme le Professeur Véronique DUBOIS	Président
Mme le Professeur Anne-Marie ROGUES	Juge
Mme le Docteur Tina KAUSS	Juge
Mme le Professeur Corinne ARPIN	Directeur

# Remerciements

---

## Aux membres du jury

### **A Madame le Professeur Véronique DUBOIS,**

Je te remercie de me faire l'honneur de présider ce jury et pour l'intérêt que tu portes à ce sujet. Un grand merci également pour tous tes conseils et ton aide précieuse au laboratoire de Bactériologie.

### **A Madame le Professeur Anne-Marie ROGUES,**

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse. Je garde un excellent souvenir de mon passage dans votre service lors de mon externat, qui m'a permis d'appréhender l'hygiène hospitalière.

### **A Madame le Docteur Tina KAUSS,**

Je te remercie d'avoir gentiment accepté de participer à ce jury de thèse et de m'avoir intégrée dans ce projet qui te tient à cœur.

### **A Madame le Professeur Corinne ARPIN,**

Merci d'avoir accepté d'encadrer cette thèse, de m'avoir initiée à la recherche et de m'avoir fait confiance tout au long de ce travail.

## Au laboratoire de Microbiologie fondamentale et pathogénicité

Sabine, Amel, Nathalie un grand merci pour votre soutien, pour les bons moments et pour votre aide dans les manip. Christina, Cindy, Marie-Line, Mathieu, Dominique, un grand merci pour vos conseils techniques ; une pensée aussi à Sandrine et à Laure pour votre bonne humeur. Merci à tous de m'avoir accueillie et intégrée dans le laboratoire.

## A l'équipe de ChemBioPharm

Tina, Sébastien, Pr Philippe Barthélémy, se fut un réel plaisir de travailler en collaboration avec vous et je vous en remercie ainsi que pour vos explications claires sur la chimie.

## A l'ensemble des biologistes du CHU de Bordeaux

Je remercie l'ensemble des biologistes des laboratoires de Bactériologie, Virologie, Mycologie-Parasitologie, Hématologie et Biochimie que j'ai pu croiser lors de mon internat et qui m'ont permis d'appréhender pas à pas le métier de biologiste.

## **A mes amis, à mes co-internes**

A Elodie et Guillaume, jamais co-internes mais toujours là pour se soutenir, de vrais amis. Merci pour vos conseils, votre soutien et pour tous nos moments partagés lors de notre incroyable implication dans la référence mais notamment pour nos soirées jeux, sorties et autres en dehors du boulot. Préparez-vous pour le « Docteurs<sup>3</sup> » !

A Charlotte dit Chacha, Ludivine dit Lulu, pour nos soirées Bowling et nos fous rires.

A tous ceux avec qui j'ai partagé au moins 6 mois de stage et qui ont participé de loin ou de près à ce que je suis devenue : Alexis, And-Nan, Andréea, Aurélie, Charly, Charvind, Elvina, Ghanou, Imène, Jacques, Jean-Madeleine, Jessica, Julie, Juliette, Justine, Khalil, Laure, Lisa, Louis, Marine, Maxime L, Mélanie, Peretz, Pierre, Sarah B, Thibaut M, Thibaut V, à ma team de bactério d'hiver 2019 : Anaëlle, Elodie B, Elodie R, Jordi, Julien, Lila, Marion, Mathilde, Maxime D, Paul, Thomas, et à tous ceux que je n'ai pas cités mais qui ont croisé ma route.

## **A mes amis hors internat**

Anaïs, Cécile, Jenny, Elodie M, Elodie B, Maëlle, Emilie, Léa, Alexandra, Ilia, et les autres, pour toutes nos soirées, nos vacances, nos sorties, nos moments partagés, pour tous ces grands bols d'énergie positive, de bonne humeur et de souvenirs qui m'ont permis de m'évader et prendre une pause dans les moments difficiles.

Henri, Robin, pour nos très bons souvenirs sur les bancs de la faculté.

## **A Olivier**

Malgré la distance, tu me soutiens et tu me réconfortes, merci d'être là.

## **A ma famille**

**A mes parents**, mes soutiens de toujours, sans vous je n'aurai pas pu être là où j'en suis aujourd'hui, vous m'avez toujours portée, je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi.

**A mon frère**, qui n'a pas toujours su comprendre mon temps passé à travailler mais qui m'a toujours soutenue.

**A ma grand-mère** « mamie za », je te dédie cette thèse, je sais que tu aurais été fière de moi.

# Sommaire

---

Remerciements.....	2
Sommaire .....	4
Abréviations .....	7
Liste des tableaux .....	9
Liste des figures .....	10

Introduction.....	13
-------------------	----

Synthèse bibliographique.....	15
-------------------------------	----

<b>1. Généralités sur les entérobactéries .....</b>	<b>15</b>
1.1. Introduction .....	15
1.2. Pouvoir pathogène et habitat.....	16
1.3. Identification au laboratoire.....	16
1.3.1. Morphologie et facteurs de virulence.....	16
1.3.2. Culture.....	18
1.3.3. Identification bactérienne.....	18
1.3.3.1. Caractères enzymatiques et biochimiques .....	18
1.3.3.2. Caractères antigéniques .....	19
1.4. Principales entérobactéries d'intérêt clinique.....	20
1.4.1. <i>Escherichia coli</i> .....	20
1.4.2. Autres entérobactéries .....	22
1.5. Sensibilité générale aux antibiotiques .....	24
1.5.1. Résistances naturelles.....	24
1.5.2. Résistances acquises .....	25
<b>2. Résistances naturelles et acquises aux <math>\beta</math>-lactamines chez les entérobactéries .....</b>	<b>26</b>
2.1. Les $\beta$ -lactamines .....	26
2.1.1. Introduction .....	26
2.1.2. Mécanisme d'action.....	26
2.1.3. Classification .....	28
2.2. Mécanismes de résistance.....	29
2.2.1. Défaut d'accumulation.....	29
2.2.1.1. Perméabilité de la membrane externe.....	29
2.2.1.2. Efflux.....	29
2.2.2. Production d'enzymes : $\beta$ -lactamases.....	31
2.2.2.1. Mode d'action.....	31
2.2.2.2. Classification .....	31
2.2.2.3. Supports génétiques.....	35
2.2.2.4. Détection des E-BLSE et EPC.....	38
2.3. Epidémiologie des entérobactéries résistantes aux $\beta$ -lactamines.....	39
2.3.1. France.....	39
2.3.2. Europe.....	42
2.3.3. Monde.....	45

<b>3. Antibiorésistance : un enjeu majeur de santé publique .....</b>	<b>47</b>
3.1. Origine et prise de conscience .....	47
3.2. Bactérie multirésistante : quelle définition ?.....	50
3.3. La lutte contre l'antibiorésistance .....	52
3.3.1. Au niveau mondial .....	52
3.3.2. Au niveau Européen .....	55
3.3.3. En France.....	56
3.4. Prévention des BMR et BHRé.....	58
<b>4. Stratégies thérapeutiques contre la résistance aux antibiotiques .....</b>	<b>61</b>
4.1. Antibiotiques actuels .....	61
4.2. Nouveaux antibiotiques.....	62
4.3. Nouvelles alternatives .....	64
4.3.1. Exemples d'alternatives thérapeutiques .....	64
4.3.1.1. Bactériophages et bactériolysines .....	64
4.3.1.2. Peptides antimicrobiens .....	66
4.3.1.3. Anticorps.....	66
4.3.1.4. Stratégies ciblant le microbiote intestinal .....	67
4.3.1.4.1. Probiotiques .....	67
4.3.1.4.2. Transplantation du microbiote fécal .....	67
4.3.1.5. Stimulation de l'immunité .....	67
4.3.1.6. Vaccins .....	68
4.3.1.7. Autres stratégies.....	68
4.3.2. Oligonucléotides .....	69
4.3.2.1. Définition - Mécanisme d'action.....	69
4.3.2.2. Modifications chimiques.....	70
4.3.2.3. Exemples d'oligonucléotides antibactériens .....	73
<b>Projet de recherche.....</b>	<b>77</b>
<b>1. Contexte : Eucaryotes.....</b>	<b>77</b>
<b>2. Concept : Procaryotes.....</b>	<b>78</b>
<b>3. Matériels et méthodes .....</b>	<b>80</b>
3.1. Matériels.....	80
3.1.1. Oligonucléotides .....	80
3.1.2. Souches bactériennes et conditions de culture .....	81
3.2. Méthodes.....	82
3.2.1. Techniques de bactériologie .....	82
3.2.1.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	82
3.2.1.2. Expériences de viabilité bactérienne .....	82
3.2.1.3. Expériences de conjugaison.....	82
3.2.1.4. Visualisation de la localisation des (L)ON .....	83
3.2.2. Techniques de biologie moléculaire.....	83
3.2.2.1. Extractions d'ADN et ARN.....	83
3.2.2.1.1. Dosage des acides nucléiques par spectrométrie .....	84
3.2.2.1.2. Evaluation de la qualité des acides nucléiques .....	84
<i>Révélation par électrophorèse en gel d'agarose .....</i>	<i>84</i>
<i>Utilisation de puce AGILENT.....</i>	<i>84</i>
3.2.2.2. Amplifications par PCR.....	84
3.2.2.3. Transcription <i>in vitro</i> .....	85
3.2.2.4. Expériences de reverse-transcriptase PCR quantitative (RT-qPCR) .....	86
3.2.3. Techniques d'étude des protéines .....	87
3.2.3.1. SDS-PAGE et WESTERN BLOT.....	87
3.2.3.2. Nitrocéfine .....	87

<b>4. Résultats</b> .....	<b>88</b>
4.1. Etude de l'effet des (L)ON chez les bactéries .....	88
4.1.1. Effet sur la CMI <sub>CRO</sub> des différents <i>E.coli</i> .....	88
4.1.2. Viabilité bactérienne .....	89
4.1.3. Localisation des (L)ON.....	91
4.1.4. Importance des modifications chimiques .....	91
4.1.5. Expériences préliminaires .....	94
4.1.5.1. Utilisation d'autres β-lactamines.....	94
4.1.5.2. Essais sur <i>K.pneumoniae</i> .....	94
4.1.5.3. Synthèse importante des (L)ON.....	95
4.2. Etude du mécanisme d'action .....	95
4.2.1. Au niveau de l'ARNm CTX-M-15.....	95
4.2.1.1. Extraction des ARN .....	95
4.2.1.2. Transcription <i>in vitro</i> .....	96
4.2.1.3. Expériences de RT-qPCR .....	98
4.2.2. Au niveau de la protéine CTX-M-15 .....	100
4.2.2.1. Evaluation de l'activité de la β-lactamase .....	100
4.2.2.2. Evaluation de la quantité de β-lactamase .....	101
<b>5. Discussion et perspectives</b> .....	<b>103</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>106</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>107</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>114</b>

# Abréviations

---

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AON	<i>Antisense Oligonucleotides</i>
ARN	Acide ribonucléique
BHRe	Bactérie hautement résistante émergente
<i>bla</i>	Gène de $\beta$ -lactamase
BLSE	$\beta$ -lactamase à spectre étendu
BMR	Bactérie multi-résistante
C3G	Céphalosporine de 3 <sup>ème</sup> génération
CASFM	Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CPP	<i>Cell-penetrating peptide</i>
CRO	Ceftriaxone
CTX-M	Céfotaximase-Munich
DDJ	Doses définies journalières
DID	Doses définies journalières/1000 habitants/jour
E-BLSE	Entérobactérie productrice de BLSE
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EGM	Éléments génétiques mobiles
EPC	Entérobactérie productrice de carbapénémase
ERG	<i>Enterococcus faecium</i> résistant aux glycopeptides
HAS	Haute Autorité de Santé
HCSP	Haut Conseil de la Santé Publique
IBL	Inhibiteur de $\beta$ -lactamase
<i>K.pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LON	<i>Lipid-oligonucleodide</i> ou Oligonucléotide conjugué à un nucléolipide
LPS	Lipopolysaccharide
MBL	Métallo- $\beta$ -lactamase
MH	Mueller Hinton
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ON	Oligonucléotide
PAM	Peptides anti-microbiens
PCC	Précautions complémentaires contact
PCR	<i>Polymerase chaine reaction</i>
PG	Peptidoglycane
PLP	Protéines liant la pénicilline
PMO	Phosphorodiamidate morpholino
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i>

PO	Phosphodiester
PS	Précautions standards
PTO	Phosphorothioate
RNAse H	Ribonucléase H
RT-qPCR	Réverse-transcriptase PCR quantitative
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la métiline

# Liste des tableaux

---

Tableau 1. Principales entérobactéries pathogènes hors pathovars <i>E.coli</i> .....	23
Tableau 2. Classification des $\beta$ -lactamines.....	28
Tableau 3. Classification des $\beta$ -lactamases .....	32
Tableau 4. Augmentation du nombre des principales $\beta$ -lactamases au cours du temps ....	34
Tableau 5. Différents groupes d'entérobactéries : profils sauvages, résistances acquises	35
Tableau 6. Catégories d'antibiotiques et molécules à tester pour définir les MDR, XDR et PDR chez les <i>Enterobacteriaceae</i> .....	51
Tableau 7. Antibiotiques ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché entre Juillet 2017 et Septembre 2019 .....	63
Tableau 8. $\beta$ -lactamines et inhibiteurs de $\beta$ -lactamases en cours de développement .....	63
Tableau 9. Thérapies par oligonucléotides chez les eucaryotes.....	69
Tableau 10. Exemples d'oligonucléotides antisens étudiés chez les bactéries.....	74
Tableau 11. Liste des séquences utilisées .....	80
Tableau 12. Caractéristiques des souches et plasmide utilisés .....	81
Tableau 13. Amorces utilisées dans cette étude .....	85
Tableau 14. Résultats de la quantification absolue des ARN <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> et <i>cysG</i> .....	98
Tableau 15. Résultats de la quantification relative (RT-qPCR).....	99
Tableau 16. Résultats de la quantification absolue des ARN <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> et <i>gapA</i> .....	100

# Liste des figures

---

Figure 1. Répartition des genres parmi les sept familles de l'ordre des Entérobactérales..	15
Figure 2. Structure des entérobactéries.....	17
Figure 3. Caractères principaux d'identification de certains genres de l'ordre des Entérobactérales.....	19
Figure 4. Distribution des bactéries selon les 4 principales infections nosocomiales .....	22
Figure 5. Résistances naturelles des Entérobactérales (CASFM, Avril 2020) .....	24
Figure 6. Blocage des PLP par analogie structurale entre pont $\beta$ -lactame et D-ala-D-ala ...	26
Figure 7. Synthèse du peptidoglycane .....	27
Figure 8. Différentes familles de pompe à efflux et mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines .....	30
Figure 9. Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamases .....	31
Figure 10. Chronologie de découverte des antibiotiques et premières descriptions des différentes $\beta$ -lactamases.....	33
Figure 11. Eléments génétiques mobiles : mobilités intra- et inter-cellulaires de gènes de résistances aux antibiotiques .....	37
Figure 12. Résistances aux $\beta$ -lactamines des souches d'entérobactéries isolées d'infections nosocomiales ou communautaires en France .....	40
Figure 13. Exemples d'environnement génétique des gènes <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....	41
Figure 14. Distribution des différentes espèces d'entérobactéries selon le type de carbapénémase identifiée.....	42
Figure 15. Consommation des $\beta$ -lactamines (hors pénicillines et pénicillines/IBL) à usage systémique dans la communauté et à l'hôpital, en Europe en 2018.....	43
Figure 16. <i>Escherichia coli</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Pourcentage (%) de souches invasives résistantes aux céphalosporines de 3 <sup>ième</sup> génération (C3G) et aux carbapénèmes par pays. En Europe, 2018. ....	44
Figure 17. <i>Escherichia coli</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Pourcentage (%) de souches invasives résistantes aux céphalosporines de 3 <sup>ième</sup> génération (C3G) et aux carbapénèmes par pays. Dans le monde, 2016-2017.....	45
Figure 18. Distribution des variants CTX-M sur 3 périodes en Europe et dans le reste du monde .....	46
Figure 19. Causes de l'antibiorésistance .....	47
Figure 20. Lutter contre la résistance aux antibiotiques : 10 points d'action .....	49
Figure 21. Définitions des bactéries multirésistantes selon les critères microbiologiques internationales et épidémiologiques en France .....	52

Figure 22. Plans mondial, européen et français pour lutter contre l'antibiorésistance .....	54
Figure 23. Nombre de cas d'infections à bactéries résistantes aux antibiotiques et nombre de décès qui leur sont attribuables, Europe, 2015 .....	55
Figure 24. Consommation des antibiotiques à usage systémique dans la communauté et à l'hôpital, en Europe en 2018. ....	58
Figure 25. Densité d'incidence globale des SARM et des EBLSE pour 1000 JH. En France, données 2002 à 2018 .....	60
Figure 26. Antibiothérapies d'infections documentées à entérobactérie productrice de BLSE.....	61
Figure 27. Mécanismes d'action des oligonucléotides antisens.....	70
Figure 28. Modifications chimiques des oligonucléotides antisens .....	72
Figure 29. Conjugaison à un nucléolipide.....	77
Figure 30. Utilisation d'un LON ciblant l'ARNm <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> en association avec la ceftriaxone chez <i>E.coli</i> .....	78
Figure 31. CMI <sub>CRO</sub> et viabilité de la souche sensible <i>E.coli</i> K12.....	88
Figure 32. CMI <sub>CRO</sub> et viabilité des souches résistantes <i>E.coli</i> TcK12 et Ec3536.....	89
Figure 33. CMI <sub>CRO</sub> en fonction de la concentration en 5'LON chez <i>E.coli</i> TcK12 .....	89
Figure 34. Suivi des absorbances au cours du temps chez <i>E.coli</i> TcK12.....	90
Figure 35. Suivi de la quantification bactérienne au cours du temps chez <i>E.coli</i> TcK12.....	90
Figure 36. Images en microscopie confocale localisation des (L)ON chez <i>E.coli</i> TcK12 .....	91
Figure 37. Impact du nucléolipide conjugué aux oligonucléotides sur la CMI <sub>CRO</sub> chez <i>E.coli</i> TcK12 .....	91
Figure 38. Impact du nucléolipide conjugué aux oligonucléotides sur la CMI <sub>CRO</sub> chez <i>E.coli</i> Ec3536 .....	92
Figure 39. Impact du nucléolipide conjugué aux oligonucléotides sur la CMI <sub>CRO</sub> chez <i>E.coli</i> sensible K12.....	92
Figure 40. Impact de la modification chimique au niveau du phosphate des oligonucléotides sur la CMI <sub>CRO</sub> chez <i>E.coli</i> TcK12 .....	93
Figure 41. Impact de la longueur de l'oligonucléotide sur la CMI <sub>CRO</sub> chez <i>E.coli</i> TcK12 .....	93
Figure 42. CMI de 4 β-lactamines avec ou sans 5'LON chez <i>E.coli</i> TcK12.....	94
Figure 43. CMI <sub>CRO</sub> en présence de 5'LON issus de synthétiseurs différents, chez <i>E.coli</i> TcK12 .....	95
Figure 44. Exemple d'ARN totaux extraits visualisés en gel d'agarose et puce Agilent® ....	96
Figure 45. Transcrit <i>in vitro</i> du gène <i>cysG</i> .....	97
Figure 46. Transcrit <i>in vitro</i> du gène <i>gapA</i> .....	97
Figure 47. Transcrit <i>in vitro</i> du gène <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> .....	98

Figure 48. Quantification relative de l'ARNm <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> par RT-qPCR en présence de (L)ON $\alpha$ , $\delta$ , contrôle chez <i>E.coli</i> TcK12 .....	99
Figure 49. Activité de la $\beta$ -lactamase CTX-M-15 chez <i>E.coli</i> TcK12 en présence de LON $\alpha$ comparé au LON <sub>contrôle</sub> par dosage colorimétrique de l'hydrolyse de la nitrocéfine.....	100
Figure 50. Activité de la $\beta$ -lactamase CTX-M-15 chez <i>E.coli</i> TcK12 en présence de différents (5'L)ON par dosage colorimétrique de l'hydrolyse de la nitrocéfine.....	101
Figure 51. Quantification relative de la protéine CTX-M-15 par Western Blot chez <i>E.coli</i> K12 et chez <i>E.coli</i> TcK12 en présence ou absence de 5'LON $\alpha$ .....	102
Figure 52. Quantification relative de la protéine CTX-M-15 par Western Blot chez <i>E.coli</i> TcK12 en présence ou absence de (5'L)ON $\alpha$ , $\delta$ ou contrôle .....	102

# Introduction

---

La résistance aux antibiotiques, ou antibiorésistance est un problème majeur de santé publique, si aucune mesure n'est prise, en 2050, le nombre de décès attribuables à la résistance aux antimicrobiens dans le monde est estimé à 10 millions par an. Pour éviter cela, de nombreux programmes à l'échelle mondiale, européenne et française ont vu le jour, afin de cadrer les points d'action essentiels dans cette lutte contre l'antibiorésistance.

Les entérobactéries, large ensemble de bactéries, dont *Escherichia coli*, sont fréquemment retrouvées en pathologie infectieuse à l'hôpital et dans la communauté. Ces bactéries ont su acquérir de nouvelles résistances au fil du temps sous la pression de sélection due à l'utilisation des antibiotiques, notamment la résistance aux  $\beta$ -lactamines et plus particulièrement à l'acquisition d'enzymes, les  $\beta$ -lactamases capables d'hydrolyser les molécules de cette classe d'antibiotiques. En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) publie une liste d'agents prioritaires pour la recherche et développement de nouveaux antibiotiques. Les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>èmes</sup> génération (C3G) font partie de la première priorité dite critique. Ceci concerne les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (E-BLSE), capables d'hydrolyser la plupart des  $\beta$ -lactamines dont les C3G, elles représentent aujourd'hui, près de 10 % des souches à l'hôpital. Ces BLSE sont principalement de type CTX-M (Céfotaximase-Munich) et plus particulièrement des CTX-M-15.

De nouvelles résistances aux  $\beta$ -lactamines apparaissent au cours du temps, rendant certaines infections impossibles à traiter devant des bactéries de plus en plus résistantes ; c'est le cas avec l'apparition des carbapénémases empêchant l'utilisation des carbapénèmes antibiotiques dits de derniers recours. Cette prise de conscience a permis de mettre en place des programmes de lutte contre l'antibiorésistance avec une sensibilisation du public et des professionnels sur le bon usage des antibiotiques, la mise en place de mesures de prévention, et la nécessité de trouver de nouvelles thérapies. Ces thérapies peuvent être variées : de nouveaux antibiotiques, des bactériophages, des peptides antimicrobiens et autres stratégies.

Cette thèse s'inscrit dans un programme de recherche d'une alternative thérapeutique par l'utilisation d'oligonucléotides modifiés en association avec la ceftriaxone chez les entérobactéries productrices de BLSE de type CTX-M-15.

Dans une première partie, une revue de la littérature sera présentée concernant les entérobactéries et leurs résistances aux  $\beta$ -lactamines ; l'origine et la lutte contre l'antibiorésistance et enfin les stratégies thérapeutiques utilisées actuellement dans ce contexte et celles en cours de recherche.

Le projet de recherche faisant l'objet de cette thèse sera développé dans une seconde partie, en expliquant son concept, les méthodes utilisées et les résultats obtenus.

Ce travail de thèse est le fruit d'une étroite collaboration entre l'équipe du Pr Corinne Arpin du Laboratoire de Microbiologie fondamentale et pathogénicité (CNRS UMR 5234) et de l'équipe ChemBioPharm (INSERM U1212, CNRS UMR 5320) dirigée par le Pr Philippe Barthélémy. Cette thèse fait suite aux travaux de master 2 de Mr Phouc Vinh Nguyen encadrés par le Dr Tina Kauss, les résultats obtenus sont étroitement liés et seront ainsi présentés comme un unique projet.

# Synthèse bibliographique

## 1. Généralités sur les entérobactéries

### 1.1. Introduction

Les entérobactéries sont un groupe hétérogène de gammaprotéobactéries présentant des caractéristiques communes. Il s'agit de bacilles à Gram négatif, non sporulés, mobiles (ciliature péritriche) ou immobiles, aéro-anaérobies facultatifs, oxydase négative, catalase positive, nitrate réductase positive, fermentant le glucose et non exigeants cultivant sur milieux ordinaires.

Ces bactéries ont comme habitat principal le tube digestif de l'Homme et des animaux mais sont également retrouvées dans l'environnement (végétaux, eau et sol).

Historiquement, la différenciation des membres de cette famille était basée sur des caractéristiques biochimiques et plus récemment, sur l'analyse de la séquence du gène ARN 16S (1); ainsi la taxonomie des entérobactéries a subi des changements répétés au cours des dernières années (2). Le changement le plus récent date de 2016 (3), basé sur des analyses phylogénétiques et une analyse des caractéristiques moléculaires conservées, propose l'ordre des Entérobacterales, divisé en sept familles : *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* et *Budviciaceae*. Il existe ainsi 60 genres et plus de 250 espèces parmi l'ordre des Entérobacterales (**Figure 1**).

Ordre : Enterobacterales					
<i>Enterobacteriaceae</i>					
<i>Atlantibacter</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>Gibbsiella</i>	<i>Leclercia</i>	<i>Raoultella</i>	<i>Shimwellia</i>
<i>Biostraticola</i>	<i>Enterobacillus</i>	<i>Izhakiella</i>	<i>Lelliottia</i>	<i>Rosenbergiella</i>	<i>Siccibacter</i>
<i>Buttiauxella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Mangrovibacter</i>	<i>Saccharobacter</i>	<i>Trabulsiella</i>
<i>Cedecea</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Kluyvera</i>	<i>Pluralibacter</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Yokenella</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Franconibacter</i>	<i>Kosakonia</i>	<i>Pseudocitrobacter</i>	<i>Shigella</i>	
<i>Erwiniaceae</i>	<i>Pectobacteriaceae</i>	<i>Yersiniaceae</i>	<i>Hafniaceae</i>	<i>Morganellaceae</i>	<i>Budviciaceae</i>
<i>Buchnera</i>	<i>Brenneria</i>	<i>Chania</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Arsenophonus</i>	<i>Budvicia</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Dickeya</i>	<i>Ewingella</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Cosenzaea</i>	<i>Leminorella</i>
<i>Pantoea</i>	<i>Lonsdalea</i>	<i>Rahnella</i>	<i>Obesumbacterium</i>	<i>Moellerella</i>	<i>Pragia</i>
<i>Phaseolibacter</i>	<i>Pectobacterium</i>	<i>Rouxiella</i>		<i>Morganella</i>	
<i>Tatumella</i>	<i>Sodalis</i>	<i>Samsonia</i>		<i>Photobacterium</i>	
<i>Wigglesworthia</i>		<i>Serratia</i>		<i>Proteus</i>	
		<i>Yersinia</i>		<i>Providencia</i>	
				<i>Xenorhabdus</i>	

**Figure 1. Répartition des genres parmi les sept familles de l'ordre des Entérobacterales**

Sources : adapté de (3,4)

## 1.2. Pouvoir pathogène et habitat

Les entérobactéries sont des bactéries ubiquitaires, certaines sont saprophytes (milieux humides, sols, eaux, végétaux) comme *Kluyvera*, *Enterobacter*, *Serratia* ; d'autres phytopathogènes comme *Erwinia*, *Pantoea*, *Pectobacterium* (5–8) mais surtout commensales du tube digestif de l'homme et des animaux (9–12).

Elles sont impliquées dans de nombreuses infections communautaires ou nosocomiales. On distingue les pathogènes spécifiques (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, certaines souches d'*Escherichia coli*) responsables majoritairement d'infections intestinales ; des pathogènes opportunistes responsables d'infections variées : urinaires, digestives, respiratoires, néonatales, bactériémies, méningites...

## 1.3. Identification au laboratoire

### 1.3.1. Morphologie et facteurs de virulence

Il s'agit de bacilles à Gram négatif de 2-4  $\mu\text{m}$  de long sur 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  de large, aux extrémités arrondies.

La structure des entérobactéries est résumée dans la **Figure 2**. On peut séparer les éléments constants, indispensables à la bactérie ; des éléments inconstants lui conférant des caractéristiques supplémentaires.

#### Constituants constants, essentiels

La paroi des bactéries à Gram négatif est constituée :

- d'un espace périplasmique avec une couche fine de peptidoglycane (PG), réseau tridimensionnel constitué de chaînes de glycanes unies par des chaînes peptidiques, assurant la forme de la bactérie et une protection mécanique contre la pression osmotique
- d'une membrane externe constituée :
  - de phospholipides
  - de protéines : porines (diffusion passive), lipoprotéine de Braun (attachement avec le PG), OmpA (structuration de la membrane externe) et diverses autres protéines
  - de lipopolysaccharides (LPS) avec le lipide A (ou endotoxine), le core et la chaîne de polysaccharides (antigène O)

La membrane plasmique est une double couche de phospholipides où sont enchâssées les protéines liant la pénicilline (PLP, impliquées dans la synthèse du PG) ainsi que diverses protéines impliquées dans les systèmes de transport, de sécrétion et dans la chaîne respiratoire.

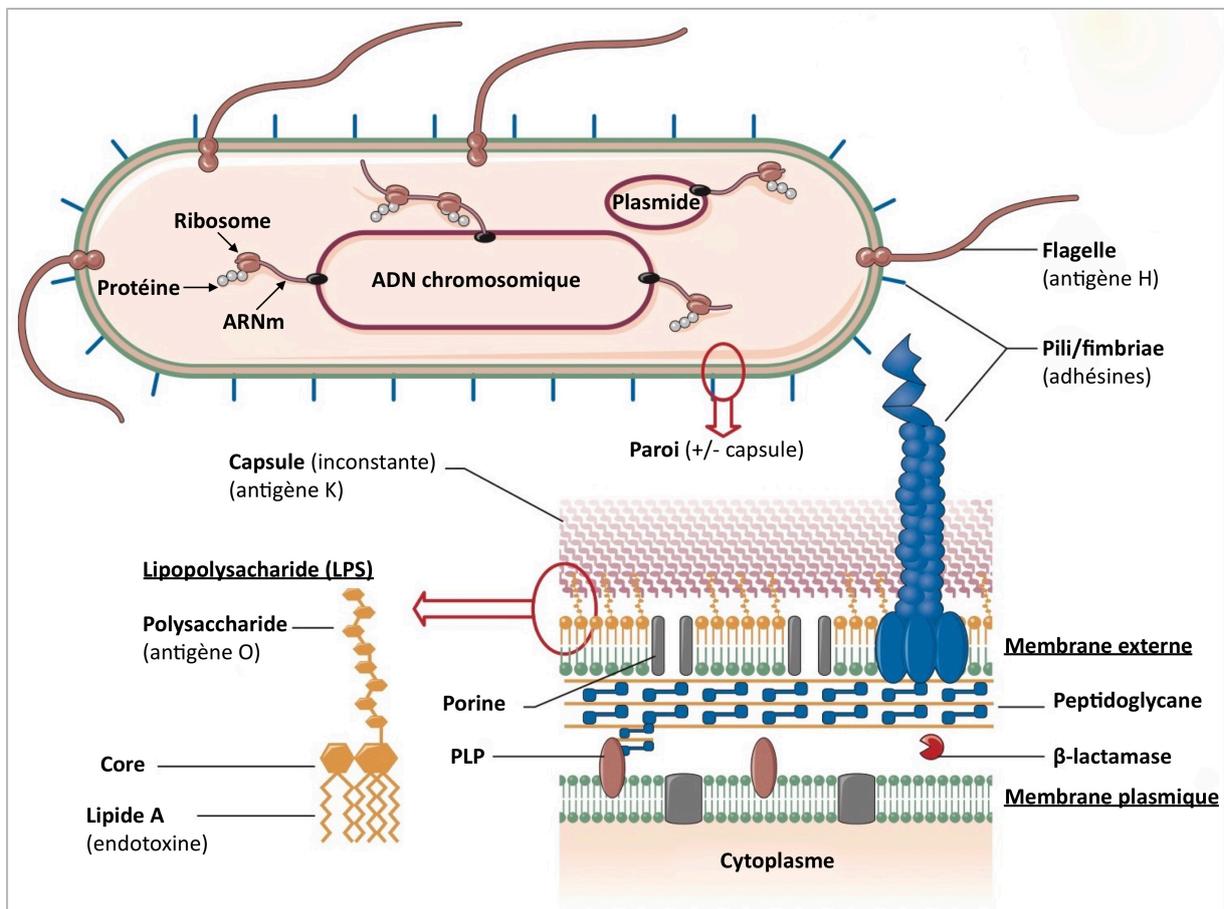
Le cytoplasme renferme le nucléoïde constitué principalement d'ADN circulaire surenroulé, d'ARN messagers et de ribosomes ; la transcription et la traduction sont couplées du fait de l'absence de membrane nucléaire chez les procaryotes. Pour exemple, le core-génome d'*E.coli* fait environ 4,6 millions de paires de bases et comporte près de 4300 gènes (13).

### **Constituants inconstants, principaux facteurs de virulence**

Certaines entérobactéries comme *Klebsiella pneumoniae* et *E.coli* possèdent une capsule polysaccharidique (antigène K) protégeant de la phagocytose (14).

Elles sont généralement mobiles grâce à des flagelles (antigène H) à ciliature péritriche, certaines sont cependant immobiles comme *Klebsiella*, *Shigella* et *Yersinia*.

Enfin, elles peuvent posséder des pili ou fimbriae permettant l'adhérence aux cellules cibles, comme les souches d'*E.coli* porteuses de pili de type 1 ou P permettant l'adhérence à l'épithélium urinaire (15,16) ; jouant un rôle dans les systèmes de sécrétion (17–19).



**Figure 2. Structure des entérobactéries**

Explication du schéma dans le paragraphe associé chapitre 1.3.1.

Source : d'après (20)

## 1.3.2. Culture

Les entérobactéries sont isolées de divers prélèvements : urines, hémocultures, selles, liquides de ponction.

Ce sont des bactéries peu exigeantes qui se cultivent facilement sur les milieux ordinaires, elles sont aéro-anaérobies facultatifs à croissance rapide à une température optimale entre 35 et 37°C (sauf pour *Yersinia* poussant entre 28 et 30°C).

Les principaux milieux non sélectifs utilisés sont les géloses BCP (bromocrésol pourpre) et CLED (Cystine Lactose Electrolyt Deficient) permettant de mettre en évidence la fermentation du lactose. Des milieux sélectifs sont également employés notamment pour les coprocultures, comme les milieux Hektoen (*Salmonella*, *Shigella*) et CIN (*Yersinia*). Il existe également des milieux chromogéniques comme le milieu UTI, différenciant les entérobactéries selon leur activité enzymatique ; les milieux ESBL et CARB permettant de détecter les entérobactéries productrices de BLSE ou carbapénémase (cf. **Chapitre 2.2.2.4**).

L'aspect des colonies sont généralement muqueuses, notamment *Klebsiella* qui peut avoir un caractère très mucoïde du fait de la capsule. Le genre *Proteus* (famille des *Morganellaceae*) s'étale et voile sauf sur certains milieux empêchant sa diffusion (BCP, UTI).

## 1.3.3. Identification bactérienne

L'utilisation en routine de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*) à la fois facile, rapide et peu coûteuse, a révolutionné la pratique des laboratoires en améliorant les délais de rendu de résultats (21,22).

Néanmoins, l'identification des bactéries par des tests d'orientation (oxydase, catalase), des tests biochimiques ou antigéniques ne doit pas être oubliée.

### 1.3.3.1. Caractères enzymatiques et biochimiques

Ces tests peuvent se réaliser manuellement, en galeries miniaturisées ou sur automate. Les caractéristiques des principales entérobactéries sont résumées dans la **Figure 3**.

L'utilisation de ces tests reste limitée dans la routine actuelle du laboratoire. Cependant, le MALDI-TOF ne pouvant pas discriminer les *Shigella* des *E.coli* lactose négatif, il est indispensable de réaliser des tests complémentaires pour les différencier, par exemple grâce à une galerie api®20E™.

	ONPG ( $\beta$ -galactosidase)	ADH (arginine dihydrolase)	LDC (lysine décarboxylase)	ODC (ornithine décarboxylase)	CIT (utilisation du citrate)	Production H <sub>2</sub> S	URE (uréase)	TDA (tryptophase désaminase)	IND (production d'indole)	VP (production d'actéoine)	GEL (gélatinase)	Fermentation des sucres										
												GLU (glucose)	MAN (mannitol)	INO (inositol)	SOR (sorbitol)	RHA (rhamnose)	SAC (saccharose)	MEL (melibiose)	AMY (amygdaline)	ARA (arabinose)	LAC (Lactose)	
<i>Citrobacter braakii</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<
<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<
<i>Citrobacter koseri</i>	+	v	-	+	v	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	v	v	+	+	+	<
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<
<i>Enterobacter asburiae</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	<
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	<
<i>Hafnia alvei</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	<
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<
<i>Morganella morganii</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	+	v	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Providencia stuartii</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Salmonella spp</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Shigella spp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-

**Figure 3. Caractères principaux d'identification de certains genres de l'ordre des Entérobactérales**

Légende : + : réaction positive, - : réaction négative, v : réaction variable

Source : adapté de la fiche technique galerie api®20E™, Biomérieux

### 1.3.3.2. Caractères antigéniques

Comme vu dans le **Chapitre 1.3.1** il existe 3 grands types d'antigènes :

- O somatique : antigène spécifique de groupe (= séro groupe)
- H flagellaire : antigène spécifique de type (= séro type)
- K capsulaire

Le typage antigénique est utilisé grâce à des sérums agglutinants poly ou monovalents pour *Salmonella* (tableau de Kauffmann White) et *Shigella* dès leur identification et pour certaines souches d'*Escherichia coli* (ex : K1 chez les nouveaux nés (23), O157:H7 (24)).

## 1.4. Principales entérobactéries d'intérêt clinique

### 1.4.1. *Escherichia coli*

Découvert en 1885 par Théodor Escherich, *Escherichia coli* est l'une des bactéries les plus fréquente en pathologie humaine étant la 1<sup>ère</sup> cause d'infections urinaires communautaires (>80%) et nosocomiales, 1<sup>ère</sup> cause avec *Staphylococcus aureus* de bactériémies, une des principales causes d'infections materno-fœtales et d'infections digestives.

Selon leurs propriétés pathogènes, ils peuvent être regroupés en pathogènes, pathogènes facultatifs (opportunistes) ou non pathogènes. Les *E.coli* dits pathogènes peuvent être divisés en deux groupes, ceux responsables d'infections intestinales et ceux responsables d'infections extra-intestinales (ExPEC) (25). Le pouvoir pathogène provient de l'acquisition de gènes de virulence par transfert horizontal de gènes (transposons, îlots de pathogénicité, phages, plasmides).

Il existe 7 pathovars responsables d'infections intestinales (25,26) :

- ***E.coli* entéropathogènes (EPEC)** : responsable de diarrhées infantiles (< 2 ans) dans les pays en voie de développement par un phénomène d'attachement-effacement sur les cellules épithéliales intestinales grâce à l'îlot de pathogénicité (PAI) LEE (*locus of enterocyte effacement*) codant, entre autre, pour un système de sécrétion de type III (T3SS) et au plasmide EAF (*EPEC adherence factor*), dérégulant ainsi l'absorption des cellules.
- ***E.coli* entérohémorragiques (EHEC)** : cause de colite hémorragique et de syndrome hémolytique et urémique (SHU) dans les pays développés dont le principal facteur de virulence est un phage codant pour des toxines Shiga-like stx1 et stx2 provoquant la mort cellulaire, mais aussi un PAI LEE comme les EPEC mais qui injecte deux fois plus de composants dans la cellule. Le sérotype le plus fréquent est le O157:H7 (porteur du plasmide pO157 codant pour de nombreux facteurs de virulences) responsable d'intoxications alimentaires par la viande hachée, on parle aussi de « maladie du hamburger ».
- ***E.coli* entérotoxigène (ETEC)** : à l'origine du syndrome choléiforme, diarrhée des voyageurs (turista), ce pathovar doit sa pathogénicité aux facteurs de colonisation CFA permettant l'adhérence aux entérocytes, mais surtout à la sécrétion d'entérotoxines LT (labile à la chaleur, similaire à la toxine du choléra) et ST (plus stable) qui activent respectivement l'adénylate cyclase et la guanylate cyclase provoquant *in fine* l'excrétion d'électrolytes et une fuite osmotique dans la lumière intestinale.
- ***E.coli* entéroinvasifs (EIEC)** : apparentés à *Shigella*, ils provoquent des diarrhées dysentériques. Possédant un pouvoir invasif apporté par un plasmide codant notamment pour un T3SS libérant des effecteurs nécessaires à l'invasion, la bactérie traverse les cellules M, puis se multiplie dans les macrophages induisant leur apoptose, pour enfin atteindre les entérocytes par leur pole basal et les détruire. Aussi, des filaments d'actine

permettent à la bactérie de passer de cellule en cellule et évitant ainsi les défenses immunitaires de l'hôte.

- ***E.coli* entéroagrégatifs (EAEC)** : considérés comme la 2<sup>ème</sup> cause de turista, responsables aussi de diarrhées persistantes à tout âge. Ils ont la capacité de former un biofilm à la surface de l'épithélium intestinal grâce au plasmide pAA codant pour des gènes nécessaires à la biosynthèse de facteurs d'adhésion AAF, ils sécrètent ensuite des cytotoxines endommageant la muqueuse intestinale.
- ***E.coli* entéro-adhérents de phénotype diffus (DAEC)** : impliqués dans les diarrhées chez les enfants de 18 mois à 5 ans. Par l'interaction d'adhésines au DAF (*decay-accelerating factor*) au niveau de la bordure en brosse, ils sont capables d'allonger, de désorganiser les microvillosités et d'induire la sécrétion d'IL8 induisant une réponse inflammatoire et la migration des polynucléaires neutrophiles.
- ***E.coli* adhérent-invasifs (AIEC)** : impliqués dans la maladie de Crohn, sont capables d'adhérer et d'envahir les cellules de la muqueuse intestinale au niveau de CAECAM6 (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6*) grâce à leur pili de type 1 et leur long fimbriae polaire. Ils peuvent également se multiplier dans les cellules épithéliales et les macrophages de l'hôte.

Parmi les ExPEC, on trouve 2 pathovars et des *E.coli* pathogènes facultatifs :

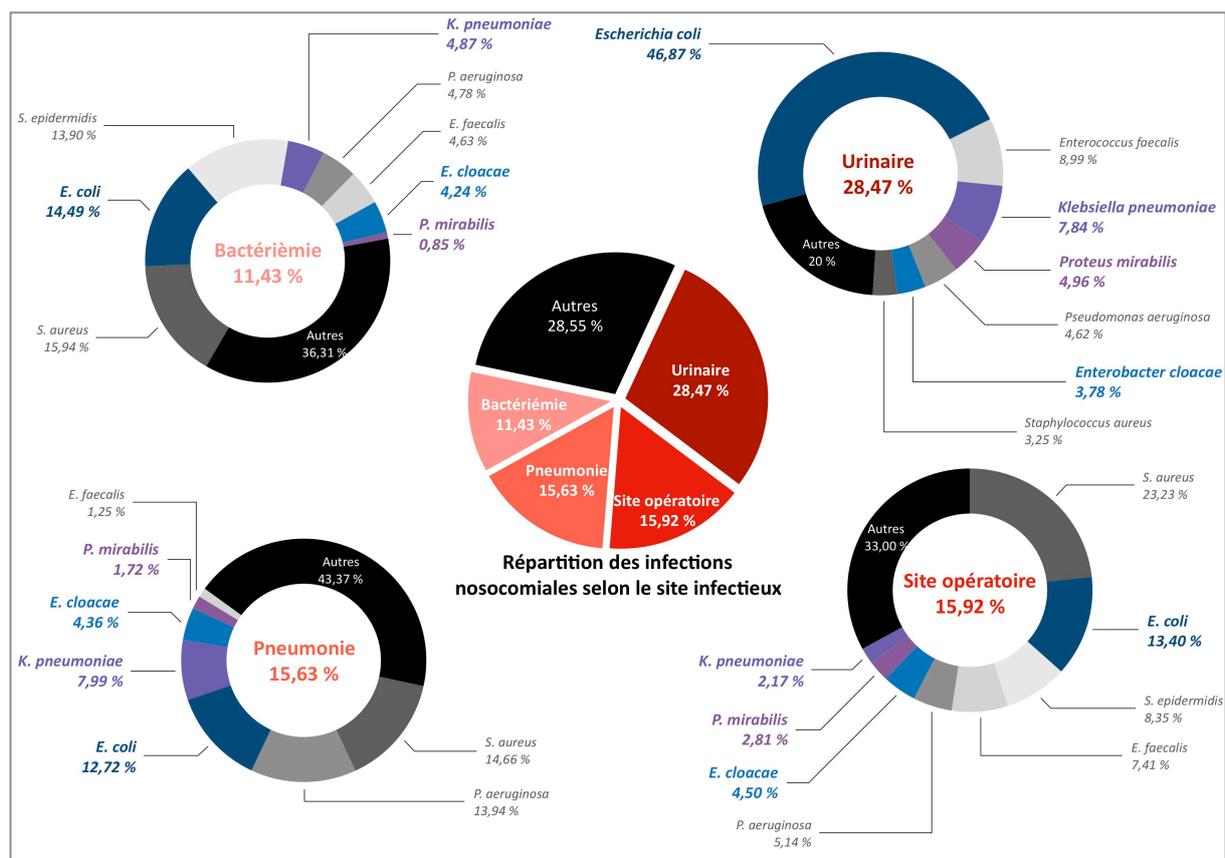
- ***E.coli* uropathogènes (UPEC)** : responsables de plus de 80 % des infections urinaires basses (cystites) et hautes (pyélonéphrites), ils adhèrent aux cellules du tractus urinaire par l'acquisition de fimbriae de type 1 dans les cystites et de type P ou PAP (*pyelonephritis associated pili*) se fixant aux cellules rénales dans les pyélonéphrites et induisent l'invasion de la muqueuse. La sécrétion d'hémolysines par certaines souches est responsable de l'apoptose des cellules.
- ***E.coli* responsables de méningites néonatales (MNEC)** : possédant dans 80 % des cas une capsule K1, celle-ci permet leur protection contre le système immunitaire de l'hôte. L'invasion des macrophages favorise une bactériémie importante permettant ainsi de franchir la barrière hémato-méningée par l'intermédiaire de pili de type 1 et envahir le système nerveux
- *E.coli* pathogènes facultatifs : les infections par ces opportunistes apparaissent lorsque *E.coli* de la flore commensale échappe au système immunitaire de l'hôte, colonise un autre site et s'y multiplie y trouvant un environnement favorable, c'est pour cela qu'ils sont fréquemment retrouvés dans les infections nosocomiales. Ils sont notamment responsables de sepsis, infections du site opératoire, infections intra-abdominales.

On peut aussi classer *Escherichia coli* en 8 groupes phylogénétiques par MLST (*Multilocus sequence typing*) ou PCR multiplex : A, B1, B2, C, D, E, F et G (27,28), les *E.coli* commensaux appartiennent principalement au groupe A, les ExPEC au groupe B2, les EHEC au groupe B1 sauf *E.coli* O157:H7 qui appartient au groupe E (29).

## 1.4.2. Autres entérobactéries

Les principales informations concernant les entérobactéries pathogènes autres que les pathovars *E.coli* décrits précédemment en 1.4.1 sont résumées dans le **Tableau 1**.

Les bactéries de l'ordre des Entérobacterales, ou appartenant à l'ancienne famille des entérobactéries, potentiellement pathogènes ou opportunistes regroupent principalement *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*. Ils ont un pouvoir pathogène facultatif nécessitant une prédisposition chez l'organisme hôte pour la pathogénicité, ils sont ainsi souvent impliqués dans les infections nosocomiales. Les infections urinaires communautaires sont majoritairement dues à *E.coli* (> 80 %) mais aussi à *Proteus* (4 %), *Klebsiella* (2 %) et les autres entérobactéries (1,5 %) (*Enterobacter*, *Citrobacter*) (30). Il en est de même pour les infections intra-abdominales communautaires, parmi les bactéries à Gram négatif, *E.coli* se retrouve au 1<sup>er</sup> rang (72 %), suivi de *Enterobacter* (13 %), *Klebsiella* (7 %) et *Proteus mirabilis* (4 %) (31). Selon une enquête de 2018 de Santé publique France sur les infections nosocomiales (32), après *E.coli* au 1<sup>er</sup> rang (23,6 %), *K.pneumoniae* arrive au 5<sup>ème</sup> rang responsable de 5,6 % de infections nosocomiales, *E.cloacae* (7<sup>ème</sup> rang, 3,8 %), *P.mirabilis* (8<sup>ème</sup> rang, 2,9 %), *K.oxytoca* (14<sup>ème</sup> rang, 1,2 %), *E.aerogenes* (nouvellement *K.aerogenes*) (17<sup>ème</sup> rang, 0,9 %) et *Morganella* spp. (19<sup>ème</sup> rang, 0,8 %). Leur répartition selon le site infectieux est répertoriée dans la **Figure 4**.



**Figure 4. Distribution des bactéries selon les 4 principales infections nosocomiales**

Données de l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, Santé publique France, 2018 (32)

**Tableau 1. Principales entérobactéries pathogènes hors pathovars *E.coli***

ENTEROBACTERIES	MALADIES - SYMPTOMES	EPIDEMIOLOGIE
<p><b>Salmonelloses majeures</b></p> <p><i>S.typhi, S.paratyphi</i></p>	<p><b>Fièvres typhoïdes et paratyphoïdes</b> Incubation de 1 à 3 semaines. Fièvre continue accompagnée de maux de tête, d'anorexie, d'abattement (tuphos) et de douleurs abdominales avec diarrhée ou constipation <u>Guérison</u> : en une 15aines de jours <u>Complications</u> : intestinale, cardiaque, nerveuse <u>Mortalité</u> : 10 % en l'absence de traitement</p>	<p>Anthroponoses : contamination le plus souvent par ingestion d'eau ou d'aliments souillés par contamination fécale d'origine humaine ou d'une transmission directe Epidémies dans les pays en voie de développement (Asie, Afrique, Amérique latine), rare dans les pays industrialisés Dans le monde : 20 millions de cas/an et &gt; 200 000 décès En France (MDO) : 100-150 cas/an</p>
<p><b>Salmonelloses mineures</b></p> <p><i>S.typhimurium, S.enteritidis</i> (les plus fréquents)</p>	<p><b>Gastroentérites</b> Incubation : 1-2 jours. Fièvre, diarrhée, vomissements, douleurs abdominales <u>Guérison</u> : sans traitement 3-5 jours <u>Complication</u> : déshydratation</p>	<p>Antropozoonoses : contamination indirecte par consommation d'aliments souillés viande, œufs, produits laitiers, ou plus rarement direct avec contact d'un animal malade ou porteur sain 2<sup>ème</sup> cause de diarrhées bactériennes : Responsable de cas sporadiques ou des toxi-infections d'origine alimentaire collective (TIAC) (MDO) En France : plus de 17000 cas confirmés/an</p>
<p><b>Shigelloses</b></p> <p><i>S.flexneri</i> (endémique), <i>S.dysenteriae</i> (bacille de Shiga, épidémies), <i>S.sonnei</i></p>	<p><b>Dysenterie bactérienne (<i>S.dysenteriae</i> sérotype 1) (Shiga-toxine)</b> Incubation 1-3 jours. Début brutal avec fièvre, douleurs abdominales, vomissements, épreintes, selles très nombreuses, glairo-sanglantes, purulentes <u>Guérison</u> : spontanée, en quelques jours <u>Complications</u> : déshydratation, mégacôlon, occlusion intestinale, SHU <u>Mortalité</u> : enfant &lt; 5 ans <b>Entérites</b> (autres <i>Shigella</i>)</p>	<p>Strictement inter-humaine, transmission oro-fécale, extrêmement infectieuse, de façon directe ou indirecte Grave problème de santé publique dans les pays en voie de développement Dans le monde : 100000 morts/an (surtout &lt; 5 ans) En France : cas isolés</p>
<p><i>Yersinia pestis</i></p>	<p><b>Peste</b> : 3 formes : bubonique (la plus fréquente), septicémique et pulmonaire Incubation : 2-8 jours, Forte fièvre, atteinte de l'état général, hypertrophie ganglionnaire (bubon), dissémination sanguine possible, ou pulmonaire (90-100 % de mortalité)</p>	<p>Transmission par piqûre de puce du rat Principaux foyers : Madagascar, République Démocratique du Congo, Ouganda, Chine, Indonésie, Pérou France : dernier cas en 1945 en Corse</p>
<p><b>Yersinioses intestinales</b></p> <p><i>Yersinia enterocolitica, Y.pseudotuberculosis</i></p>	<p><b><i>Y.enterocolitica</i> : entérite aiguë</b> Fièvre, diarrhées, douleurs abdominales Touche principalement les enfants &lt; 10 ans Infection modérée et spontanément résolutive <b><i>Y.pseudotuberculosis</i> : adénite mésentérique</b> Syndrome pseudo-appendiculaire Touche surtout les sujets de &gt; 60 ans <u>Complications</u> : érythème noueux, arthrites réactionnelles</p>	<p>3<sup>ème</sup> cause de diarrhées bactériennes en France et en Europe Transmission oro-fécale par ingestion d'aliments contaminés France : cas sporadiques ou cas groupés en faible nombre Incidence en France: entre 2 et 16/100000 habitants <i>Y.enterocolitica</i> (98 %), <i>Y.pseudotuberculosis</i> (2 %)</p>

(Données tirées de l'Institut Pasteur : www.pasteur.fr) ; MDO : maladie à déclaration obligatoire ; SHU : syndrome hémolytique et urémique



*Serratia marcescens* est naturellement résistante à la kanamycine, tobramycine, netilmicine, amikacine, ayant un profil KTNA de bas niveau par production d'une acétyltransférase chromosomique AAC (6')-Ic (33), restant sensible à la gentamicine. *Providencia stuartii* est naturellement résistant à la gentamicine, tobramycine, netilmicine (profil GTN de bas niveau) et sensible à l'amikacine grâce à une acétyltransférase chromosomique AAC(2')-I (34).

*Proteus*, *Providencia*, *Morganella* et *Serratia* ont une résistance naturelle de haut niveau à la colistine par modification du LPS (35,36) et certains *Enterobacter cloacae* ont une résistance hétérogène (37), enfin *Hafnia* possède une résistance à bas niveau encore mal connue (38).

Grâce à un système d'efflux intrinsèque, *Proteus*, *Providencia* et *Morganella* sont résistants à la tigécycline (39). Ils sont également résistants à la nitrofurantoïne.

## 1.5.2. Résistances acquises

Les résistances aux aminosides sont majoritairement dues à l'inactivation enzymatique des aminosides par des enzymes modificatrices : phosphotransférases (APH), acétyltransférases (AAC), nucléotidyltransférases (ANT) acquises via notamment des plasmides ; AAC(6')-Ib (profil KTNA) et AAC(3')-IIa (profil KGTN) étant les plus fréquentes. Plus rarement, l'acquisition de méthylases (*rmt*, *armA*) ciblant et modifiant l'ARN 16S mène à la résistance à tous les aminosides (profil KGTNA de haut niveau) (40). Enfin la résistance peut se faire par mécanisme d'efflux (41).

Le mécanisme principal de résistance aux fluoroquinolones est l'altération des enzymes cibles (les topoisomérases II : topoisomérase IV et ADN gyrase) par mutations chromosomiques au niveau des gènes de leurs sous unités (*gyrA/gyrB* et *parC/parE*). Ces mutations ont lieu au niveau des domaines QRDR (*quinolone resistance determining region*), situé pour *gyrA* au niveau des acides aminés situés entre la position 67 et 106 chez *E.coli* ; les mutations les plus fréquentes sont en position Ser83 et Asp87. Chez les entérobactéries, les mutations apparaissent en premier au niveau de *gyrA*, selon le nombre de mutations, le niveau de résistance sera différent. La résistance peut être apportée par des plasmides pouvant coder pour 1/ des protéines Qnr qui protègent l'ADN gyrase de *E.coli* contre l'action de la ciprofloxacine, 2/ une acétyltransférase particulière AAC(6')-Ib-cr active sur les aminosides mais aussi sur la ciprofloxacine et norfloxacine 3/ des pompes d'efflux QepA et OqxAB. La résistance peut se faire également par imperméabilité et efflux (ex pompe AcrAB-TolC chez *E.coli*) (42).

Succinctement, les résistances au cotrimoxazole (sulfaméthoxazole-triméthoprime) apparaissent par modification de la dihydroptéroïlsynthétase (DHPS) et/ou dihydrofolate réductase (DHFR) par mutations chromosomiques ou acquisition d'un gène *dhfr* plasmidique.

La fosfomycine nécessite un transport actif pour traverser la membrane cytoplasmique, des mutations au niveau de ces systèmes sont responsables de résistance acquise (gènes *glpT*, *uhpA*, *uhpT*). Il existe aussi des enzymes plasmidiques modificatrices de la fosfomycine (gène *fosA*).

Les résistances acquises à la colistine sont souvent dues à des mutations : chromosomiques dans des systèmes à deux-composants ou dans leurs systèmes de régulation (mutations *mgrB*, *pmrA/B*, *phoQ/P*) ou d'origine plasmidique (gènes *mcr*).

## 2. Résistances naturelles et acquises aux $\beta$ -lactamines chez les entérobactéries

### 2.1. Les $\beta$ -lactamines

#### 2.1.1. Introduction

Depuis la découverte en 1928 de la Pénicilline G, première molécule de cette famille, les  $\beta$ -lactamines constituent la plus importante famille d'antibiotiques (> 20 molécules) et la plus prescrite en ville et dans les établissements de santé (plus de 60 % des prescriptions et consommation) (43,44). Elles inhibent la synthèse de la paroi exerçant ainsi un effet bactéricide.

#### 2.1.2. Mécanisme d'action

Chez les bactéries à Gram négatif, les  $\beta$ -lactamines, molécules hydrosolubles, traversent la membrane externe grâce aux porines, leur permettant ainsi d'atteindre l'espace périplasmique où se trouve les protéines liant la pénicilline (PLP) sur la face externe de la membrane cytoplasmique.

La **Figure 7**. explique la synthèse du peptidoglycane qui se fait en 3 étapes, les  $\beta$ -lactamines agissent au niveau de l'étape terminale au niveau de la paroi. Par leur analogie structurale entre leur pont  $\beta$ -lactame et la liaison peptidique D-alanyl-D-alanine, les  $\beta$ -lactamines se lient de façon covalente et irréversible aux PLP (transpeptidases et carboxypeptidases) ; ceci explique l'action bactériostatique (**Figure 6**).

L'effet bactéricide provient de l'activation dérégulée des autolysines bactériennes qui destructurent le peptidoglycane et donc la paroi menant à la lyse de la bactérie par pression osmotique élevée.

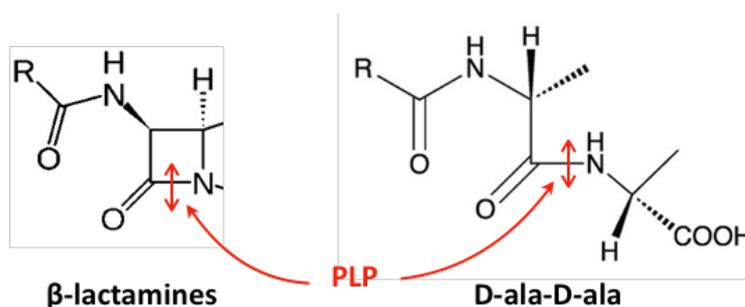
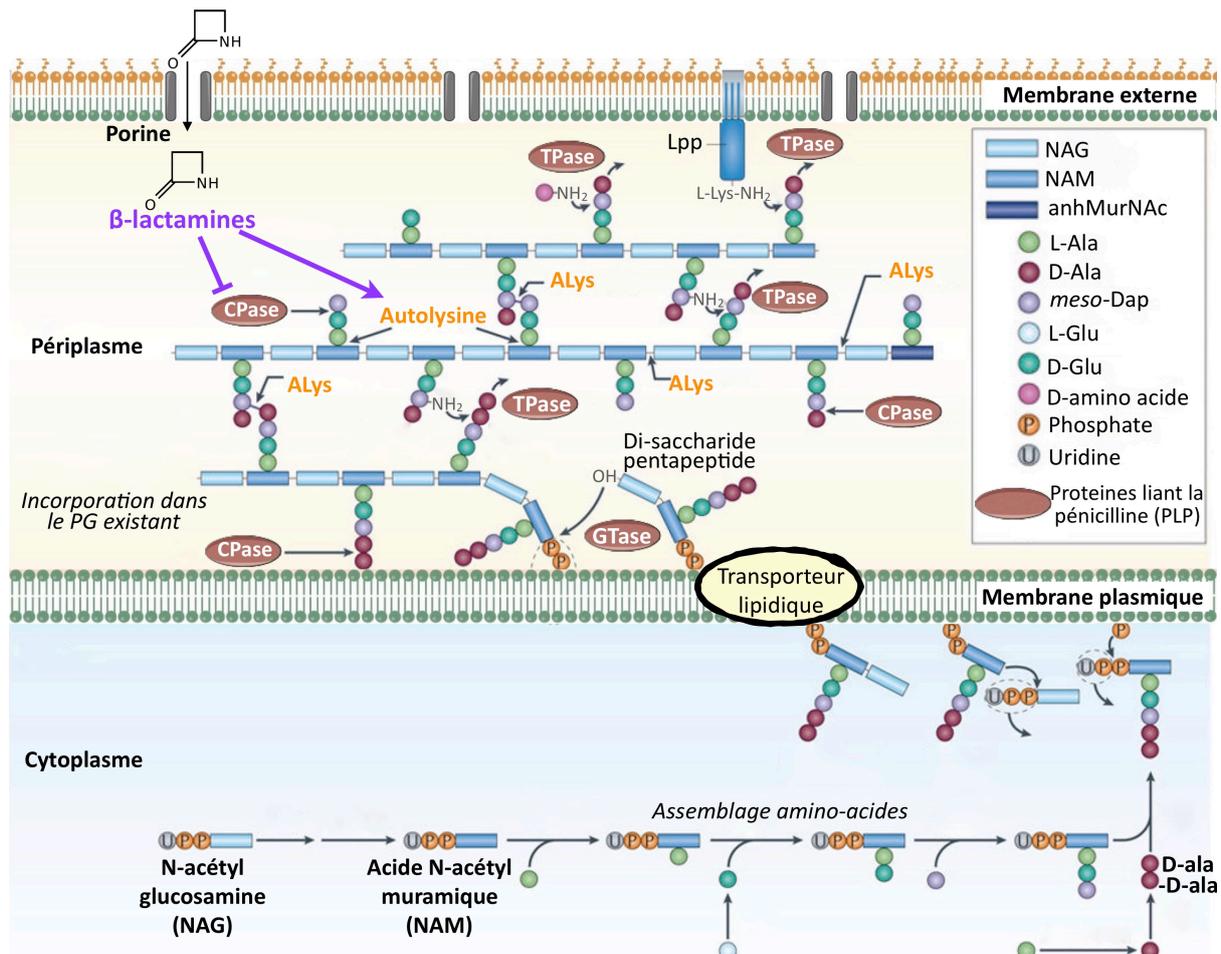


Figure 6. Blocage des PLP par analogie structurale entre pont  $\beta$ -lactame et D-ala-D-ala



**Figure 7. Synthèse du peptidoglycane**

Le peptidoglycane, élément essentiel à la paroi bactérienne est une structure tridimensionnelle, réticulée, constituée de chaînes de glycanes reliées entre elles par de courtes chaînes térapeptidiques. Sa synthèse se fait selon 3 étapes. Les précurseurs disaccharidiques N-acétyl-glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl muramique (NAM) associés à un pentapeptide sont synthétisés dans le cytoplasme. Ces précurseurs hydrophiles traversent la membrane cytoplasmique lipidique par un transporteur lipidique puis, au niveau de l'espace périplasmique ils sont incorporés au peptidoglycane préexistant grâce à des glycosyltransférases (GTase) synthétisant les chaînes polysaccharidiques et les transpeptidases (TPase) synthétisant les ponts peptidiques. Les carboxypeptidases (CPase) limitent la transpeptidation. Les autolysines (ALys) (amidases, endopeptidases, glucosamidases, muraminases) hydrolysent le peptidoglycane à différents endroits afin de réguler la structuration. Enfin le peptidoglycane est relié à la membrane externe par la lipoprotéine de Braun (lpp).

Les  $\beta$ -lactamines après avoir traversé la membrane externe via des porines, bloquent de façon compétitive, par analogie de structure avec les motifs D-ala-D-ala, les protéines liant la pénicilline (PLP) (GTases, TPases, CPases) qui sont ancrées sur la face externe de la membrane cytoplasmique. Elles ciblent également les autolysines déclenchant leur activation anarchique et la lyse bactérienne reflétant leur effet bactéricide.

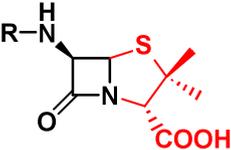
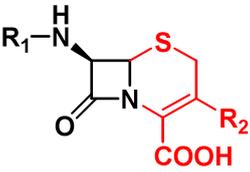
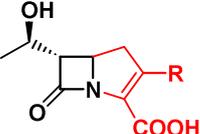
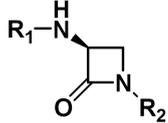
Source : adapté de (45)

## 2.1.3. Classification

Les  $\beta$ -lactamines ont un cycle bêta-lactame commun à toutes les molécules, on les classe ensuite en 5 grands groupes selon leur structure : pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes, monobactame et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.

Au sein de chaque groupe, les groupements (R, R2) déterminent le spectre anti-bactérien ou la stabilité de la molécule, ainsi on distingue des sous-groupes et plusieurs molécules différentes (Tableau 2).

Tableau 2. Classification des  $\beta$ -lactamines

Groupes	Sous-groupes	Principales molécules
<b>PÉNICILLINES</b> 	Pénicillines G	Benzylpénicilline
	Pénicillines M	Oxacilline Cloxacilline
	Aminopénicillines	Ampicilline Amoxicilline <i>Amoxicilline + acide clavulanique</i>
	Amidinopénicillines	Pivmécillinam
	Carboxypénicillines Uréidopénicillines	Ticarcilline Pipéracilline Témocilline <i>Ticarcilline + acide clavulanique</i> <i>Pipéracilline + tazobactam</i>
<b>CÉPHALOSPORINES</b> 	C1G orales injectables	Céfalexine, Céfalotine Céfazoline
	C2G orales injectables	Céfuroxime-axetil Céfamandole, Céfuroxime
	Céphamycines injectables	Céfoxitine, Céfotétan
	C3G orales injectables	Céfixime, Cefpodoxime-proxetil Céfotaxime, Ceftriaxone, Ceftazidime, Céfopérazone, Cefsulodine Ceftaroline, Ceftobiprole <i>Ceftolozane + tazobactam</i> <i>Ceftazidime + avibactam</i>
	C4G injectables	Céfépime, Cefpirome
<b>CARBAPÉNÈMES</b> 		Ertapénème Imipénème Méropénème Doripénème
<b>MONOBACTAMES</b> 		Aztréonam
<b>INHIBITEURS DE B-LACTAMASES</b>		Acide clavulanique Tazobactam Avibactam

En italique : association  $\beta$ -lactamines /inhibiteur de  $\beta$ -lactamase ; C1G/2G/3G/4G : Céphalosporines de 1<sup>ère</sup> /2<sup>ème</sup> / 3<sup>ème</sup> / 4<sup>ème</sup> generation

## 2.2. Mécanismes de résistance

Chez les entérobactéries, le mécanisme majeur de résistance aux  $\beta$ -lactamines est leur inactivation enzymatique mais peut être aussi dû à un défaut d'accumulation ; des modifications de PLP ont aussi été décrites (non traité ici).

### 2.2.1. Défaut d'accumulation

L'une des stratégies de résistance aux antibiotiques consiste à limiter leur accumulation intrabactérienne via une modification de la perméabilité membranaire et l'efflux d'antibiotiques.

#### 2.2.1.1. Perméabilité de la membrane externe

Les porines de la membrane externe, qui sont des canaux protéiques, permettent l'entrée de petits solutés hydrophiles comme les  $\beta$ -lactamines ou les fluoroquinolones. Les principales porines des entérobactéries sont les suivantes : *E.coli* (OmpF, OmpC, PhoE), *K.aerogenes* (Omp35, Omp36), *E.cloacae* (OmpEc35, OmpEc36), *K.pneumoniae* (OmpK35, OmpK36), *S.enterica* (OmpC, OmpF, OmpD), *P.stuartii* (OmpPst1, OmpPst2) (46).

Les résistances sont dues à des altérations qualitatives des porines par mutations (substitutions, insertions) au niveau de la zone de constriction (ex : boucle L3), par conséquent, l'efficacité d'entrée des  $\beta$ -lactamines (et fluoroquinolones) est diminuée conduisant à une accumulation insuffisante dans l'espace périplasmique et donc à une sensibilité diminuée aux  $\beta$ -lactamines. Les altérations peuvent être également quantitatives par perte de porines (*via* un petit ARN antisens *micF*, inhibant l'expression de la porine) (**Figure 8**). L'expression de porines alternatives pour compenser la perte des porines majeures a été observée (surexpression de LamB chez *K.aerogenes* dépourvus d'OmpK36) (46).

#### 2.2.1.2. Efflux

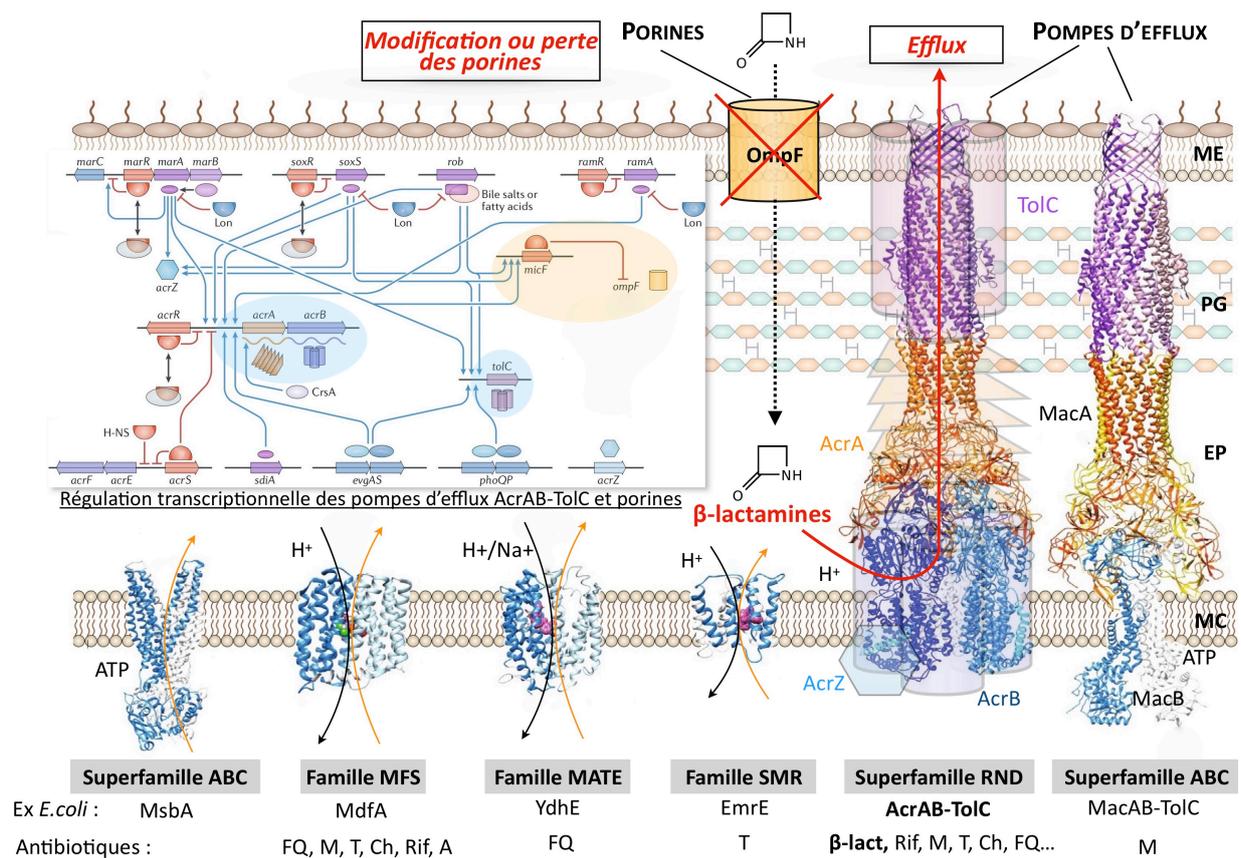
Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires actifs qui expulsent des molécules, dont les antibiotiques, à l'extérieur de la bactérie. Ces pompes sont codées par des gènes chromosomiques ou par acquisition de gènes (plasmides, transposons, intégrons). Selon leur structure, le nombre de domaines transmembranaires, la source d'énergie utilisée (protons, sodium, ATP), leurs substrats, les pompes d'efflux sont classées en 6 familles (**Figure 8**) : la superfamille des ABC (*Adenosine triphosphate-Binding Cassette*), la superfamille des MFS (*Major Facilitator Superfamily*), la famille des MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*), des SMR (*Small Multidrug Resistance*), des RND (*Resistance Nodulation cell Division*) et des PACE (*Proteobacterial Antimicrobial Compounds Efflux*).

Les systèmes à un seul composant (membrane cytoplasmique) (ABC, MFS, MATE, SMR, PACE) sont retrouvés chez les Gram positif et négatif alors que les systèmes à 3 composants (membrane cytoplasmique et externe) (RND, ABC et MFS associés à une protéine de membrane externe) sont rencontrés uniquement chez les Gram négatif. Quelques pompes ont une spécificité étroite conférant la résistance à un seul antibiotique ou famille d'antibiotiques et

d'autres pompes sont dites MDR (*multidrug resistance*) pouvant effluer des antibiotiques de structures différentes.

Certaines pompes retrouvées chez *E.coli* sont montrées dans la **Figure 8**, seuls les substrats de type antibiotiques sont mentionnés, cependant, certaines pompes peuvent effluer d'autres molécules : MsbA (lipide A, vérapamil, colchicine, daunorubicine (47)), MdfA (bromure d'éthidium (BET), tétraphénylphosphonium, rhodamine, daunomycine (48)), YdhE (BET, rhodamine (49)), EmrE (BET, ammoniums quaternaires), AcrAB-TolC (antiseptiques, détergents, colorants), MacAB-TolC (glycolipides de la membrane externe, lipopeptides, protoporphyrines, entérotoxine thermostable II (50)).

La pompe d'efflux AcrAB-TolC est le principal mécanisme d'efflux des  $\beta$ -lactamines chez *E.coli*, naturellement présent (chromosomique), l'apparition de mutations aux niveaux des gènes régulateurs entraîne l'hyperexpression de ces pompes d'efflux. La régulation de *acrAB* et de *tolC* est très complexe impliquant plusieurs gènes dont MarA/SoxS/Rob (activateurs de *acrAB* et *tolC*), AcrR (répresseur de *acrAB*) et MarR (répresseur de *marA*). A ce mécanisme d'efflux, s'ajoute comme vu précédemment la perte de porine par exemple par régulation *micF* sur *ompF* (**Figure 8**).



**Figure 8. Différentes familles de pompe à efflux et mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines**

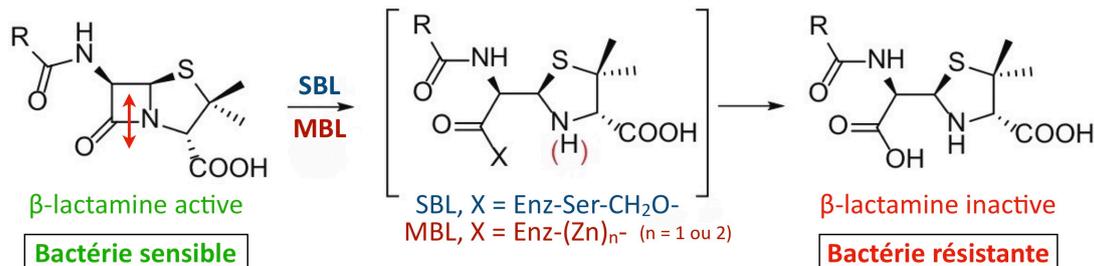
Pour chaque famille, un exemple de pompes présentes chez *E.coli* et les antibiotiques qu'elles effluer est indiqué. Dans l'encadré, la régulation de la pompe d'efflux AcrAB-TolC et la porine *ompF*. En rouge, les mécanismes de résistances aux  $\beta$ -lactamines. ME : Membrane externe ; PG : peptidoglycane ; EP : espace périplasmique ; MC : membrane cytoplasmique ;  $\beta$ -lact :  $\beta$ -lactamines ; FQ : fluoroquinolones ; T : tétracyclines ; M : macrolides ; Ch : chloramphenicol ; Rif : rifampicine, A : aminosides

Source : adapté de (51)

## 2.2.2. Production d'enzymes : $\beta$ -lactamases

### 2.2.2.1. Mode d'action

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes qui hydrolysent de façon irréversible la liaison amide du cycle lactame des  $\beta$ -lactamines (**Figure 9**). Cette hydrolyse rend inactive la  $\beta$ -lactamine qui ne peut donc plus atteindre ses cibles, les PLP, rendant la bactérie résistante vis à vis de cet antibiotique.



**Figure 9. Mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamases**

SBL : Sérine  $\beta$ -lactamases, MBL : Métallo  $\beta$ -lactamases

Ces enzymes sont codées par des gènes d'origine chromosomique ou extra-chromosomique (plasmides, transposons, intégrons voir **Chapitre 2.2.2.3**). Les  $\beta$ -lactamases sont excrétées dans le milieu extracellulaire (bactéries à Gram positif) ou périplasmique (bactéries à Gram négatif). Chez les entérobactéries, la production des  $\beta$ -lactamases est le mécanisme de résistance majeur aux  $\beta$ -lactamines.

### 2.2.2.2. Classification

Il existe plus de 200 types de  $\beta$ -lactamases et plus de 4500 enzymes (<http://www.bldb.eu> (52)).

On classe les  $\beta$ -lactamases selon deux classifications :

- Classification moléculaire selon Ambler, 1980 (53), se basant sur l'homologie de séquences, divise les  $\beta$ -lactamases en 4 classes : A, C, D, qui sont des sérine-enzymes et la classe B qui sont des métalloenzymes nécessitant des ions zinc pour l'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines (**Figure 9**)
- Classification fonctionnelle selon Bush et Jacoby, 2010 (54) prend en compte le type de  $\beta$ -lactamines principalement touchées et les substances (acide clavulanique, tazobactam, EDTA) qui inhibent les enzymes concernées

Le **Tableau 3** est la compilation de ces deux classifications, pour chaque classe de  $\beta$ -lactamases des exemples d'enzymes sont donnés en distinguant les enzymes chromosomiques (naturelles) en bleu et les enzymes acquises (plasmiques ou autres) en mauve.

**Tableau 3. Classification des  $\beta$ -lactamases**

Bush-Jacoby (2010)	Ambler (1980)	Substrats préférentiels	Inhibition par		Caractéristiques, enzymes représentatives
			AC ou TZB	EDTA	
1	C	Céphalosporines	NON	NON	<b>Céphalosporinases</b> : AmpC (inductible : <i>E.cloacae</i> , <i>C.freundii</i> , <i>S.marcescens</i> , réprimée : <i>E.coli</i> ) ; ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1, DHA-1
1e	C	Céphalosporines large spectre	NON	NON	<b>Céphalosporinases à spectre élargi</b> : GC1 ( <i>E.cloacae</i> ) ; CMY-10, CMY-19, CMY-37
2a	A	Pénicillines	OUI	NON	<b>Pénicillinases</b> des Gram positif : PC1 ( <i>S.aureus</i> )
2b	A	Pénicillines, Céphalosporines 1G	OUI	NON	<b>Pénicillinases des BGN</b> : SHV ( <i>K.pneumoniae</i> ), OXY ( <i>K.oxytoca</i> ), MAL, CKO ( <i>C.koseri</i> ) ; TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	2b + Céphalosporines large spectre, monobactames	OUI	NON	<b>BLSE</b> : KLUVA ( <i>Kluyvera</i> ), SED ( <i>C.sedlakii</i> ), ERP ( <i>E.persicina</i> ) ; TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	2b	NON	NON	<b>Pénicillinases résistantes aux IBL</b> : TEM-30 (TRI), SHV-10
2ber	A	2be	NON	NON	<b>BLSE résistantes aux IBL</b> : TEM-50
2c	A	Carboxy-uréidopénicillines	OUI	NON	<b>Carboxypénicillinases</b> : PSE/CARB ( <i>P.aeruginosa</i> )
2ce	A	2c + céfépime, cefpirome	OUI	NON	<b>BLSE</b> : RTG-4 ( <i>A.baumannii</i> )
2d	D	Cloxacilline, oxacilline	Variable	NON	<b>Oxacillinases</b> : OXA-1, OXA-10
2de	D	2d + Céphalosporines large spectre	Variable	NON	<b>BLSE</b> : OXA-11, OXA-15
2df	D	2d + Carbapénèmes	Variable	NON	<b>Carbapénémases</b> : OXA-23 ( <i>A.baumannii</i> ), OXA-48 (Enterobactéries)
2e	A	Céphalosporines large spectre	OUI	NON	<b>Céphalosporinases</b> : CepA ( <i>B.fragilis</i> ), CumA ( <i>P.vulgaris</i> ), HugA ( <i>P.penneri</i> )
2f	A	Carbapénèmes, céphalosporines large spectre	Variable	NON	<b>Carbapénémases</b> : SME ( <i>S.marcescens</i> ), NMC-A, IMI-1 ( <i>E.cloacae</i> ), SFC ( <i>S.fonticola</i> ) ; KPC, IMI, GES
3a	B (B1) B (B3)	Pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes sauf aztréonam	NON	OUI	<b>Carbapénémases</b> : CfiA ( <i>B.fragilis</i> ), IND-1 ( <i>Chryseobacterium indologenes</i> ) ; NDM, IMP, VIM <b>Carbapénémases</b> : L1 ( <i>S.maltophilia</i> ), CAU-1 ( <i>Caulobacter crescentus</i> ), GOB-1 ( <i>Elizabethkingia meningoseptica</i> ), FEZ-1 ( <i>Fluoribacter gormanii</i> )
3b	B (B2)	Carbapénèmes	NON	OUI	<b>Carbapénémases</b> : CphA ( <i>A.hydrophila</i> ), Sfh-1 ( <i>S.fonticola</i> ), PFM ( <i>P.fluorescens</i> )

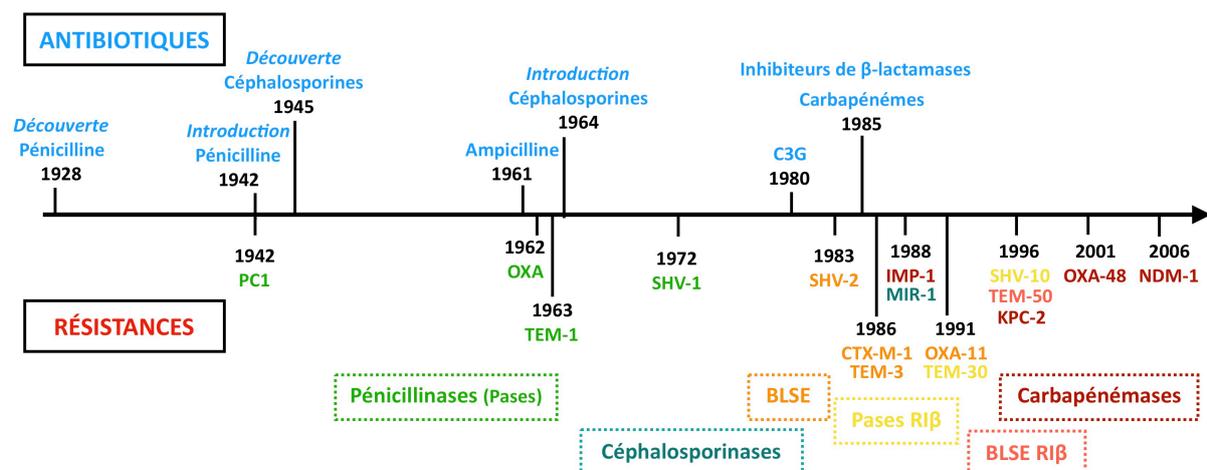
Liste non exhaustive des enzymes. AC : acide clavulanique ; TZB : tazobactam ; céphalosporines large spectre : C3G, C4G ; TRI : TEM-résistant aux inhibiteurs ; BLSE :  $\beta$ -lactamases à spectre étendu ; Résistance naturelle chromosomique, Résistance acquise. Sources : (54) et <http://www.bldb.eu>

La dissémination des  $\beta$ -lactamases au sein de plusieurs espèces de bactéries et l'apparition d'enzymes mutées ou de nouvelles enzymes sont reliées directement à l'introduction et l'utilisation des  $\beta$ -lactamines. Comme on peut le voir sur la **Figure 10**, peu de temps après l'introduction d'une nouvelle molécule, les bactéries s'adaptent et deviennent résistantes grâce à des  $\beta$ -lactamases qui ont des spectres d'activité de plus en plus large. Au fur et à mesure, de simples pénicillinases (ex : TEM-1, appelées aussi BLS ( $\beta$ -lactamases à large spectre)) hydrolysant uniquement les pénicillines sont devenues des BLSE, des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (ex : TEM-3, CTX-M) capables d'hydrolyser la plupart des  $\beta$ -lactamines (hormis les céphamycines et carbapénèmes).

Devant l'apparition de ces nouvelles enzymes, des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (I $\beta$ L) en association avec une  $\beta$ -lactamine ont été mis sur le marché : l'acide clavulanique (+ amoxicilline ou ticarcilline) et le tazobactam (+ pipéracilline) jouant le rôle de leurres (réaction irréversible), par leur structure dérivant des pénicillines, inhibant donc la  $\beta$ -lactamase permettant de rétablir l'activité bactéricide de la  $\beta$ -lactamine. Néanmoins, très vite des pénicillinases sont devenues résistantes à ces inhibiteurs (ex : TRI : TEM résistante aux inhibiteurs) et également des BLSE (ex : TEM-50).

De façon concomitante, les premières céphalosporinases plasmidiques (ex : MIR-1, CMY-2) et les carbapénémases (ex : IMP) sont apparues, ces dernières étant des enzymes hydrolysant quasiment toutes les  $\beta$ -lactamines (selon la classe de carbapénémase) menant à des impasses thérapeutiques.

En 2015, les nouvelles associations Ceftolozane-tazobactam et Ceftazidime-avibactam ont montré une réelle efficacité contre les BLSE et même certaines carbapénémases (OXA-48, KPC) pour la seconde association. L'avibactam étant un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases non  $\beta$ -lactamine qui agit en formant un complexe covalent avec l'enzyme, qui est stable à l'hydrolyse (réaction réversible).



**Figure 10. Chronologie de découverte des antibiotiques et premières descriptions des différentes  $\beta$ -lactamases**

RI $\beta$  : Résistance aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases

Le nombre de  $\beta$ -lactamases ne cesse de croître et de nouveaux variants sont découverts chaque année grâce à la biologie moléculaire, le **Tableau 4** montre cette augmentation au cours du temps.

**Tableau 4. Augmentation du nombre des principales  $\beta$ -lactamases au cours du temps**

Type d'enzyme	Classe	Groupe fonctionnel	Nombre par classe par année							
			1961	1995	2000	2005	2010	2015	2018	2020*
CMY	C	1	0	1	6	22	64	136	139	170
TEM	A	2b, 2be, 2br, 2ber	0	36	86	153	178	219	224	242
SHV	A	2b, 2be, 2br	0	6	26	89	134	182	193	228
CTX-M	A	2be	0	2	9	51	103	172	182	233
KPC	A	2f	0	0	0	3	11	22	24	54
OXA	D	2d, 2de, 2df	0	18	28	88	202	498	520	899
IMP	B1	3a	0	1	3	23	29	48	53	85
VIM	B1	3a	0	0	2	12	27	41	46	69
NDM	B1	3a	0	0	0	0	1	12	14	29
$\beta$ -lactamases totales			(<13)	217	309	584	1003	1855	2771	4940

Données de 1961 à 2018 selon K.Bush (2008) (55) s'appuyant notamment sur l'ancien site <http://www.lahey.org/Studies/>. \*Les données de 2020 ont été tirées de <http://www.bldb.eu>, à la date du 03 Juin 2020.

En ce qui concerne les entérobactéries (ou le nouvel ordre des Entérobactérales), la présence de  $\beta$ -lactamases à l'état sauvage permet de les classer en six groupes :

- groupe 0 : dépourvues de  $\beta$ -lactamase ;
- groupe 1 : possédant une céphalosporinase AmpC qui est cependant réprimée à l'état sauvage ;
- groupe 2 : avec une pénicillinase de bas niveau ;
- groupe 3 : caractérisées par la présence d'une céphalosporinase AmpC inductible ;
- groupe 4 : possédant à la fois une pénicillinase et une céphalosporinase ;
- groupe 5 : présentant une céfuroximase ;
- groupe 6 : avec une BLSE chromosomique.

Les résistances naturelles aux  $\beta$ -lactamines sont indiquées dans la **Figure 5** (Chapitre 1.5.1 Résistances naturelles) tirée du CASFM 2020 (56) et le **Tableau 5**.

L'acquisition de nouvelles  $\beta$ -lactamases ou la surexpression d'enzymes chromosomiques des entérobactéries modifient leur profil qui devient plus ou moins résistant. Les profils pour les principaux groupes (0 à 3) en fonction des enzymes acquises sont répertoriés dans le **Tableau 5**. On peut ainsi parler de profil sauvage, résistance modérée (pénicillinases, céphalosporinases), Bactérie Multi-Résistante (BMR) (BLSE) et Bactérie Hautement Résistante (BHR) (carbapénémase). Ces notions seront abordées dans le **Chapitre 3.2**.

**Tableau 5. Différents groupes d'entérobactéries : profils sauvages et résistances acquises**

		Résistances chromosomiques		Résistances acquises		
Groupe 0		* ou **	Pase ou (TRI)	Case	BLSE	Carbapénémase
*Absence de	AMX	S	R	R	R	R
β-lactamase	TIC	S	R	S	R	R
<i>Salmonella spp</i>	PIP	S	I/R (R)	S	R	R
<i>P.mirabilis</i>	AMC	S	S (R)	R	S/I/R	R
	TCC, PTZ	S	S (R)	S	S/I/R	R
<b>Groupe 1</b>	C1G	S	S	R	R	R
**Céphalosporinase	FOX	S	S	I/R	S	I/R
AmpC réprimée	C3G	S	S	I/R	I/R	S/I/R
<i>E.coli</i>	C4G	S	S	S	I/R	S/I/R
<i>Shigella spp</i>	Carba	S	S	S	S	I/R
		Pase de bas niveau	Pase déprimée	Case	BLSE	Carbapénémase
	AMX	R	R	R	R	R
	TIC	R	R	R	R	R
<b>Groupe 2</b>	PIP	I/R	R	I/R	R	R
	AMC	S	I/R	R	S/I/R	R
<i>K.pneumoniae</i>	TCC, PTZ	S	I/R	S	S/I/R	R
<i>K.oxytoca</i>	C1G	S	I/R	R	R	R
<i>C.koseri</i>	FOX	S	S	I/R	S	I/R
	C3G	S	S	I/R	I/R	S/I/R
	C4G	S	S	S	I/R	S/I/R
	Carba	S	S	S	S	I/R
		Case AmpC inducible	Pase	Case déprimée	BLSE	Carbapénémase
<b>Groupe 3</b>	AMX	R	R	R	R	R
	TIC	S	R	R	R	R
	PIP	S	I/R	R	R	R
<i>E.cloacae</i>	AMC	R	R	R	S/I/R	R
<i>K.aerogenes</i>	TCC, PTZ	S	I/R	I/R	S/I/R	R
<i>C.freundii</i>	C1G	R	I/R	I/R	R	R
<i>S.marcescens</i>	FOX	I/R	I/R	I/R	I/R	I/R
<i>P.stuartii</i>	C3G	S	S	I/R	I/R	I/R
<i>M.morganii</i>	C4G	S	S	S	I/R	I/R
	Carba	S	S	S	S	I/R
		Sauvage	Résistance modérée	BMR	BHR	
<b>Groupe 4</b>	<i>Y.entérocolitica</i>	Pase+Case : AMX AMC TIC PIP C1G				
<b>Groupe 5</b>	<i>P.vulgaris, P.penneri</i>	Céfuroxime : AMX C1G CXM				
<b>Groupe 6</b>	<i>Kluyvera, Erwinia</i>	BLSE				

AMX : Amoxicilline ; TIC : Ticarcilline ; PIP : Pipéracilline ; AMC : Amoxicilline+acide clavulanique ; TCC : Ticacilline+acide clavulanique ; PTZ : Pipéracilline+tazobactam ; C1G/2G/3G/4G : céphalosporines de 1<sup>ère</sup>/2<sup>ème</sup>/3<sup>ème</sup>/4<sup>ème</sup> génération ; FOX : céfoxitine ; CXM : céfuroxime ; Carba : carbapénèmes ; Pase : Pénicillinase ; Case : Céphalosporinase ; BLSE : β-lactamases à spectre étendu ; TRI : TEM résistant aux inhibiteurs ; BMR : bactérie multi-résistante ; BHR : bactérie hautement résistante

### 2.2.2.3. Supports génétiques

L'apparition rapide de nouvelles bactéries résistantes est étroitement liée aux transferts génétiques entre réplicons et entre bactéries. On parle d'éléments génétiques mobiles (EGM), qui favorisent la mobilité intracellulaire de l'ADN (entre réplicons : du chromosome à un plasmide ou entre les plasmides) ou qui permettent la mobilité intercellulaire de l'ADN.

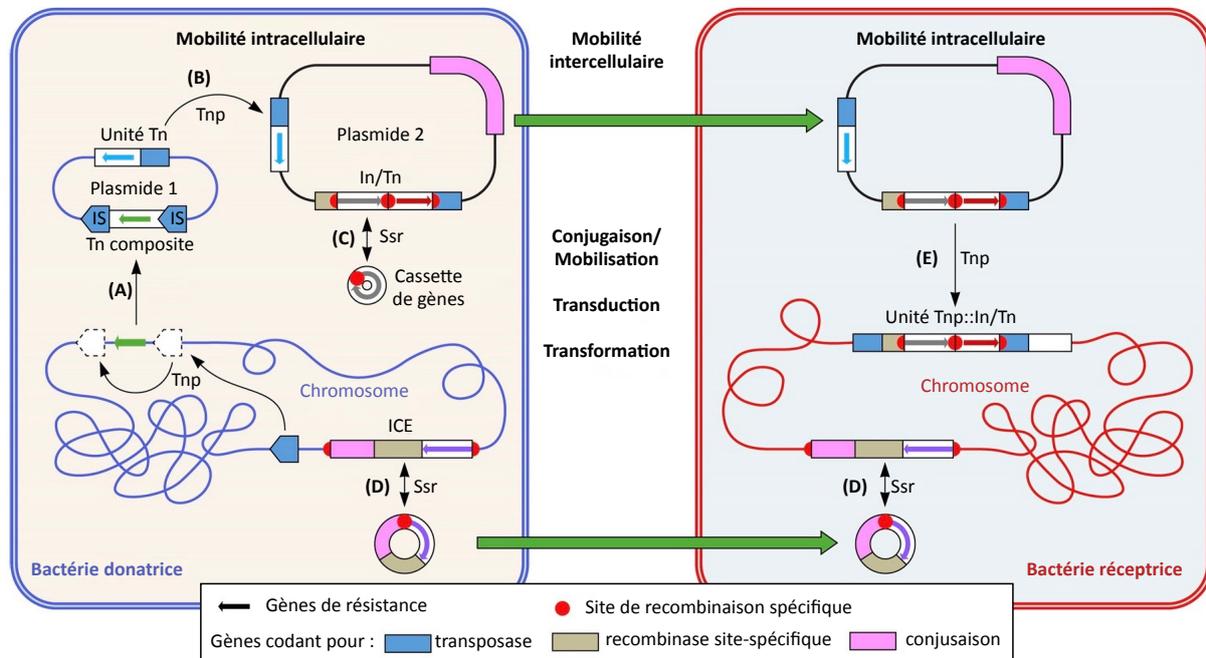
La mobilité intracellulaire fait intervenir divers EGM qui sont capables de se déplacer (incluant les gènes de résistance associés) entre réplicons :

- les séquences d'insertion (IS) sont des petits segments d'ADN codant uniquement pour leur propre transposition via le gène d'une transposase encadrée, le plus souvent, par deux séquences inverses répétées
- les transposons (Tn) : segments de taille plus élevée codant pour leur transposition et d'autres gènes associés. Les Tn composites sont composés de deux IS qui encadrent une séquence, par exemple un gène de résistance. Les Tn unitaires de type Tn3 codent en plus de la transposase, pour une résolvase permettant leur persistance
- les intégrons (In) ne sont pas des EGM, mais constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Les cassettes sont des séquences mobiles capables d'être intégrées ou excisées par un mécanisme de recombinaison site-spécifique (Ssr) médié par une intégrase

Il existe trois grands mécanismes principaux intercellulaires d'échange génétique. Il s'agit de processus unidirectionnels allant d'une bactérie donatrice vers une bactérie réceptrice, on parle de transfert horizontal de gènes :

- la **transformation naturelle**, qui correspond à un transfert d'ADN libéré par la donatrice vers une réceptrice en état de compétence, essentiellement chez les genres *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Helicobacter*
- la **transduction**, par l'intervention de bactériophages (virus des bactéries) incorporant de l'ADN bactérien de la bactérie donatrice lors de leur cycle de multiplication qui sera injecté ensuite dans la bactérie réceptrice
- la **conjugaison**, fréquente chez les entérobactéries, est médiée par des plasmides ou des éléments intégratifs et conjugatifs (ICE) (ou transposons conjugatifs). Les plasmides sont des molécules d'ADN doubles brins circulaires extra-chromosomiques doués de réplication autonome pouvant se transférer de façon autonome (plasmide conjugatif). Les ICE ont la capacité de s'exciser du chromosome de la bactérie donatrice, de se circulariser, et de se transférer vers une bactérie réceptrice par conjugaison avant de s'intégrer dans son chromosome. Il a été récemment découvert que certains ICE excisés étaient capables de se répliquer.

Les éléments génétiques mobiles se combinent. En effet, les intégrons se déplacent intégrés dans les transposons eux-mêmes intégrés dans un plasmide qui peut donc être porteur de nombreux gènes de résistance (et autre gènes, ex : gènes de virulence) menant à des bactéries multi-résistantes et ces résistances sont facilement mobilisables via la conjugaison. Une synthèse des différentes mobilités des EGM est illustrée par la **Figure 11**.



**Figure 11. Éléments génétiques mobiles : mobilités intra- et inter-cellulaires de gènes de résistances aux antibiotiques**

Deux bactéries de souches ou d'espèces différentes sont représentées, l'une agissant comme donatrice (en bleu, avec deux plasmides) et l'autre comme réceptrice (en rouge). Divers éléments génétiques mobiles sont représentés, les fonctions des gènes qu'ils portent sont indiquées par un code couleur, les gènes de résistance sont représentés par de petites flèches de différentes couleurs. Les flèches noires fines indiquent les processus intracellulaires, avec ceux médiés par une transposase (Tnp) et ceux médiés par une recombinase site-spécifique (Ssr). Les flèches vertes épaisses représentent le transfert intercellulaire (horizontal). Des insertions successives de la même séquence d'insertion (IS) des deux côtés d'un gène de résistance peuvent permettre de le capturer et de le déplacer vers une autre molécule d'ADN (par exemple, du chromosome à un plasmide) dans le cadre d'un Tn composite (A). Un Tn unitaire portant un gène de résistance peut se transposer entre les plasmides (B) ou d'un plasmide au chromosome ou vice versa. Une cassette de gènes peut se déplacer entre un intégron (In) (une structure In/Tn de classe 1 est représentée ici) via un intermédiaire circulaire (C). Un élément intégratif et conjugatif (ICE) peut être intégré dans le chromosome ou excisé en tant qu'élément circulaire qui peut ensuite se conjuguer dans une cellule réceptrice et s'intégrer (de manière réversible) dans le chromosome à un site de recombinaison spécifique (D). Un plasmide peut être capable de médier son propre transfert intercellulaire par conjugaison ou, s'il n'a pas de région de conjugaison, être mobilisé par un autre plasmide (ou, alternativement, se déplacer horizontalement par transduction de phage ou transformation). Le Tn et/ou In et les gènes de résistance associés sur un plasmide entrant peuvent se déplacer dans le chromosome ou d'autres plasmides dans la cellule réceptrice (E), comme illustré ici pour la classe 1 In/Tn, qui sont connus pour cibler des Tn unitaires.

Source : d'après (57)

#### 2.2.2.4. Détection des E-BLSE et EPC

La détection des entérobactéries productrices de BLSE (E-BLSE) et de carbapénémases (EPC) est indispensable du fait de leur haute résistance et leur possible dissémination, nécessitant des précautions particulières.

La réalisation d'un antibiogramme en milieu liquide ou solide permet de mettre en évidence les  $\beta$ -lactamines qui sont touchées, notamment la résistance aux C3G qui doit faire suspecter une BLSE et la résistance aux carbapénèmes à une carbapénémase. En milieu solide, la présence d'une BLSE est caractérisée par des images dites en « bouchon de champagne » témoignant d'une synergie entre l'acide clavulanique (AMC) et les C3G (ceftazidime, ceftriaxone, CTX), céfépime et aztréonam. En milieu liquide automatisé, la détermination du profil BLSE est souvent aisée par le système d'interprétation pour les groupes 0, 1 et 2 mais nécessite dans certains cas et pour le groupe 3 des tests complémentaires. Pour cela, un test MAST® utilisant 4 disques imprégnés (cefepodoxime  $\pm$  inhibiteur AmpC  $\pm$  inhibiteur de BLSE) permet de détecter la production de céphalosporinase AmpC et/ou BLSE, intéressant pour différencier une céphalosporinase hyperproduite d'une BLSE. La résistance à un carbapénème doit systématiquement être investiguée. Chez les entérobactéries du groupe 3 l'ertapénème peut être touché par la céphalosporinase hyperproduite ainsi la présence d'une carbapénémase peut être écartée en réalisant une CMI ertapénème par bandelette E-test® sur milieu Mueller Hinton additionné de cloxacilline qui inhibe la céphalosporinase, si la sensibilité est restaurée sur ce milieu, l'hypothèse de la céphalosporinase hyperproduite est confirmée, sinon d'autres tests doivent être effectués.

Pour confirmer la présence d'une carbapénémase, plusieurs tests sont disponibles :

- Tests immunochromatographiques sur bandelettes (Coris BioConcept) détectant les antigènes par des anticorps anti-carbapénémase, permet de détecter simultanément ou non selon les kits : OXA-48, KPC, NDM, VIM, IMP. Facile, rapide (15 min), sur culture
- Test biochimique RAPIDEC® CARBA NP mettant en évidence l'hydrolyse des carbapénèmes par les carbapénémases en utilisant l'imipénème et le rouge de phénol comme indicateur. Facile, rapide (2h), permet de détecter toutes les carbapénémases mais ne permet pas d'en déterminer le type
- Biologie moléculaire : PCR en temps réel (ex : Xpert® Carba-R) détectant en moins d'1h KPC, NDM, VIM, IMP et OXA-48, plus coûteux
- Spectrométrie de masse MALDI-TOF : pas utilisé en routine mais avenir prometteur
- D'autres tests permettent d'orienter sur la classe de carbapénémase : par exemple les bandelettes CMI E-test® Imipénème-Imipénème+EDTA orientant vers une métalloenzyme

Dans le cadre du dépistage des BMR (BLSE) et BHR (EPC), des écouvillons rectaux sont ensemencés sur des milieux chromogéniques sélectifs des BLSE (ex : chromID® BLSE Biomérieux) ou des EPC (ex : chromID® CARBA SMART Biomérieux), toutes entérobactéries cultivant sur ces milieux doit amener à des tests complémentaires vus précédemment : MAST® (pour BLSE) et un des tests pour confirmation d'EPC.

## 2.3. Epidémiologie des entérobactéries résistantes aux $\beta$ -lactamines

### 2.3.1. France

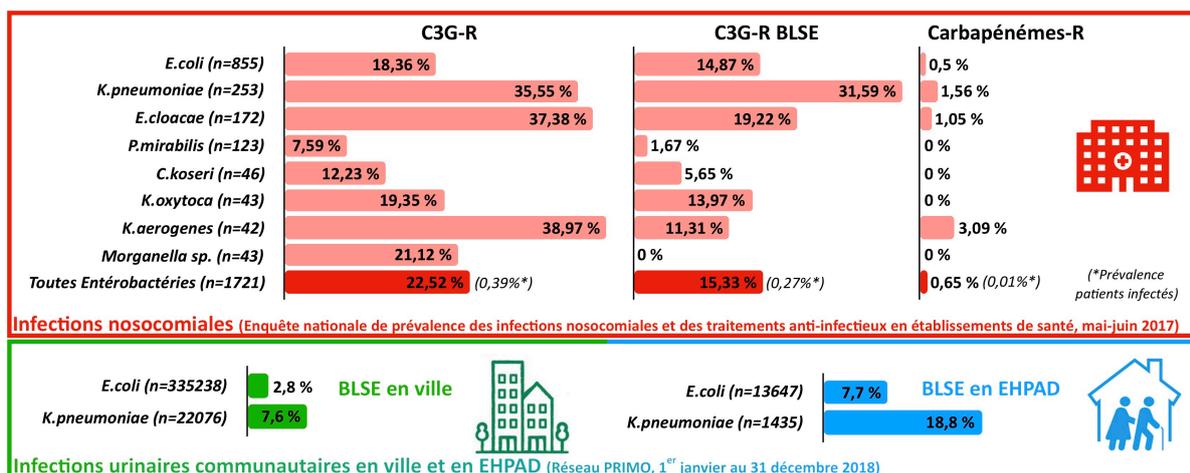
L'augmentation des résistances aux  $\beta$ -lactamines est particulièrement inquiétante chez les entérobactéries, comme *Escherichia coli* qui est la principale bactérie retrouvée en pathologie humaine. La résistance d'*E.coli* aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) a été multipliée par 3 dans la communauté et par 6 en établissement de santé, depuis le début des années 2000 (58–61). La résistance d'*E.coli* aux C3G est majoritairement due à l'acquisition de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Comme vu précédemment, les gènes des BLSE se sont disséminés par l'intermédiaire de plasmides conjugatifs qui ont transféré entre bactéries présentes dans l'environnement, les animaux et chez l'homme. Les gènes des BLSE sont très souvent associés à d'autres gènes de résistance, conduisant à une multirésistance et à des situations d'impasses thérapeutiques.

Selon Santé publique France (62), en 2018, dans les établissements de santé, *E.coli* était de loin la première espèce isolée parmi les entérobactéries productrices de BLSE (51 %), devant *K.pneumoniae* (28 %) et *E.cloacae* (13 %).

La proportion des souches d'entérobactéries résistantes aux C3G (mécanisme BLSE ou non) ou aux carbapénèmes (mécanisme non défini) dans les infections nosocomiales (2017) et infections urinaires communautaires en ville et EHPAD (établissements d'hébergement pour personnes âgées dépendantes) (2018) est indiquée dans la **Figure 12**.

Pour les entérobactéries isolées d'infections nosocomiales, sur l'ensemble des souches testées : 22,52 % sont résistantes aux C3G ce qui correspond à une prévalence des patients infectés par des souches résistantes aux C3G égale à 0,39 % ; 15,33 % sont des souches productrices de BLSE (0,27 %) enfin ; 0,65 % sont résistantes aux carbapénèmes (0,01 %). La proportion pour chaque entérobactérie est indiquée dans la **Figure 12**. Par comparaison avec l'enquête de 2012 : la prévalence des patients infectés par des E-BLSE augmente en 2017 (0,27 %) par rapport à 2012 (0,22 %), les prévalences des patients infectés par des entérobactéries résistantes aux C3G (0,39% en 2017 vs. 0,37 % en 2012) et résistantes aux carbapénèmes (0,01 % en 2017 vs. 0,025 % en 2012) sont restées stables. A noter que la proportion de souches d'*E.coli* résistantes aux C3G n'est pas différente en 2017 (18,36 %) et 2012 (17,64 %), cependant, la proportion de souches d'*E.coli* productrices de BLSE parmi les souches résistantes aux C3G a augmenté en 2017 (81,01%) par rapport à 2012 (62,17 %) alors qu'aucune différence de proportion n'est observée pour *K.pneumoniae* (32).

Concernant les infections urinaires en ville, la proportion de *E.coli* a augmenté entre 2012 (2,3 %) et 2015 (3,7 %) puis a diminué de 2016 à 2018 en passant de 3,4 % à 2,8 %. En EHPAD, la proportion de *E.coli* BLSE est globalement plus élevée qu'en ville : elle a augmenté entre 2012 (6,6 %) et 2015 (9,7 %) puis a diminué entre 2016 (8,3 %) et 2018 (7,7 %) (63).



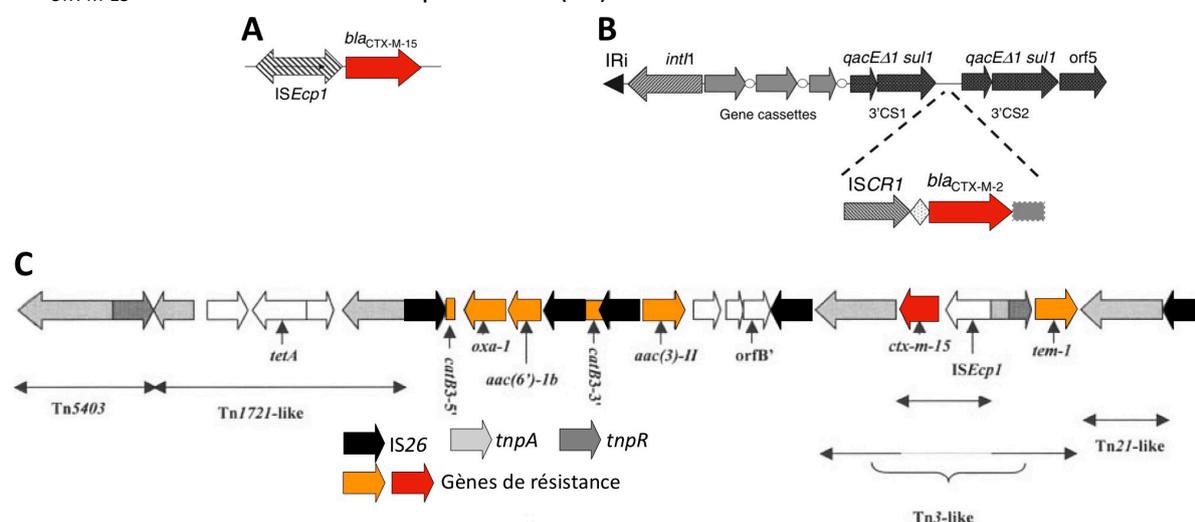
**Figure 12. Résistances aux β-lactamines des souches d'entérobactéries isolées d'infections nosocomiales ou communautaires en France**

Données tirées de (32,63). Les pourcentages correspondent à la proportion de souches résistantes par rapport aux nombres isolés (n=nombre d'isolats). C3G : céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, BLSE : β-lactamases à spectre étendu, R : résistance, EHPAD : établissements d'hébergement pour personnes âgées dépendantes

Avant les années 2000, la majorité des BLSE identifiées dans les isolats cliniques était de type TEM ou SHV, principalement rencontrée chez les bactéries responsables d'infections nosocomiales (64). Depuis le début des années 2000, les BLSE de type CTX-M (CéfoTaXimase-Munich, première description en 1989 à Munich), dont les gènes proviennent de bactéries de l'environnement (genre *Kluyvera* spp.) ont pris de l'importance et sont considérées comme des enzymes pandémiques en milieu hospitalier, mais aussi en milieu communautaire, chez l'animal et dans l'environnement (65,66). Ces enzymes confèrent une efficacité catalytique élevée contre le céfotaxime, mais également contre la ceftriaxone (CRO), une autre C3G (67). Actuellement, plus de 200 variants de CTX-M ont été identifiés et divisés en cinq groupes : groupe 1 (comprenant en autres les enzymes CTX-M-1, 3, 15), groupe 2 (2, 97), groupe 9 (9, 14, 27), groupe 8 et groupe 25. Au sein de chaque groupe, les identités de séquence sont importantes (> 98 %), par exemple, l'alignement des séquences nucléotidiques du gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (GenBank, n° AY044436) et *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (X92509) montre 98,7% d'identité. Une prévalence élevée d'enzyme CTX-M-15 (groupe 1) a été trouvée en France et dans le monde entier (61,65). Selon une publication de 2017 (61) d'une étude menée en 2012, la prévalence annuelle des entérobactéries productrices de BLSE (E-BLSE) atteint jusqu'à 10,5 % dans les hôpitaux en France. Les BLSE majeures chez *E. coli* (l'espèce prédominante, 62 %) sont : CTX-M-15 (37,1 %), CTX-M-1 (24,2 %) et CTX-M-14 (21,8 %). A noter que *K. pneumoniae* (2<sup>ème</sup> espèce, 18,5 %) présente majoritairement des BLSE de type CTX-M-15 (81,1 %).

Durant l'année 2018, le CNR de la résistance aux antibiotiques (Laboratoire de Clermont-Ferrand) (68) a analysé 121 souches productrices de BLSE et 94 souches productrices de céphalosporinases plasmidiques. Elles appartenaient principalement aux espèces *K. pneumoniae* (37,4 %), *E. coli* (21,3 %), *E. cloacae* (21,3 %) et *P. mirabilis* (13,4 %). Les principales enzymes identifiées étaient des BLSE de type CTX-M (71,5 % CTX-M-15, 5,9 % CTX-M-14, 4,2 % CTX-M-1) et des céphalosporinases plasmidiques de type DHA (61,7 %, principalement DHA-1) et CMY (38,3 %, principalement CMY-2).

L'origine des enzymes CTX-M, déterminée par l'analyse génétique et phylogénétique des gènes  $bla_{CTX-M}$  montre leur homologie avec les gènes chromosomiques  $bla_{KLU}$  des *Kluyvera* environnementales. Ainsi chaque groupe de CTX-M dérive d'une espèce de *Kluyvera* : *K.ascorbata* (groupe 2), *K.georgiana* (groupe 9, 8, 25), *K.cryocrescens* (groupe 1). Même si le gène  $bla_{KLU}$  est présent, la plupart (90 %) des *Kluyvera* sont sensibles au céfotaxime, le gène est peu exprimé et nécessite un promoteur fort pour être exprimé et induire une résistance aux C3G. Des analyses expérimentales et de l'environnement génétique ont montré que les gènes chromosomiques  $bla_{KLU}$  ont vraisemblablement été mobilisés sur des plasmides conjugatifs avec la présence d'un promoteur fort par l'*ISEcp1*, donnant les gènes  $bla_{CTX-M}$  (**Figure 13**). Les plasmides conjugatifs sont majoritairement de la famille IncF pour  $bla_{CTX-M-15}$ , IncF et IncK pour  $bla_{CTX-M-14}$ ; des plasmides dit endémiques, responsables de la dissémination mondiale des CTX-M ont été identifiés : pCT et pHK01 (porteurs du gène  $bla_{CTX-M-14}$ ), pC15-1a (**Figure 13**), pEK516, pEC-B24 (porteurs de  $bla_{CTX-M-15}$ ) (60). La séquence d'insertion *ISEcp1* est décrite pour la majorité des gènes CTX-M, cette séquence permet à la fois la mobilisation du gène mais également son expression grâce à son rôle de promoteur fort ; on retrouve aussi l'*IS26* (groupes 1 et 9) et l'*ISCR1* (groupes 2 et 9) (**Figure 13**). D'autres gènes de résistance peuvent être associés, notamment avec la présence d'intégrons de classe I qui possèdent des cassettes MDR (*multi drug resistance*) avec des gènes de résistance aux fluoroquinolones, chloramphénicol, aminosides, triméthoprime. Les principales résistances associées à CTX-M-15 sont : AAC(6')Ib-cr (74,2 % des souches CTX-M-15), AAC(3)-II (63,4 %), QnrB (29%) (61). S'il existe des plasmides endémiques, il existe également des clones bactériens présents au niveau mondial notamment *E.coli* clone ST131, groupe phylogénétique B2, sérotype O25b:H4, sous clone H30-Rx porteur de  $bla_{CTX-M-15}$  et résistant aux fluoroquinolones (69).

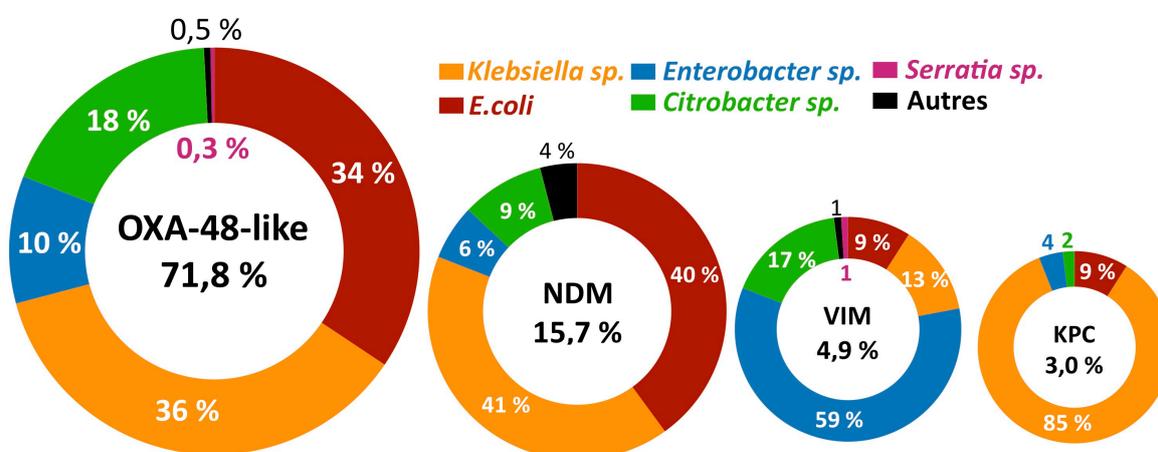


**Figure 13. Exemples d'environnement génétique des gènes  $bla_{CTX-M}$**

A :  $bla_{CTX-M-15}$  en aval de *ISEcp1* ; B :  $bla_{CTX-M-2}$  en aval de *ISCR1* en association avec un intégron de classe I ; C : région MDR du plasmide pC15-1a  
Sources : (70,71)

Les gènes  $bla_{CTX-M}$  sont très largement présents chez les entérobactéries mais on peut également les retrouver chez les bacilles à Gram négatif non fermentants : *Pseudomonas aeruginosa* (CTX-M-1, CTX-M-43 (groupe 2), CTX-M-2), *Stenotrophomonas maltophilia* (CTX-M-1), *Acinetobacter* spp (CTX-M-43) mais aussi chez *Aeromonas* et *Vibrio*.

En 2018, le pourcentage d'Entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) est encore faible par rapport aux E-BLSE, il est inférieur à 0,1 % pour *E.coli* et de 0,5 % pour *K.pneumoniae* (**Figure 16**). En 2018, le CNR de la résistance aux antibiotiques (Laboratoire de Bicêtre) (68) a reçu 2674 souches d'Entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) (1916 des Hôpitaux (71,7 %), 758 de la communauté (28,3 %)) contre 343 en 2012. La majorité des EPC appartenait aux espèces *K. pneumoniae* (33,2 % ; n=887), *E.coli* (31,7 % ; n=847), *C. freundii* (13,9 % ; n=373) et *E. cloacae* (10,2 % ; n=272). Depuis 2012, les carbapénémases les plus identifiées sont de type OXA-48, représentant 71,8 % en 2018 (majoritairement les variants OXA-48 et OXA-181), suivis des NDM (15,7 % (majoritairement NDM-5 puis NDM-1), VIM (4,9 %) et KPC (3,0 %). La répartition des différentes espèces d'entérobactéries par types de carbapénémases est représentée dans la **Figure 14**. La majorité des EPC (66 %) provenaient de prélèvements rectaux de dépistage et sur les 33 % provenant d'infections, 70 % étaient responsables d'infections urinaires.

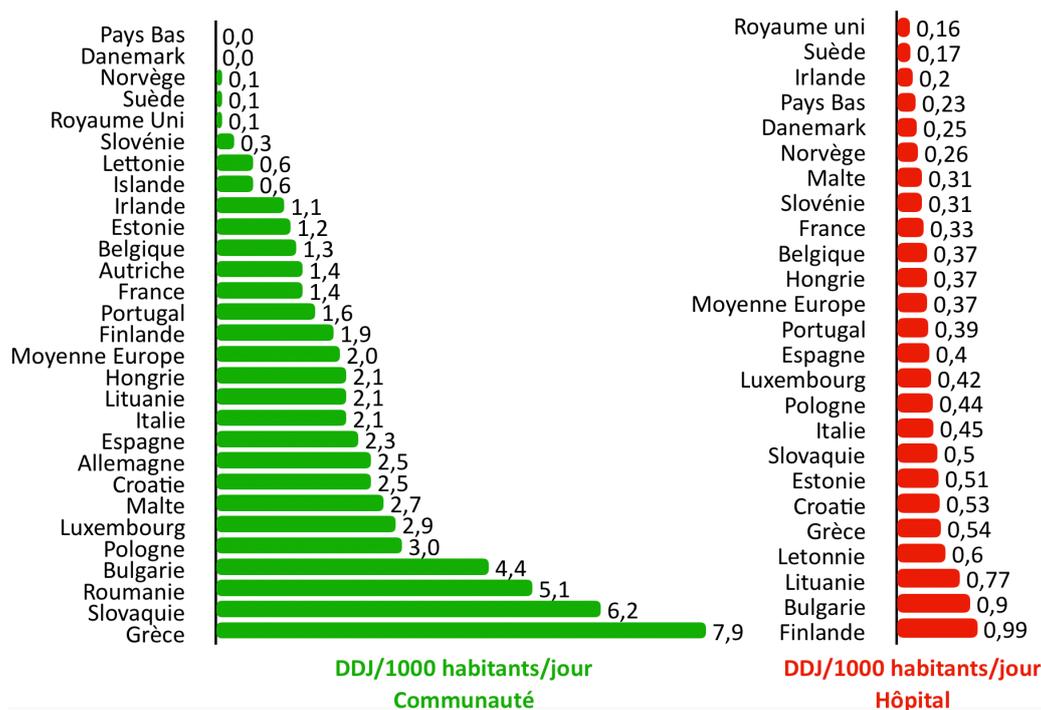


**Figure 14. Distribution des différentes espèces d'entérobactéries selon le type de carbapénémase identifiée**

Source : (68)

### 2.3.2. Europe

La résistance aux antibiotiques est, entre autre, liée à la consommation d'antibiotiques, dans la **Figure 15**, la consommation des  $\beta$ -lactamines (céphalosporines, monobactame, carbapénèmes) est évaluée grâce à la dose définie journalière pour 1000 habitants par jour (DID) dans la communauté et à l'hôpital, on remarque une forte disparité entre les pays européens. Dans la communauté, les pays nordiques font partie des plus faibles consommateurs, la France (1,4 DID) est proche de la moyenne Européenne (2,0 DID) alors que les pays des Balkans (Grèce, Roumanie, Bulgarie, Slovaquie, Croatie) font partie des plus gros consommateurs (> 3 DID). A l'hôpital, on observe globalement la même distribution qu'en ville (72).



**Figure 15. Consommation des  $\beta$ -lactamines (hors pénicillines et pénicillines/IBL) à usage systémique dans la communauté et à l'hôpital, en Europe en 2018.**

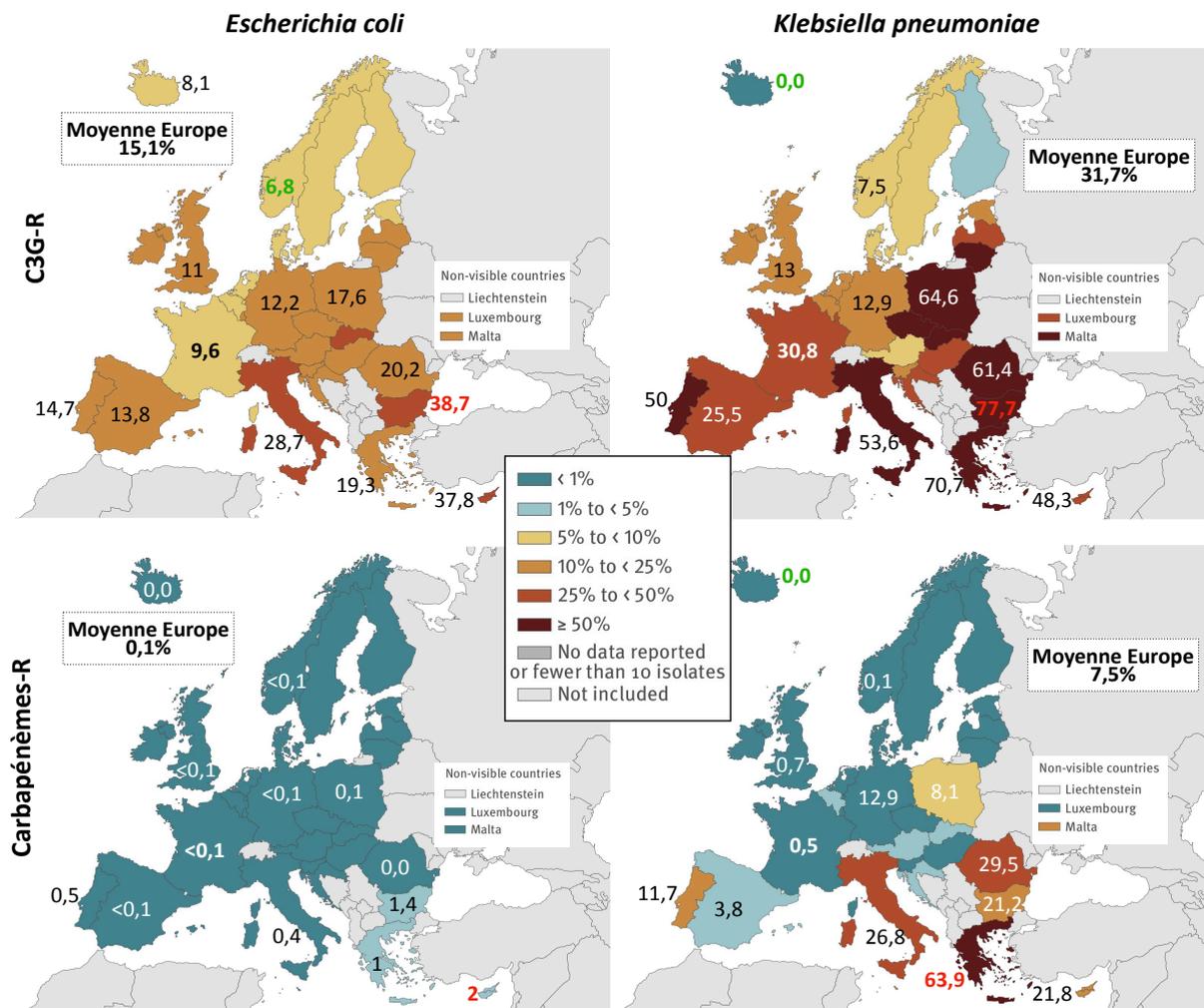
Source : (72). DDJ : Dose définie journalière

La **Figure 16** présente le pourcentage de souches invasives de *E.coli* et *K.pneumoniae* résistantes aux C3G et celles résistantes aux carbapénèmes à travers l'Europe. En 2018, selon l'ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) (73), concernant la résistance aux céphalosporines de 3<sup>èmes</sup> génération, le pourcentage moyen en Europe est de 15,1 % pour *E.coli* (vs 14,6 % en 2015, légère augmentation), allant de 6,8 % (Norvège) à 38,7 % (Bulgarie). Entre 2015 et 2018, on observe une augmentation du pourcentage pour la Finlande (+ 1,5 %), les Pays Bas (+ 1,6 %), Irlande (+ 1,5 %), Allemagne (+ 1,9 %), Espagne (+ 2,2 %), Pologne (+ 5,7 %), Hongrie (+ 5,9 %), Islande (+ 6,4 %) et une diminution pour la France (- 1,4 %), Portugal (- 1,4 %), Italie (- 1,4 %) et la Roumanie (- 6,6 %). Pour *K.pneumoniae*, la moyenne européenne est de 31,7% (vs 31,0 % en 2015, stable), allant de 0 % en Islande à 77,7 % en Bulgarie. Par rapport à 2015, une augmentation est observée pour le Royaume Uni (+ 2,5 %), l'Espagne (+ 5,2 %), Portugal (+ 9,6 %), Malte (+ 37,4 %) et une diminution pour Italie (- 2,3 %), Slovénie (- 7,9 %), Lettonie (- 9,3 %), Roumanie (- 9,3 %), Estonie (- 10,1 %) et Slovaquie (- 11,3 %).

En ce qui concerne la résistance aux carbapénèmes, la moyenne européenne est de 0,1 % pour *E.coli* (Chypre étant le pays avec le plus fort pourcentage à 2 %), est de 7,5 % pour *K.pneumoniae* (vs 6,8 % en 2015) (avec de forts pourcentages pour la Grèce (63,9 %), Roumanie (29,5 %), Italie (26,8 %)). Globalement on observe une stabilité pour *E.coli* et une augmentation pour *K.pneumoniae* par rapport à 2015.

Ainsi si l'on met en corrélation la **Figure 15** avec la **Figure 16**, on remarque que les forts consommateurs de  $\beta$ -lactamines (Grèce, Bulgarie, Roumanie) font partie des pays avec le plus fort pourcentage de résistance. Bien évidemment, la consommation d'antibiotiques n'est pas

l'unique facteur responsable de la résistance aux antibiotiques, les autres facteurs seront abordés dans le **Chapitre 3**.



**Figure 16. *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Pourcentage (%) de souches invasives résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) et aux carbapénèmes par pays. En Europe, 2018.**

En vert : pays avec le pourcentage le plus faible, en rouge : pays avec le pourcentage le plus élevé. Source : Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, 2018, ECDC (73).

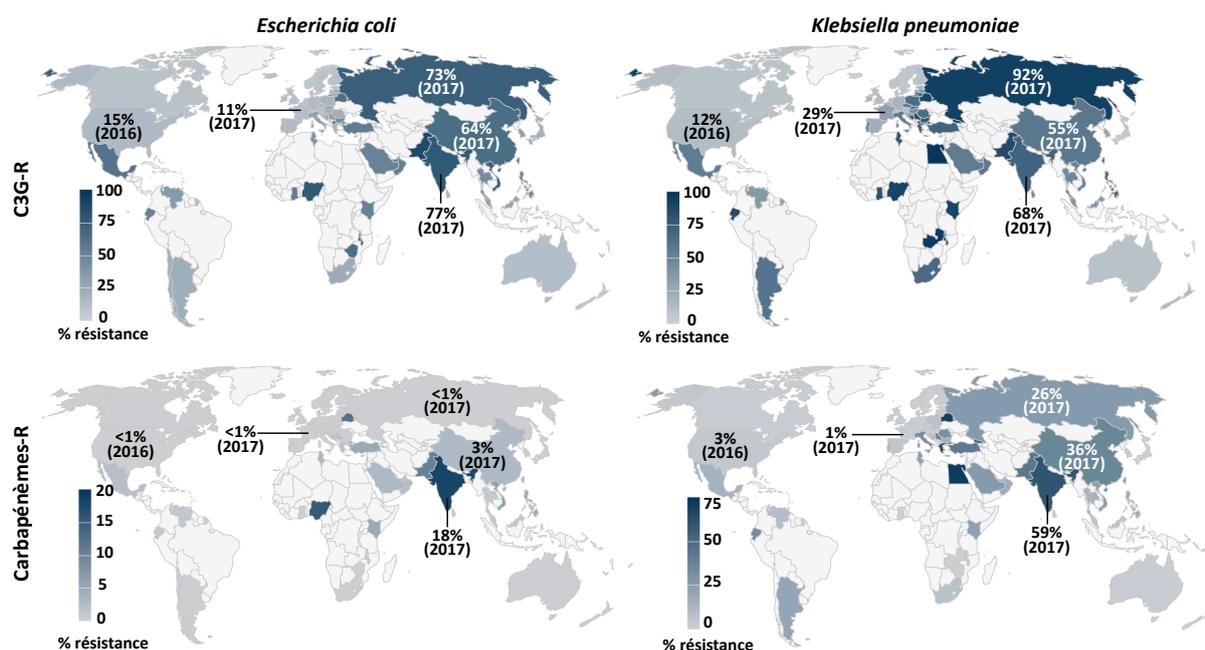
Les BLSE sont principalement de type CTX-M, notamment CTX-M-15 sauf en Espagne où CTX-M-14 est majoritaire (**Figure 18**).

Malgré les faibles pourcentages dans de nombreux pays européens de la résistance aux carbapénèmes chez *K.pneumoniae* et *E.coli* dans les isolats invasifs (hémocultures, liquides céphalorachidiens), des stades épidémiologiques de propagation des EPC (entérobactéries productrices de carbapénémases) en Europe ont été définis, prenant en compte tous les types d'infection ainsi que le portage. Ainsi, on définit 7 stades : 0 : aucun cas signalé, 1 : cas sporadiques, 2a : épidémie hospitalière unique, 2b : éclosions sporadiques d'hôpitaux, 3 : propagation régionale, 4 : propagation interrégionale, 5 : situation endémique. En 2018, 16 (43%) des 37 pays participants ont signalé une propagation régionale ou interrégionale des EPC (dont la France, au stade 4) et 4 pays ont signalé une situation endémique (Grèce, Italie, Malte, Turquie). Par rapport à une évaluation précédente en 2015, 11 pays ont signalé un stade

épidémiologique d'EPC plus élevé, indiquant une propagation croissante entre 2015 et 2018. Le nombre de cas d'infections en Europe en 2015 a été estimé à 15 947 (13 473-18 478) infections à *K.pneumoniae* résistants aux carbapénèmes, et 2 619 (2269 à 2961) infections à *E.coli* résistants aux carbapénèmes (74,75). En 2015, la distribution du type de carbapénémases selon le stade épidémiologique était le suivant : OXA-48 (stade 5 en Turquie, Malte ; stade 4 en France, Belgique, Espagne, Roumanie ; stade 3 en Allemagne, Italie, Irlande, Croatie), NDM (stade 4 en Roumanie, Pologne, Danemark ; stade 3 en France, Grèce, Turquie), KPC (stade 5 en Italie, Grèce ; stade 4 en Roumanie, Royaume uni, Belgique, Slovaquie ; stade 3 en Espagne, Pologne, Irlande) et VIM (stade 5 en Grèce, stade 4 en Italie, Espagne, Slovaquie, stade 3 en Belgique) (75).

### 2.3.3. Monde

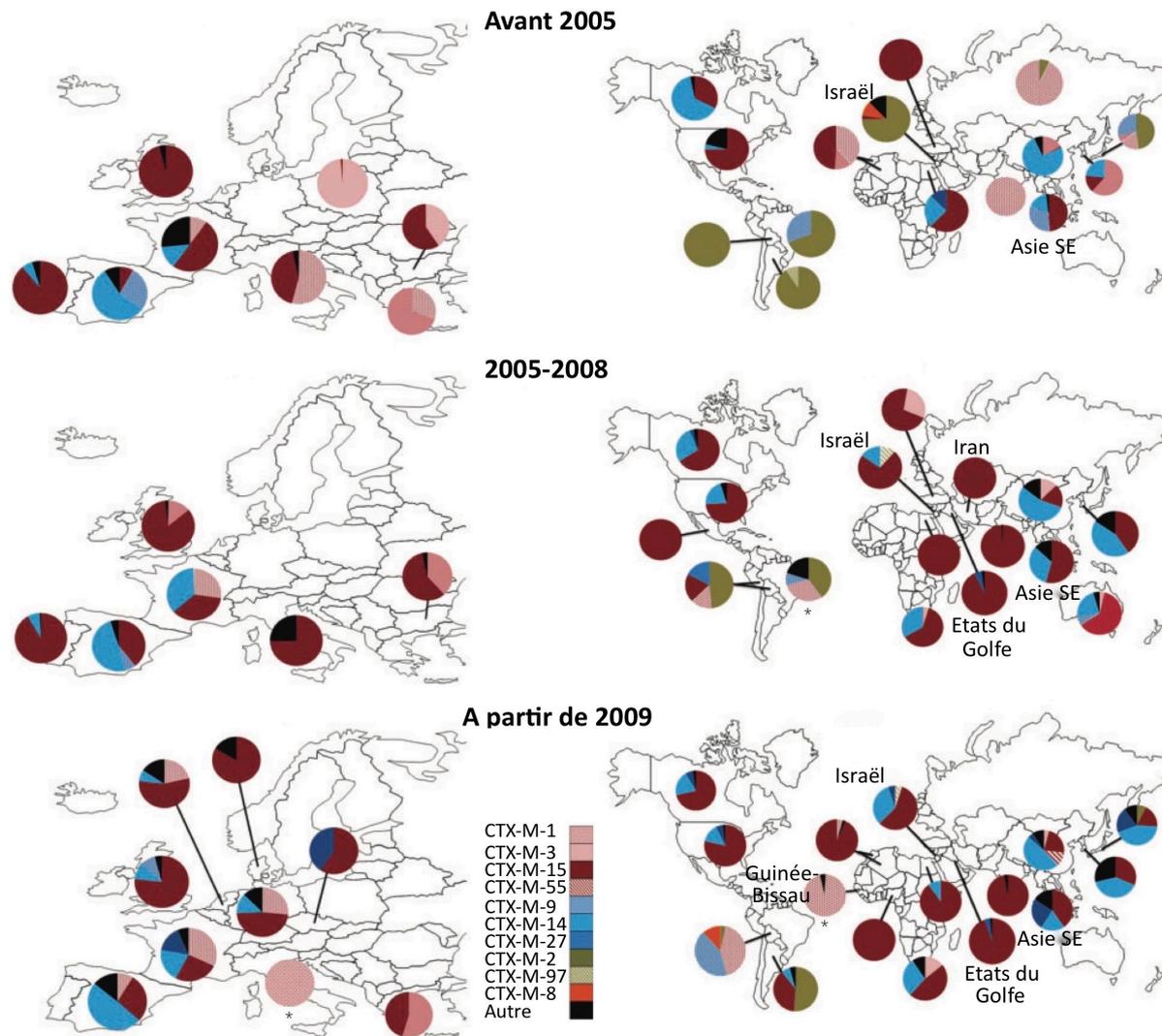
Au niveau mondial, comme au niveau européen, on observe de forts écarts de pourcentage de résistances aux C3G et carbapénèmes selon les pays (**Figure 17**). On remarque ainsi que la Chine et l'Inde sont les pays avec des résistances élevées, plus de 50 % des souches *E.coli* et *K.pneumoniae* C3G-R et plus de 2 % d'*E.coli* et 30 % pour *K.pneumoniae* concernant les carbapénèmes. Néanmoins, ces pourcentages ne rendent pas compte de la proportion de BLSE et carbapénémases et certaines données sont difficiles à interpréter à cause du nombre limité de souches (ex : Russie 52 souches pour *E.coli* vs 6520 souches en Chine).



**Figure 17. *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Pourcentage (%) de souches invasives résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) et aux carbapénèmes par pays. Dans le monde, 2016-2017.**

Exemples de pourcentages pour les Etats-Unis, France, Russie, Chine et Inde. Source : Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (<https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>)

Concernant la répartition des CTX-M dans le monde, il apparaît clairement que CTX-M-15 a augmenté au fil du temps dans la plupart des pays et est dominant dans la plupart des régions (**Figure 18**) à l'exception de la Chine, l'Asie du Sud-Est, la Corée du Sud, le Japon et l'Espagne, où le groupe 9 domine (en particulier CTX-M-14), et l'Amérique du Sud, où CTX-M-2 est toujours présent. On remarque que CTX-M-2 qui était présent en Israël et au Japon a peu à peu, était remplacé par CTX-M-15 et CTX-M-14. Enfin on observe l'apparition de CTX-M-27 (différent de CTX-M-14 d'un acide aminé), en France, Europe, et en Asie, ceci s'explique par le fait que CTX-M-27 induit une résistance à la Ceftriaxone plus haute que CTX-M-14, donc l'utilisation de cet antibiotique permet la sélection de CTX-M-27.



**Figure 18. Distribution des variants CTX-M sur 3 périodes en Europe et dans le reste du monde**  
 Pays indiqués par une étoile \* : seul le groupe de CTX-M est indiqué, pas le génotype. Source : (60)

Pour les EPC, de la même façon qu'en Europe on peut définir des stades épidémiologiques dans le monde (cas sporadiques (stade 1), éclosions (2), endémicité (3)), ainsi par ordre de prévalence : NDM est au stade 3 en Inde, Pakistan et au stade 2 en Chine, Australie, Europe, Etats-Unis, Brésil, Colombie, Arabie Saoudite, Maroc, Nigéria ; KPC est au stade 3 aux Etats-Unis, Colombie, Italie, Grèce et stade 2 en Amérique du Sud, Europe, Chine ; OXA-48 est au stade 3 en Inde, Maroc, Libye, Egypte, Turquie (pourtours méditerranée) et stade 2 en Europe, Irak, Kenya ; enfin VIM est retrouvé au stade 3 en Grèce et IMP au Japon, Taiwan (76–78).

# 3. Antibiorésistance : un enjeu majeur de santé publique

## 3.1. Origine et prise de conscience

La résistance aux antibiotiques (et plus largement aux antimicrobiens) est un processus naturel qui a été observé depuis la découverte des premiers antibiotiques, les bactéries étant capables par divers mécanismes de s'adapter pour survivre. Cependant la surconsommation d'antibiotiques a accéléré ce processus créant une pression de sélection des bactéries les plus résistantes envers lesquelles les thérapeutiques actuelles sont de moins en moins efficaces. Le problème de l'antibiorésistance touche la santé humaine mais aussi la santé animale et l'environnement. La **Figure 19**, adaptée d'une brochure de Santé publique France de 2019, montre comment la surconsommation d'antibiotiques et leurs mauvais usages favorisent l'émergence des bactéries résistantes dans tous les écosystèmes (humains, animaux, sols, eaux...) et compromettent l'efficacité des traitements pour les humains et les animaux.

### SURCONSOMMATION D'ANTIBIOTIQUES FAVORISANT L'ÉMERGENCE DE BACTÉRIES RÉSISTANTES

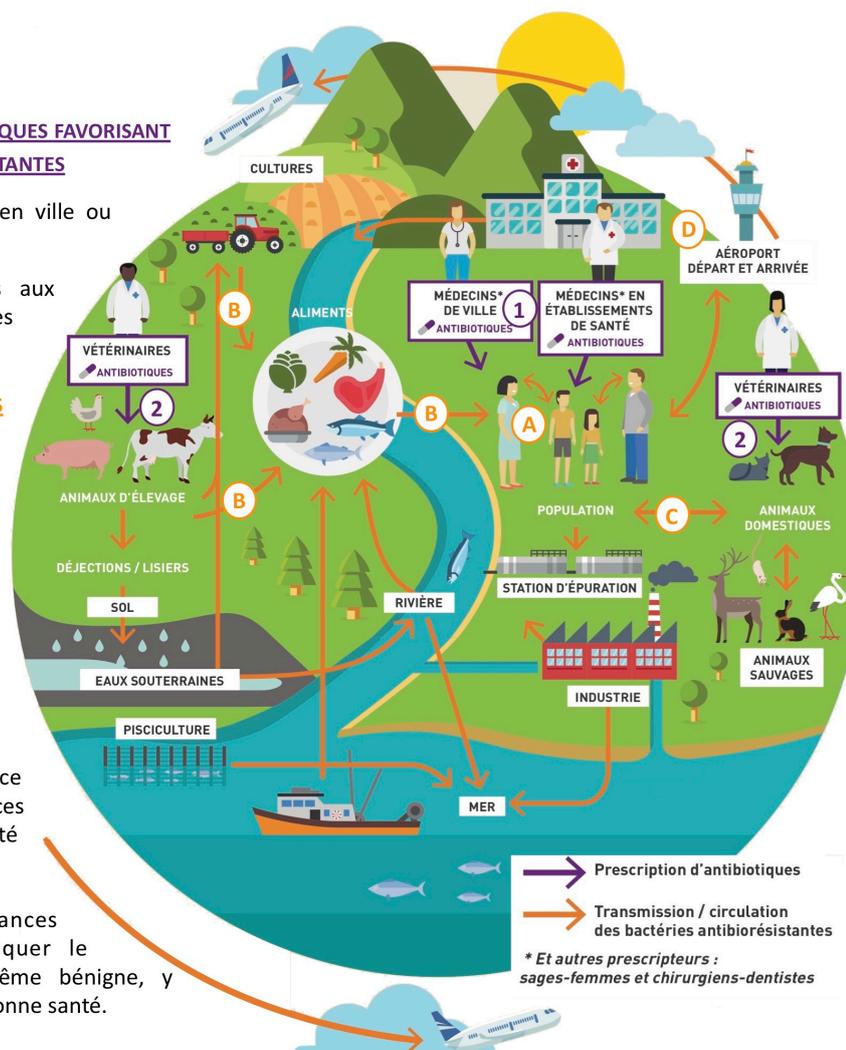
- (1) Prescription d'antibiotiques en ville ou en établissement de santé
- (2) Prescription d'antibiotiques aux animaux d'élevage et domestiques

### DISSÉMINATION DES BACTÉRIES RÉSISTANTES

- (A) Transmission inter-humaine
- (B) Contamination de l'homme par la nourriture ou par l'environnement (eau, sol) ou
- (C) par contact direct avec les animaux
- (D) Retour de zone d'endémie

L'antibiorésistance est une menace mondiale qui a des conséquences sur la santé humaine, la santé animale et l'environnement.

Aujourd'hui, certaines résistances bactériennes peuvent compliquer le traitement d'une infection, même bénigne, y compris chez une personne en bonne santé.



**Figure 19. Causes de l'antibiorésistance**

Source : Antibiorésistance : une menace mondiale, des conséquences individuelles, Santé publique France (79)

Pendant longtemps, les bactéries résistantes étaient principalement associées aux hôpitaux et établissements de soins mais aujourd'hui le milieu communautaire est également touché. Le problème de la résistance aux antibiotiques a toujours été pris au sérieux et diverses mesures ont été prises pour les réduire, mais c'est à partir de 2014, qu'une réelle prise de conscience est apparue. En effet, en 2014, le premier ministre britannique David Cameron commande une revue indépendante sur la résistance antimicrobienne à l'économiste Jim O'Neill qui a pour objectifs d'évaluer, selon une perspective économique, les menaces croissantes engendrées par la résistance aux antimicrobiens et de proposer des solutions en émettant des recommandations. Après plusieurs versions, en Mai 2016, le rapport final est publié « *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final report and recommendations* » (80), il est alarmant : si le nombre de décès dans le monde attribué à la résistance aux antimicrobiens est d'aujourd'hui 700 000/an, il pourrait être selon une estimation de près de 10 millions/an en 2050 si aucune mesure n'est prise, devenant l'une des principales causes de mortalité, et représenterait un coût de 100 000 milliards de dollars ; leur analyse pointe du doigt notamment le manque d'investissement dans la recherche et développement (R&D) des antimicrobiens (représentant moins de 5 % du montant investi dans le domaine de la santé entre 2003 et 2013). Afin d'éviter cette crise mondiale, ils proposent 10 recommandations **Figure 20**.

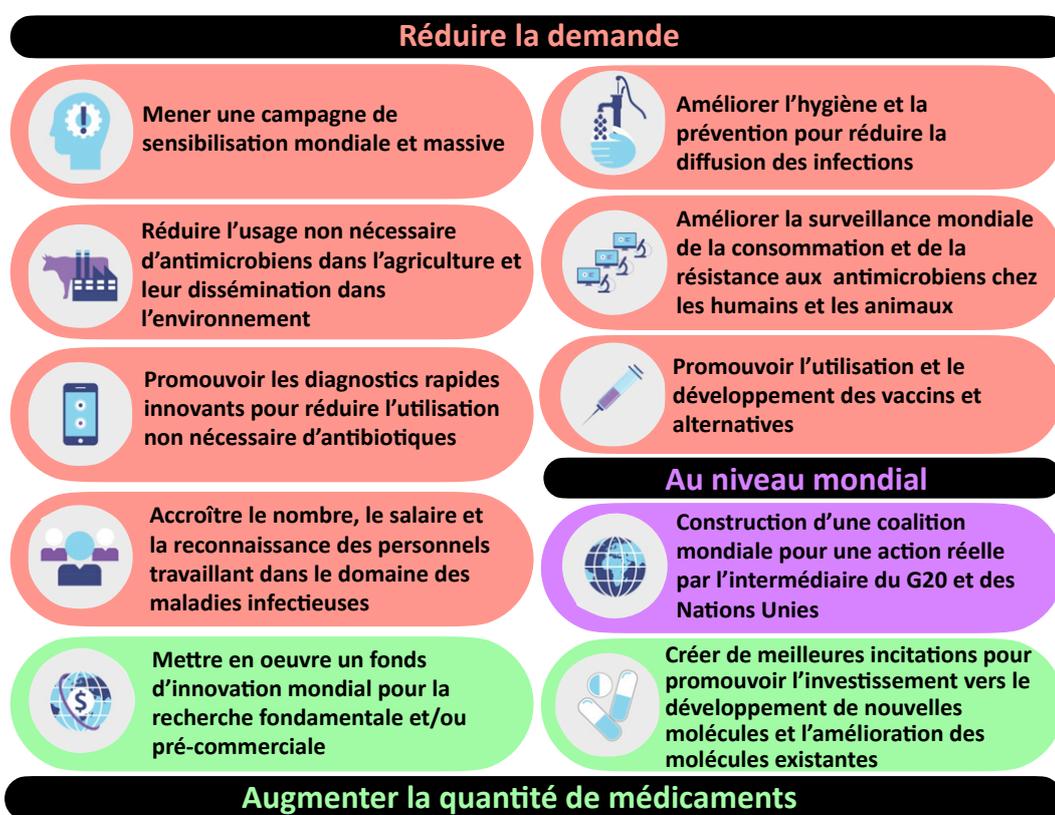
Tout d'abord en préconisant de réduire la consommation des antibiotiques :

- en sensibilisant la population sur le mésusage des antibiotiques via des campagnes de communication (TV, radio, internet, posters)
- en apportant l'eau et des sanitaires aux pays qui en ont besoin (un accès insuffisant à l'eau potable et à l'assainissement sont une des causes de la morbidité des infections diarrhéiques dans les pays en voie de développement) et en instaurant des règles de prévention des infections à l'hôpital
- en réduisant l'utilisation d'antibiotiques chez les animaux, en épargnant des antibiotiques critiques (ex : colistine) et en augmentant la transparence des producteurs sur leurs utilisations ; en régulant l'émission de déchets pharmaceutiques des industries dans l'environnement
- en améliorant la surveillance de la consommation et des résistances aux antibiotiques à l'échelle locale, nationale et mondiale (ex : GLASS *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System*, par l'OMS)
- en encourageant l'utilisation de tests diagnostics rapides, afin de motiver ou non la prescription d'antibiotiques et instaurer le traitement adéquat
- en promouvant l'utilisation et le développement des vaccins (ex : pneumocoque) et autres alternatives (phages, lysines, anticorps, probiotiques, stimulation immunité, peptides) (voir **Chapitre 4**)
- en augmentant les effectifs et valorisant les métiers liés aux maladies infectieuses (devant un salaire moindre que les autres spécialités médicales)

Tout en recommandant d'accroître le nombre d'agents antimicrobiens efficaces contre les infections devenues résistantes aux médicaments actuels :

- en augmentant les fonds d'investissement pour la R&D trop insuffisants jusqu'alors, en utilisant un fonds d'innovation mondial
- en instituant un système de « récompenses d'entrée sur le marché », en facilitant le développement de nouvelles molécules par l'harmonisation mondiale des processus réglementaires et en instituant des réseaux d'essais cliniques nationaux et régionaux dans un but de réduire les coûts et la durée de développement des antibiotiques

L'ensemble de ces actions n'aura aucun effet s'il n'est pas créé, dans le même temps, une coalition mondiale pour la résistance antimicrobienne qui possède une réelle capacité d'action (via le G20 ou l'Organisation des Nations Unies).



**Figure 20. Lutter contre la résistance aux antibiotiques : 10 points d'action**

Source : Tackling drug-resistant infections globally : Final report and recommendations, 2016 (80)

Le coût global de ces actions est évalué à plus de 40 milliards de dollars sur 10 ans : soit 16 milliards (sur 10 ans) pour promouvoir le développement de nouveaux antimicrobiens ; 2 milliards (sur 5 ans) pour le Fonds mondial d'innovation qui soutient la recherche sur les médicaments, les vaccins et les diagnostics ; 1 à 2 milliards (par an) pour le déploiement des tests diagnostics et vaccins nouveaux et actuels ; 40 à 100 millions (par an) pour la campagne mondiale de sensibilisation du public.

En avril 2014, le premier rapport de l’OMS sur la résistance aux antimicrobiens intitulé *Antimicrobial resistance : global report on surveillance* (81) mène aux mêmes conclusions : l’antibiorésistance est une grave menace bien réelle dans chaque région du monde. Ce rapport s’est notamment intéressé à 7 bactéries responsables de maladies graves courantes (diarrhées, pneumonies, infections des voies urinaires, bactériémies et la gonorrhée) : *E.coli* résistant aux C3G et aux fluoroquinolones (FQ), *K.pneumoniae* résistant aux C3G et aux carbapénèmes, *Staphylococcus aureus* méticillino-résistant (SARM), *Streptococcus pneumoniae* de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) ou résistant (PRP), *Salmonella* non typhique résistant aux FQ, *Shigella* spp. résistant aux FQ et enfin *Neisseria gonorrhoea* résistant aux C3G ; mais s’est intéressé aussi à la tuberculose, le paludisme, le VIH et la grippe. Les données provenant de 114 pays (sur 194 membres de l’OMS) arrivent à une constatation importante : il existe des biais car la surveillance de la résistance aux antibiotiques n’est généralement ni coordonnée ni harmonisée, ce qui compromet la capacité d’évaluer et de surveiller la situation. Néanmoins, le rapport montre que la résistance aux antibiotiques a atteint des niveaux alarmants dans de nombreuses régions du monde, ce qui indique que les traitements dans certains contextes deviennent inefficaces ce qui peut être catastrophique étant donné que les antibiotiques sont utilisés aussi bien dans des mesures curatives que préventives (dans le cadre de chirurgie, chimiothérapie). Aussi, le rapport montre que la résistance aux antibiotiques a un impact négatif sur le devenir des patients et les dépenses de santé.

### 3.2. Bactérie multirésistante : quelle définition ?

La définition d’une bactérie multirésistante est restée longtemps non harmonisée entre les études, souvent décrite comme une accumulation de mécanismes de résistances acquises à plusieurs classes d’antibiotiques. En 2011, un groupe d’experts internationaux réunis par l’ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) et le CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, Etats-Unis) a déterminé une terminologie internationale normalisée (82). Selon le profil de sensibilité ou non (déterminée selon les diamètres ou concentrations critiques de l’EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) et FDA (*United States Food and Drug Administration*)), les bactéries sont classées en 3 degrés différents : MDR (multidrug-resistant), XDR (extensively drug-resistant et PDR (pandrug-resistant). Pour cela, ils ont défini pour les principales bactéries (*S.aureus*, *Enterococcus* spp, *Enterobacteriaceae*, *P.aeruginosa* et *Acinetobacter* spp.) des catégories d’antibiotiques et les molécules associées à tester afin de pouvoir les classer. Pour exemple, le **Tableau 6** indique quelles sont les molécules à tester pour pouvoir classer les *Enterobacteriaceae*. Ainsi, une bactérie est catégorisée MDR si elle est résistante ou intermédiaire à au moins 1 molécule dans au moins 3 catégories différentes ; XDR si elle est résistante ou intermédiaire à au moins 1 molécule dans toutes les catégories sauf 1 ou 2 et enfin PDR lorsqu’elle est résistante à toutes les molécules de toutes les catégories (**Figure 21**).

**Tableau 6. Catégories d'antibiotiques et molécules à tester pour définir les MDR, XDR et PDR chez les *Enterobacteriaceae***

Catégories	Molécules	MDR	XDR	PDR
Pénicillines	Ampicilline	X	X	X
Pénicillines + inhibiteurs de $\beta$ -lactamases	Amoxicilline-Acide clavulanique		X	X
	Ampicilline-Sulbactam		X	X
Pénicillines anti- <i>pseudomonas</i> + inhibiteurs de $\beta$ -lactamases	Ticarcilline-Acide clavulanique		X	X
	Pipéracilline-Tazobactam		X	X
C1G, C2G	Céfazoline	X	X	X
	Céfuroxime	X	X	X
C3G, C4G	Céfotaxime ou Ceftriaxone	X	X	X
	Ceftazidime	X	X	X
	Céfépime		X	X
Céphamycines	Céfoxitine		X	X
	Céfotétan		X	X
Céphalosporines anti-SARM	Ceftaroline		X	X
Carbapénèmes	Ertapénème		X	X
	Imipénème		X	X
	Méropénème			X
	Doripénème			X
Aminosides	Gentamicine		X	X
	Tobramycine		X	X
	Amikacine			X
	Netilmicine		X	X
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	X	X	X
Sulfamides	Sulfaméthoxazole-Triméthoprime	X	X	X
Glycylcyclines	Tigécycline		X	X
Monobactames	Aztréonam			X
Phénicolés	Chloramphénicol		X	X
Acides phosphoriques	Fosfomycine		X	X
Polymyxines	Colistine			X
	Tétracycline		X	X
	Doxycycline		X	X
Tétracyclines	Minocycline			X

Source : (82) Profils MDR, XDR, PDR donnés à titre d'exemples

Néanmoins, il s'agit d'une définition uniquement basée sur des critères microbiologiques (profil de l'antibiogramme) ne tenant pas compte des critères épidémiologiques concernant la bactérie. C'est pour cela qu'en France, le HCSP (Haut Conseil de la Santé Publique) prend en compte la capacité de diffusion des bactéries, a défini les BMR (Bactérie MultiRésistante) évoluant sous un mode endémo-épidémique en France (SARM et E-BLSE) et les BHRé (Bactérie Hautement Résistante émergente) comme des bactéries commensales du tube digestif (susceptibles d'être portées longtemps et de diffuser largement tant à l'hôpital qu'en ville), résistantes à de nombreux antibiotiques, avec des mécanismes de résistance transférables entre bactéries et n'ayant, à ce jour, diffusé en France que sur un mode sporadique ou épidémique limité (EPC et ERG) (83)(Figure 21). On peut apparenter les BMR à la définition de MDR et les BHRé de XDR. Ne sont pas considérés comme des BHRé, les bactéries saprophytes telles que *P.aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* quelle que soit leur multirésistance car ils présentent un risque de diffusion limité aux établissements de santé, et *E.faecalis* qui est rarement impliqué dans des épidémies.

On peut citer des exemples (liste non exhaustive) de MDR, XDR voir PDR : *A.baumannii* résistant aux carbapénèmes, *P.aeruginosa* résistant aux carbapénèmes ou multi-résistant, SARM de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA). Récemment, en 2016, pour la première fois une souche de *K.pneumoniae* PDR a été isolée d'une patiente aux Etats-Unis revenant d'Inde, cette souche était résistante à 26 antibiotiques, notamment productrice de 4 β-lactamases : CTX-M-15, SHV-28, CMY-6 et NDM-1 et présentant de nombreux autres gènes de résistance et mutations associées. En l'absence de thérapeutique efficace la patiente décèdera d'un choc septique (84).

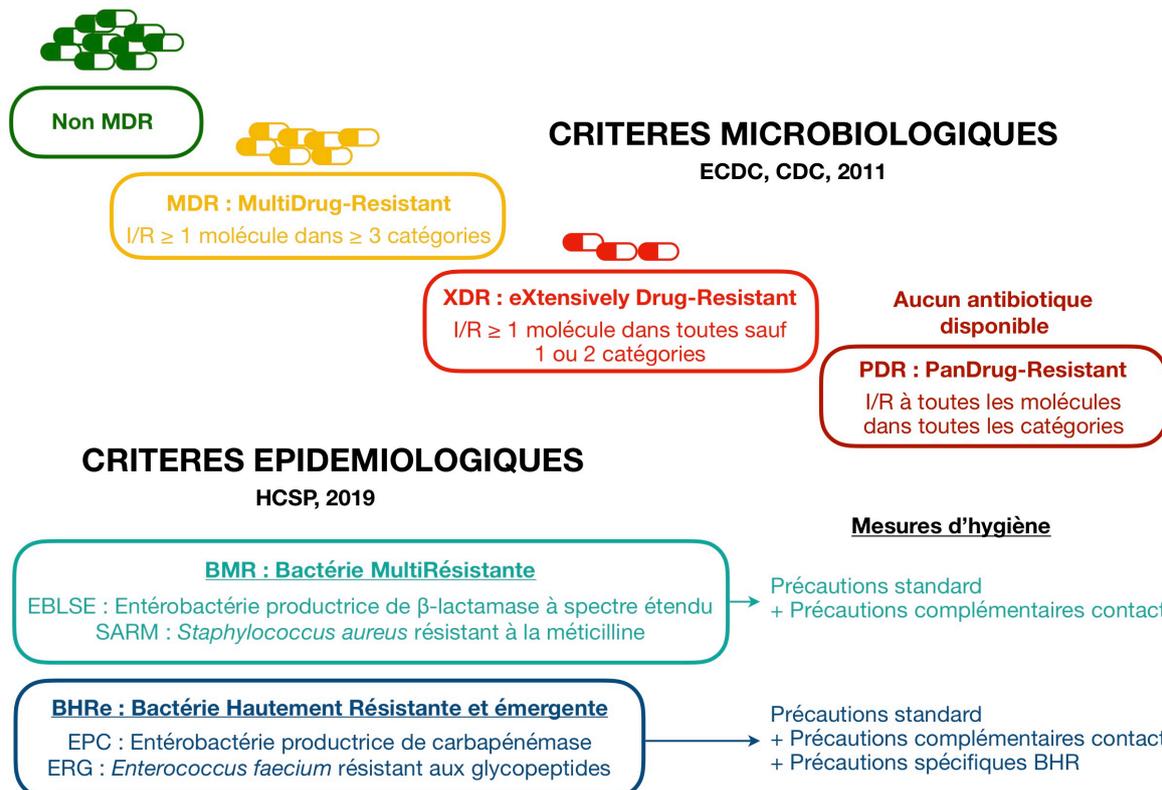


Figure 21. Définitions des bactéries multirésistantes selon les critères microbiologiques internationales et épidémiologiques en France

Sources : (82,83)

### 3.3. La lutte contre l'antibiorésistance

La prise de conscience de l'enjeu de l'antibiorésistance a conduit à l'élaboration de plans d'action pour définir des recommandations et objectifs pour mener à bien cette lutte.

#### 3.3.1. Au niveau mondial

Le dernier rapport rédigé par l'OMS est paru en Mai 2015, lors de la 68<sup>ème</sup> Assemblée mondiale de la Santé, s'intitulant « Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens » (85), il définit 5 objectifs stratégiques décrit dans le **Figure 22**. Ces objectifs se rapprochent des 10 recommandations du rapport de Jim O'Neill (**Figure 20**.) selon l'approche « Un monde, une santé » et il est rappelé que « si nous n'agissons pas immédiatement et de manière coordonnée à l'échelle mondiale, nous nous dirigerons vers une ère post-antibiotiques où des infections courantes pourraient être à nouveau meurtrières ».

Lors de la 72<sup>ème</sup> Assemblée mondiale de la Santé se tenant fin Mai 2019 (86), l'état d'avancement de la mise en œuvre du plan d'action mondial était à l'ordre du jour. Pour exemples, pour répondre à :

- l'objectif 1, une semaine mondiale pour un bon usage des antibiotiques a été instaurée depuis 2015 tous les mois de novembre ;
- l'objectif 2, le système GLASS (*Global antimicrobial resistance surveillance system*) lancé en octobre 2015 propose une approche normalisée de l'analyse et du partage par les pays des données sur la résistance aux antimicrobiens, 73 pays étant inscrits en 2019 ;
- l'objectif 3, l'OMS a préconisé de nouvelles recommandations concernant des programmes efficaces de lutte contre les infections et des campagnes telles que « Sauvez des vies : pratiquez l'hygiène des mains » ;
- l'objectif 4, l'OMS dans sa *Liste modèle des médicaments essentiels (2017)* et mis à jour en 2019 (87) a adopté une nouvelle classification des antibiotiques destinée à promouvoir un usage optimal des antibiotiques et à réduire la résistance, laquelle se subdivise en trois groupes :
  - les antibiotiques **accessibles** : ils devraient être disponibles à tout moment, abordables et d'une qualité garantie. Ils représentent les antibiotiques de première et de deuxième intention pour le traitement empirique des infections et syndromes bactériens les plus courants et/ou graves (amikacine, amoxicilline, amoxicilline + acide clavulanique, ampicilline, benzathine benzylpénicilline, benzylpénicilline, céfalexine, céfazoline, chloramphénicol, clindamycine, cloxacilline, doxycycline, gentamicine, métronidazole, nitrofurantoïne, sulfaméthoxazole + triméthoprimé)
  - les antibiotiques à **surveiller** : recommandés uniquement pour des indications spécifiques et limitées (azithromycine, céfixime, céfotaxime, ceftriaxone, céfuroxime, ciprofloxacine, clarithromycine, pipéracilline + tazobactam, vancomycine, ceftazidime, méropénème)
  - les antibiotiques de **réserve** : pour les situations où tous les autres antibiotiques ont échoué ou lorsqu'une réponse est nécessaire à un problème d'ordre microbiologique (ceftazidime + avibactam, colistine, fosfomycine, linézolide, méropénème + vaborbactam, plazomicine)
- l'objectif 5, l'OMS a publié en 2017 une liste mondiale d'agents pathogènes prioritaires résistants aux antibiotiques les plus menaçants pour la santé humaine (88), permettant d'orienter la recherche de nouveaux antibiotiques, en les classant en priorité critique, élevée et moyenne (**Figure 22**).

 **Organisation mondiale de la Santé**

**Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens Mai 2015**

**Objectif 1** : Mieux faire connaître et comprendre le problème de la résistance aux antimicrobiens grâce à une communication, une éducation et une formation efficaces

**Objectif 2** : Renforcer les connaissances et les bases factuelles par la surveillance et la recherche

**Objectif 3** : Réduire l'incidence des infections par des mesures efficaces d'assainissement, d'hygiène et de prévention des infections

**Objectif 4** : Optimiser l'usage des médicaments antimicrobiens en santé humaine et animale

**Objectif 5** : Dégager les arguments économiques en faveur d'investissements durables qui tiennent compte des besoins de tous les pays et accroître les investissements dans la mise au point de nouveaux médicaments, outils diagnostiques, vaccins et autres interventions

**Liste des agents pathogènes prioritaires pour la recherche-développement de nouveaux antibiotiques Septembre 2017**

**Priorité 1 : CRITIQUE**

*Acinetobacter baumannii*, résistant aux carbapénèmes  
*Pseudomonas aeruginosa*, résistant aux carbapénèmes  
*Enterobacteriaceae*, résistant aux carbapénèmes, résistant aux C3G

**Priorité 2 : ÉLEVÉE**

*Enterococcus faecium*, résistant à la vancomycine  
*Staphylococcus aureus*, résistant à la méthicilline, résistant ou Intermédiaire à la vancomycine  
*Helicobacter pylori*, résistant à la clarithromycine  
*Campylobacter spp.*, résistant aux fluoroquinolones  
*Salmonella spp.*, résistant aux fluoroquinolones  
*Neisseria gonorrhoeae*, résistant aux C3G, résistant aux fluoroquinolones

**Priorité 3 : MOYENNE**

*Streptococcus pneumoniae*, sensibilité diminuée à la pénicilline  
*Haemophilus influenzae*, résistant à l'ampicilline  
*Shigella spp.*, résistant aux fluoroquinolones

 **Commission Européenne**

**Plan d'action européen fondé sur le principe «Une seule santé» pour combattre la résistance aux antimicrobiens Juin 2017**

**1. Faire de l'Union une « région de pratiques d'excellence »**

- Améliorer les bases factuelles et faire mieux prendre conscience des problèmes liés à la résistance aux antimicrobiens
- Améliorer la coordination et l'application des règles de l'Union visant à combattre la résistance aux antimicrobiens
- Mieux prévenir et surveiller la résistance aux antimicrobiens
- Mieux cerner le rôle de l'environnement
- Renforcer le partenariat de lutte contre la résistance aux antimicrobiens et assurer une meilleure disponibilité des antimicrobiens

**2. Encourager la recherche, le développement et l'innovation en matière de résistance aux antimicrobiens**

- Améliorer les connaissances sur le dépistage et sur les mesures efficaces de surveillance et de lutte contre les infections
- Mettre au point de nouveaux traitements et solutions de remplacement
- Mettre au point de nouveaux vaccins préventifs
- Créer de nouveaux outils diagnostiques
- Élaborer des modèles économiques et des mesures d'incitation inédits
- Comblent les lacunes dans les connaissances concernant la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement et la manière de prévenir la transmission

**3. Donner corps aux objectifs mondiaux**

- Renforcer la présence de l'Union à l'échelle mondiale
- Renforcer les partenariats bilatéraux pour intensifier la coopération
- Coopérer avec les pays en développement
- Définir des objectifs mondiaux pour la recherche

 **Comité interministériel pour la santé**

**Maîtriser la résistance bactérienne aux antibiotiques Novembre 2016**

**Sensibilisation et communication auprès du grand public et des professionnels de santé**

**Mesure 1** : Lancer le premier programme national intersectoriel de sensibilisation à la prévention de l'antibiorésistance  
**Mesure 2** : Améliorer l'accès à l'information et l'engagement citoyen en faveur de la maîtrise de l'antibiorésistance

**Formation des professionnels de santé et bon usage des antibiotiques**

**Mesure 3** : Apporter une aide à la juste prescription des médicaments par les professionnels de santé humaine et animale  
**Mesure 4** : Inciter les professionnels de santé à la juste prescription en renforçant son encadrement  
**Mesure 5** : Encourager un bon usage des antibiotiques  
**Mesure 6** : Améliorer l'adoption par les professionnels et le public des mesures de prévention efficaces en santé humaine et animale

**Recherche et innovation en matière de maîtrise de l'antibiorésistance**

**Mesure 7** : Structurer et coordonner les efforts de recherche, de développement et d'innovation sur l'antibiorésistance et ses conséquences  
**Mesure 8** : Faire converger le soutien à la recherche et l'innovation en renforçant le partenariat public-privé  
**Mesure 9** : Valoriser et préserver les produits contribuant à la maîtrise de l'antibiorésistance

**Mesurer et surveiller l'antibiorésistance**

**Mesure 10** : Améliorer la lisibilité de la politique nationale de surveillance de l'antibiorésistance et des consommations antibiotiques et de ses résultats  
**Mesure 11** : Développer de nouveaux indicateurs et outils de surveillance par une meilleure exploitation des bases de données

**Gouvernance et politique intersectorielles de maîtrise de l'antibiorésistance**

**Mesure 12** : Renforcer la coordination interministérielle de la maîtrise de l'antibiorésistance  
**Mesure 13** : Coordonner les actions nationales avec les programmes européens et internationaux afin de conforter le rôle moteur de la France dans la maîtrise de l'antibiorésistance

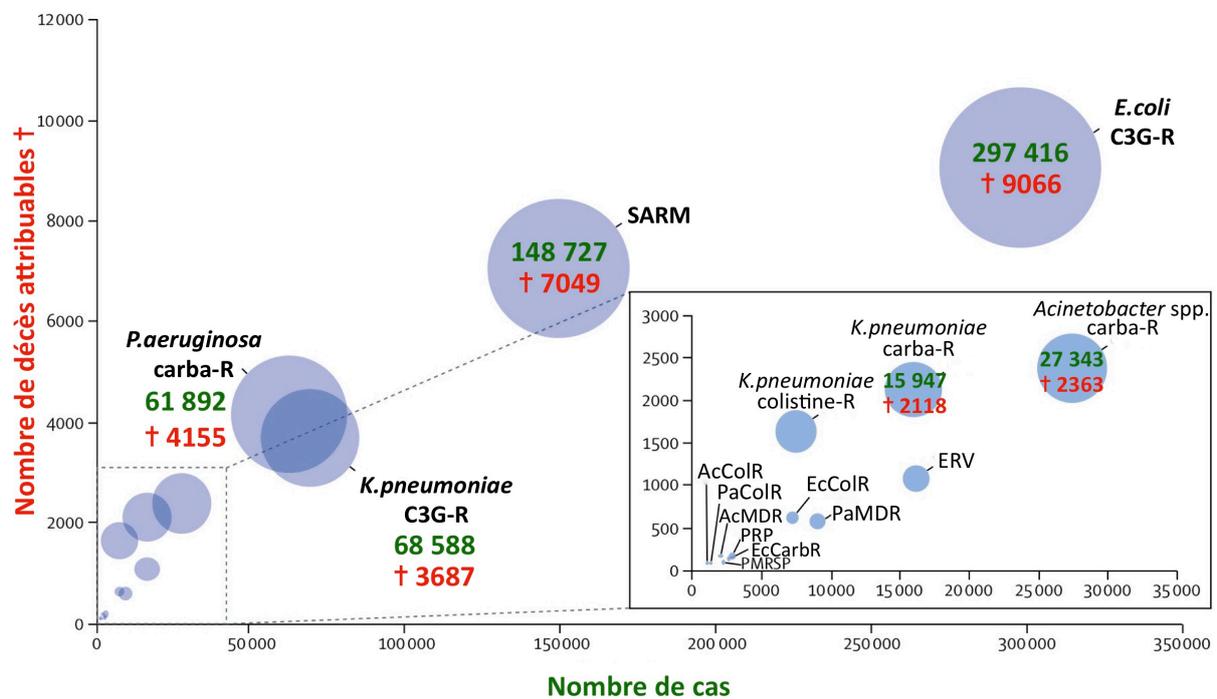
**Figure 22. Plans mondial, européen et français pour lutter contre l'antibiorésistance**

Source : (85,88–90)

### 3.3.2. Au niveau Européen

La résistance aux antibiotiques est la cause de près de 33000 décès par an concernant les infections invasives (dont 9000 dus à *E.coli* C3G-R et 3600 à *K.pneumoniae* C3G-R, soit 38 %) dans l'Union Européenne en 2015 (91) (**Figure 23**). La morbidité et les effets économiques sont estimés à un coût global d'environ 1,5 milliard d'euros par an en Europe.

À la demande des États membres, les conclusions du Conseil du 17 juin 2016 préconisent l'élaboration d'un nouveau plan d'action global de l'Union sur la résistance aux antimicrobiens s'appuyant sur le principe «Une seule santé» et qui soit en adéquation avec les objectifs du plan d'action mondial de l'OMS. C'est ainsi qu'en juin 2017, la commission européenne publie son plan d'action pour combattre la résistance aux antimicrobiens (89) qui s'articule sur 3 grands axes (**Figure 22**).



**Figure 23. Nombre de cas d'infections à bactéries résistantes aux antibiotiques et nombre de décès qui leur sont attribuables, Europe, 2015**

Source : (91), C3G : céphalosporines de 3<sup>èmes</sup> génération, Carba : carbapénèmes, R : résistant SARM : *Staphylococcus aureus* méticillino-résistant, AcCoIR : *Acinetobacter* spp résistant a la colistine, ERV : *Enterococcus* résistant à la vancomycine, PaCoIR : *P.aeruginosa* résistant à la colistine, EcCoIR : *E.coli* résistant à la colistine, PaMDR : *P.aeruginosa* multi-résistant, AcMDR : *Acinetobacter* spp multi-résistant, PRP : *S.pneumoniae* résistant à la pénicilline, EcArbR : *E.coli* résistant aux carbapénèmes, PMRSP : *S.pneumoniae* résistant à la pénicilline et aux macrolides

### 3.3.3. En France

Une première estimation de la morbidité et mortalité des infections à bactéries multirésistantes (BMR) en France est parue en 2015 évaluant les données de 2012 grâce à l'étude Burden BMR (92), prenant en compte : *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM), *Enterococcus faecium* et *E. faecalis* résistants aux glycopeptides, *Escherichia coli* résistants aux C3G, *Klebsiella pneumoniae* résistants aux C3G, *Pseudomonas aeruginosa* résistants aux carbapénèmes, *Klebsiella pneumoniae* résistants aux carbapénèmes, *Acinetobacter* spp. résistants à l'imipénème, impliqués dans les infections invasives (bactériémies, méningites), urinaires, de la peau et des tissus, du site opératoire, respiratoires, osseuses et digestives. Le nombre d'infections à ces BMR est estimé à 158 000 par an (dont 16 000 infections invasives) principalement à SARM (33 %) et *E.coli* (32 %) et *K.pneumoniae* C3G-R (10 %). Le nombre de décès annuel attribué aux infections a été estimé à 12 500 (dont 2700 liés à des infections invasives), majoritairement dû à *P.aeruginosa* carbapénèmes-R (53 %), SARM (18 %) et *E.coli* C3G-R (16 %).

Une étude européenne plus récente de 2019 (91) se basant sur les données de 2015 prenant en compte plus de bactéries (SARM, *E.coli* C3G-R, carba-R, colistine-R ; *K.pneumoniae* C3G-R, carba-R, colistine-R ; *P.aeruginosa* carba-R, MDR (multidrug-resistant), colistine-R ; *Acinetobacter* spp. carba-R, MDR, colistine-R ; *E.faecalis* et *E.faecium* vancomycine-R ; *S.pneumoniae* pénicilline-R et pénicilline-R + macrolides-R) responsables d'infections variées (invasives, respiratoires, urinaires, du site opératoire, et autres : digestives, peau et tissu, ORL, osseuses, cardiovasculaires, génitales...) estime à près 125 000 cas d'infections et 5500 décès par an en France.

Pour faire face à cette réalité, la France a mis en place dès les années 2000 des plans d'action :

- Premier plan (2001-2005) : « Maitriser et rationaliser la prescription d'antibiotiques » avec notamment le slogan « Les antibiotiques, c'est pas automatique », avec comme objectif de maîtriser et de rationaliser la prescription des antibiotiques
- Deuxième plan (2007-2010) : « Plan pour préserver l'efficacité des antibiotiques » avec le slogan « Les antibiotiques, utilisés à tort, ils seront moins forts », permettant de poursuivre les actions déjà engagées au cours de la première phase
- Troisième plan (2011-2016) : « Plan national d'alerte sur les antibiotiques » avec une stratégie de juste utilisation des antibiotiques qui s'articule autour de 3 axes : améliorer l'efficacité de la prise en charge des patients, préserver l'efficacité des antibiotiques et promouvoir la recherche
- Dernièrement, en Novembre 2016, une feuille de route interministérielle de maîtrise de l'antibiorésistance (**Figure 22**) (90), construite autour de 5 grands axes, 13 mesures et 40 actions a été mise en place selon 3 plans d'actions dans chaque secteur : de la santé humaine avec le programme national d'actions de prévention des infections associées aux soins (PROPIAS) (2017), de la médecine vétérinaire avec le plan « Ecoantibio 2 » (2017-2021) et enfin de l'environnement avec le « plan national santé environnement » (2015-2019). Afin de sensibiliser au concept « une seule santé, une seule planète », une

nouvelle identité visuelle est créé « Les antibiotiques, ils sont précieux, utilisons les mieux ».

Ces plans ont permis, par exemple :

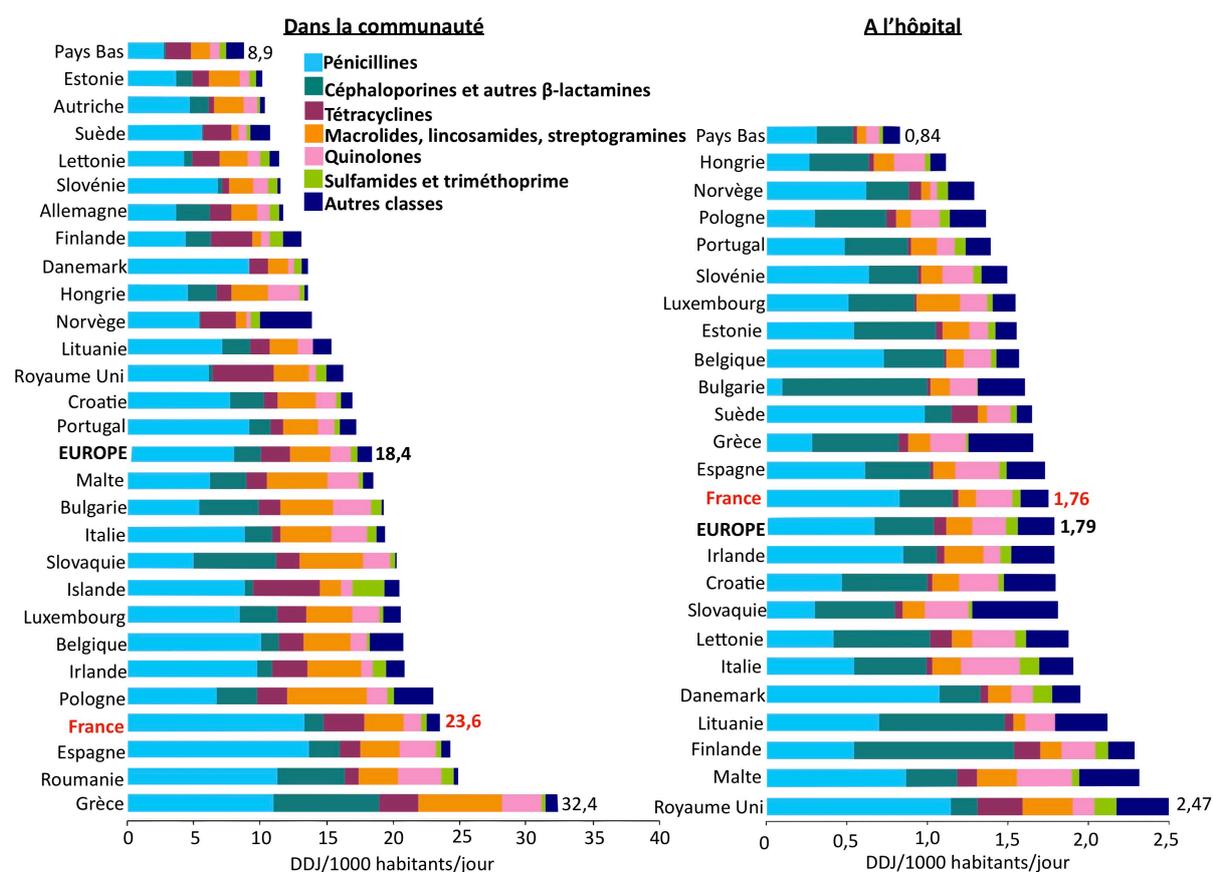
- la mise en œuvre de campagnes, d'outils éducatifs (e-Bug), et de pages d'informations sur internet pour le grand public et les professionnels ;
- une nette amélioration de la surveillance de l'antibiorésistance ces 10 dernières années grâce à des réseaux de surveillance ;
- le lancement de Géodes par Santé publique France, un observatoire cartographique dynamique permettant d'accéder aux principaux indicateurs de santé notamment les données de consommation des antibiotiques en santé humaine et des résistances ;
- l'instauration de la «Rémunération sur objectifs de santé publique» (ROSP) par l'assurance maladie qui accorde une rémunération supplémentaire aux médecins généralistes et pédiatres lors de prescriptions raisonnées ;
- une gratuité des Tests Rapides d'Orientation Diagnostique (TROD) pour les angines pour les médecins généralistes, pédiatres et ORL (et bientôt pour les pharmaciens) ;
- des programmes de financement de la recherche au niveau international par l'intermédiaire du JPI-AMR (*Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance*) et d'un plan franco-allemand, et au niveau national via le programme prioritaire de recherche coordonné par l'Institut national de la santé et de la recherche médicale
- des recommandations en terme de prévention notamment sur la transmission croisée des BHRé qui seront abordées dans le **Chapitre 3.4**

Pour évaluer l'impact de ces différents plans d'actions, Santé publique France publie en Novembre 2019 un rapport sur la consommation d'antibiotiques en secteur de ville en France de 2009 à 2018 (43). La consommation d'antibiotiques exprimée en DDJ (Doses définies journalières) est restée stable (22,5 DDJ pour 1 000 habitants et par jour en 2018), et le nombre de prescriptions a par contre diminué (-15%) (2,38 prescriptions pour 1 000 habitants et par jour en 2018) ; cette baisse concerne essentiellement les enfants (< 14 ans). La différence entre les deux indicateurs s'explique par une moindre prescription des céphalosporines au profit des pénicillines à large spectre (amoxicilline). La DDJ est un indicateur écologique reflétant la pression des antibiotiques comme facteur de sélection des bactéries multi résistantes alors que les prescriptions reflètent le comportement des prescripteurs.

En 2018, il a été vendu en France 728 tonnes d'antibiotiques destinés à la santé humaine et 471 tonnes d'antibiotiques destinés à la santé animale. En santé animale, 95 % des antibiotiques sont administrés à des animaux destinés à la consommation humaine et 5 % à des animaux de compagnie. En santé humaine, 93 % des antibiotiques sont dispensés en médecine de ville et 7 % en établissements de santé ; parmi ceux dispensés en ville, 13 % relèvent d'une prescription hospitalière. Les molécules les plus utilisées sont l'amoxicilline en ville, l'association amoxicilline-acide clavulanique dans les établissements de santé et les tétracyclines en santé animale (93).

Concernant le secteur vétérinaire, l'Anses (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) a montré dans un rapport de 2018 que l'exposition globale des animaux (toutes espèces confondues) aux antibiotiques a diminué de 38% depuis 2011, qu'une baisse de 48 % a été enregistrée concernant la vente d'antibiotiques vétérinaires depuis 2011, et qu'enfin le recours aux antibiotiques critiques est en baisse par rapport à 2013 (- 86 % pour les fluoroquinolones et - 94 % pour les C3G) (94).

Ces observations sont plutôt positives, néanmoins, en 2018, la France reste l'un des pays les plus consommateurs d'antibiotiques dans la communauté, avec une consommation 30 % supérieure à la moyenne européenne et presque 3 fois supérieure à celle des Pays Bas (**Figure 24**) montrant que les efforts doivent encore être poursuivis.



**Figure 24. Consommation des antibiotiques à usage systémique dans la communauté et à l'hôpital, en Europe en 2018.**

Source : (72). DDJ : Dose définie journalière.

### 3.4. Prévention des BMR et BHRé

Dans le but de maintenir la propagation des BMR et BHRé, en France, des guides de recommandations ont été écrits : « Recommandation d'isolement septique en établissement de santé » en 1998 (95), « Prévention de la transmission croisée : précautions complémentaires contact » en Avril 2009 par la Société française d'hygiène hospitalière (96) ; « Prévention de la transmission croisée des BHRé » en Juillet 2013 par le Haut conseil santé publique (97) et actualisé en Décembre 2019 (83).

Les principales lignes sont les suivantes (**Figure 21**) :

- pour la prise en charge de tout patient, des précautions standard (PS) doivent être prises, elles sont la base indispensable des mesures de prévention de la transmission croisée des micro-organismes. Il s'agit de l'hygiène des mains par friction hydro-alcoolique ; d'un port de gants, d'une protection vestimentaire (tablier plastique, surblouse) ou encore de lunettes et masques lors d'exposition aux liquides biologiques ; la gestion des excréta et de l'entretien de l'environnement ; avec une évaluation régulière des pratiques de soins
- des précautions complémentaires « contact » (PCC) sont mises en place pour les patients porteurs de BMR (E-BLSE, SARM) en plus des PS : une chambre individuelle ; une identification sur la porte de la chambre et dans le dossier médical du patient ; le port d'un tablier ; des soins personnalisés, et du petit matériel dédié à la chambre. Ces précautions peuvent être mises en place aussi pour les Entérobactéries résistantes à la colistine, les Entérobactéries hyperproductrices de céphalosporinase en néonatalogie, *A.baumannii* résistant à l'imipénème, *E.faecalis* résistant aux glycopeptides, *P.aeruginosa* résistant à l'imipénème associé à une résistance à la ticarcilline ou à la ceftazidime
- des précautions spécifiques pour les BHRe (EPC, ERG) reposant sur l'identification des patients à risque et leur dépistage à la recherche du portage digestif de BHRe (pour rechercher des cas secondaires, différents niveaux de risques sont définis : risque faible, moyen et élevé) ; l'application des PCC avec un très haut niveau de respect et une organisation spécifique des soins (équipes dédiées, et marche en avant dans le service)

Il n'est pas possible de dépister tous les patients, c'est pour cela qu'une politique de dépistage est à respecter selon le type de service clinique et situation épidémiologique : limiter le dépistage de SARM et E-BLSE à l'admission en réanimation aux seuls patients à risque ou systématiquement en situation épidémique et un suivi hebdomadaire est recommandé ; dans les services de médecine-chirurgie-obstétrique, et en soins de suite et de réadaptation, le dépistage est recommandé seulement en situation épidémique ; en soins de longue durée, le dépistage n'est pas recommandé. Enfin, il n'est pas préconisé de dépister lors de la sortie du service (96). Le dépistage de SARM se fait grâce à un écouvillon nasal et un écouvillon rectal pour les E-BLSE. Les facteurs de risque d'infection à E-BLSE sont des antécédents de traitement par  $\beta$ -lactamines ou fluoroquinolones, d'hospitalisation, contexte nosocomial, âge élevé, sexe féminin, existence de co-morbidités, diabète, infections urinaires récidivantes, sondage urinaire, chirurgie gynécologique (98).

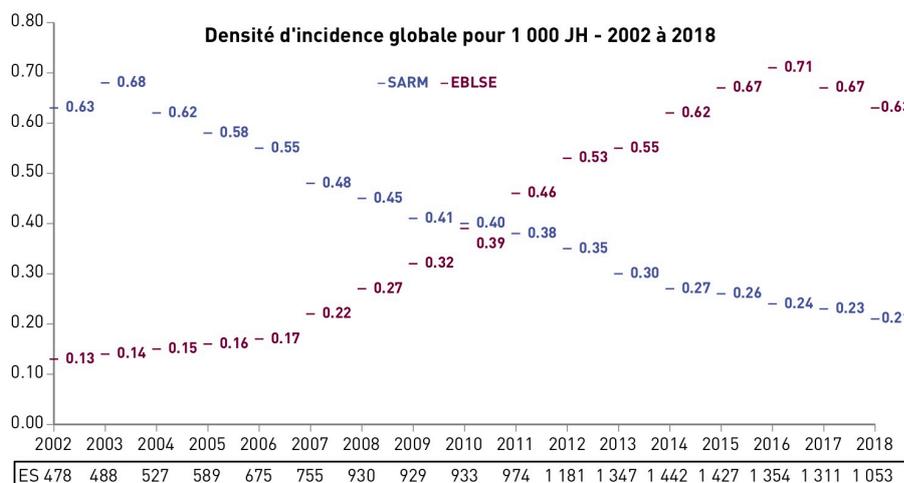
Le dépistage des BHRe est recommandé à l'admission de tout patient ayant été hospitalisé à l'étranger pendant au moins 24 heures dans les 12 derniers mois ; tout patient contact à risque élevé réhospitalisé ou transféré d'un établissement de santé français ; tout patient réhospitalisé aux antécédents de portage de BHRe ; il est possible de dépister des patients dans d'autres situations à évaluer sur des critères d'analyse de risque (pays, prises d'antibiotiques, provenance d'un établissement dans lequel l'épidémie est active...). Le dépistage est réalisé grâce à un écouvillonnage rectal pour les EPC et ERG. L'analyse au laboratoire des E-BLSE et EPC a été

évoqué dans le **Chapitre 2.2.2.4**, notamment l'utilisation de milieux chromogènes sélectifs, des tests moléculaires ou des tests immunochromatographiques. Concernant les SARM et les ERG il existe aussi des géloses sélectives et pour les ERG des tests moléculaires (recherche de *vanA*, *vanB*), la PCR pouvant être réalisée directement à partir d'un écouvillon pour le dépistage.

Par ailleurs, il est recommandé d'analyser le risque pour un patient contact de devenir porteur de BHRé en fonction du niveau de prise en charge initiale du patient porteur de BHRé. Le risque pour un contact de devenir porteur est considéré comme : faible (si le porteur a été pris en charge en PCC dès son admission), moyen (si le porteur a été pris en charge en PS à son admission mais qu'il n'y a pas d'épidémie confirmée), élevé (si au moins un patient porteur (cas secondaire) a été identifié parmi les patients contact (situation épidémique)) **Annexe 1**.

Dans l'actualisation des recommandations (83), l'aspect du bon usage des antibiotiques chez les patients porteurs de BHRé et leurs contacts est rajouté, en recommandant que toute antibiothérapie soit discutée en prenant en compte la probabilité que le germe responsable de l'infection soit une BHRé, la sévérité du tableau clinique et la nécessité de donner ou non une antibiothérapie probabiliste.

La mise en place de ces préventions des transmissions croisées a permis de diminuer le nombre de BMR, en effet les données de 2018 de la surveillance des BMR dans les établissements de santé (62) confirment la baisse de l'incidence des infections à SARM engagée depuis 2004, et la tendance à la réduction de l'incidence des EBLSE observée depuis 2017 (**Figure 25**). On remarque que les mesures prises n'ont pas eu le même impact sur les SARM et les E-BLSE, ceci peut s'expliquer par le fait que les SARM ont été une priorité de santé public avant les E-BLSE (apparition en 1960 vs 1980), que la taille de l'inoculum et les sites de portage sont différents ( $10^8$  SARM, rhinopharynx par sujet colonisé,  $> 10^{10}$  *E.coli* BLSE tube digestif) et que les risques de dissémination sont donc différents de par ces sites de portages mais aussi par le type de transmission : de souche pour les SARM, et de gène de résistance pour les BLSE entre les entérobactéries (98).



**Figure 25. Densité d'incidence globale des SARM et des EBLSE pour 1000 JH. En France, données 2002 à 2018**

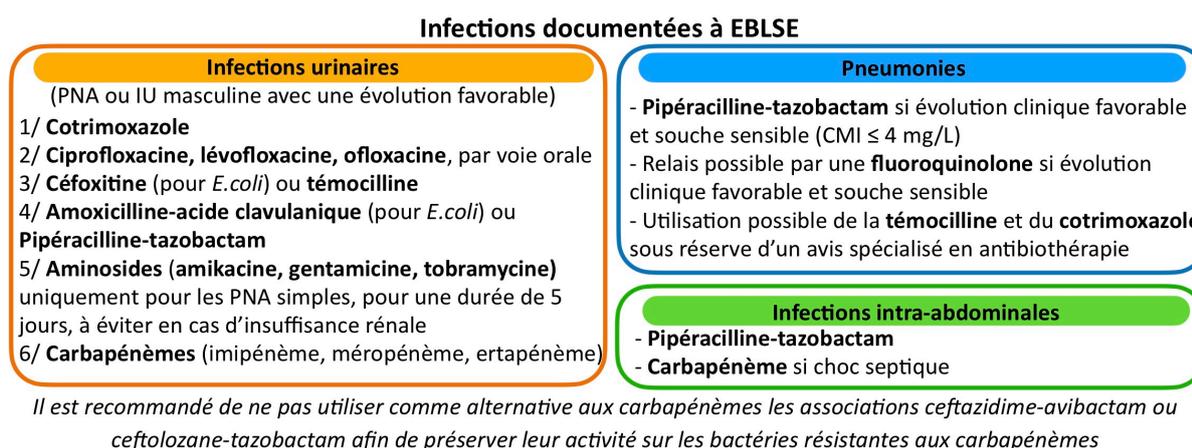
Source : BMR-Raisin 2018, analyse Spares (62)

La prévention est donc indispensable dans la lutte contre l'antibiorésistance, sans l'application des précautions d'hygiène, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques n'aurait que peu d'intérêt.

## 4. Stratégies thérapeutiques contre la résistance aux antibiotiques

### 4.1. Antibiotiques actuels

En Mai 2019, la Haute Autorité de Santé (HAS) publie des recommandations concernant l'antibiothérapie des infections à entérobactéries résistantes aux C3G, la place des carbapénèmes et de leurs alternatives. Ce rapport rappelle les différents antibiotiques actifs sur les souches de *E.coli* productrices de BLSE qui sont : la fosfomycine-trométamol (> 98 %), la nitrofurantoïne (> 90 %), le pivmécillinam (70-90 %), les aminosides (amikacine 90 %, gentamicine 65-70 %), la céfoxitine (90 %), la témocilline (dérivée de la ticarcilline résistante aux  $\beta$ -lactamases)(60-90 %) et la pipéracilline-tazobactam (> 80 %). Aussi, les E-BLSE restent très sensibles aux carbapénèmes (> 99 % chez *E.coli*) ; cependant, afin de préserver au maximum cette classe de dernier recours, il est nécessaire de privilégier les alternatives chaque fois que possible (99). Outre les recommandations d'antibiothérapies probabilistes, celles d'infections documentées à E-BLSE sont définies et répertoriées dans la **Figure 26**.



**Figure 26. Antibiothérapies d'infections documentées à entérobactérie productrice de BLSE**

PNA : pyélonéphrite aigüe ; IU : infection urinaire ; Source : (99)

Hormis les associations des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases classiques (amoxicilline-acide clavulanique, pipéracilline-tazobactam), les nouvelles associations ceftolozane (dérivé de la ceftazidime)-tazobactam et ceftazidime-avibactam sont actives sur les BLSE, néanmoins il est préconisé de les préserver dans le traitement des EPC.

En effet, l'association ceftazidime-avibactam inhibe les enzymes de classe A (BLSE : CTX-M, TEM, SHV, carbapénémase : KPC), classe C (AmpC) et classe D (carbapénémase OXA-48) mais est inefficace contre les classe D (carbapénémase NDM, VIM). L'efficacité de ceftolozane-tazobactam reste limitée contre les carbapénémases. Il n'existe pas de recommandation pour le traitement des EPC, seuls les résultats d'études peuvent orienter sur la prise en charge. Il est possible d'utiliser selon la sensibilité, principalement en association : Ceftazidime-avibactam, méropénème (forte dose), aztreonam, colistine, tigécycline, aminosides, fosfomycine (100).

Les EPC de classe NDM restent difficile à traiter de part l'inefficacité du Ceftazidime-avibactam néanmoins des études ont montré l'efficacité de l'association Aztréonam-tazobactam (101) qui n'est pas encore commercialisée mais qui pour l'instant peut être remplacée par l'association ceftazidime-avibactam-aztréonam (102).

Brièvement, pour les SARM le traitement repose sur les glycopeptides (vancomycine, teicoplanine, dalbavancine), des céphalosporines anti-SARM (ceftaroline, ceftobiprole) ou encore rifampicine, acide fusidique, linézolide, tédizolide, daptomycine (103) et pour les ERG la daptomycine, le linézolide, tigécycline peuvent être utilisés.

Actuellement, nous disposons toujours de traitements contre les BMR et les BHRé néanmoins des résistances sont observées également pour les molécules alternatives (exemple : gène *mrc-1* pour la colistine, résistance au ceftazidime/avibactam (104)) menant à des impasses thérapeutiques, c'est pourquoi la recherche de nouveaux antibiotiques ou autres alternatives est indispensable.

## 4.2. Nouveaux antibiotiques

L'OMS publie en 2019 la liste des antibiotiques en cours de développement clinique (105), 8 antibiotiques dirigés contre les pathogènes prioritaires définis par l'OMS (**Figure 22**) ont reçu l'autorisation de mise sur le marché depuis 2017 (**Tableau 7**), 50 antibiotiques sont en cours de développement (phase clinique 1, 2 ou 3) dont 32 dirigés contre les pathogènes prioritaires, 12 contre la tuberculose et 6 contre *Clostridioïdes difficile* (anciennement *Clostridium difficile*).

Parmi les antibiotiques mis récemment sur le marché, seule l'association Méropénème-vaborbactam est arrivée en France début 2020 (106). La vaborbactam est un nouvel inhibiteur de  $\beta$ -lactamases, non  $\beta$ -lactamine (acide boronique cyclique) qui inhibe les enzymes de classe A et C. La seconde association imipénème-relebactam n'est pour l'instant disponible qu'aux Etats-Unis, le relebactam fait partie de la famille des diazobicyclooctanes (DBO) (comme l'avibactam) inhibant les classes A et C mais inactif sur les classes D (contrairement à l'avibactam) et B. Comme expliqué dans le **Chapitre 2.3.1**, les résistances aux aminosides sont fréquemment associées aux BLSE (et EPC), c'est pourquoi la plazomicine, nouvel aminoside, a un intérêt car il résiste à plus de 99 % des enzymes modificatrices (aac, ant...) et est actif vis à vis des BLSE et carbapénémases (avec une moins bonne activité contre les MBL) (107). L'éravacycline plus stable que la tigécycline peut être une alternative à cette dernière.

En ce qui concerne les SARM, 3 molécules sont disponibles aux Etats-Unis : délafloxacine, omadacycline et léfamuline.

Pour les antibiotiques en cours de développement, seuls les  $\beta$ -lactamines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases seront abordés (**Tableau 8**) représentant 13 molécules sur les 32 dirigées contre les pathogènes prioritaires ; les autres antibiotiques sont en **Annexe 2**.

**Tableau 7. Antibiotiques ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché entre Juillet 2017 et Septembre 2019**

Nom	Approuvé par, le	Classe antibiotique		Spectre d'activité contre les pathogènes prioritaires
		Voie d'administration	Indications	
<b>Delafloxacin</b>	FDA (06/2017, 10/2019)	Fluoroquinolone (IV, oral)	Infections peau et tissus mous Pneumonie aiguë communautaire	SARM
<b>Méropénème + vaborbactam</b>	FDA (08/2017) EMA (11/2018) France (02/2020)	Carbapénème + IβL (IV)	Infections urinaires compliquées	Enterobactéries carba-R : classe A (KPC) et C (non actif sur classes B et D)
<b>Plazomicine</b>	FDA (08/2018)	Aminoside (IV)	Infections urinaires compliquées	Enterobactéries carba-R
<b>Eravacycline</b>	FDA (08/2018) EMA (09/2018)	Tétracycline (IV)	Infections intra-abdominales compliquées	Enterobactéries carba-R <i>A.baumannii</i> carba-R : ?
<b>Omadacycline</b>	FDA (10/2018)	Tétracycline (IV, oral)	Infections peau et tissus mous Pneumonie aiguë communautaire	SARM
<b>Imipénème/cilastatine + relebactam</b>	FDA (07/2019)	Carbapénème/inhibiteur de dégradation + IβL (IV)	Infections urinaires compliquées Infections intra-abdominales compliquées	Enterobactéries carba-R : classe A (KPC) et C (non actif sur classe B et D) <i>P.aeruginosa</i> carba-R : ?
<b>Lefamuline</b>	FDA (08/2019)	Pleuromutiline (IV, oral)	Pneumonie aiguë communautaire	SARM
<b>Pretomanide</b>	FDA (08/2019)	Nitroimidazole (oral)	Tuberculose XDR	Tuberculose (en association avec bédaquiline et linézolide)

FDA : *Food and Drug Administration* (Etats-Unis) ; EMA : *European Medicines Agency* (Europe) ; IβL : inhibiteur de β-lactamases ; ? : activité possible ; Source : (105)

**Tableau 8. β-lactamines et inhibiteurs de β-lactamases en cours de développement**

Nom	Phase	Classe antibiotique (Voie d'administration)	Entérobactéries carba-R					
			A BLSE	A KPC	D OXA	B MBL	AbCR	PaCR
<b>Cefiderocol</b>	NDA, MAA	Céphalosporine sidérophore (IV)	x	x	x	x	x	x
<b>Sulfopénème, Sulfopénème etzadroxil/probénécide</b>	3	Carbapénème (IV, oral)	x	-	-	-	-	-
<b>Durlobactam + sulbactam</b>	3	IβL (IV)	-	-	-	-	x	-
<b>Céfépime + taniborbactam</b>	3	Céphalosporine + IβL (IV)	x	x	x	x	-	?
<b>Céfépime + enmetazobactam</b>	3	Céphalosporine + IβL (IV)	x	?	-	-	-	-
<b>BOS-228 (LYS-228)</b>	2	Monobactam (IV)	x	x	x	x	-	-
<b>Bénapénème</b>	2	Carbapénème (IV)	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>Céfépime + zidébactam</b>	1	Céphalosporine + IβL (IV)	x	x	x	?	-	?
<b>Méropénème + nacubactam</b>	1	Méropénème + IβL (IV)	x	x	x	?	-	-
<b>Cefpodoxime + ETX0282</b>	1	Céphalosporine + IβL (oral)	x	x	x	-	-	-
<b>Cetibuten + VNRX-7145</b>	1	Céphalosporine + IβL (oral)	x	x	x	-	-	-
<b>ARX-1796 (prodrogue orale Avibactam)</b>	1	β-lactam + IβL (oral)	x	x	x	-	-	-
<b>AIC-499 + IβL</b>	1	β-lactam + IβL (IV)	NR	NR	NR	NR	NR	NR

x : actif ; ? : activité possible, - non actif ; NR : non renseigné ; NDA : *New Drug Application* (Etats-Unis) ; MAA : *marketing authorisation application* (Europe) ; IβL : inhibiteur de β-lactamases ; AbCR : *Acinetobacter baumannii* résistant aux carbapénèmes ; PaCR : *Pseudomonas aeruginosa* résistant aux carbapénèmes ; IV : intra-veineux ; Source : (105)

La majeure partie des nouvelles  $\beta$ -lactamines sont des associations avec des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases : on compte 8 associations sur les 13 molécules en cours de développement. Il s'agit de nouveaux inhibiteurs : Taniborbactam (acide boronique), Enmetazobactam (dérivé du Tazobactam), Zidébactam (DBO), Nacubactam (DBO), Durlobactam (DBO), leur spectre d'activité vis à vis des classes de  $\beta$ -lactamases est indiqué dans le **Tableau 8**. Ainsi, toutes les associations inhibent les BLSE, et la plupart les carbapénémases de classe A et D, mais seule l'association Céfépime-taniborbactam a une action contre les MBL (des CMI élevées sont observées avec Céfépime-zidebactam et Méronème-nacubactam). Le Céfidérol, une céphalosporine liée à un sidérophore, lui permettant une meilleure absorption à travers la membrane externe des bactéries grâce au transport bactérien du fer, présente donc un spectre très large pour les Gram négatif, étant actif sur les classes A, B, C et D ainsi que sur les *A.baumannii* et *P.aeruginosa*. Certaines molécules présentent l'intérêt de pouvoir être administrées par voie orale ce qui n'est actuellement pas le cas pour les molécules de derniers recours. Néanmoins, les pistes contre les MBL restent limitées en phase clinique, pourtant plusieurs inhibiteurs de NDM ont été mis en évidence *in vitro* (108).

Les autres molécules sont présentées dans l'**Annexe 2**, elles sont principalement dirigées contre les Gram positif.

La grande majorité des molécules en cours de développement dérive de classes d'antibiotiques déjà existantes. Parmi les molécules qui représentent une innovation, on trouve (liste non exhaustive) : un inhibiteur de FabI (enzyme de la biosynthèse des acides gras) (afabicine), un inhibiteur de FtsZ (protéine essentielle à la division cellulaire) (TXA-709) et deux inhibiteurs de topoisomérase II avec une nouvelle structure chimique (Zoliflodacine, structure spiropyrimidintrione et Gépotidacine, structure triazaacenaphthylène).

Par conséquent, il est intéressant d'orienter la recherche d'antibactériens vers des nouvelles alternatives seules ou en association avec les antibiotiques.

## 4.3. Nouvelles alternatives

Le rapport de Jim O'Neill et les plans d'action de l'OMS, de l'Europe et de la France, comme vu dans le **Chapitre 3**, encouragent la recherche de nouveaux médicaments pour lutter contre l'antibiorésistance. Les pistes de recherche sont nombreuses et variées, des exemples d'alternatives seront tout d'abord abordés en s'appuyant sur des publications récentes qui font un état des lieux actuel (109,110) puis nous porterons un intérêt particulier pour les oligonucléotides, qui font l'objet de cette thèse.

### 4.3.1. Exemples d'alternatives thérapeutiques

#### 4.3.1.1. Bactériophages et bactériolysines

Les bactériophages (ou phages) sont des virus spécifiques des bactéries, présents dans l'ensemble des écosystèmes et dont la diversité est extrêmement importante. Leur utilisation en

thérapeutique est appelée phagothérapie et se base sur le cycle lytique des phages qui consiste à lyser *in fine* la bactérie après la multiplication des virions dans la bactérie.

La phagothérapie n'est pas nouvelle, elle est découverte dans les années 1915, et fut utilisée dans plusieurs pays. Néanmoins, du fait d'un manque d'essais thérapeutiques rigoureux montrant une efficacité et une innocuité, une production de phages non contrôlée ainsi que l'avènement des antibiotiques, l'utilisation des phages reste limitée à certains pays, notamment l'ex-union soviétique (111).

Cependant, les phages présentent un réel potentiel thérapeutique. Leur principal avantage est leur spécificité étroite vis à vis de telle ou telle bactérie, ce qui permet de ne pas impacter le microbiote intestinal. Leur concentration augmente aussi avec le temps au niveau du foyer infectieux et ils possèdent la propriété d'hydrolyser des composants des biofilms (112). Leurs inconvénients sont : leur incapacité à pénétrer dans les cellules eucaryotes et il est donc impossible de les utiliser dans les infections à bactérie intracellulaire, la nécessité d'une documentation microbiologique préalable pour cibler la bonne bactérie. Il existe plusieurs études sur l'animal avec l'utilisation d'un phage ou de cocktails de phages, par exemple : contre les SARM (113), *P.aeruginosa* MDR (114). On peut citer les projets internationaux en phase préclinique : PhagUTI pour les infections urinaires compliquées, PHOSA contre les infections ostéoarticulaires et de l'ulcère du pied diabétique provoqués par *S.aureus* et PneumoPhage pour traiter les infections des voies respiratoires aiguës à *P.aeruginosa* (<https://fr.pherecydes-pharma.com>). Enfin la première étude clinique (phase 1/2) menée dans le respect des standards internationaux d'évaluation clinique, PhagoBurn a permis d'évaluer la tolérance et l'efficacité des bactériophages pour traiter des infections cutanées, chez les grands brûlés, provoquées par *P.aeruginosa* (115) montre une efficacité chez 50 % des patients traités à faible dose mais une action moins rapide que le traitement de référence (sulfadiazine d'argent), une bonne tolérance ; encourageant à poursuivre les études avec de plus fortes concentrations. Les phages peuvent être utilisés à l'état naturel ou génétiquement modifiés.

Les lysines (ou endolysines) sont des enzymes utilisées par les bactériophages pour détruire le peptidoglycane de la paroi des bactéries permettant la libération des nouvelles particules virales. De la même manière que les phages, les lysines sont donc spécifiques de certaines bactéries. De nombreuses lysines font l'objet d'essais précliniques vis à vis de Gram positif (*S.pneumoniae*, *S.pyogenes*, *S.agalatae*, *S.aureus*), Gram négatif (*P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *C.freundii*, *S.maltophilia*, *Burkholderia* sp.) et des mycobactéries (116). Deux endolysines sont actuellement en essais cliniques : CF-301 (exebacase) en cours de phase 3 (essai DISRUPT : *Direct Lysis of Staph Aureus Resistant Pathogen Trial of Exebacase*, inclusion de patients avec une bactériémie y compris endocardite) et SAL-200 (tonabacase) en cours de phase 2. Ce sont deux endolysines dirigées contre *S.aureus* (y compris les souches résistantes aux antibiotiques), utilisées en intra-veineuse, elles ont un effet synergique en association avec des antibiotiques anti-staphylocoques (105).

### 4.3.1.2. Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAMs) sont des molécules de petite taille (10 à 50 acides aminés) qui constituent la 1<sup>ère</sup> ligne de défense chez les animaux, les plantes et les microorganismes. Ils ont un spectre d'activité large tuant directement les bactéries, champignons, parasites et virus. Il existe plus de 3000 PAMs (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), on peut les classer selon leur structure, la plupart sont chargés positivement (cationiques) et sont amphiphiles, leur mode d'action est varié, principalement par interaction avec la membrane mais peuvent avoir d'autres cibles (ADN, ARN, protéines) (117). Ils présentent de nombreux avantages du fait de leur spectre d'action large, d'une bactéricidie rapide, d'une faible immunogénicité, et d'une faible résistance. Leur inconvénient est leur toxicité et leur sensibilité à la protéolyse (pouvant être pallié grâce à des peptides synthétiques mimant les propriétés des PAMs). Cependant, il n'existe pour l'instant pas d'utilisation en clinique du fait de résultats non concluants des essais cliniques (exemple : Pexiganan, candidat contre l'ulcère du pied diabétique, échoue en phase 3 (118)). Sont actuellement en cours d'essais cliniques : par exemple, Omiganan pour la rosacée, acné et dermatite atopique (phase 2-3), Brilacidine dans les infections aiguës de la peau (notamment à SARM) (phase 2) et d'autres en phase préclinique comme NP432 contre les infections à bactéries multirésistantes (110).

Certains peptides antimicrobiens ont une action immuno-modulatrice et d'autres une action anti-biofilm, on peut citer : AB103 (Reltecimod) pour les infections nécrosantes de la peau (phase 3), LL-37 dans l'ulcère chronique de la jambe (phase 2) (110).

Enfin, les bactériocines sont des PAMs synthétisés naturellement par les bactéries, par exemple la nisine, produite par *Lactococcus lactis* est utilisé comme additif alimentaire. Il n'existe pas encore d'essais cliniques, seulement des essais précliniques *in vitro* en majorité : Mutacine 1140 contre SARM (119), NAI-107 contre *N.gonorrhoeae*, *M.catarrhalis*, *H.influenzae*, et en association avec la colistine contre *A.baumannii*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* (120).

### 4.3.1.3. Anticorps

Les anticorps peuvent agir directement sur les bactéries ou indirectement en neutralisant leurs produits : toxines et facteurs de virulences, réduisant ainsi leur pathogénicité. De nombreux anticorps contre Staphylocoques, *P.aeruginosa*, *Bacillus anthracis* et *C.difficile* sont sur le marché ou en cours de développement. En effet, le bezlotoxumab (AMM en 2017 en France) est un anticorps monoclonal anti-toxine B de *C.difficile* indiqué dans la prévention des récurrences d'infection à *C.difficile* ; et le raxibacumab et obiltoxaximab sont des anticorps dirigés contre *B.anthraxis* dans le cadre de l'anthrax. A cela s'ajoute, faisant l'objet d'essais cliniques : 4 anticorps anti-*S.aureus* : tosatocumab (IgG ciblant  $\alpha$ -toxine, phase 3), suvatocumab (IgG ciblant  $\alpha$ -toxine et facteur d'agglutination A, phase 2), 514G3 (IgG ciblant facteur SpA, phase 2), DSTA-4637S (IgG ciblant protéine de surface + rifamycine, phase 1) et 2 anticorps anti-*P.aeruginosa* : gremubamab (IgG ciblant facteurs Psl, PcrV, phase 2), panabacumab (IgG ciblant polysaccharide de surface, phase 2) (105). Le principal inconvénient des anticorps est leur coût mais ils présentent un intérêt certain dans le traitement des infections.

#### 4.3.1.4. Stratégies ciblant le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal héberge des milliards de microorganismes, principalement des bactéries avec plus de 1000 espèces appartenant aux *Bacteroidetes* (*Bacteroides* sp.), Firmicutes (*Clostridioides* sp., *Lactobacillus* sp., *Eubacterium* sp.), *Actinobacteria* (*Bifidobacterium* sp.) et *Proteobacteria* (*E.coli*, *K.pneumoniae*). Le microbiote est largement étudié depuis quelques années, révélant diverses fonctions : métaboliques, immunitaires, protectrices, maintenant l'homéostasie. L'utilisation d'antibiotiques déséquilibre ce microbiote et peut entraîner des infections secondaires notamment les colites à *C.difficile*.

##### 4.3.1.4.1. Probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants, qui, administrés en quantité suffisante, ont des effets bénéfiques sur la santé. Leur rôle est de contribuer à maintenir le microbiote ou à corriger leur déséquilibre lors de dysbiose. Ils sont naturellement présents dans certains aliments (ex : produits laitiers) et existent en tant que complément alimentaire. Les probiotiques peuvent être utilisés dans le traitement ou en prévention des infections gastrointestinales à *C.difficile*. Plusieurs probiotiques contre *C.difficile* sont en cours de développement clinique: SER-109 (Phase 3), RBX2660 (phase 3), VP20621 (phase 2), FIN 403 (phase 2) (110). Leur intérêt dans les infections à *Helicobacter pylori* est également étudié (121).

Outre le microbiote intestinal, des études portent sur les autres microbiotes : cutané (122), respiratoire (123,124).

##### 4.3.1.4.2. Transplantation du microbiote fécal

La transplantation du microbiote fécal (TMF) consiste à administrer une préparation de matière fécale issue d'un sujet sain à un patient atteint d'une pathologie liée à une altération du microbiote intestinal, en vue d'exercer des effets thérapeutiques. La seule indication actuelle est l'infection à *C.difficile* récidivante (125). La TMF pourrait être intéressante dans l'éradication du portage de bactéries multirésistantes (126,127).

#### 4.3.1.5. Stimulation de l'immunité

De nouvelles molécules immunostimulantes, hormis les PAMs font l'objet d'axes de recherche, en effet le système immunitaire a une part importante dans la physiopathologie des infections. Les thérapies immunomodulatrices exploitant les mécanismes naturels de défense de l'hôte sont des approches prometteuses pour améliorer le bénéfice thérapeutique (128). Par exemple, la flagelline, agoniste du TLR5 (*Toll like receptor*) montre une activité anti-infectieuse dans un modèle murin d'infection respiratoire à *S.pneumoniae*, et son association avec un antibiotique améliore la réponse anti-infectieuse dans un modèle de surinfection pneumococcique post-grippale (129,130). Aussi le phénylbutyrate augmente l'expression de LL-37, un peptide anti-microbien, montre un effet bénéfique dans le cas d'infection à *Shigella* (131) et *Salmonella enterica* chez la souris (132), et de tuberculose chez l'homme en phase 2 (133). Enfin, l'immunomodulation a été étudiée pour *Bordetella* spp. (134).

#### 4.3.1.6. Vaccins

Un vaccin est une suspension de micro-organismes inactivés ou atténués, ou des produits ou dérivés de micro-organismes, qui provoque l'immunité contre une maladie en stimulant la production d'anticorps. Les vaccins constituent l'un des investissements les plus rentables dans le domaine de la santé publique, en effet il existe plus de 50 vaccins couvrant une vingtaine de maladies, dont des infections bactériennes : coqueluche, diphtérie, tétanos, *H.influenzae* B, leptospirose, méningocoque, pneumocoque, tuberculose, typhoïde. Entre 2 et 3 millions de vies sont sauvées chaque année dans le monde grâce à la vaccination mais 1,5 millions de vies supplémentaires pourraient être épargnées en améliorant l'accès à celle-ci. Le nombre de cas avant et après l'introduction de la vaccination a drastiquement diminué, montrant une efficacité des vaccins. La vaccination de l'homme et des animaux est un moyen très efficace d'éviter les infections, et donc d'éviter d'utiliser des antibiotiques limitant ainsi la propagation de la résistance aux antibiotiques. En déployant l'utilisation des vaccins existants, on peut réduire la consommation d'antibiotiques et le développement de la résistance. La mise au point et l'utilisation de nouveaux vaccins pour éviter les maladies bactériennes pourraient réduire davantage le développement des résistances et éviter de contracter des maladies causées par des bactéries multi-résistantes (135).

Actuellement, quelques exemples de vaccins en cours de développement : IC-43 anti-*P.aeruginosa* chez les patients ventilés en réanimation (mais cependant ne montre pas de bénéfice clinique par rapport au placebo, en phase 2/3) (136), VLA84 anti-*C.difficile* en phase 1 (137), SA4Ag anti-*S.aureus* en phase 1 (138), ExPEC4V anti-*E.coli* dans les infections urinaires en phase 1 (139,140), anti-Streptocoque B (141).

#### 4.3.1.7. Autres stratégies

Nous citerons ici qu'une liste non exhaustive d'autres voies de recherche : l'utilisation de bactéries prédatrices comme *Bdellovibrio* (142), de la technologie récente CRISPR/Cas9, ciseaux et outils moléculaires (endonucléase Cas9 modifiée et couplée à d'autres enzymes de modification de l'ADN comme des cytidines désaminases), pouvant cibler des gènes de résistances, néanmoins l'intermédiaire de bactériophage est nécessaire pour délivrer le système (143,144). Certains métaux présentent une activité antibactérienne intéressante comme le gallium *in vitro* (145) et *in vivo* chez les patients atteints de mucoviscidose avec une colonisation chronique à *P.aeruginosa* (Phase 1) (146), ou encore l'argent sous forme de nanoparticules en association avec l'ampicilline contre les bactéries MDR (147), mais tous les métaux sont potentiellement intéressants (148) et leurs utilisations sous forme de nanoparticules font l'objet de nombreuses recherches (149). Des études portant sur l'utilisation de la lumière bleue ont également été rapportées contre le *P.aeruginosa* dans les infections cutanées (150) et contre les infections cutanées à SARM (151).

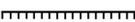
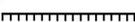
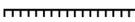
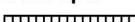
## 4.3.2. Oligonucléotides

### 4.3.2.1. Définition - Mécanisme d'action

Les oligonucléotides sont de courts segments d'acides nucléiques (acide désoxyribonucléique ADN ou acide ribonucléique ARN) de quelques dizaines de nucléotides. Outre leur utilisation en biologie moléculaire notamment comme amorces en PCR (*polymerase chain reaction*) et en séquençage ou comme sondes marquées en *Southern Blot* ou *Northern Blot* ; les oligonucléotides ont toute leur place en thérapeutique.

En effet, il existe plusieurs classes d'oligonucléotides qui ont un intérêt en thérapie : les oligonucléotides antisens, les ARN interférents (siARN et miARN), les aptamères, les CpG oligonucléotides immunostimulants, leurs caractéristiques sont synthétisées dans le **Tableau 9**. Ces oligonucléotides sont utilisés en thérapie contre certaines maladies et virus, nous citerons les premiers médicaments et leur date d'autorisation de mise sur le marché (ou à défaut la molécule la plus avancée en recherche) pour chaque types oligonucléotides : Fomivirsen (1998, retiré en 2002), oligonucléotide antisens qui était indiqué dans la rétinite à cytomégalovirus ; Patisiran (2018), siARN pour le traitement des patients atteints d'amylose à transthyrétine héréditaire ; Remlarsen (recherche clinique phase 2), miARN mimétique dans la prévention ou traitement des chéloïdes ; Miravirsen (phase 2), antagomir dans le traitement de l'hépatite C ; Pégaptanib (2006, retiré en 2019), aptamère utilisé dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge ; Heplisav-B (2017), oligonucléotide CpG utilisé comme adjuvant du vaccin de l'hépatite B (152,153) ; les oligonucléotides ciblant l'ADN n'ont pour l'instant que des études *in vitro* et *in vivo* par exemple dans la mucoviscidose (154,155).

**Tableau 9. Thérapies par oligonucléotides chez les eucaryotes**

	Structure	Cible	Mécanisme d'action
<b>Oligonucléotides antisens</b> 	Simple brin ADN ou ARN	ARNm Pré-ARNm	Dégradation ARNm par RNase H (cytoplasme) Blocage stérique (cytoplasme) Inhibition épissage ou dégradation pré-ARNm par RNase H (noyau)
<b>siARN</b> 	Double brin ARN	ARNm	Dégradation ARNm par protéine AGO (cytoplasme)
<b>miARN mimétiques</b> 	Double brin ARN	ARNm	Dégradation ARNm par protéine AGO (cytoplasme) Blocage stérique (cytoplasme)
<b>Antagomirs</b> 	Simple brin ARN	miARN	Blocage stérique (cytoplasme)
<b>Oligonucléotides anti-gènes</b> 	Simple brin ADN	ADN	Formation de triple hélice (noyau)
<b>Aptamères</b> 	Simple brin ADN ou ARN	Protéines	Inhibition fonctionnelle (cytoplasme)
<b>Oligonucléotides CpG</b> 	Simple brin ADN	TLR9	Immunostimulant (endosome)

siARN : *small interfering* ARN, miARN : micro ARN ; ARNm : ARN messenger ; TLR : *toll-like receptor* ; Ago : protéine argonaute, endonucléase. Source : synthèse de (156)

Chez les procaryotes, les oligonucléotides antisens restent la stratégie la plus étudiée parmi tous les oligonucléotides, nous nous focaliserons donc uniquement sur les oligonucléotides antisens.

Les oligonucléotides antisens (AON, *Antisense Oligonucleotides*) sont des séquences simple brin qui s'hybrident spécifiquement par appariement de bases à des régions complémentaires de l'ARN messager. Les AON ont montré leur efficacité dans l'inhibition de l'expression de gènes aussi bien chez les cellules eucaryotes que chez les cellules bactériennes (157). Il a été montré que leur action peut résulter de deux mécanismes (158), schématisés dans la **Figure 27** : 2) soit par un blocage stérique (empêchant la fixation ou la progression des ribosomes) inhibant la traduction, 3) soit par dégradation de l'ARNm de l'hétéroduplexe ARNm/AON par une ribonucléase H (RNase H), ainsi, ils effectuent un *knock-out* des fonctions de l'ARNm, ce qui les rend très spécifiques, 1) correspondant à la situation physiologique : transcription de l'ADN en ARNm suivi de la traduction en protéine via l'intermédiaire des ribosomes .

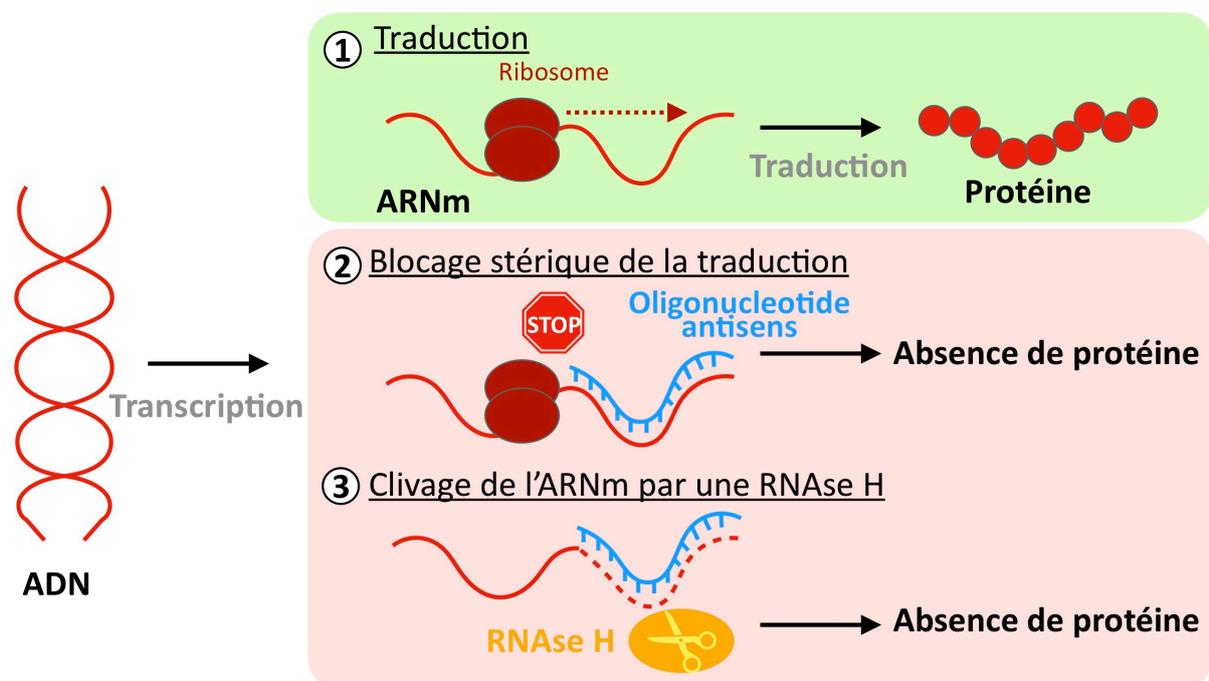


Figure 27. Mécanismes d'action des oligonucléotides antisens

#### 4.3.2.2. Modifications chimiques

Les oligonucléotides non modifiés sont rapidement dégradés par les nucléases, c'est pourquoi des modifications chimiques sont nécessaires ; elles peuvent se faire au niveau de la liaison phosphodiester, du sucre, de la base permettant d'augmenter la stabilité vis à vis des nucléases et leur affinité à l'ARNm. Certaines modifications sont indiquées dans la **Figure 28**, nous en décrivons succinctement quelques unes.

Les liaisons phosphodiester (PO) reliant les nucléotides entre eux sont rapidement clivées par les endo- et exo-nucléases, le remplacement d'un des atomes d'oxygène libres par un atome de soufre donnant un phosphorotioate (PTO) permet d'augmenter la stabilité de l'oligonucléotide contre les nucléases tout en restant accessible aux RNases H, mais peut diminuer l'affinité à la séquence cible du fait de l'introduction d'un centre de chiralité.

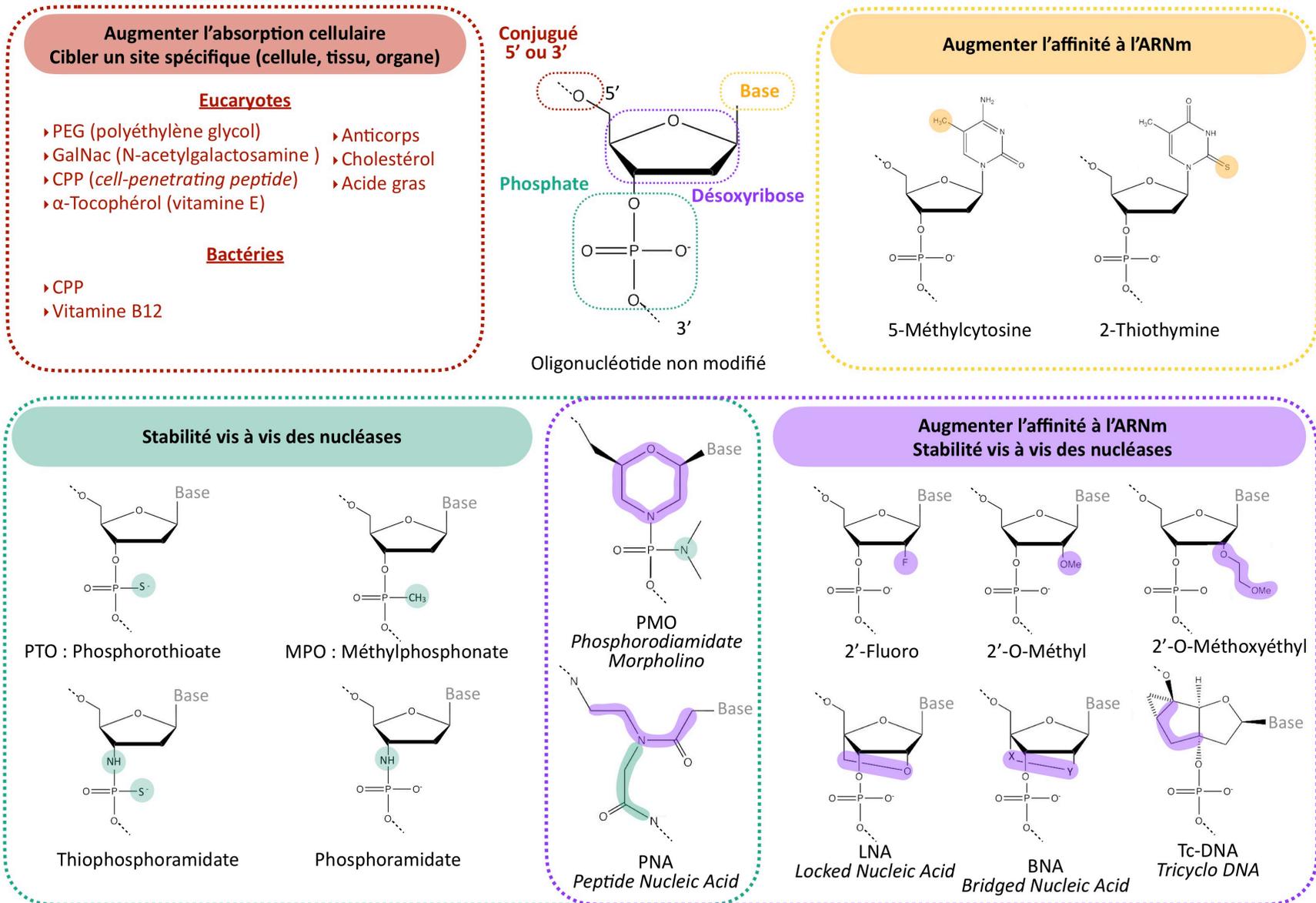
Les modifications au niveau du sucre permettent à la fois d'augmenter l'affinité pour l'ARNm et d'améliorer la stabilité de l'oligonucléotide vis à vis des nucléases notamment avec les LNA (*locked nucleic acid*) avec l'introduction d'un pont méthylène entre l'oxygène 2' et le carbone 4' du sucre, et ces analogues BNA (*bridged nucleic acid*) avec l'introduction d'atomes ou groupements, qui sont plus résistants aux nucléases et moins toxiques que les LNA (159).

La structure des oligonucléotides peut totalement être modifiée, c'est le cas avec les PMO (*phosphorodiamidate morpholino*) avec la substitution du ribose par un cycle morpholine et le phosphate par un groupement phosphorodiamidate ; et les PNA (*peptide nucleic acid*) qui ont une base peptidique avec un enchaînement de N-(2-aminoéthyl)glycine ; il s'agit de structures neutres, non dégradées par les nucléases, avec une forte affinité de liaison à l'ARN et RNase H indépendantes.

Enfin la modification des bases est possible, comme l'introduction d'un groupe méthyl sur les cytosines et d'un soufre sur les thymines, ces modifications ont pour but d'augmenter la stabilité du duplex ADN/ARN ou encore d'éviter les réponses immunitaires (par les motifs CpG).

Néanmoins, pour parvenir à leurs cibles et exercer leur action, les oligonucléotides doivent atteindre le cytoplasme voire le noyau, devant franchir les barrières cellulaires : la membrane cytoplasmique voire la membrane nucléaire chez les eucaryotes. Leur caractère hydrophile anionique les empêche de franchir ces membranes qui sont formées d'une bicouche phospholipidique. Pour cela, il existe plusieurs sortes de formulations pour la vectorisation des oligonucléotides : les vecteurs viraux, physiques et chimiques. Les vecteurs chimiques forment des complexes avec les oligonucléotides par interactions électrostatiques pour former des nanoparticules qui peuvent être des complexes lipidiques (micelles, liposomes), des polymères cationiques (poly-L-lysine (PLL), poly(éthylène-imine)(PEI)), des polymères-lipidiques (lipopolyplexes) ou encore de particules inorganiques (silice, or, oxyde de fer) (160). Une autre stratégie consiste à utiliser des molécules conjuguées de façon covalente aux oligonucléotides en 5' ou 3' voire intra-séquence, ce qui a pour avantage par rapport aux formulations d'avoir une maîtrise sur la composition finale du produit et en plus de faciliter l'absorption cellulaire, ils peuvent également délivrer l'oligonucléotide vers un site spécifique (cellule, tissu, organe) (161). L'utilisation d'oligonucléotides bioconjugués a montré son efficacité chez les eucaryotes, comme la conjugaison avec des lipides (cholestérol, acide gras,  $\alpha$ -tocophérol), avec des oligosaccharides (le N-acetylgalactosamine (GalNac), ligand du récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGPR), présent à la surface des hépatocytes), avec des peptides (CPP, *Cell penetrating peptides*), avec des anticorps ou encore des associations de deux molécules conjuguées (161).

La délivrance des oligonucléotides dans les cellules procaryotes est beaucoup plus difficile que dans les cellules eucaryotes, en effet, comme vu dans le **Chapitre 1.3.1** et **Figure 2**, une bactérie est constituée en plus d'une membrane plasmique, d'une paroi constituée du peptidoglycane et d'une membrane externe chez les Gram négatif avec des lipopolysaccharides et phospholipides constituant ainsi une barrière supplémentaire à franchir par les oligonucléotides. Les parois bactériennes représentent donc un obstacle majeur à contourner pour les oligonucléotides anti-bactériens nécessitant une formulation ou l'association à un autre composé pour traverser cette barrière d'autant plus que certaines bactéries peuvent être intracellulaires (157).



**Figure 28. Modifications chimiques des oligonucléotides antisens**

Sources : (161–165)

Les stratégies actuellement étudiées pour améliorer la délivrance des oligonucléotides chez les bactéries sont : la conjugaison avec des CPP ou de la vitamine B12, l'utilisation de nanoparticules lipidiques, nanocomplexes bolaamphiphiles et des nanostructures d'ADN (165).

Les CPP sont de petits peptides (10-30 acides aminés), les séquences les plus rapportées sont le KFFKFFKFFK (ou (KFF)<sub>3</sub>K) et RRRXRRXRRXRXB (ou (RXR)<sub>4</sub>XB) (avec K correspondant à la lysine, F phénylalanine, R arginine, X à l'acide 6-aminohexanoïque, et B à la β-alanine). Ils peuvent être conjugués à l'oligonucléotide de façon covalente ou par des interactions non covalentes via des nanocomplexes. Ces CPP montrent une efficacité chez les Gram positif, négatif et les bactéries intracellulaires (**Tableau 10**). Aussi, des oligonucléotides conjugués à la vitamine B12 semblent avoir une meilleure absorption qu'avec les CPP, la vitamine B12 pourrait être une nouvelle molécule intéressante (166)

Les nanoparticules lipidiques bien que largement utilisées chez les eucaryotes, ne sont qu'encore peu utilisées chez les bactéries (167). Les bolaamphiphiles sont des molécules amphiphiles qui ont des groupes hydrophiles aux deux extrémités d'une chaîne d'alkyle hydrophobe formant des micelles ou vésicules avec les oligonucléotides. Il s'agit d'une stratégie à explorer et qui a son intérêt chez les bactéries. La vectorisation par un ADN tétraèdre est un autre procédé montrant de bons résultats (168,169).

Les oligonucléotides antisens antibactériens présentent plusieurs avantages par rapport aux antibiotiques : il suffit de connaître la séquence cible pour *designer* l'oligonucléotide et leur spécificité vis à vis de leur cible (165).

#### 4.3.2.3. Exemples d'oligonucléotides antibactériens

Le **Tableau 10**. montre les différents axes de recherche concernant les oligonucléotides anti-sens chez les bactéries. On remarque que les études sont principalement *in vitro* et qu'elles sont limitées à des étapes pré-cliniques. Aussi les gènes cibles sont le plus souvent des gènes essentiels à la bactérie, néanmoins certaines études s'intéressent aux gènes de résistances aux antibiotiques. L'avantage de cibler des gènes non essentiels est de réduire le risque de résistance (170).

Toutes bactéries sont étudiées : Gram négatif, Gram positif et intracellulaires. Les oligonucléotides les plus largement utilisés sont les PMO et PNA et les CPP sont majoritairement employés pour favoriser leur passage à travers la paroi bactérienne.

Les oligonucléotides antisens présentent donc un intérêt dans le domaine de la recherche de nouvelles molécules antibactériennes.

**Tableau 10. Exemples d'oligonucléotides antisens étudiés chez les bactéries**

Cible	Type d'oligonucléotide	Conjugué Formulation	Espèce bactérienne	In vitro	Ex vivo	In vivo	Date, référence
<i>aac(6')-Ib</i>	BNA <sup>NC</sup>	CPP	<i>Acinetobacter baumannii</i> MDR	x	-	<i>Galleria mellonella</i>	2015, (171)
<i>acpP</i>	PMO	CPP	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	x	Cellules épithéliales intestinales	Souris (IP)	2006, (172) 2007, (173)
<i>acpP</i>	PNA	PAM	<i>Escherichia coli</i>	x	-	-	2016, (174)
<i>acpP</i>	PMO	CPP	<i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	x	-	Souris (IN)	2013, (175)
<i>acpP</i>	PMO	CPP	<i>Burkholderia cepacia</i> complexe	x	-	Souris (IP)	2010, (176)
<i>acpP</i>	PMO	CPP	<i>Escherichia coli</i>	x	-	Souris (IP)	2009, (177)
<i>acpP</i>	PNA	CPP	<i>Escherichia coli</i>		-	Souris (IP)	2005, (178)
<i>acpP</i>	PNA	CPP	<i>Haemophilus influenzae</i>	x	-	-	2016, (179)
<i>acpP</i>	PMO	CPP	<i>Salmonella enterica</i> sérovar <i>Typhimurium</i>	x	Macrophages murins	-	2009, (180)
<i>acpP</i>	PMO	CPP	<i>Burkholderia cepacia</i> complexe	x	Modèle crachat artificiel	Souris (IN)	2018, (181)
<i>acpP</i>	PMO	CPP	<i>Escherichia coli</i>	x	-	Souris (IP)	2009, (182)
<i>acpP, ftsZ</i>	PNA	CPP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	x	-	-	2012, (183)
<i>acpP, gyrA</i>	PMO	CPP	<i>Bacillus anthracis</i>	x	Macrophages murins	Souris (IP)	2012, (184)
<i>acpP, lpxC, rpsJ</i>	PMO	CPP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	x	-	Souris (IN)	2017, (185)
<i>acpP, polA, dnaG, gyrA, rpoB, asd, kdtA</i>	PNA	CPP	<i>Brucella suis</i>	x	Macrophages murins	-	2013, (186)
<i>acrA</i>	PMO	CPP	<i>Escherichia coli</i>	x	-	-	2016, (187)
<i>acrB</i>	PTO	Liposome	<i>Escherichia coli</i> FQ-R	x	-	-	2011, (188)
ARNr 16S	LNA, 2'-O-méthyl PO ou PTO	Liposome Lipoplexe	<i>Helicobacter pylori</i>	x	Mucus gastrique de porc	-	2017, (189)

Tableau 10 (suite)

Cible	Type d'oligonucléotide	Conjugué Formulation	Espèce bactérienne	In vitro	Ex vivo	In vivo	Date, référence
<i>bla</i> <sub>CTX-M groupe 1</sub>	PNA	ADN tétraèdre	<i>Escherichia coli</i>	x	-	-	2016, (168)
<i>bla</i> <sub>CTX-M groupe 1</sub>	PNA, PMO	CPP	<i>Escherichia coli</i>	x	-	-	2016, (190)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	PMO	CPP	<i>Escherichia coli</i>	x	-	Souris (IP)	2016, (191)
<i>cmeABC</i>	PNA	CPP	<i>Campylobacter jejuni</i>	x	-	-	2013, (192)
<i>dnaE, fabD, ftsZ, rpoB</i>	2'-O-méthyl PTO	Nanocomplexe bolaamphiphile	<i>Clostridium difficile</i>	x	-	-	2016, (193)
<i>fmhB, gyrA, hmrB</i>	PNA	CPP	<i>Staphylococcus aureus</i>	x	-	-	2004, (194)
<i>ftsZ</i>	LNA	CPP	SARM	x	Cellules épithéliales muqueuse gastrique	Souris (IP)	2015, (195)
<i>ftsZ</i>	PNA	CPP	SARM	x	-	-	2015, (196)
<i>ftsZ</i>	PNA	ADN tétraèdre	SARM	x	-	-	2018, (169)
<i>gyrA</i>	PNA	CPP	<i>Streptococcus pyogenes</i>	x	-	-	2013, (197)
<i>gyrA, ompA</i>	PNA	CPP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> TEM-1, SHV-11, DHA-1	x	Fibroblastes	-	2007, (198)
<i>inhA</i>	PNA	CPP	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	x	-	-	2005, (199)
<i>lepB, lptD, mraY</i>	PNA	CPP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	x	-	-	2015, (200)
<i>lpxB</i>	PNA	CPP	<i>Acinetobacter baumannii</i>	x	Cellules épithéliales alvéolaires humaines	<i>Galleria mellonella</i>	2019, (201)
<i>mecA</i>	PTO	Liposome	SARM <i>Staphylococcus epidermidis</i> méti-R	x	-	Souris (IP)	2009, (202) 2015, (167)
<i>mecA, ftsZ</i>	PNA	CPP	SARM <i>Staphylococcus pseudointermidius</i> méti-R	x	-	-	2005, (203)
<i>oprM</i>	PTO	Liposome	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR	x	-	-	2010, (204)

**Tableau 10 (suite)**

Cible	Type d'oligonucléotide	Conjugué Formulation	Espèce bactérienne	In vitro	Ex vivo	In vivo	Date, référence
<i>rpoA</i>	PNA	CPP	<i>Listeria monocytogenes</i>	x	Macrophages murins	<i>Caenorhabditis elegans</i>	2016, (205)
<i>rpoD</i>	PNA	CPP	SARM	x	Cellules épithéliales muqueuse gastrique	-	2012, (206)
<i>rpoD</i>	PNA	CPP	<i>Escherichia coli</i> BLSE / MDR <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE <i>Salmonella enterica</i> MDR <i>Salmonella flexneri</i> MDR	x	Cellules épithéliales muqueuse gastrique	Souris (IP)	2012, (207)

Abréviations : X : réalisé ; - : non réalisé ; PMO : *phosphorodiamidate morpholino* ; PNA : *peptid nucleic acid* ; LNA : *locked nucleic acid* ; PTO : phosphorothioate ; CPP : *cell-penetrating peptide* ; PAM : peptide antimicrobien ; IN injection intranasale ; IP : injection intrapéritonéale ; BLSE :  $\beta$ -lactamase à spectre étendu ; MDR : *multidrug resistance* ; SARM : *Staphylococcus aureus* meticillino-résistant

Gènes essentiels, rôle dans :

Synthèse des acides gras : *acpP* : *acyl carrier protein* ; *fabD* : *malonyl COA-ACP transacylase* ; *hmrB* : *acyl carrier protein* ; *inhA* : enoyl réductase ; *kdtA* : *3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase*

Synthèse et maintien de la paroi, membrane : *asd* : *aspartate-semialdehyde dehydrogenase* ; *fmhB* : *peptidoglycan pentaglycine interpeptide biosynthesis protein* ; *lptD* : *LPS-assembly protein LptD* ; *lpxB* : *lipid-A-disaccharide synthase* ; *lpxC* : *UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase* ; *mraY* : *phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase* ; *ompA* : *outer membrane protein A*

Réplication de l'ADN, division cellulaire : *dnaE* : sous-unité  $\alpha$  ADN polymerase III ; *dnaG* : ADN primase ; *ftsZ* : *filamentous temperature-sensitive protein Z* ; *gyrA* : sous unité A ADN gyrase ; *polA* : ADN polymérase I

Transcription : *rpoA*, *rpoB*, *rpoD* : sous unité  $\alpha/\beta$ /facteur  $\sigma^{70}$  ARN polymérase

Traduction : *ARNr 16S* ; *rpsJ* : *30S ribosomal protein S10* ; *lepB* : *signal peptidase I*

Gènes non essentiels (en rouge), ciblant des gènes de résistance aux antibiotiques :

*aac(6')-Ib* : *aminoglycoside acetyltransferase* ; *acrA*, *acrB* : pompe AcrAB-TolC ;  $\beta$ -lactamases : *bla*<sub>CTX-M groupe 1</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> ; *cmeABC* : pompe CmeABC ; *mecA* : code pour la PLP2a, mécanisme de résistance des SARM ; *oprM* : pompe MexAB-OprM

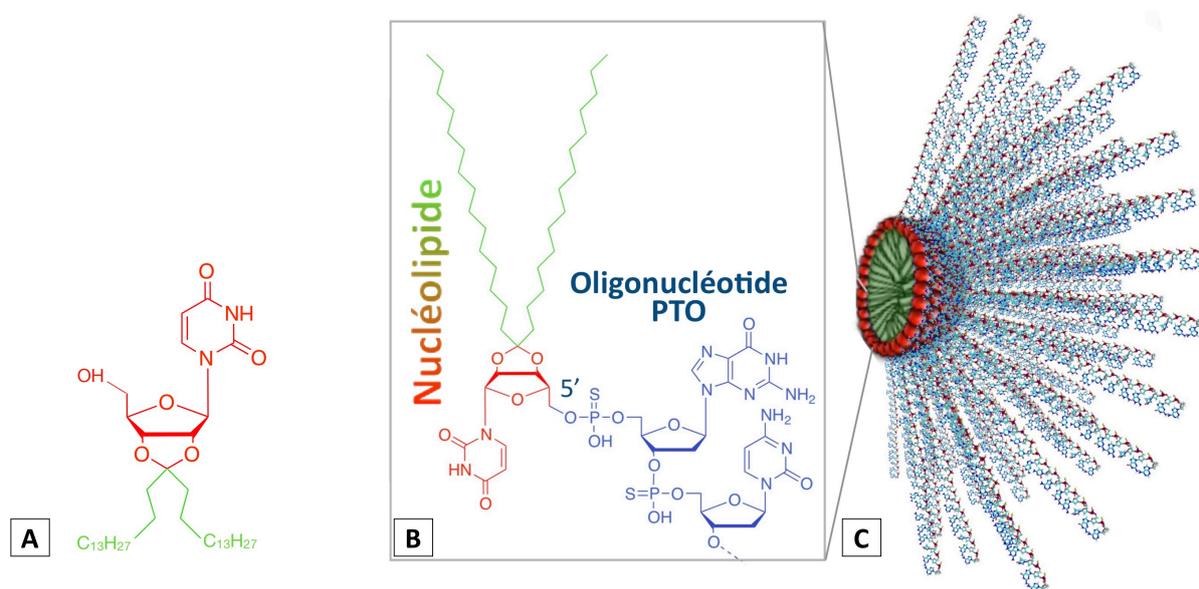
Sources : cf. références et (157,165)

# Projet de recherche

## 1. Contexte : Eucaryotes

Ce projet de thèse a été réalisé en étroite collaboration avec l'équipe ChemBioPharm du laboratoire de chimie de l'université de Bordeaux (ARNA, INSERM U1212, CNRS UMR 5320). Dans le cadre de l'amélioration de la délivrance des oligonucléotides abordée dans le **Chapitre 4.3.2.2**, cette équipe s'est intéressée plus particulièrement aux lipides et notamment aux nucléolipides. Les membres de l'équipe ont montré l'efficacité des oligonucléotides en les utilisant comme formulation en formant des nanoparticules pour des principes actifs, siARN et oligonucléotides antisens (208–211) mais aussi directement conjugués aux oligonucléotides antagonistes et antisens (212–214). Ils ont montré que la conjugaison d'un lipide permettait d'augmenter la délivrance et l'activité des oligonucléotides dans les cellules cancéreuses eucaryotes.

En effet, ils ont développé des oligonucléotides (ON) antisens chimiquement modifiés utilisant une structure phosphorothioate (PTO) qui augmente leur stabilité et les ont conjugués en 5' à un nucléolipide générant un LON (*lipid-oligonucleotide*) (215) (**Figure 29, A, B**). Il a été montré que le passage des LON à travers la membrane des cellules eucaryotes était plus important qu'avec les ON (214) grâce à leur propriété amphiphiles et leur auto-assemblage en micelles (216,217) (**Figure 29, C**). Ainsi les LON améliorent l'absorption cellulaire et l'efficacité de l'antisens dans le cancer de la prostate *in vitro* et *in vivo* sans observer de cytotoxicité (214).



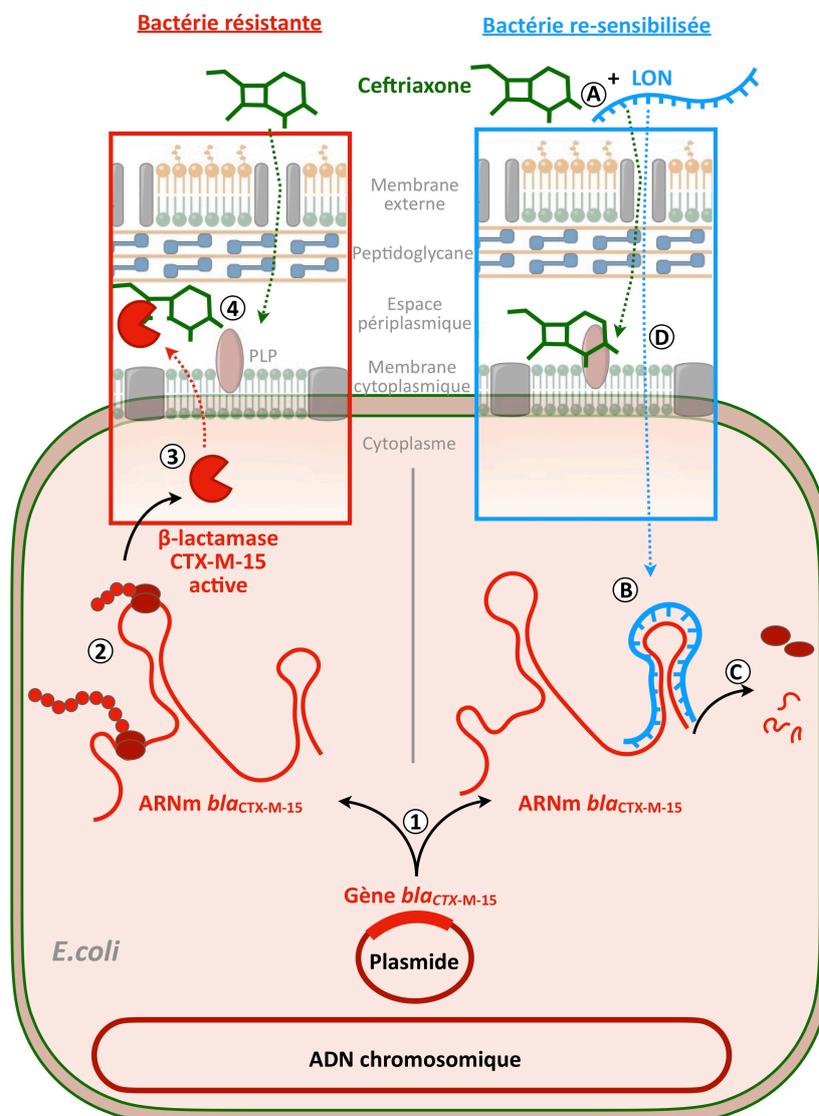
**Figure 29. Conjugaison à un nucléolipide**

A : nucléolipide 2',3'-O-16-hentriacontanyliden-uridine (cétal bis-C<sub>15</sub>-uridine) ; B : oligonucléotide chimie phosphorothioate avec un conjugué nucléolipidique en 5' formant un LON (*lipid-oligonucleotide*) ; C : formation d'une micelle

## 2. Concept : Procaryotes

L'objectif de la thèse est de montrer l'entrée des LON développés par le Laboratoire de Chimie (**Figure 29**) chez les procaryotes et de confirmer leur ciblage spécifique à un ARN messager. Afin d'apporter la preuve de ce concept et dans le contexte de la situation critique de l'antibiorésistance le choix a été de cibler chez *E.coli*, les ARNm du gène  $bla_{CTX-M-15}$ , codant pour une CTX-M du groupe 1, la BLSE la plus prévalente, comme vu dans le **Chapitre 2.3** et faisant partie des agents pathogènes de priorité critique selon l'OMS (**Figure 22, Chapitre 3.3.1**). Le blocage de la transcription devrait permettre de restaurer la sensibilité à la ceftriaxone, C3G co-administrée avec l'oligonucléotide.

La **Figure 30** permet d'expliquer le concept : une bactérie, *E.coli* est schématisée avec dans son cytoplasme son ADN chromosomique et un plasmide porteur du gène  $bla_{CTX-M-15}$ , qu'elle a acquis, codant pour la  $\beta$ -lactamase CTX-M-15.



**Figure 30. Utilisation d'un LON ciblant l'ARNm  $bla_{CTX-M-15}$  en association avec la ceftriaxone chez *E.coli***

LON : lipid-oligonucléotide ; PLP : protéines liant la pénicilline

Explication du schéma dans le paragraphe associé « 2. Concept : Procaryotes »

En temps normal lors d'un traitement par une  $\beta$ -lactamine, ici la ceftriaxone, chez une bactérie contenant un gène de résistance : le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> est transcrit en ARN messager (ARNm *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) [1] puis traduit grâce à l'intervention des ribosomes [2] en protéine, la  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 [3], l'enzyme va venir hydrolyser le pont  $\beta$ -lactame de la ceftriaxone la rendant inactive et ne pouvant plus agir sur ces cibles les PLP [4], la bactérie est donc résistante à la ceftriaxone.

Dans le cas où la ceftriaxone est associée avec un oligonucléotide antisens conjugué à un lipide (LON) [A], la ceftriaxone rentre dans l'espace périplasmique et le LON traverse la paroi et la membrane cytoplasmique pour aller vers sa cible, l'ARNm *bla*<sub>CTX-M-15</sub> [B], comme vu dans la **Figure 27**. l'oligonucléotide va empêcher la traduction soit par blocage stérique soit par clivage par une RNase H [C], la  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 n'est donc pas produite permettant l'action de la ceftriaxone sur sa cible [D], empêchant la synthèse du peptidoglycane et destructurant la paroi, on parle de bactérie re-sensibilisée à la ceftriaxone.

## 3. Matériels et méthodes

### 3.1. Matériels

#### 3.1.1. Oligonucléotides

Les oligonucléotides ont été synthétisés par l'équipe ChemBioPharm (unité ARNA, INSERM U1212, CNRS UMR 5320) en utilisant deux synthétiseurs ADN automatisés différents : un H8 (K&A Laborgeraete, Allemagne) pour des échelles de synthèse de 0,2 à 1  $\mu\text{mol}$  et un AKTA OligoPilot 10 (GE Healthcare, USA) pour des échelles de synthèse de 15 à 50  $\mu\text{mol}$ .

La synthèse d'oligonucléotides est réalisée sur un support solide constitué de billes de verre pour le synthétiseur H8 ou de polystyrène réticulé pour l'AKTA OP10, de l'extrémité 3' à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide. La croissance de l'oligonucléotide fixé sur le support est réalisée par des réactions entre le groupement N,N-diisopropyle du phosphoramidite et l'alcool primaire en position 5' du dernier nucléotide de l'oligonucléotide. La synthèse s'effectue avec des étapes de protection/déprotection successives de l'alcool primaire en position 5' du désoxyribose et des bases. Le cycle de synthèse est constitué principalement des étapes de détritulation, couplage, oxydation (ou thiolation) et *capping*. Le nucléolipide est rajouté à la fin de la synthèse (215). Un schéma simplifié est expliqué en **Annexe 3**.

Les oligonucléotides sont ensuite purifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance et leur concentration est déterminée par spectrophotométrie.

La séquence codante du gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> se compose de 876 paires de bases (pb) (GenBank N° AY044436) et son ARNm comprend une courte région en amont incluant la région de fixation aux ribosomes. Dans un premier temps, pour cibler l'inhibition de la production de la BLSE CTX-M-15, un couple ON <sub>$\alpha$</sub> /LON <sub>$\alpha$</sub>  a été synthétisé en utilisant une séquence précédemment publiée de 25 bases ciblant essentiellement le début de la région codante (168,190). Un screening des séquences à l'aide de la bio-informatique (Dr Nicolas TOURASSE, ARNA, INSERM U1212, CNRS UMR 5320) a permis de définir d'autres séquences potentiellement efficaces, ainsi les séquences utilisées sont listées dans le **Tableau 11**. La structure de l'ARNm CTX-M-15 est en **Annexe 4**.

**Tableau 11. Liste des séquences utilisées**

Nom	Séquence (5'→3') / Longueur (pb)	Structure chimique
$\alpha$ ( $\pm$ Cy5)	GCG CAG TGA TTT TTT AAC CAT GGG A 25	PTO, PTO-L (en 5' et 3')
$\beta$	CGT GTA GGT ACG GCA GAT C 19	PTO, PTO-L (en 5' et 3')
$\gamma$	TGA ACT GGC GCA GTG ATT TTT TAA C 25	PTO, PTO-L (en 5' et 3')
$\delta$	GTC GGC TCG GTA CGG TCG AGA 21	PTO, PTO-L (en 5' et 3')
Contrôle	TGT AGT AGG TTG TGT CTG G 19	PO, PO-L
Séquence 1 ou 20-mer <sub>1</sub>	TC TGG TCA CTT ACT TCA CCC 20	PTO, PTO-L, PO-L
Séquence 2	TG GTC ACT TAC TTC ACC CAG 20	PTO, PTO-L, PO-L
Séquence 3	GG TCA CTT ACT TCA CCC AGC 20	PTO, PTO-L, PO-L
Séquence 4	GT CAC TTA CTT CAC CCA GCC 20	PTO, PTO-L, PO-L
Séquence 5	TC ACT TAC TTC ACC CAG CCT 20	PTO, PTO-L, PO-L

PTO : phosphorothioate ; PO : phosphodiester ; L : couplé au nucléolipide (en 5' si non indiqué)

**Tableau 11 (suite)**

Nom	Séquence (5'→3') / Longueur (pb)	Structure chimique
7-mer <sub>1</sub>	ATA TAT A	7 PTO, PTO-L
7-mer <sub>2</sub>	GGT ACG G	7 PTO, PTO-L
13-mer <sub>1</sub>	TTC CTT ATT CTG G	13 PTO, PTO-L
13-mer <sub>2</sub>	GGT TAT TCC TTC T	13 PTO, PTO-L
19-mer <sub>1</sub>	CGT GTA GGT ACG GCA GAT C	19 PTO, PTO-L
19-mer <sub>2</sub>	TGT AGT AGG TTG TGT CTG G	19 PTO, PTO-L
20-mer <sub>2</sub>	CGG CAC ACT TCC TAA CAA CA	20 PTO, PTO-L
21-mer <sub>1</sub>	ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA	21 PTO, PTO-L
21-mer <sub>2</sub>	CGT GTA GTA CAT GCA GAT C	21 PTO, PTO-L
25-mer <sub>1</sub>	ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT A	25 PTO, PTO-L
25-mer <sub>2</sub>	TGG ACT AGA CCC TAC TAG GAC TAG A	25 PTO, PTO-L

PTO : phosphorothioate ; PO : phosphodiester ; L : couplé au nucléolipide (en 5' si non indiqué)

Pour suivre la localisation des (L)ON, un marqueur fluorescent, la Cyanine-5 a été couplée à l'extrémité 3' du ON<sub>α</sub> et LON<sub>α</sub> donnant respectivement ON<sub>α-Cy5</sub> et LON<sub>α-Cy5</sub>.

### 3.1.2. Souches bactériennes et conditions de culture

Les caractéristiques des souches d'entérobactéries et du plasmide utilisés dans cette étude sont indiqués dans le **Tableau 12**. Les souches ont été cultivées sur milieu liquide ou gélosé, Mueller-Hinton (MH, Bio-Rad) à 37°C en aérobiose. Les bactéries sont stockées à -80°C en milieu Cœur-Cerveau additionné de 20 % de glycérol. La pureté des souches a été vérifiée en réalisant un antibiogramme par la méthode standard de diffusion en milieu gélosé MH selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (56).

**Tableau 12. Caractéristiques des souches et plasmide utilisés**

Souches	Génotype des souches et/ou caractéristique du plasmide	Sensibilité à la CRO
<i>E. coli</i> K12	Souche de génotype sauvage, mutant spontané résistant à l'acide nalidixique et à la rifampicine (Nal <sup>R</sup> Rif <sup>R</sup> )	S
<i>E. coli</i> TcK12	Transconjugant avec le plasmide p3536	R
<i>E. coli</i> 3536 (Ec3536)	Souche d'origine clinique (urines) avec le plasmide conjugatif p3536	R
<i>K. pneumoniae</i> CIP 8291 <sup>T</sup>	Souche de la collection de l'Institut Pasteur contenant un gène de résistance à la gentamicine	S
TcKp/p3536	Transconjugant <i>K. pneumoniae</i> CIP 8291T avec le plasmide conjugatif p3536	R
<b>Plasmide</b>		
p3536	Plasmide conjugatif contenant le gène <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	

CRO : ceftriaxone, S : souche sensible, R : souche résistante

## 3.2. Méthodes

### 3.2.1. Techniques de bactériologie

#### 3.2.1.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La détermination des CMI de la ceftriaxone (CMI<sub>CRO</sub>) a été réalisée sans ou avec (L)ON selon un protocole de micro-dilution en milieu liquide, adapté de celui décrit par le CA-SFM (56).

Dans les cupules d'une microplaque de 96 puits, la ceftriaxone est distribuée après dilution de raison 2 en milieu MH (volume final de 50 µL), selon une gamme allant de 2048 mg/L à 2 mg/L. Puis, un inoculum bactérien standardisé est réalisé. En bref, une suspension bactérienne est effectuée à partir de colonies sur gélose MH (16h de culture à 37°C), en solution salée (0,85 % de NaCl) afin d'atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland (Densimat, BioMérieux), puis diluée au 1/50<sup>ième</sup> en bouillon MH 2X (concentré 2 fois). Cette suspension est diluée 2 fois par addition d'une préparation de (L)ON à une concentration adéquate. Une fois cette suspension bactérienne avec et sans (L)ON réalisée, un volume de 50 µL est distribué dans la gamme de CRO. Un volume final de 100 µL par puits est obtenu correspondant à un inoculum d'*E.coli* d'environ 5.10<sup>4</sup> UFC/100 µL et une concentration fixe de (L)ON de 5 µM (excepté pour les tests dose-effet). Les microplaques sont placées dans une étuve pendant 24h à 35 ± 2°C. La CMI<sub>CRO</sub> est considérée comme la plus petite concentration inhibant toute croissance visible. Une lecture automatisée (Turbidimeter Apollo LB 911, Berthold) à une longueur d'onde (λ) à 620 nm a été effectuée à temps (t), t=0h et t=24h.

#### 3.2.1.2. Expériences de viabilité bactérienne

L'impact des (L)ON sur la viabilité bactérienne a été évalué en mesurant l'absorbance à 620 nm à 24h lors des expériences de CMI.

La croissance bactérienne a également été suivie au cours du temps par le suivi de l'absorbance à 620 nm entre 0 et 9h puis à 24h. La viabilité a été évaluée en absence de ceftriaxone, avec ou sans (L)ON en dénombrant le nombre d'UFC/mL au cours du temps en réalisant des dilutions et en étalant 100 µL sur gélose MH, les résultats étant exprimés en log UFC/mL en fonction du temps.

#### 3.2.1.3. Expériences de conjugaison

Des expériences de conjugaison ont été réalisées afin d'obtenir une souche de *Klebsiella pneumoniae* portant le plasmide p3536. En bref, après 2h de culture en milieu liquide MH de la bactérie donatrice (*E.coli* TcK12, résistante à la ceftriaxone) et de la bactérie réceptrice (*K. pneumoniae* CIP 8291<sup>T</sup>, résistante à la gentamicine), les bactéries concentrées par centrifugation ont été mélangées et déposées sur un filtre de 0,45 µm (Millipore type HA) préalablement placé sur une gélose MH. Après 7 à 18 h d'incubation à 37°C, le filtre est déchargé dans 1 mL de MH,

des dilutions du mélange de raison 10 sont effectuées en milieu MH jusqu'à la dilution  $10^{-3}$ . Les transconjugants sont ainsi sélectionnés par étalement de 100  $\mu\text{L}$  des différentes dilutions du mélange sur milieux sélectifs (ceftriaxone, 50 mg/l et gentamicine à 10 mg/l).

### 3.2.1.4. Visualisation de la localisation des (L)ON

Les  $\text{ON}_{\alpha\text{-Cy5}}$  et  $\text{LON}_{\alpha\text{-Cy5}}$  marqués à la cyanine-5 incubés à une concentration de 5  $\mu\text{M}$  avec  $5 \times 10^4$  UFC/mL d'*E.coli* TcK12 pendant 20h ont été observés en microscopie confocale (grossissement 630x, Détecteur PMT4, Laser 638 nm) sur la plateforme d'imagerie BIC (Bordeaux Imaging Center).

## 3.2.2. Techniques de biologie moléculaire

### 3.2.2.1. Extractions d'ADN et ARN

L'ADN total d'*E.coli* TcK12 a été extrait à partir d'un volume de 6 mL de culture en milieu MH incubée à 37°C pendant une nuit. Après centrifugation, le culot de bactéries a été repris par 500  $\mu\text{L}$  de tampon SET (Tris 20 mM, pH 7,5, EDTA pH 8,0 25 mM, NaCl 75 mM), 50  $\mu\text{L}$  de dodécylsulfate de sodium (SDS) 10 % et 5  $\mu\text{L}$  de lysozyme à 20 mg/mL. Ensuite, les bactéries ont été incubées pendant 1h à 37°C. Après ajout de 220  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M et de 700  $\mu\text{L}$  de chloroforme/alcool isoamylique (V/V, 96/4), la phase aqueuse après centrifugation a été récupérée et les acides nucléiques ont été précipités en utilisant 700  $\mu\text{L}$  d'isopropanol froid. Après centrifugation, les culots d'acides nucléiques ont été lavés avec de l'éthanol 70%, puis repris dans un volume final de 50  $\mu\text{L}$  d'eau ultra-pure, avant d'être traités par 1U de RNase A (Sigma).

Les ARN totaux d'*E.coli* TcK12 ont été extraits par une méthode utilisant du phénol-acide. Après une préculture de 16h, une culture de 2 mlensemencée au  $1/100^{\text{ième}}$  a été réalisée en milieu MH, en présence ou absence de (L)ON (à 5  $\mu\text{M}$ ) et incubée à 37°C pendant environ 3h ( $\text{DO}_{620\text{nm}}$  entre 0,4 et 0,5). Par la suite, un volume de  $1/10^{\text{ième}}$  de solution stop (éthanol absolu/ phénol acide, 95/5) est ajouté, et les bactéries ont été centrifugées pendant 10 min à 3000 g à 4°C. Le culot a été repris dans 440  $\mu\text{L}$  d'eau RNase-free contenant du SDS à un volume final de 1 %. Après 2 min à température ambiante, un volume de 44  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium 3 M pH 5,5 RNase-free (Invitrogen™) et 500  $\mu\text{L}$  de phénol-acide (Sigma-Aldrich) ont été rajoutés, et incubés à température ambiante 10 min en vortexant régulièrement. Après centrifugation (10 min à 13 000 g à 4°C), la phase aqueuse a été récupérée, puis mélangée à volume égal de chloroforme. Cette dernière étape a été réalisée 2 fois, puis les ARN ont été précipités en rajoutant  $1/10^{\text{ième}}$  du volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,5) et 2,5 du volume d'éthanol absolu froid. Chaque culot après centrifugation (10 min à 13 000 g à 4°C), a été lavé avec de l'éthanol 75 %, et suspendu dans un volume final de 30  $\mu\text{L}$  d'eau RNase-free. Cette solution a été incubée 1h à 37°C avec au moins 10U de DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega ; 1U/ $\mu\text{g}$  d'ARN), puis précipitée par un volume de chlorure de Lithium 7,5M. Après un minimum de 30 min à une température de -20°C, les échantillons ont été centrifugés, lavés à l'éthanol 75 %, et repris dans un volume final de 30  $\mu\text{L}$  d'eau RNase-free.

### 3.2.2.1.1. Dosage des acides nucléiques par spectrométrie

La concentration d'ADN et d'ARN a été mesurée à  $\lambda_{260\text{nm}}$  en utilisant le spectrophotomètre, NanoDrop™ (Thermo Scientific™).

La pureté des acides nucléiques est évaluée en mesurant l'absorbance à 280 nm et 230 nm. Le ratio 260/280 permet de détecter une contamination par des protéines, sa valeur doit être entre 1,8 et 2,0 pour de l'ADN et entre 2,0 et 2,2 pour de l'ARN. Le ratio 260/230, détectant la présence de contaminants (Phénol, EDTA....) doit se situer entre 2,0 et 2,2.

### 3.2.2.1.2. Evaluation de la qualité des acides nucléiques

#### *Révélation par électrophorèse en gel d'agarose*

Les extraits d'ADN et ARN (additionnés d'un 1/10<sup>ième</sup> de volume avec un colorant de migration Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega)) sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose de 1% à 1,5 % (p/v) auquel on rajoute 0,5 à 1  $\mu\text{L}$  de SYBR® Safe DNA Gel Stain, réalisé en tampon TBE 0,5 X (Tris-HCl 90 mM ; acide borique 90 mM ; EDTA 2,5 mM ; pH 8,0), sous une tension d'environ 3 V/cm. Après électrophorèse, le gel est observé en lumière bleue (UVI-Blue Transilluminator, UVITEC), puis photographié à l'aide du logiciel Gel Smart (Clara Vision) par le biais du système d'acquisition d'images Gel Smart (Clara Vision). Les tailles des fragments de restriction sont comparées à celles d'un marqueur de poids moléculaire (DNA ladder 1 kb (Promega)).

#### *Utilisation de puce AGILENT*

Une visualisation plus sensible (conditions RNase-free) de la qualité des ARN est réalisée sur puce microfluidique AGILENT (Agilent RNA 6000 Nano) en suivant les recommandations du fournisseur. Brièvement, 1,5  $\mu\text{L}$  d'ARN sont dénaturés à 72°C pendant 2 min puis placés dans la glace, 1  $\mu\text{L}$  de chaque ARN ou 1  $\mu\text{L}$  de marqueur de taille (ladder) est déposé dans les puits de la puce préalablement préparée avec le Gel-Dye mix et le RNA marker. La puce est ensuite placée dans le bioanalyseur Agilent 2100 permettant de réaliser une électrophorèse capillaire. Les ARN sont séparés en fonction de leur mobilité électrophorétique, l'analyse des électrophorégrammes permet de calculer le RIN (RNA Integrity Number) ; l'ARN extrait de bactéries est considéré de bonne qualité (peu dégradés) si le RIN est supérieur ou égal à 7.

### **3.2.2.2. Amplifications par PCR**

En vue de réaliser la transcription *in vitro* afin d'obtenir des transcrits du gène de la  $\beta$ -lactamase CTX-M-15, ainsi que du gène de ménage *cysG* (codant pour la sirohème synthase ou Uroporphyrinogen-III C-methyltransferase), une amplification par PCR a tout d'abord été réalisée en utilisant une amorce sens possédant en 5' la séquence du promoteur de la T7 RNA polymérase (TAATACGACTCACTATAGGG). Les amorces utilisées sont répertoriées dans le **Tableau 13**.

Les amplifications par PCR ont été effectuées avec la GoTaq Flexi® (ADN polymérase thermostable), selon le protocole standard préconisé par le fournisseur (Promega). Un total de 35 cycles d'amplification et une température d'hybridation des amorces de 62°C ont été utilisés. Une quantité de 1 ng d'ADN total d'*E. coli* TcK12 a été rajoutée par réaction.

La taille et la qualité des amplicons obtenues ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % comme décrit précédemment.

**Tableau 13. Amorces utilisées dans cette étude**

Amorce	Séquence (5' → 3')	Localisation
<b>Amorces utilisées pour les expériences de PCR en vue de la transcription <i>in vitro</i></b>		
T7_CTXM15F_iv	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTATCTTCCAGAATAAGGAATC</u>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
CTXM15R_iv	CATCACTTTACTGGTGTGCACATC	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
T7_cysGF_iv	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCCAATTACGCGATCGCGAC</u>	<i>cysG</i>
cysGR_iv	GAGAACCAGTTCAGTTTATCGCGCAG	<i>cysG</i>
T7_gapAF_iv	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCTGGTGAATATATGAC</u>	<i>gapA</i>
gapAR_iv	TTTCTGAGTAGCGGTAGTA	<i>gapA</i>
<b>Amorces utilisées pour la RT-qPCR</b>		
CTXM15_F	TGTGCCGCTGTATGCGCAAA	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
CTXM15_R	TGCTGTGTTAATCAATGCCACAC	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
cysG_1F	ATTCGGTTCTCGGTGGTTCC	<i>cysG</i>
cysG_1R	CCAGCGTCTGTTTTCTGCC	<i>cysG</i>
RT_gap1	TGTTGACGTTGTCGCTGA	<i>gapA</i>
RT_gap2	TTTCTGAGTAGCGGTAGTA	<i>gapA</i>

*bla*<sub>CTXM-15</sub> : gène codant pour la β-lactamase CTX-M-15, *cysG* : gène codant pour la sirohème synthase (Uroporphyrinogen-III C-méthyltransferase), *gapA*, gène codant pour la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; souligné : séquence du promoteur T7

### 3.2.2.3. Transcription *in vitro*

La transcription *in vitro* a été réalisée à partir des produits de PCR précédemment obtenus et vérifiés contenant en 5' la séquence de la T7 RNA polymérase. Une étape préalable de purification (élimination des amorces) a été effectuée. Une quantité d'environ 2 µg de produits de PCR dans un volume de 100 µL a été déposée sur une colonne G25 (Microspin G25 columns, Illustra™). Ce volume de produits de PCR ainsi filtré, a été dilué de 2 fois avec de l'eau RNase-free, et 200 µL de phénol (pH, 8,0). Après mélange et centrifugation (13 000 g, 4 min à 4°C), un volume (200 µL) de chloroforme est ajouté à la phase aqueuse. Après centrifugation, 1/10<sup>ième</sup> du volume de NaCl 4M RNase-free et 3 volumes d'éthanol absolu ont été rajoutés à la phase aqueuse. Le culot d'ADN obtenu après centrifugation et lavage à l'éthanol 75 %, a été repris dans 12 µL d'eau RNase-free et la concentration d'ADN a été mesurée à 260 nm au NanoDrop™.

La transcription *in vitro* a été effectuée avec le kit MEGAscript™ T7 Transcription comme préconisé par le fournisseur (Invitrogen™). En bref, 1,5 µg d'ADN a été mélangé avec un tampon contenant les 4 NTPs (nucléosides triphosphates) (concentration finale de 7,5 mM) et de la T7 ARN polymérase dans un volume final de 10 µL. Le tout a été incubé 4h à 37°C. Pour éliminer la matrice d'ADN, un traitement avec 2 U de DNase a été réalisé (15 min à 37°C). Après avoir dilué avec 115 µL d'eau RNase-free, 15 µL d'acétate NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (5 M) et 150 µL de phénol acide (pH, 5,0), le mélange a été incubé 10 min à température ambiante en vortexant régulièrement. Après centrifugation (13 000 g, 4 min), 150 µL de chloroforme sont ajoutés à la phase aqueuse. Après une seconde centrifugation, les ARN contenus dans la phase aqueuse ont été précipités avec 150 µL d'isopropanol froid et incubée à -20°C pendant au moins 1h, puis récupérés après centrifugation et lavage dans l'éthanol 75%, dans un volume final de 50 µL d'eau RNase-free. Les échantillons ont été filtrés sur colonne G25. La concentration des ARN a été évaluée (NanoDrop™), puis ils ont été aliquotés et stockés à -80°C.

### 3.2.2.4. Expériences de reverse-transcriptase PCR quantitative (RT-qPCR)

Les expériences de RT-qPCR ont été effectuées à partir des transcrits *in vitro* (*bla*<sub>CTX-M-15</sub> et *cysG*) comme décrit précédemment pour réaliser la gamme étalon (10<sup>7</sup> à 10<sup>3</sup> copies d'ARN/µL) et des différents ARN extraits en présence ou non de (L)ON pour les quantifications absolues et relatives.

Pour les expériences de quantification relative, les ARN d'un autre gène de ménage *gapA*, codant pour la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), ont été utilisés.

Chaque gamme a été réalisée en duplicate. Pour les ARN à tester, une ou plusieurs dilutions ont été effectuées. Les amorces utilisées sont répertoriées dans le **Tableau 13**.

Le protocole utilisé est celui du kit GoTaq qRT-PCR Master (technologie utilisant le BRYT Green® Dye, un colorant fluorescent de liaison à l'ADN) comme recommandé par le fournisseur (Promega). En bref, après une étape de *reverse transcription* (42°C, 20 min), 40 cycles ont été réalisés avec une étape d'hybridation des amorces choisies à 60°C. Une courbe de fusion a été programmée (de 60°C à 95°C, avec un incrément de 0,5°C toutes les 5s). Les thermocycleurs utilisés ont été les appareils suivants (BIO-RAD) : MyIQ™ et CFX96 Touch™ et les résultats ont été analysés avec les logiciels MyIQ™ 1.0 et CFX Manager™ 3.0.

La quantification relative (R) utilise le calcul (ΔΔCt) suivant :

$$R = 2^{-\left( \text{Ct}_{\text{CTX-M-15}} - \text{Ct}_{\text{ménage avec (L)ON}} \right) - \left( \text{Ct}_{\text{CTX-M-15}} - \text{Ct}_{\text{ménage sans (L)ON}} \right)}$$

### 3.2.3. Techniques d'étude des protéines

#### 3.2.3.1. SDS-PAGE et WESTERN BLOT

Les protéines totales d'*E.coli* TcK12 ont été extraites à partir d'une préculture diluée au 1/100<sup>ième</sup> en milieu MH en présence ou absence de (L)ON (à 5  $\mu$ M) et incubée à 37°C pendant environ 3h ( $DO_{620nm}$  entre 0,4 et 0,5). Les échantillons de 1 mL ont été centrifugés pendant 10 min à 5000 g à 4°C puis les culots ont été repris dans 40  $\mu$ L de tampon urée, 5  $\mu$ L de Laemmli 4X et 5  $\mu$ L de DTT (dithiothréitol) 1M, les échantillons sont conservés à 4°C.

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide (gel de concentration 4 %, gel de séparation 11 %, tampon de migration TGS (Tris-Glycine-SDS) 1X). Deux gels sont réalisés en parallèle, l'un pour visualiser les protéines totales après coloration au bleu de Coomassie, l'autre gel est révélé en WesternBlot par un transfert sur membrane PVDF (PolyVinylidèneFluoride) (ThermoScientific). La quantité de la protéine CTX-M-15 (33 kDa) est normalisée par rapport à celle de la protéine GroEL (58 kDa). Les anticorps primaires utilisés sont un anti-CTX-M-1 (Cuzabio), et un anti-GroEL (Abcam), les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase permettent de révéler par chimiluminescence grâce aux réactifs Clarity™ Western ECL substrate (Bio-Rad) et le système ChemiDoc™ et ChemiDoc MP Imaging (Biorad). Les résultats ont été analysés avec le logiciel ImageJ.

#### 3.2.3.2. Nitrocéfine

L'activité de la  $\beta$ -Lactamase est mesurée grâce à une méthode colorimétrique utilisant la nitrocéfine, une céphalosporine chromogénique qui change de couleur du jaune au rouge lorsqu'elle est hydrolysée. Une suspension bactérienne de 0,5 McF est préparée et diluée au 1/100<sup>ième</sup> en bouillon MH (inoculum de  $10^6$  UFC/mL), 50  $\mu$ L de cette suspension est distribuée dans une microplaque où au préalable 50  $\mu$ L de (L)ON à la dilution souhaitée a été répartie. Un volume final de 100  $\mu$ L par puits est obtenu correspondant à un inoculum d'*E.coli* d'environ  $5 \cdot 10^4$  UFC/100  $\mu$ L et une gamme de concentration allant de 0,5 à 5  $\mu$ M de (L)ON, ou avec une concentration fixe de 5  $\mu$ M. La plaque est incubée à 37°C pendant 5h. Ensuite, 11  $\mu$ L de solution de nitrocéfine 500 mg/mL (Thermo Scientific Oxoid™) est ajoutée dans chaque puits pour obtenir une concentration finale de 50 mg/mL, une lecture automatisée (Turbidimeter Apollon LB 911, Berthold) est effectuée en continu à partir de l'ajout de la nitrocéfine, pendant 45 min à une longueur d'onde de 492 nm.

## 4. Résultats

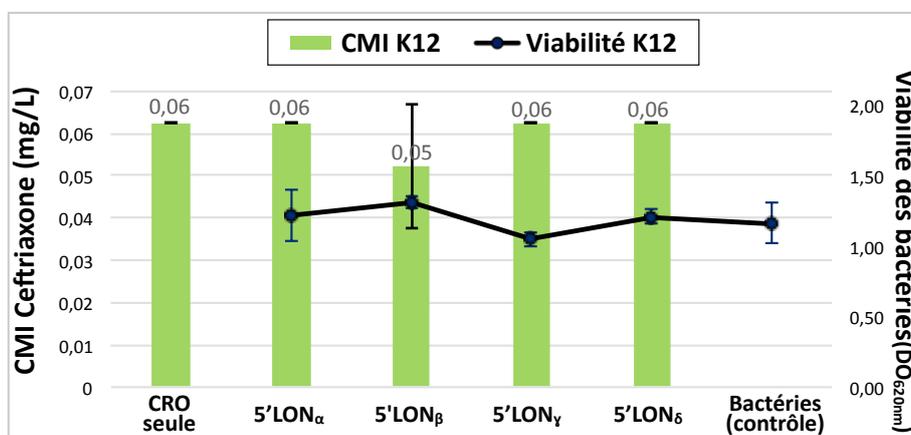
### 4.1. Etude de l'effet des (L)ON chez les bactéries

#### 4.1.1. Effet sur la CMI<sub>CRO</sub> des différents *E.coli*

*E.coli* Ec3536 est un isolat issu d'un prélèvement urinaire d'un patient de la communauté (59). Une caractérisation précédente a montré que cette souche d'*E.coli* contient un plasmide conjugatif (p3536) avec le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Aucun autre gène acquis de  $\beta$ -lactamases connu n'a été mis en évidence dans cet isolat. Le plasmide p3536 a été transféré par conjugaison à une souche réceptrice d'*E.coli* K12 (résistante à l'acide nalidixique et à la rifampicine). Ainsi *E.coli* K12 (souche sensible à la Ceftriaxone (CRO)) et TcK12 (transconjugant résistant à la CRO) sont les mêmes souches qui ne diffèrent que par la présence de p3536. L'antibiogramme de la souche *E.coli* TcK12 est visible en **Annexe 5**.

Dans un premier temps, 4 séquences d'oligonucléotides ont été étudiées : les séquences  $\alpha$  (de la littérature (168,190)),  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . Elles ont été synthétisées en chimie PTO avec le lipide en 5' (5'LON) ou sans lipide (ON). La séquence contrôle LON<sub>contrôle</sub> précédemment publiée (218) est en chimie PO. La CMI de la ceftriaxone (CMI<sub>CRO</sub>) a été déterminée en présence ou en absence de ces (L)ON sur les 3 souches d'*E.coli* : K12, TcK12 et Ec3536.

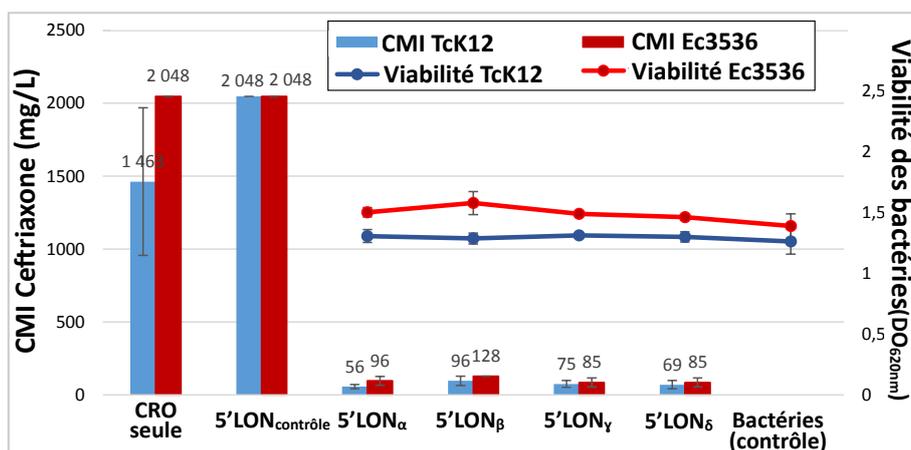
La souche sensible, *E.coli* K12 a une CMI<sub>CRO</sub> de 0,06 mg/L. On remarque qu'aucun 5'LON (à la concentration de 5  $\mu$ M) n'affectent la CMI (**Figure 31**).



**Figure 31. CMI<sub>CRO</sub> et viabilité de la souche sensible *E.coli* K12**

CMI de la ceftriaxone seule ou en présence de 5'LON à 5  $\mu$ M. Viabilité bactérienne évaluée par l'absorbance à 620 nm en absence de ceftriaxone, à 24h d'incubation

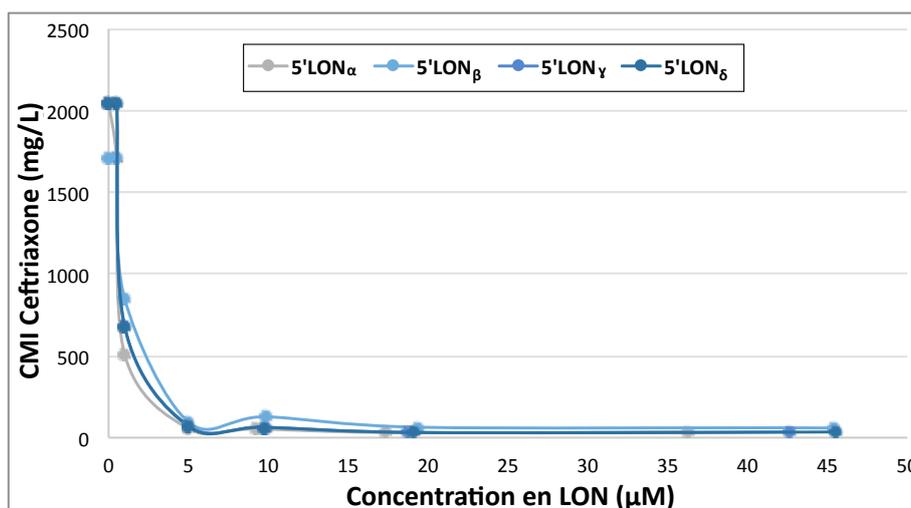
Concernant les souches résistantes, *E.coli* TcK12 a une CMI<sub>CRO</sub> de 1463 mg/L et *E.coli* Ec3536 de 2048 mg/L. On constate que les LON (5  $\mu$ M) diminuent de façon assez importante la CMI : de 15 (5'LON $\beta$  chez Ec3536) à 26 fois (5'LON $\alpha$  chez TcK12). Tandis que le LON<sub>contrôle</sub> n'a aucun effet sur la CMI (**Figure 32**).



**Figure 32. CMI<sub>CRO</sub> et viabilité des souches résistantes *E.coli* TcK12 et Ec3536**

CMI de la ceftriaxone seule ou en présence de 5'LON à 5 μM. Viabilité bactérienne évaluée par l'absorbance à 620 nm en absence de ceftriaxone, à 24h d'incubation

La concentration de 5 μM a été retenue car elle représente la concentration la plus faible pour laquelle la plus faible CMI est observée. En effet, un effet dose-dépendant a été observé (Figure 33).



**Figure 33. CMI<sub>CRO</sub> en fonction de la concentration en 5'LON chez *E.coli* TcK12**

CMI de la ceftriaxone seule ou en présence de 5'LON à différentes concentrations (μM) à 24h d'incubation

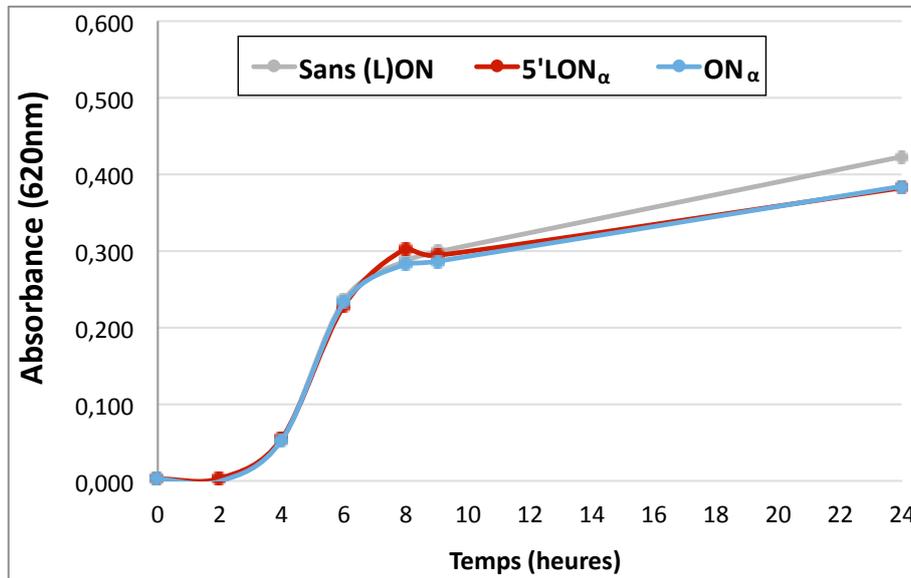
### 4.1.2. Viabilité bactérienne

Il est important de s'assurer que le lipide n'a pas un effet bactéricide en l'absence de la ceftriaxone, c'est pour cela que la viabilité a été évaluée par la mesure de l'absorbance à 620 nm en l'absence de ceftriaxone à 24h des souches en présence ou absence de LON.

L'absorbance est sensiblement identique en absence (Bactéries contrôles) ou en présence de LON et quelque soit la séquence et souche bactérienne sensible ou résistante (Figure 31 et 32).

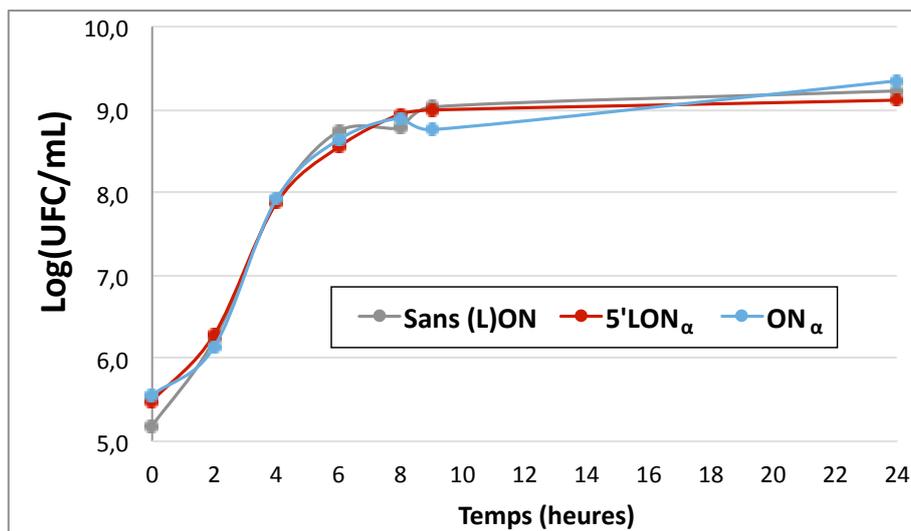
Afin de confirmer cette évaluation à 24h, un suivi des absorbances a été réalisé entre 0 et 9h à des temps réguliers puis à 24h et un suivi de la quantification des bactéries (en UFC/mL) a été effectué en parallèle. Pour cette étude, la séquence  $\alpha$  (chimie PTO) a été choisie.

Les courbes obtenues sont superposables, on remarque que l'oligonucléotide en absence (ON) ou en présence du lipide (LON) n'affecte ni l'absorbance (**Figure 34**) ni la quantité de bactéries (**Figure 35**) par rapport à la souche sans (L)ON.



**Figure 34. Suivi des absorbances au cours du temps chez *E.coli* TcK12**

Absorbances à 620 nm, en absence de ceftriaxone, mesures entre 0 et 9h à des temps réguliers puis à 24h, en présence ou absence de (L)ON $\alpha$



**Figure 35. Suivi de la quantification bactérienne au cours du temps chez *E.coli* TcK12**

Quantification en UFC/mL en absence de ceftriaxone, mesures entre 0 et 9h à des temps réguliers puis à 24h, en présence ou absence de (L)ON $\alpha$

### 4.1.3. Localisation des (L)ON

La fluorescence par microscopie confocale a permis de montrer la localisation intra-bactérienne du 5'LON $\alpha$ -Cy5 alors que le ON $\alpha$ -Cy5 ne présentait qu'un bruit de fond. Ceci signifie que le lipide permet l'entrée de l'oligonucléotide dans la bactérie.

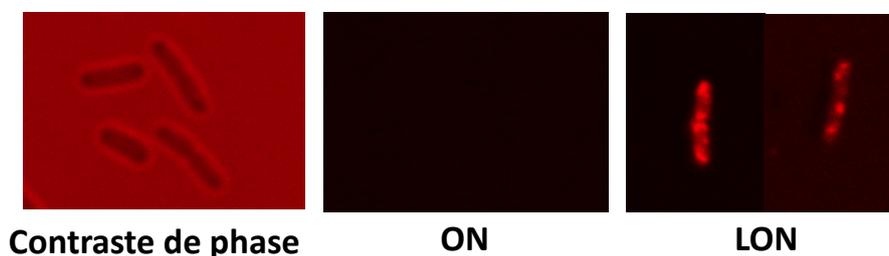


Figure 36. Images en microscopie confocale localisation des (L)ON chez *E.coli* TcK12  
Utilisation de la séquence  $\alpha$  (PTO) couplé à la Cyanine 5 en 3' (5  $\mu$ M)

### 4.1.4. Importance des modifications chimiques

Certaines modifications chimiques des oligonucléotides sont essentielles pour observer une diminution de la CMI<sub>CRO</sub>.

Premièrement, le nucléolipide est indispensable. En effet, les oligonucléotides ON non conjugués n'affectent pas la CMI<sub>CRO</sub> et cela peu importe la souche, qu'elle soit résistante (**Figures 37 et 38**) ou sensible (**Figure 39**). La CMI<sub>CRO</sub> reste proche de celle en l'absence d'oligonucléotide (1468 mg/L pour TcK12, 2048 mg/L pour Ec3536 et 0,06 mg/L pour K12 (**Figures 31 et 32**)).

Comme vu précédemment, la présence du lipide en 5' diminue de façon assez importante la CMI<sub>CRO</sub> chez les souches résistantes (**Figures 32, 37 et 38**) alors qu'elle est inchangée pour la souche sensible (**Figures 31 et 39**).

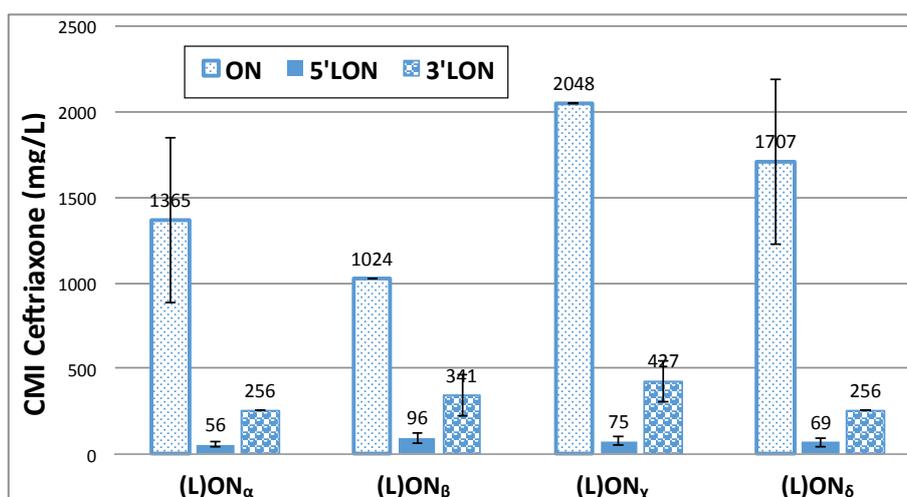
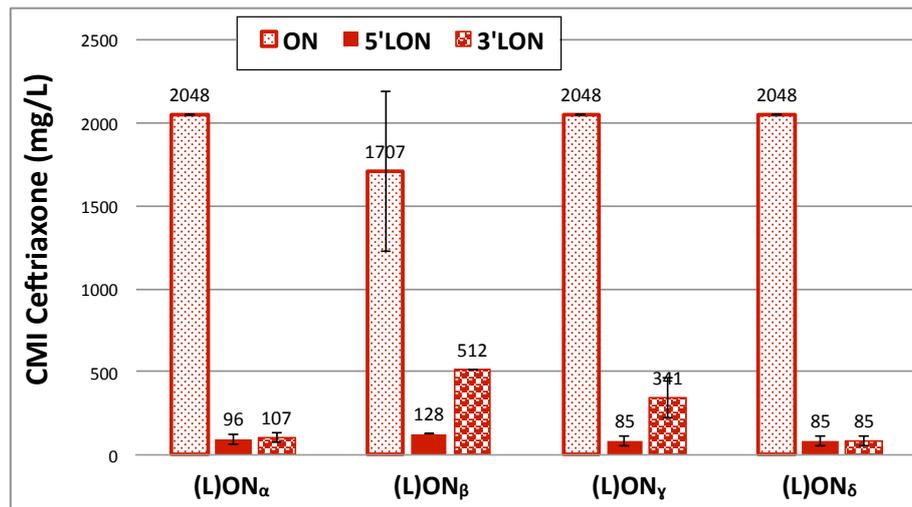


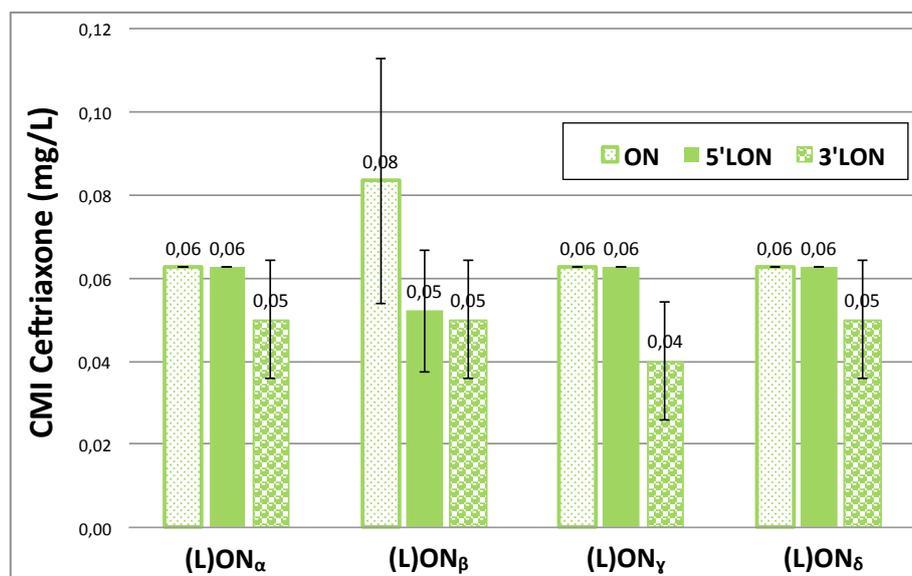
Figure 37. Impact du nucléolipide conjugué aux oligonucléotides sur la CMI<sub>CRO</sub> chez *E.coli* TcK12  
Oligonucleotides en chimie PTO conjugués ou non à un nucléolipide en 5' ou 3'.

Pour savoir si la localisation du lipide sur l'oligonucléotide a une importance, les oligonucléotides (séquences  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) ont été synthétisés avec le nucléolipide conjugué en 3'. Le lipide en 3' n'affecte pas la CMI<sub>CRO</sub> de la souche sensible (**Figure 39**) et diminue celle des souches résistantes tout comme le lipide en 5' (**Figures 37** et **38**). Néanmoins, il semble que la diminution soit moindre qu'avec le lipide en 5' chez *E.coli* TcK12 (**Figure 37**) pour toutes les séquences et pour les LON  $\beta$  et  $\gamma$  chez *E.coli* Ec3536 (**Figure 38**). L'utilisation du lipide en 5' sera donc privilégiée dans la suite des expériences.



**Figure 38. Impact du nucléolipide conjugué aux oligonucléotides sur la CMI<sub>CRO</sub> chez *E.coli* Ec3536**

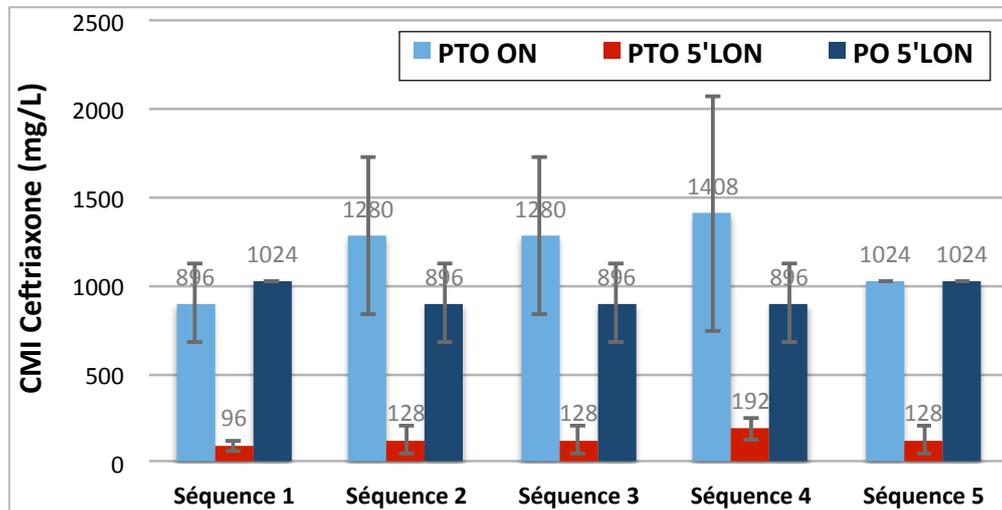
Oligonucleotides en chimie PTO conjugués ou non à un nucléolipide en 5' ou 3'.



**Figure 39. Impact du nucléolipide conjugué aux oligonucléotides sur la CMI<sub>CRO</sub> chez *E.coli* sensible K12**

Oligonucleotides en chimie PTO conjugués ou non à un nucléolipide en 5' ou 3'.

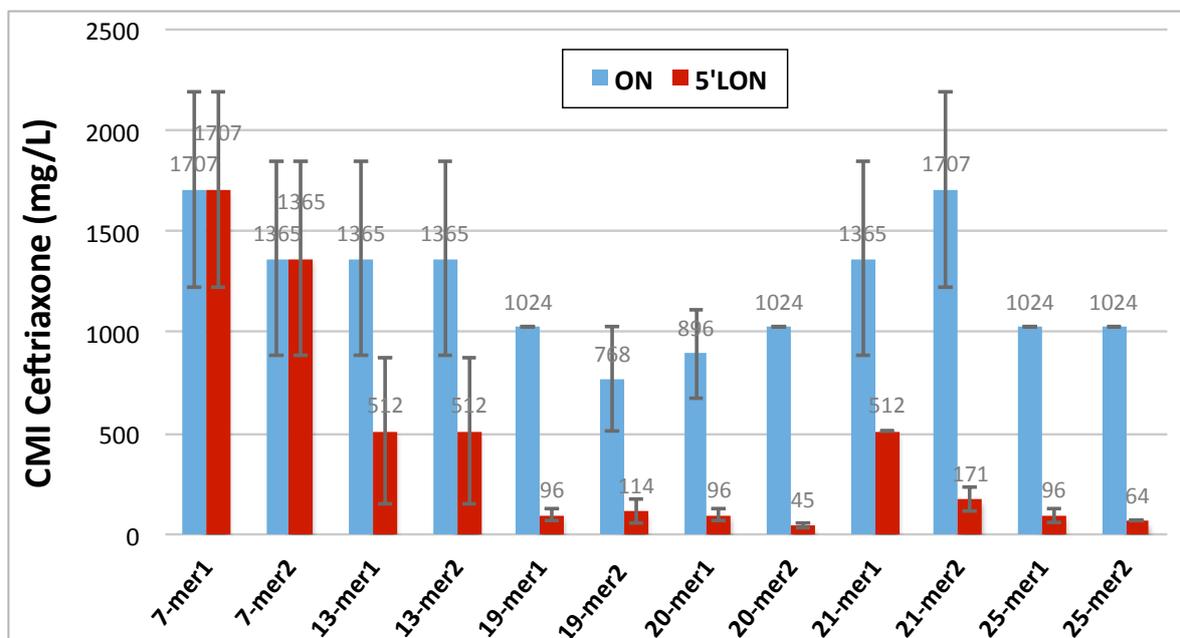
Deuxièmement, l'utilisation d'oligonucléotides en chimie PTO (phosphorothioate, avec un atome de soufre) (**Figure 28 4.3.2.2**) est nécessaire. En effet, les oligonucléotides PO (phosphodiester avec un atome d'oxygène), ne parviennent pas à diminuer la CMI<sub>CRO</sub> (**Figure 40**). Dans la littérature, il est montré que la chimie PTO permet une meilleure stabilité des oligonucléotides vis-à-vis des nucléases et donc indispensable pour qu'ils puissent exercer leur action (162).



**Figure 40. Impact de la modification chimique au niveau du phosphate des oligonucléotides sur la CMI<sub>CRO</sub> chez *E.coli* TcK12**

Oligonucléotides (séquences 1 à 5 non complémentaires) avec ou sans lipides en 5' en chimie PO ou PTO

Troisièmement, l'influence de la longueur de l'oligonucléotide a été étudiée en synthétisant des oligonucléotides de différentes longueurs de 7 à 25 paires de bases. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les séquences de 19 à 25 pb (**Figure 41**).



**Figure 41. Impact de la longueur de l'oligonucléotide sur la CMI<sub>CRO</sub> chez *E.coli* TcK12**

Utilisation d'oligonucléotides de différentes longueurs de 7 à 25 paires de bases avec ou sans lipide en 5'.

## 4.1.5. Expériences préliminaires

### 4.1.5.1. Utilisation d'autres $\beta$ -lactamines

L'utilisation des LON en association avec d'autres  $\beta$ -lactamines que la ceftriaxone a été analysée sur 4 autres  $\beta$ -lactamines : l'ampicilline, une aminopénicilline, la céfalexine une céphalosporine de 1<sup>ère</sup> génération orale (C1G), le céfixime et cefpodoxime des C3G orales. Les oligonucléotides  $\alpha$ ,  $\delta$  et 20-mer2 ont été choisis étant les 5'LON pour lesquels les CMI<sub>CRO</sub> sont les plus basses chez *E.coli* TcK12 (respectivement : 56 mg/L, 69 mg/L et 45 mg/L).

S'agissant d'expériences préliminaires, chaque LON a été testé pour chaque  $\beta$ -lactamines qu'un nombre limité de fois. Il en ressort cependant que le 5'LON $_{\alpha}$  ne diminue pas la CMI de l'ampicilline, diminue la CMI du céfixime, cefpodoxime et la céfalexine respectivement de 4, 2,7 et 4,8 fois. Les 5'LON $_{\delta}$  et 20-mer2 diminuent les CMI de la céfalexine et du cefpodoxime de 2,7 à 4 fois.

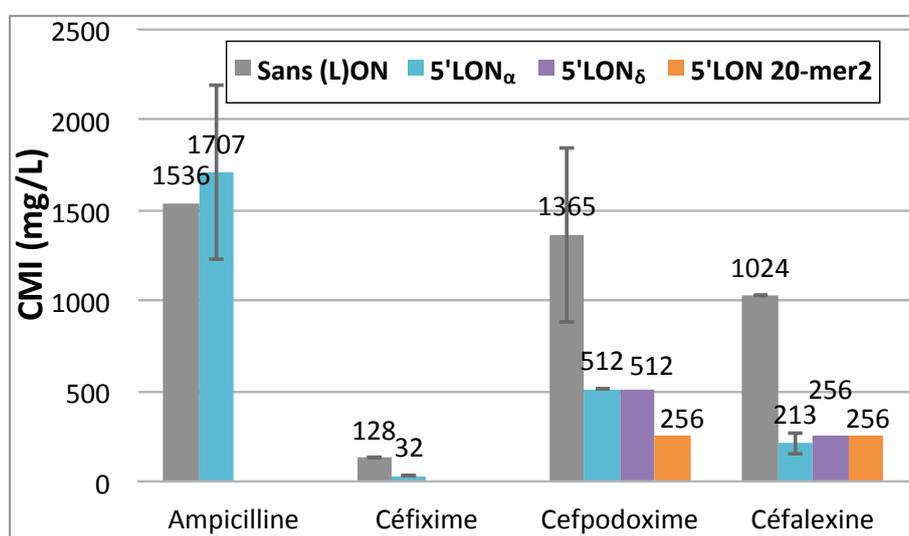


Figure 42. CMI de 4  $\beta$ -lactamines avec ou sans 5'LON chez *E.coli* TcK12

n= 2 (absence d'écart type) ou n= 3 (écarts types)

### 4.1.5.2. Essais sur *K.pneumoniae*

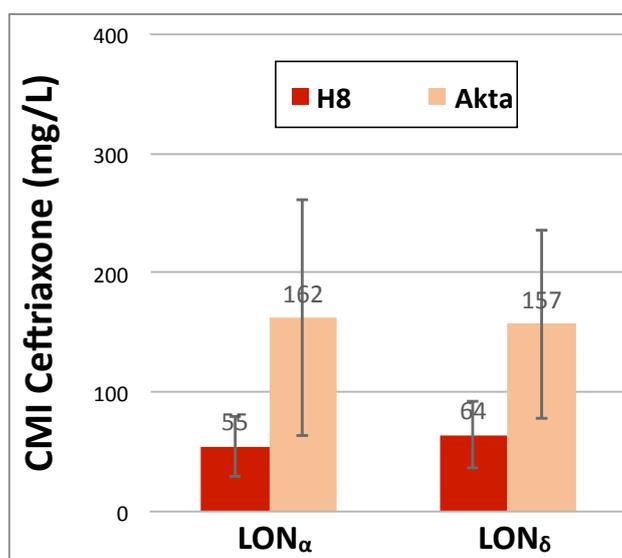
Il est intéressant de connaître le comportement des LON sur une autre entérobactérie que *E.coli*. Le choix s'est porté sur l'utilisation d'une *K.pneumoniae* (souche CIP 8291<sup>T</sup>) dont les colonies sont plus muqueuses que celle d'*E.coli*, pour savoir si les LON arrivent à traverser la capsule.

La CMI du transconjugant *K.pneumoniae* TcKp/p3536 porteur du plasmide p3536 n'a pu être déterminée que peu de fois ( $\leq 2$ ) pour tester les LON. La diminution de la CMI de la ceftriaxone chez TcKp/p3536 variait de seulement 2 à 8 fois avec les 5'LON $_{\alpha}$  et 5'LON $_{\delta}$ . Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour tester la reproductibilité de ces expériences.

### 4.1.5.3. Synthèse importante des (L)ON

Chaque expérience réalisée utilise quelques nanomoles d'oligonucléotides, la répétabilité et la diversité des tests nécessitent des quantités importantes d'oligonucléotides. Le synthétiseur H8 permet de synthétiser de 0,2 à 1  $\mu\text{mol}$ , la synthèse est donc rapidement épuisée et nécessite de réaliser des nouveaux lots. C'est pour cela qu'en produire en plus grosse quantité est indispensable pour réaliser des expériences à plus grande échelle ; le synthétiseur Akta OligoPilot 10 permet d'avoir de plus grandes quantités d'oligonucléotides allant de 15 à 50  $\mu\text{mol}$ .

Seuls les (L)ON  $\alpha$  et  $\delta$  ont également été synthétisés sur l'Akta en plus grosse quantité. De façon inattendue, les  $\text{CMI}_{\text{CRO}}$  obtenues avec ces oligonucléotides nouvellement synthétisés avec l'Akta étaient 2 à 3 fois plus élevées qu'avec le synthétiseur H8 (**Figure 43**).



**Figure 43.**  $\text{CMI}_{\text{CRO}}$  en présence de 5' LON issus de synthétiseurs différents, chez *E.coli* TcK12  
5' LON synthétisés par H8 (échelle de quantité plus petite, 0,2-1  $\mu\text{mol}$ ) et Akta (échelle 15-50  $\mu\text{mol}$ )

## 4.2. Etude du mécanisme d'action

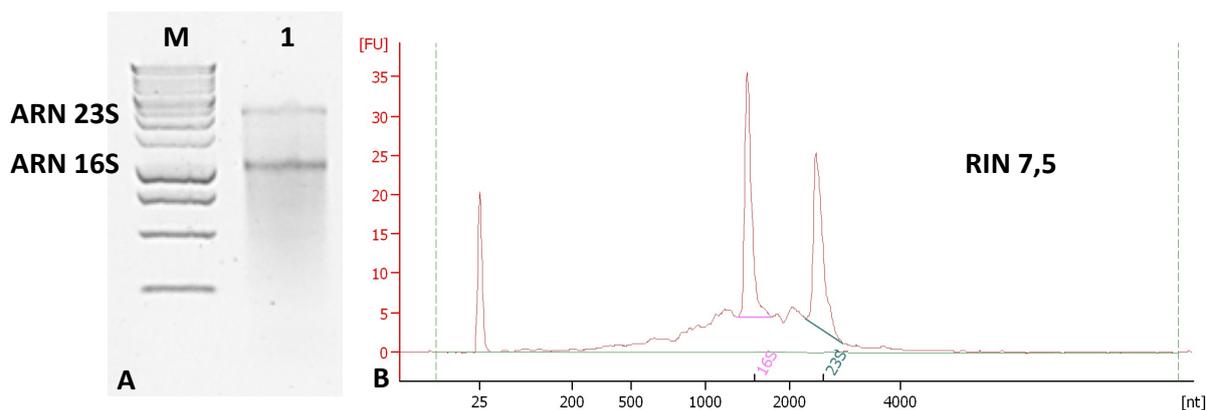
### 4.2.1. Au niveau de l'ARNm CTX-M-15

#### 4.2.1.1. Extraction des ARN

Différentes méthodes ont été utilisées pour extraire les ARN (non décrites dans la section Méthodes), incluant une technique utilisant le réactif TRIzol<sup>®</sup> Max<sup>™</sup> Bacterial RNA Isolation et le réactif TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Sigma-Aldrich). La méthode retenue utilise du phénol-acide suivie par un traitement à la DNase, comme décrite dans la section Matériel et Méthodes **3.2.2.1**. La qualité des ARN extraits a tout d'abord été vérifiée après électrophorèse en gel d'agarose, comme montré sur la **Figure 44 A**, puis, cette qualité a été contrôlée à l'aide d'une puce Agilent<sup>®</sup> (micro-gel) (**Figure 44 B**).

Un score ou RIN (pour RNA Integrity Number) allant de 1 à 10 mesure compare les ARN ribosomiques 16S et 23S. Si ce score est supérieur à 7,0, il correspond à une extraction pour laquelle les ARN sont de bonne qualité et peu dégradés et peuvent être utilisés pour les expériences de RT-qPCR. Des scores RIN compris entre 7,0 et 7,5 ont été obtenus pour toutes les extractions d'ARN utilisées pour la suite des expériences.

Nous avons extrait les ARN totaux de la souche *E.coli* TcK12 sans (L)ON, en présence de (5'L)ON  $\alpha$ ,  $\delta$  et contrôle.



**Figure 44. Exemple d'ARN totaux extraits visualisés en gel d'agarose et puce Agilent®**

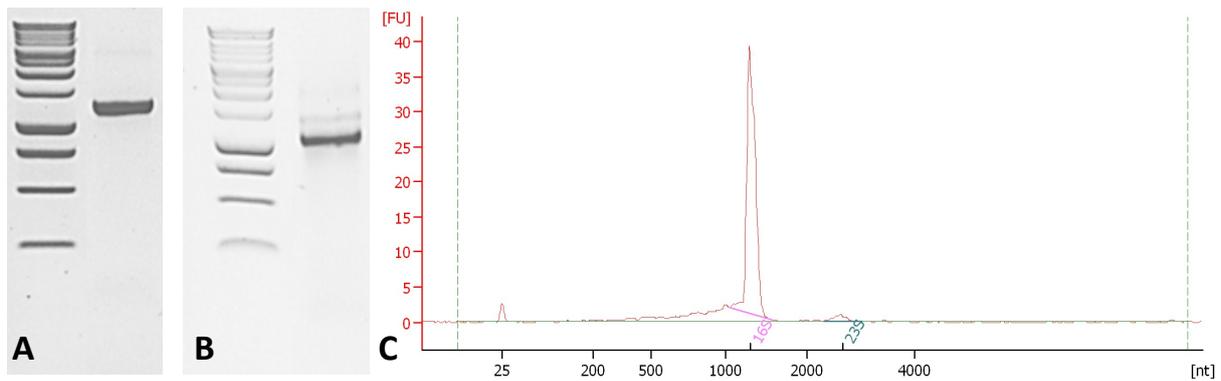
**A.** Résultats obtenus après électrophorèse en gel d'agarose 1 % des ARN totaux extraits par la méthode utilisant du phénol acide. Piste M, marqueur de taille. Piste 1 : ARN d'*E.coli* TcK12 sans (L)ON. La position des ARN ribosomiques 23S et 16S est indiquée. **B.** Résultats du même ARN obtenus par la puce Agilent®, le premier pic étant le marqueur de taille et les 2 pics suivants l'ARN 16S et 23S, le RIN était de 7,5

#### 4.2.1.2. Transcription *in vitro*

Dans le but de faire de la quantification absolue par RT-qPCR, l'obtention de transcrits *in vitro* est nécessaire pour réaliser une gamme étalon. Pour cela nous avons besoin des transcrits du gène d'intérêt *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et d'un gène de ménage pour normaliser.

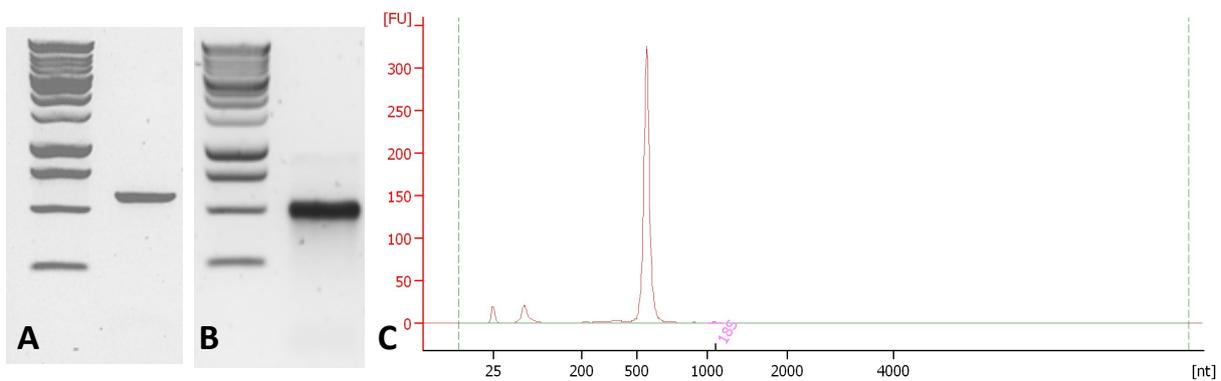
Initialement, nous avons choisi le gène *cysG* comme gène de ménage, codant pour une enzyme, sirohème synthase (ou Uroporphyrinogen-III C-méthyltransferase). En effet, dans une publication sur l'étude des mécanismes de résistance/adaptation d'oligonucléotides antisens (PNA conjugué à un CPP) utilisés pour inhiber l'expression du gène de la  $\beta$ -lactamase TEM-1, ce gène *cysG* avait été utilisé comme gène de ménage (219,220). Cependant, nous verrons qu'il ne convenait pas pour notre étude et nous avons décidé d'utiliser le gène *gapA* codant pour la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase comme gène de ménage.

L'obtention des transcrits *cysG* et *gapA* (synthétisé dans un second temps) ont été sans difficulté, en effet après amplification par PCR en utilisant les couples d'amorces adéquats, un amplicon a été obtenu et utilisé pour réaliser la transcription *in vitro*. Les résultats présentés sur les **Figure 45 et 46** montrent la présence de transcrits uniques et de bonne qualité.



**Figure 45. Transcrit *in vitro* du gène *cysG***

**A.** Produit de PCR du gène *cysG* avec les amorces T7\_*cysGF\_iv/cysGR\_iv* sur gel d'agarose (1324 pb). **B.** Transcrit du gène *cysG* obtenu par transcription *in vitro* à partir du produit de PCR sur gel d'agarose et **C.** en puce Agilent® (1305 pb : soustraction de 19 pb correspondant à la séquence T7)



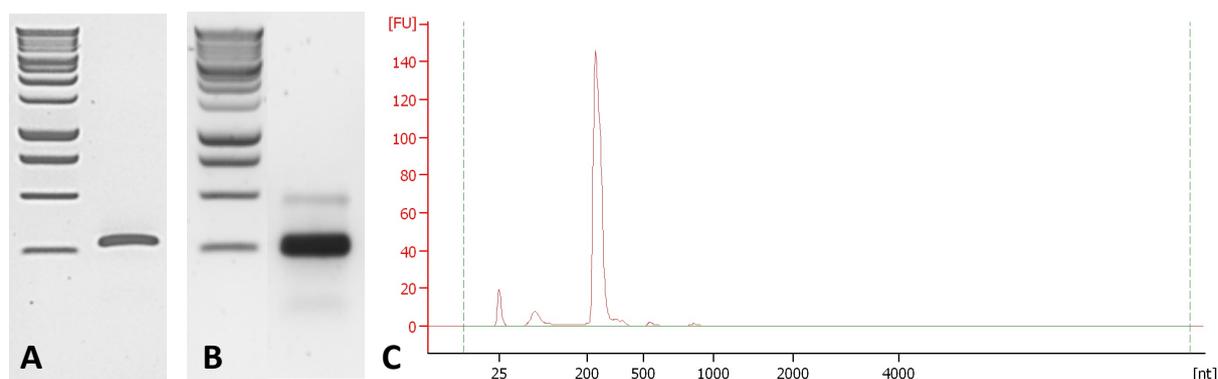
**Figure 46. Transcrit *in vitro* du gène *gapA***

**A.** Produit de PCR du gène *gapA* avec les amorces T7\_*gapAF\_iv/gapAR\_iv* sur gel d'agarose (584 pb). **B.** Transcrit du gène *gapA* obtenu par transcription *in vitro* à partir du produit de PCR sur gel d'agarose et **C.** en puce Agilent® (565 pb : soustraction de 19 pb correspondant à la séquence T7)

Nous avons rencontré davantage de difficultés pour obtenir le transcrit du gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. En effet, les produits de PCR obtenus avec différents couples d'amorces (à différentes localisations sur le gène) étaient à la taille attendue et unique. Cependant, après transcription *in vitro*, plusieurs transcrits ont été générés et ceci malgré différentes conditions testées (variation du temps d'incubation à 37°C : 3h au lieu de 4h et variation de la quantité d'ADN : 300 ng au lieu de 1500 ng) (résultats non montrés).

Une analyse *in silico* de la séquence du gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> a permis de constater la présence de deux zones riches en bases GC au niveau des régions 236-247 (CCGCGGCCGCGG) et 375-390 (TAGCGCGGCCGCGCTA) par rapport à l'ATG. Ces deux séquences pourraient être à l'origine de l'arrêt de la T7 RNA polymérase lors de la transcription *in vitro* (221–223).

Les différents transcrits obtenus lors de ces essais sont présentés en **Annexe 6**. Le transcrit utilisé pour la suite des expériences correspond au début du gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> est indiqué sur la **Figure 47**.



**Figure 47. Transcrit *in vitro* du gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub>**

**A.** Produit de PCR du gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> avec les amorces T7\_CTXM15F\_iv/CTXM15R\_iv sur gel d'agarose (258 pb).  
**B.** Transcrit du gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> obtenu par transcription *in vitro* à partir du produit de PCR sur gel d'agarose et  
**C.** En puce Agilent® (277 pb : soustraction de 19 pb correspondant à la séquence T7)

### 4.2.1.3. Expériences de RT-qPCR

Plusieurs mises au point ont été nécessaires pour déterminer les bonnes dilutions et obtenir des gammes étalons correctes.

Une quantification absolue a été réalisée à partir des gammes obtenues avec les transcrits *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (**Figure 47**) et *cysG* (**Figure 45**) avec une efficacité de la RT-qPCR proche de 80 % pour la gamme CTX-M-15 et de 90 % pour la gamme *cysG*. Les droites de la gamme étalon ont permis de quantifier les ARN d'*E.coli* Tck12 sans (L)ON, avec (L)ON<sub>α</sub> ou (L)ON<sub>contrôle</sub> réalisés à 4 dilutions différentes. Le nombre de copies d'ARNm a été rapporté par µg d'ARN totaux pour chaque dilution. Les moyennes et écarts types sont consignés dans le **Tableau 14**. La quantité de transcrits avec (L)ON a été comparée à la quantité de référence, sans (L)ON (ratio, quantité avec (L)ON/sans (L)ON). Un ratio < 0,5 ou > 2,0 est considéré comme significatif. Ainsi au vu des résultats présentés dans le **Tableau 14**, le nombre de copies d'ARNm *bla*<sub>CTX-M-15</sub> reste inchangé en présence de (L)ON. Au contraire, l'ARNm *cysG* est augmenté avec le LON<sub>α</sub> et le LON<sub>contrôle</sub>. Le gène *cysG* varie en fonction des conditions utilisées et n'est donc pas un gène de ménage adéquat pour notre étude.

**Tableau 14. Résultats de la quantification absolue des ARN *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et *cysG***

ARN <i>E.coli</i> Tck12	ARNm <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		ARNm <i>cysG</i>	
	Nb de copies/µg d'ARN totaux	Ratio quantité avec (L)ON / sans (L)ON	Nb de copies/µg d'ARN totaux	Ratio quantité avec (L)ON/ sans (L)ON
ON <sub>α</sub>	1,03.10 <sup>9</sup> ± 2,39.10 <sup>8</sup>	<b>1,0</b> [0,8 – 1,2]	2,09.10 <sup>7</sup> ± 4,50.10 <sup>6</sup>	<b>0,9</b> [0,7 – 1,1]
5'LON <sub>α</sub>	1,45.10 <sup>9</sup> ± 3,02.10 <sup>8</sup>	<b>1,4</b> [1,1 – 1,7]	8,25.10 <sup>7</sup> ± 1,71.10 <sup>7</sup>	<b>3,5</b> [2,8– 4,2]
ON <sub>contrôle</sub>	8,45.10 <sup>8</sup> ± 1,85.10 <sup>8</sup>	<b>0,8</b> [0,7 – 1,0]	1,04.10 <sup>7</sup> ± 2,64.10 <sup>6</sup>	<b>0,4</b> [0,3– 0,6]
5'LON <sub>contrôle</sub>	1,14.10 <sup>9</sup> ± 2,52.10 <sup>8</sup>	<b>1,1</b> [0,9 – 1,4]	5,79.10 <sup>7</sup> ± 8,48.10 <sup>6</sup>	<b>2,5</b> [2,1– 2,8]
<b>Sans (L)ON</b>	1,01.10 <sup>9</sup> ± 1,60.10 <sup>8</sup>	<b>1,0</b> [0,8 – 1,2]	2,34.10 <sup>7</sup> ± 9,32.10 <sup>6</sup>	<b>1,0</b> [0,6– 1,4]

Moyennes et écart-types calculés à partir de 4 dilutions pour chaque échantillon.

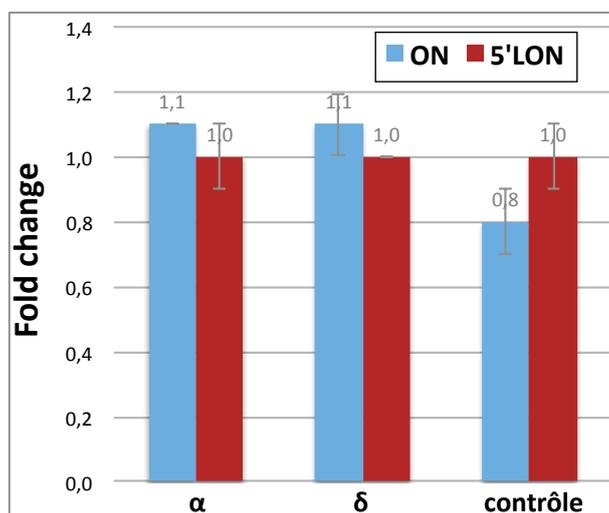
Le choix d'un autre gène de ménage a consisté à utiliser le gène *gapA* (224). Le transcrit du gène *gapA* n'étant pas disponible de suite, des études de quantification relative ont dû être réalisées. Trois expériences indépendantes ont été réalisées, les résultats obtenus lors de la première sont montrés dans le **Tableau 15**. Cela confirme les résultats obtenus par quantification absolue : la quantité d'ARNm *bla*<sub>CTX-M-15</sub> est identique en présence du LON  $\alpha$ ,  $\delta$  et contrôle en prenant le gène *gapA* comme gène de ménage (*fold change* entre 0,5 et 2). Au contraire, l'ARNm *cysG* augmente en présence des LON (*fold change* > 2).

**Tableau 15. Résultats de la quantification relative (RT-qPCR)**

ARN <i>E.coli</i> TcK12	Ct <sub>CTX-M-15</sub>	Ct <sub>cysG</sub>	Ct <sub>gapA</sub>	2 <sup>-<math>\Delta\Delta</math>Ct</sup> CTX-M-15/ <i>gapA</i>	2 <sup>-<math>\Delta\Delta</math>Ct</sup> <i>cysG</i> / <i>gapA</i>
ON $\alpha$	14,24 ± 0,08	20,16 ± 0,01	12,83 ± 0,20	<b>1,1</b> [1,0 – 1,3]	<b>1,4</b> [1,1 – 1,5]
5'LON $\alpha$	14,16 ± 0,14	18,26 ± 0,02	12,48 ± 0,02	<b>0,9</b> [0,8 – 1,1]	<b>3,7</b> [3,7 – 3,8]
ON $\delta$	14,83 ± 0,12	20,42 ± 0,40	13,26 ± 0,06	<b>1,0</b> [1,0 – 1,1]	<b>1,5</b> [1,1 – 1,9]
5'LON $\delta$	14,47 ± 0,19	18,73 ± 0,11	12,82 ± 0,27	<b>1,0</b> [0,8 – 1,1]	<b>3,5</b> [2,8 – 4,1]
ON <sub>contrôle</sub>	14,82 ± 0,21	21,48 ± 0,14	12,79 ± 0,14	<b>0,7</b> [0,6 – 0,9]	<b>0,5</b> [0,4 – 0,6]
5'LON <sub>contrôle</sub>	14,65 ± 0,17	19,39 ± 0,25	12,94 ± 0,21	<b>0,9</b> [0,7 – 1,1]	<b>2,4</b> [1,8 – 3,1]
<b>Sans (L)ON</b>	<b>14,36 ± 0,05</b>	<b>20,45 ± 0,23</b>	<b>12,76 ± 0,10</b>	<b>1,0</b> [0,9 – 1,1]	<b>1,0</b> [0,9 – 1,1]

Moyennes et écart-types calculés à partir d'une dilution en triplicat pour chaque échantillon. La quantification relative est calculée par la formule :  $R$  (ou *fold change*) =  $2^{-(Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gapA avec (L)ON}})}$  /  $2^{-(Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gapA sans (L)ON}})}$ . Les gènes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et *cysG* ont été comparés avec le gène de ménage *gapA*.

L'expérience a été réalisée 3 fois, pour les 2 autres expériences, le gène *cysG* a été abandonné. La moyenne des *fold change* qui ont été obtenus en comparant le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> avec le gène *gapA* pour chaque étude est représentée sur la **Figure 48**. Ainsi, la quantité d'ARNm CTX-M-15 n'est pas significativement différente en présence de LON.



**Figure 48. Quantification relative de l'ARNm *bla*<sub>CTX-M-15</sub> par RT-qPCR en présence de (L)ON  $\alpha$ ,  $\delta$ , contrôle chez *E.coli* TcK12**

Mesures par la méthode des 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> (*fold change*) :  $[(Ct_{\text{CTX-M-15}} - Ct_{\text{gapA}})_{\text{avec (L)ON à 5 } \mu\text{M}} - (Ct_{\text{CTX-M-15}} - Ct_{\text{gapA}})_{\text{sans (L)ON}}]$ . Résultats obtenus de 3 expériences indépendantes.

Après l'obtention du transcrit du gène *gapA* (Figure 46) une seule expérience de quantification absolue a été réalisée, bien que les gammes étalons obtenues n'avaient pas une efficacité correcte (71 % pour *gapA*) ou avec un trop faible nombre de points (3 dilutions de la gamme exploitables), nous avons tout de même analysé les données, visibles dans le Tableau 16. Il semble donc que les ARNm *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et *gapA* sont inchangés en présence de LON<sub>δ</sub>.

**Tableau 16. Résultats de la quantification absolue des ARN *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et *gapA***

ARN <i>E.coli</i> TcK12	ARNm <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		ARNm <i>gapA</i>	
	Nb de copies/ $\mu$ g d'ARN totaux	Ratio quantité avec (L)ON / sans (L)ON	Nb de copies/ $\mu$ g d'ARN totaux	Ratio quantité avec (L)ON/ sans (L)ON
ON <sub>δ</sub>	$7,74 \cdot 10^8 \pm 1,38 \cdot 10^8$	<b>0,7</b> [0,6 – 0,8]	$4,05 \cdot 10^9 \pm 5,89 \cdot 10^8$	<b>0,6</b> [0,5 – 0,7]
LON <sub>δ</sub>	$9,71 \cdot 10^8 \pm 6,77 \cdot 10^7$	<b>0,8</b> [0,7 – 0,9]	$5,47 \cdot 10^9 \pm 9,05 \cdot 10^8$	<b>0,9</b> [0,8 – 1,0]
Sans (L)ON	$1,16 \cdot 10^9 \pm 3,92 \cdot 10^7$	<b>1,0</b> [1,0 – 1,0]	$6,29 \cdot 10^9 \pm 5,08 \cdot 10^8$	<b>1,0</b> [0,9 – 1,1]

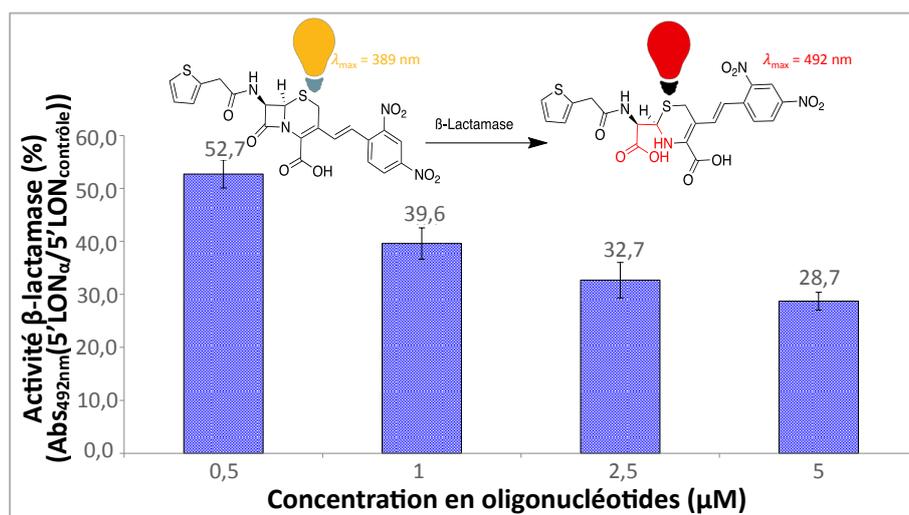
Moyennes et écart-types calculés à partir d'une dilution en triplicat pour chaque échantillon

## 4.2.2. Au niveau de la protéine CTX-M-15

### 4.2.2.1. Evaluation de l'activité de la $\beta$ -lactamase

L'activité de la  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 a été évaluée par l'utilisation de la nitrocéfine, une céphalosporine chromogène. En l'absence de la  $\beta$ -lactamase CTX-M-15, la nitrocéfine est de couleur jaune et son hydrolyse par l'enzyme peut être appréciée selon l'intensité de la couleur orange/rouge mesurée à une absorbance de 492 nm (Figure 50 B).

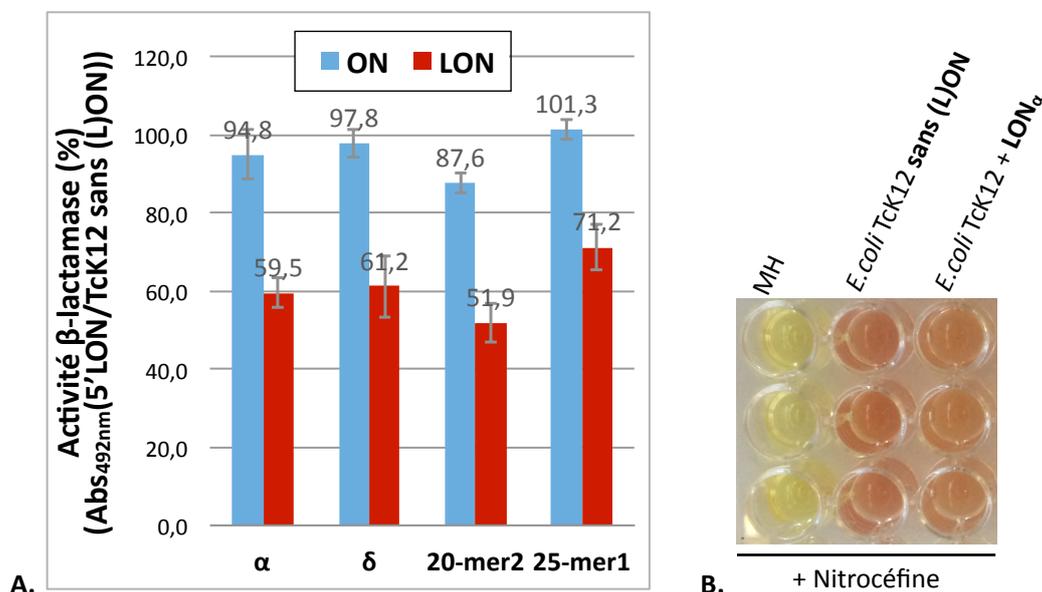
Une inhibition de l'hydrolyse de la nitrocéfine a été observée chez *E.coli* TcK12 contenant la  $\beta$ -lactamase CTX-M-15, en présence de différentes concentrations, en LON<sub>α</sub> comparé au LON<sub>contrôle</sub> de façon dose dépendante avec une inhibition maximale avec le 5'LON<sub>α</sub> à 5  $\mu$ M (Figure 49).



**Figure 49. Activité de la  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 chez *E.coli* TcK12 en présence de LON<sub>α</sub> comparé au LON<sub>contrôle</sub> par dosage colorimétrique de l'hydrolyse de la nitrocéfine**

L'activité de la  $\beta$ -lactamase est évaluée en pourcentage en comparant l'absorbance à 492 nm d'une suspension d'*E.coli* TcK12 en présence du 5'LON<sub>α</sub> par rapport à celle en présence du 5'LON<sub>contrôle</sub>. Différentes concentrations en LON ont été utilisées.

Cette expérience a été reproduite avec différents ON et LON à une concentration de 5  $\mu$ M et cette fois-ci en comparant l'activité avec ou sans ON/LON (**Figure 50 A**). L'inhibition de l'hydrolyse de la nitrocéfine est observée uniquement en présence du lipide, en effet l'activité de la  $\beta$ -lactamase est peu ou pas diminuée en présence des ON, et diminuée d'au moins 30 % en présence des 5'LON à 5  $\mu$ M.

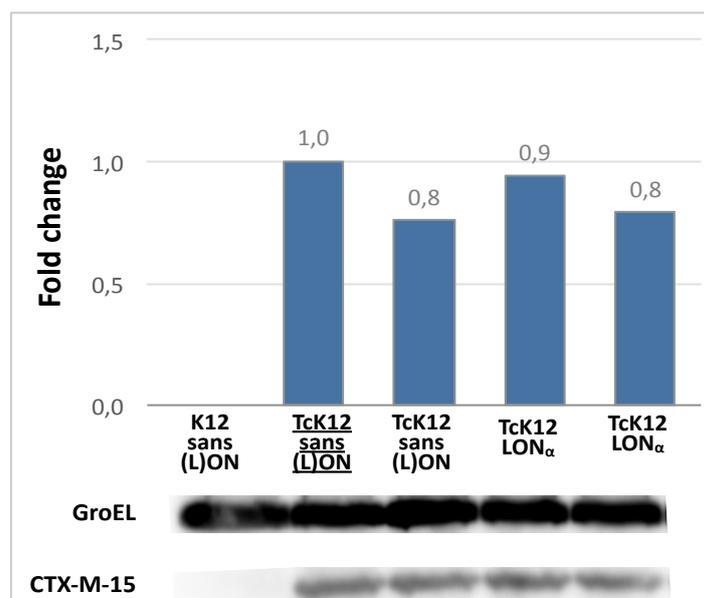


**Figure 50. Activité de la  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 chez *E.coli* TcK12 en présence de différents (5'L)ON par dosage colorimétrique de l'hydrolyse de la nitrocéfine**

**A.** L'activité de la  $\beta$ -lactamase est évaluée en pourcentage en comparant l'absorbance à 492 nm d'une suspension d'*E.coli* TcK12 en présence de (5'L)ON à 5  $\mu$ M par rapport à celle en absence de (L)ON. **B.** Visualisation des puits à 45 min après ajout de la nitrocéfine dans du milieu MH, dans une suspension d'*E.coli* TcK12 avec ou sans LON $\alpha$

#### 4.2.2.2. Evaluation de la quantité de $\beta$ -lactamase

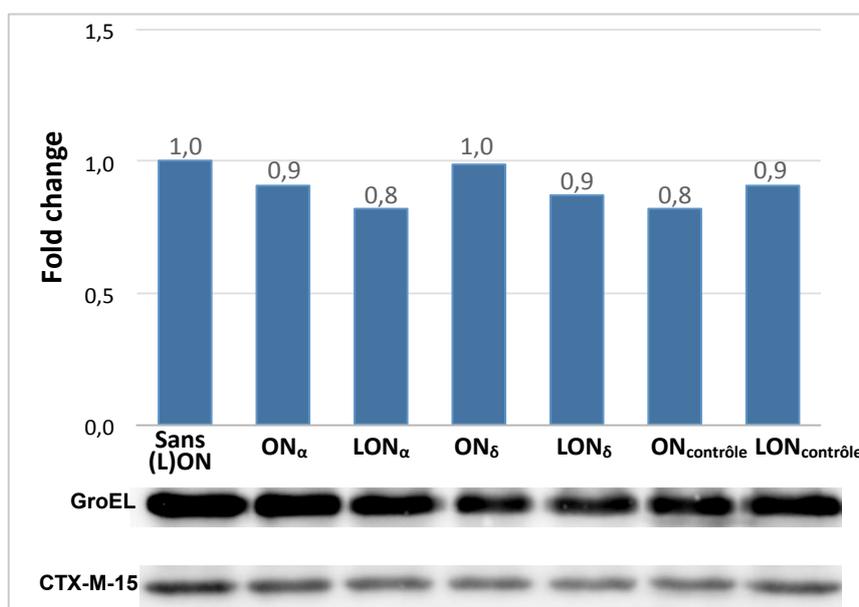
Une évaluation de la quantité de la protéine CTX-M-15 a été réalisée par Western-blot, en comparant la quantité de cette protéine (33 kDa) sur celle de la protéine GroEL (50 kDa). Une première expérience (**Figure 51**) a consisté à s'assurer de la spécificité de l'anticorps dirigé contre la protéine CTX-M-15. Ainsi, on remarque l'absence de bande à 33 kDa pour la souche sensible *E.coli* K12 ne présentant pas le plasmide porteur du gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> alors qu'une bande est bien présente chez la souche *E.coli* TcK12 résistante et porteuse du plasmide (**Figure 51**). Afin de se rendre compte de la variation intra-expérience, des duplicats ont été réalisés. On considère un résultat significatif lorsque le fold change est au minimum de 2, c'est-à-dire une quantification relative de plus de 2 ou moins de 0,5. La quantité de protéine CTX-M-15 n'est donc pas significativement différente avec ou sans LON $\alpha$ .



**Figure 51. Quantification relative de la protéine CTX-M-15 par Western Blot chez *E.coli* K12 et chez *E.coli* TcK12 en présence ou absence de 5'LON $\alpha$**

La quantification relative du niveau d'expression de la protéine CTX-M-15 (33 kDa) normalisée par rapport au niveau d'expression de la protéine GroEL (58 kDa) a été mesurée par quantification densitométrique (Logiciel Image J). Chaque valeur a été comparée par rapport à celle obtenue avec la souche *E.coli* TcK12 sans (L)ON, ici piste 2, son *fold change* étant à 1. Les protéines de *E.coli* TcK12 sans(L)ON et de *E.coli* TcK12 en présence de 5'LON $\alpha$  ont été déposées en duplicate.

La seconde expérience a permis de tester les séquences  $\alpha$ ,  $\delta$  et contrôle avec et sans lipide chez *E.coli* TcK12. Là encore nous n'observons pas de différence significative du niveau d'expression de la protéine CTX-M-15 (**Figure 52**).



**Figure 52. Quantification relative de la protéine CTX-M-15 par Western Blot chez *E.coli* TcK12 en présence ou absence de (5'L)ON  $\alpha$ ,  $\delta$  ou contrôle**

Légende : identique à la Figure 50. Piste 1 utilisée comme référence.

Les expériences de Western Blot n'ont été réalisées que deux fois mais aboutissent aux mêmes conclusions, les LON ne semblent pas affecter la quantité de protéine CTX-M-15.

## 5. Discussion et perspectives

L'ère post-antibiotiques peut malheureusement arriver dans un futur proche, des alternatives sont nécessaires. L'utilisation d'oligonucléotides a fait ses preuves chez les eucaryotes et pourrait avoir un intérêt chez les procaryotes pour lutter contre la résistance aux antibiotiques, néanmoins leur délivrance dans les bactéries reste un problème à résoudre.

Nous avons dans ce travail utilisé pour la première fois des oligonucléotides conjugués à des nucléolipides pour promouvoir leur internalisation bactérienne. D'autres systèmes de délivrance sont utilisés actuellement, notamment les CPP (*cell penetrating peptides*) mais ceux-ci ont montré une toxicité bactérienne (190). Notre choix de cibler l'ARNm *bla*<sub>CTX-M-15</sub> chez *E.coli* répond tout à fait à la liste des pathogènes prioritaires publiée par l'OMS (88) et la ceftriaxone a été choisie en association avec les oligonucléotides pour son importante utilisation en clinique, son large spectre et sa demi-vie prolongée.

Dans un premier temps, la synthèse de 4 séquences ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) en chimie PTO, nous a permis de montrer que seuls les oligonucléotides conjugués au nucléolipide (LON) diminués la CMI de la ceftriaxone de 15 à 26 fois et ce uniquement pour les souches résistantes porteuses du gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Cet effet observé est dose-dépendant avec une concentration optimale de 5  $\mu$ M. L'absence de toxicité bactérienne des LON a été étudiée par le suivi de leur absorbance et de la quantité de bactéries au cours du temps en l'absence de ceftriaxone en comparaison avec la souche *E.coli* TcK12 en l'absence de LON. L'auto-assemblage des LON en micelles pourrait expliquer leur localisation intra-bactérienne visualisée en microscopie confocale, non observée pour les ON.

Dans un deuxième temps, de nouvelles séquences synthétisées nous ont aidés à comprendre quelles modifications chimiques étaient indispensables pour observer une diminution de la CMI<sub>CRO</sub>. Nous avons donc considéré comme essentiels : le nucléolipide en 5' (une baisse plus importante a été observée en comparaison au lipide en 3'), une séquence de plus de 19 nucléotides, et la chimie PTO (comparée au PO). Il est à noter que la séquence LON<sub>contrôle</sub> a été réalisée en chimie PO.

Dans un même temps, nous avons initié des expériences pour comprendre le mécanisme d'action des LON. Chez les eucaryotes, il a été décrit que les LON peuvent cibler l'ARNm par un mécanisme antisens soit par l'intervention d'une RNase H, soit par un encombrement stérique (158). L'encombrement stérique est privilégié comme hypothèse chez *E.coli* dans le cadre de l'inhibition de l'ARNm de la  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>TEM-1</sub> par des oligonucléotides de chimie PNA liés à un CCP (219). Nos expériences de RT-qPCR montrent que les LON ne diminuent pas de façon significative la quantité d'ARNm *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et pourraient conforter l'hypothèse d'un encombrement stérique. Cependant, un encombrement stérique devrait conduire à une diminution de la traduction et donc à une diminution ciblée de la quantité de protéine CTX-M-15. Nos expériences préliminaires de Western Blot n'ont pas montré de modification de quantité de la protéine CTX-M-15 avec et sans (L)ON. Même si ces expériences restent à confirmer (expériences  $\geq$  3) et à affiner (variation du temps de contact avec les ON/LON avant l'extraction des protéines), les résultats ne vont pas dans le sens d'une baisse de la protéine CTX-M-15. Ces

expériences d'inhibition de la synthèse protéique pourraient être réalisées en ciblant la transcription de gènes comme celui de la GFP (Green Fluorescent Protein), dont l'expression peut-être directement mesurée par l'évaluation de la fluorescence.

Le mécanisme d'action des LON reste à élucider, l'hypothèse du mécanisme antisens semble écartée, d'autant que certaines séquences dites « contrôles » (sans homologie de séquence avec l'ARNm *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) diminuent aussi la CMI<sub>CRO</sub> (ex : 21-mer1, 25-mer1).

Des expériences utilisant des puces à ARN (microarrays) ou du RNA-seq pourraient être utilisées pour évaluer la sur/sous expression des transcrits totaux en présence de LON. Nous avons vu par exemple que l'ARN *cysG* semble augmenter en leur présence. Il serait intéressant d'explorer l'expression de gènes impliqués dans des voies métaboliques ou ceux de la réponse au stress.

Néanmoins, une diminution de l'activité de la  $\beta$ -lactamase a été observée en présence des LON en suivant l'hydrolyse d'une céphalosporine chromogène, la nitrocéfine. Les LON pourraient donc de façon directe ou indirecte inhiber l'enzyme.

Les hypothèses pour le mode d'action des LON peuvent être variées : une inhibition de la  $\beta$ -lactamase par interaction avec la protéine qui empêcherait d'hydrolyser la ceftriaxone. L'étude de l'activité de la  $\beta$ -lactamase pourrait être affinée en déterminant sa cinétique enzymatique et ses différentes constantes ( $K_M$ ,  $K_{cat}$ ) pour la nitrocéfine, ceftriaxone et autres substrats, en présence ou non de LON (225). Mais il faudrait pour cela purifier l'enzyme CTX-M-15. Une autre possibilité serait de quantifier la  $\beta$ -lactamase en suivant la dégradation de la ceftriaxone par HPLC (190,226).

On peut aussi émettre l'hypothèse que les LON facilitent l'entrée de la ceftriaxone grâce au lipide en déstabilisant la membrane externe de façon transitoire. Cette deuxième hypothèse pourrait être explorée en utilisant des antibiotiques marqués fluorescents, comme la Bocilline-FL (pénicilline V fluorescente) (227), en permettant des études d'imagerie (228), et des études de compétition (229). Des mutants (gènes de protéines ou d'enzymes impliquées dans la synthèse de la membrane externe) issus d'une banque commercialisée d'*E.coli* K12 (collection KEIO, mutants de délétion d'un seul gène non-létal) pourraient aussi être testés.

Une diminution importante de la CMI de la ceftriaxone est obtenue avec les LON, avec une CMI minimale de 32 mg/L chez *E.coli* TcK12, néanmoins cette diminution reste insuffisante pour catégoriser la souche comme sensible à la ceftriaxone. En effet, selon les recommandations du CASFM une souche est dite sensible lorsque la CMI<sub>CRO</sub> est inférieure ou égale à 1 mg/L et résistante au-delà de 2 mg/L (56). Dans la littérature, Readman *et al.* (190) ont utilisé des oligonucléotides conjugués à des CPP avec des chimies différentes : PMO-CPP (séquence de 25-mer, correspondant à la séquence  $\alpha$  dans notre étude) et PNA-CPP (séquence de 13-mer), qui ont montré selon les 6 souches utilisées (porteuses d'un gène *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> : CTX-M-1, CTX-M-15 ou CTX-M-3) une diminution de la CMI de la céfotaxime (une autre C3G). La diminution de la CMI était de 3 à 4,8 fois (avec une CMI minimale à 10 mg/L) pour PMO-CPP et de 3,3 à 55 fois pour PNA-CPP (avec une CMI minimale de 2 mg/L). Cependant, un effet négatif sur la croissance bactérienne a été observé en présence des PMO-CPP et PNA-CPP seuls, sans céfotaxime, supposant une toxicité des CPP. Dans une seconde étude (168), ces auteurs ont utilisé le même

oligonucléotide PNA que précédemment mais cette fois-ci sous forme de tétraèdre, une réduction de la CMI du céfotaxime d'une souche porteuse de CTX-M-3 (passant de 35 (sans oligonucléotide) à 16 mg/L (avec oligonucléotide)) a été observée, et le tétraèdre ne présentait pas de toxicité. Il est ainsi difficile d'allier efficacité et innocuité pour les oligonucléotides. Dans notre étude, les LON ne semblent pas présenter une toxicité intrinsèque sur les bactéries, la présence des nucléolipides ne modifie pas la croissance bactérienne. Afin d'améliorer leur efficacité (baisse plus importante de la CMI<sub>CRO</sub>), nous pourrions envisager des modifications de la chimie de ces LON (utilisation de gapmers, triple chaîne lipidique, autre chimie que celle du PTO...).

Une autre interrogation a été soulevée lors de cette étude, quand à la structuration des LON. L'environnement des LON pourrait influencer leur structuration, comme la concentration en ions ou la température. Le milieu MH utilisé lors de nos expériences est calibré en ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>, respectivement entre 20-25 mg/L et 10-12,5 mg/L (MHB-CA). Il serait intéressant d'étudier l'influence de différents ions contenus dans le milieu, sur les LON, par exemple en utilisant un milieu LB (Luria-Bertani). La différence de CMI<sub>CRO</sub> observée en comparant le même LON issu de la synthèse de deux synthétiseurs différents est également à investiguer en effectuant plusieurs contrôles analytiques pour comprendre ce qui pourrait influencer la CMI.

Aussi, des expériences préliminaires ont montré que les LON pouvaient diminuer la CMI d'autres β-lactamines et semblent agir sur *K.pneumoniae*. Ces études sont intéressantes et devront être poursuivies et étendues aussi à d'autres β-lactamases et à des bactéries (Gram négatif ou Gram positif), ou encore d'autres mécanismes de résistances, pour évaluer le spectre d'action des LON.

Des études de toxicité des LON au niveau des cellules eucaryotes (études ex-vivo) devront être entrepris et plus tard des études *in vivo* dans des modèles animaux devront être évaluées.

# Conclusion

---

La lutte contre les résistances aux antibiotiques est aujourd'hui une priorité de santé publique. Si des améliorations ont été observées, grâce à une utilisation raisonnée des antibiotiques et des règles de prévention respectées, il faut néanmoins poursuivre les efforts.

Les E-BLSE sont largement présentes à l'hôpital mais on observe une tendance à la baisse depuis 2017. Il faut cependant garder en tête que les bactéries sont dotées de capacités adaptatives importantes et acquièrent rapidement de nouvelles résistances. Nous devons donc être capables de repérer rapidement ces nouvelles résistances mais aussi avoir un « coup d'avance » pour disposer de traitements efficaces contre ces bactéries de plus en plus résistantes.

De nombreuses stratégies thérapeutiques sont étudiées, néanmoins les nouvelles molécules mises sur le marché se font rares, ce n'est que le reflet de la difficulté à trouver de nouvelles cibles, de nouveaux mécanismes d'action et de garantir leur innocuité. La plupart des nouvelles molécules mises sur le marché sont essentiellement des antibiotiques ou association d'antibiotiques ayant des cibles et mécanismes d'action déjà connus. Seuls les anticorps monoclonaux ont obtenu l'AMM, les autres alternatives n'ont pas dépassé la phase 3 de la recherche clinique.

Dans notre projet, nous montrons l'intérêt des oligonucléotides phosphorothioates conjugués à un nucléolipide (LON) en association avec la ceftriaxone chez *E.coli* porteur d'une BLSE de type CTX-M-15. Même si le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé et que la baisse des CMI est insuffisante, les LON présentent une nouvelle stratégie pour lutter contre l'antibiorésistance et leur application pourrait être étendue à d'autres bactéries, d'autres résistances et avoir une plus large utilisation.

Ce travail a suscité l'intérêt scientifique et a fait l'objet d'une publication en Janvier 2020 (230), d'un financement (231), d'un brevet (232) et d'une communication affichée à un congrès international (233).

# Annexes

---

Annexe 1 : Mesures de contrôle de la transmission croisée selon les modalités de prise en charge du patient porteur de BHR <sub>e</sub> depuis son admission et selon la situation épidémiologique .....	108
Annexe 2. Antibiotiques dirigés contre les pathogènes prioritaires définis par l’OMS, en cours de développement.....	109
Annexe 3 : Synthèse d’oligonucléotides selon la méthode phosphoramidite et ajout d’un nucléolipide .....	110
Annexe 4 : Structure de l’ARNm <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> .....	111
Annexe 5 : Antibiogramme de la souche <i>E.coli</i> TcK12 .....	112
Annexe 6 : Différents transcrits du gène <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> .....	112

**Annexe 1 : Mesures de contrôle de la transmission croisée selon les modalités de prise en charge du patient porteur de BHRé depuis son admission et selon la situation épidémiologique**

Situation épidémiologique	PCC dès l'admission	Retard à la mise en place des PCC	Épidémie
	Admission d'un patient connu porteur ou patient hospitalisé à l'étranger	Porteur pris en charge en précautions standard à son admission (découverte fortuite)	Au moins un cas secondaire
Porteur	Précautions d'hygiène	Chambre individuelle avec WC + PCC*	Chambre individuelle avec WC + PCC
	Organisation des soins	Selon l'analyse de risque : - Personnel dédié - Renfort en personnel - Marche en avant	Selon l'analyse de risque : - Personnel dédié - Renfort en personnel - Marche en avant
	Admissions	Poursuivies	Poursuivies
Patient contact	Précautions d'hygiène	PS**	PS dans le secteur dédié
	Dépistages	Hebdomadaires tant que le porteur est présent.	Hebdomadaires tant que le porteur est présent. Puis un dépistage hors exposition (idéalement après 4 à 7 jours ou à la sortie du contact), puis arrêt.
		Puis un dépistage hors exposition (idéalement après 4 à 7 jours ou à la sortie du contact), puis arrêt.	Si transfert, au moins 2 dépistages hebdomadaires hors exposition. Si le 1 <sup>er</sup> dépistage est réalisé moins de 48 heures après l'arrêt de l'exposition, réaliser 3 dépistages.
	Technique dépistage	Culture	PCR souhaitable pour le 1 <sup>er</sup> dépistage (ou à défaut culture), puis culture.
	Transfert des contacts	Possible sans restriction.	Possible après au moins un dépistage négatif des contacts présents dans l'unité.
	Précautions d'hygiène si transfert	PS	Chambre individuelle + PCC jusqu'à au moins 2 dépistages négatifs hors exposition
Réhospitalisation	Précautions standard et pas de dépistage	Précautions standard et pas de dépistage	
Identification informatique en cas de réadmission	Uniquement le porteur	Uniquement le porteur	Patients contacts n'ayant pas eu 3 dépistages négatifs hors exposition et porteurs
Antibiotiques	Limités au strict nécessaire Après avis référent	Limités au strict nécessaire Après avis référent	Limités au strict nécessaire Après avis référent

\*PCC : Précautions complémentaires contact, \*\*PS : précautions standard

Source : (83)

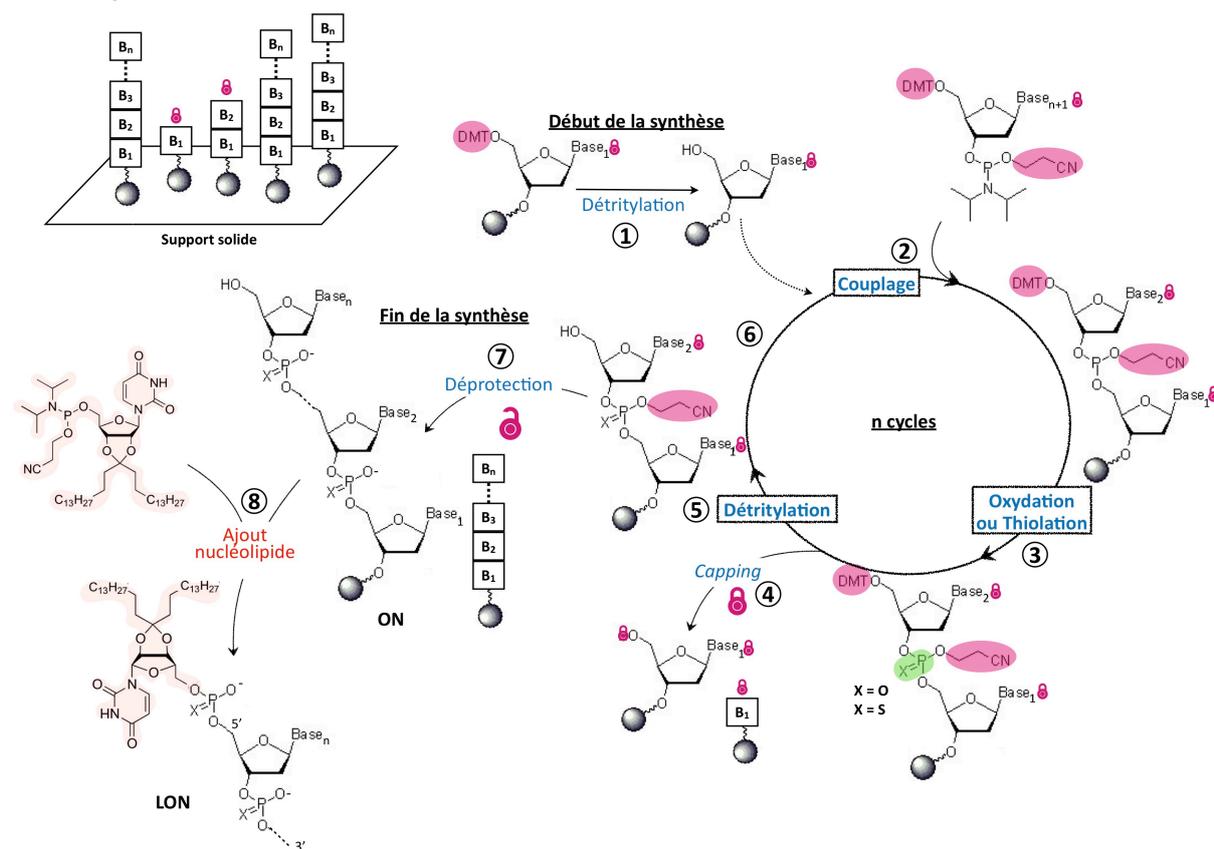
## Annexe 2. Antibiotiques dirigés contre les pathogènes prioritaires définis par l’OMS, en cours de développement

Nom	Phase	Classe antibiotique (Voie d’administration)	Activité contre les pathogènes prioritaires				Précisions sur l’activité
			AbCR	PaCR	ECR	Autres	
Lascufloxacin	NDA	Fluoroquinolone (IV, oral)				?	Gram positif, infection respiratoire
Lévonadifloxacin	3	Fluoroquinolone (IV, oral)				?	Gram positif
Alalevonadifloxacin							
Zoliflodacin*	3	Inhibiteur de topoisomérase (Oral)				x	<i>N.gonorrhoeae</i> , Cocci Gram positif
Gépotidacin*	3	Inhibiteur de topoisomérase (IV, oral)				x	Cocci Gram négatif et positif
Céfilavancin	3	Céphalosporine-glycopeptide (IV)				x	Gram positif
Solithromycine	3	Macrolide (IV, oral)				x	Gram positif
Contézolide	2/3	Oxazolidinone (IV, oral)				x	SARM, ERG, <i>S.pneumoniae</i> résistant
Contézolide acefosamil							
Afabicin (Debio-1450)*	2	Inhibiteur de FabI (IV, oral)				x	<i>S.aureus</i>
Nafithromycine (WCK-4873)	2	Macrolide (oral)				x	<i>S.pneumoniae</i> résistant aux macrolides
TNP-2092	2	Rifamycine-quinolone (IV, oral)				?	<i>S.aureus</i> , <i>Helicobacter pylori</i>
β-lactam + SPR-741	1	β-lactam + polymyxine (IV)	?	?	?		
SPR-206	1	Polymyxine (IV)	x	x	x		
KBP-7072	1	Tétracycline (oral)				x	Gram positif
TP-271	1	Tétracycline (IV, oral)				x	Gram positif (dont ERG), <i>H.influenzae</i>
TP-6076	1	Tétracycline (IV)	x		?		
EBL-100031 (apramycine)	1	Aminoside (IV)	?		?		
TNP-2198	1	Rifamycine-nitroimidazole (oral)				x	<i>C.difficile</i> , <i>H.pylori</i> , anaérobies
TXA-709*	1	Inhibiteur FtsZ (IV, oral)				x	<i>S.aureus</i>
BCM-0184	1	? (oral)				x	

x : actif ; ? : activité possible ; NDA : *New Drug Application* (Etats-Unis) ; AbCR : *Acinetobacter baumannii* résistant aux carbapénèmes ; PaCR : *Pseudomonas aeruginosa* résistant aux carbapénèmes ; ECR : entérobactérie résistante aux carbapénèmes ; IV : intra-veineux ; \* : nouvelle classe chimique voire nouvelle cible d’action

Source : (105)

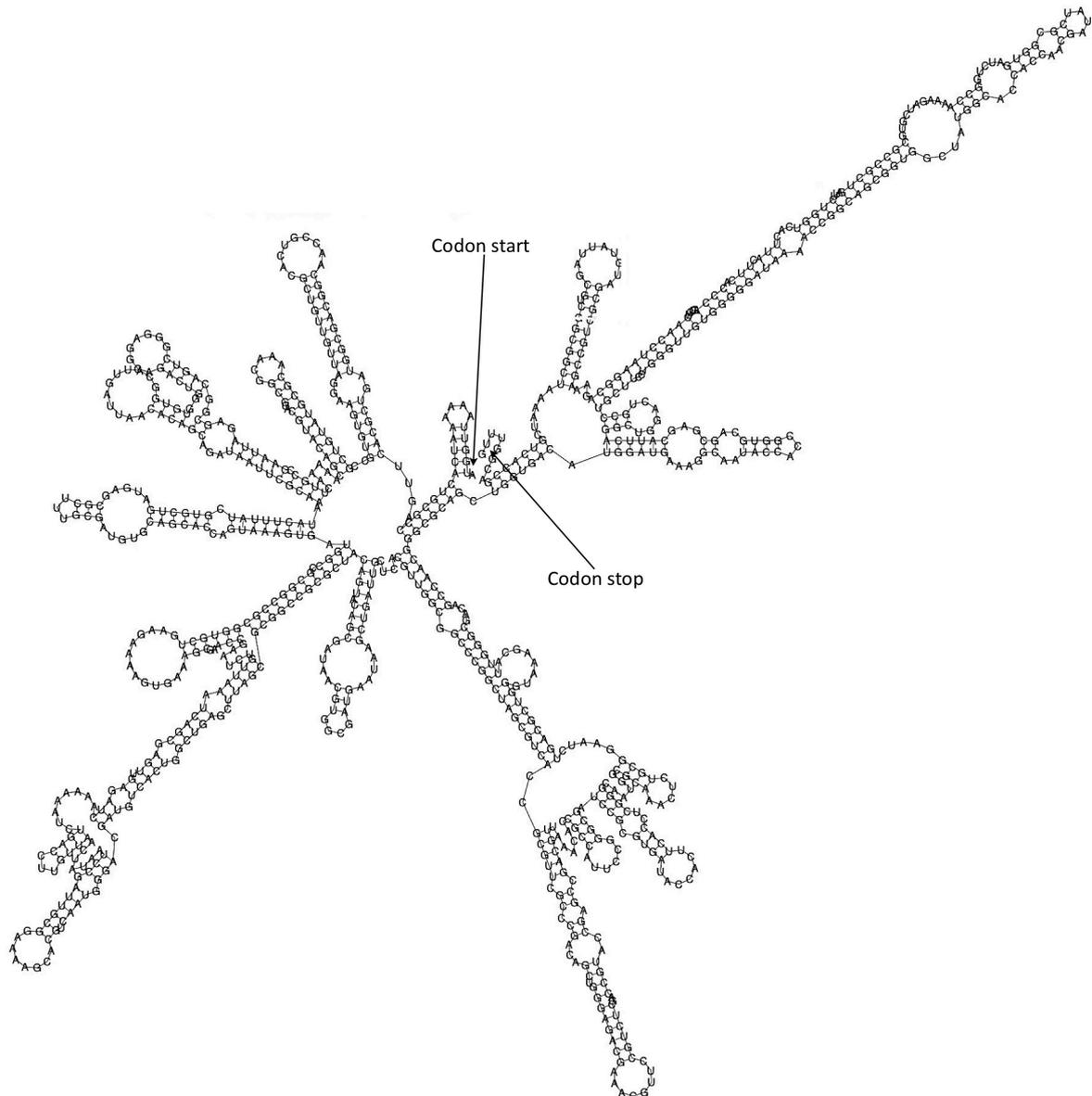
### Annexe 3 : Synthèse d'oligonucléotides selon la méthode phosphoramidite et ajout d'un nucléolipide



La synthèse d'oligonucléotides est réalisée sur un support solide, indiqué en haut à gauche du schéma, présentant des billes sur lesquelles est fixée la première base (Base 1) qui correspond à la base en 3', la croissance de l'oligonucléotide se faisant de l'extrémité 3' à 5'. Les bases sont protégées par différents groupements, ils sont représentés par un cadenas et l'alcool en 5' est protégé par le DMT (diméthoxytrityl). La première réaction consiste en une détritylation [1] permettant de libérer le groupement DMT du nucléotide fixé au support solide. Ensuite, un nucléotide phosphoramidite (qui est protégé en 5' par le DMT, au niveau de sa base et par un groupement 2-cyanoéthyle au niveau de l'hydroxyle du phosphate) vient se coupler par des réactions entre le groupement N,N-diisopropyle du phosphoramidite et l'alcool primaire en position 5' du dernier nucléotide de l'oligonucléotide [2]. Une étape d'oxydation ou de thiolation permet d'obtenir respectivement un phosphodiester (PO) ou phosphorothioate (PTO) [3]. Le couplage à chaque étape de synthèse n'étant jamais total, certains hydroxyles en 5' vont rester libres, il est donc nécessaire de bloquer ces alcools primaires n'ayant pas réagi par un groupement acétyle, ces oligonucléotides acétylés restent donc incomplets, on parle de « *capping* » [4]. Pour les oligonucléotides pour lesquels le couplage s'est correctement effectué, une étape de détritylation à lieu pour libérer l'alcool en 5' [5] et ainsi permettre un nouveau couplage avec le nucléotide suivant. Les étapes de détritylation, couplage, oxydation (ou thiolation) et capping se répètent jusqu'à l'obtention de l'oligonucléotide complet [6]. Lors de la fin de la synthèse, une étape de déprotection doit avoir lieu pour libérer les bases, les phosphates et les alcools en 5' [7]. Enfin, dans le cas des LON, le nucléolipide est rajouté en 5' [8].

Sources : (215,234), <https://www.twistbioscience.com/blog/science/simple-guide-phosphoramidite-chemistry-and-how-it-fits-twist-biosciences-commercial> ; [https://fr.wikipedia.org/wiki/Synthèse\\_d%27oligonucléotide](https://fr.wikipedia.org/wiki/Synthèse_d%27oligonucléotide)

#### Annexe 4 : Structure de l'ARNm *bla*<sub>CTX-M-15</sub>



La structure a été prédite en utilisant deux programmes du logiciel ViennaRNA (RNAalifold et RNAfold) à partir d'un alignement de 60 séquences de  $\beta$ -lactamases CTX-M appartenant au groupe 1, une structure consensus a été calculée avec le programme RNAalifold. Cette structure contient les appariements et repliements qui sont conservés dans toutes ou la plupart des CTX-M de groupe 1. Puis, la structure de CTX-M-15 a été prédite par le programme RNAfold en utilisant la structure consensus comme contrainte. L'utilisation de la structure consensus permet d'améliorer la prédiction en tenant compte des appariements/repliements conservés dans les différentes CTX-M, ce qui est mieux que de prédire la structure uniquement à partir de la séquence de CTX-M-15 seule.

## Annexe 5 : Antibiogramme de la souche *E.coli* TcK12

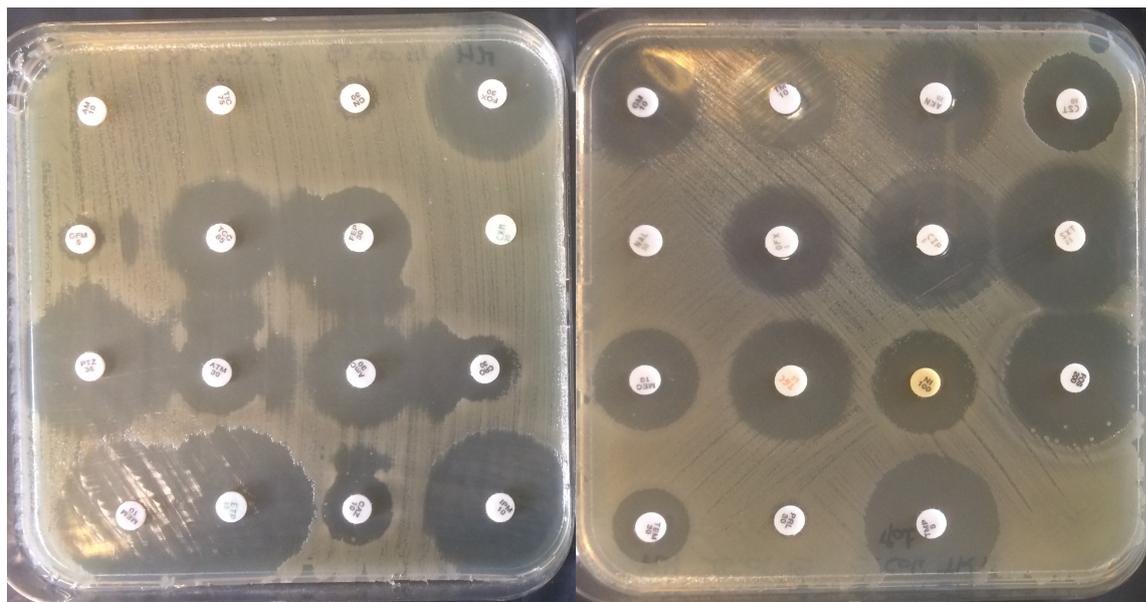


Image en « bouchon de champagne », caractéristique de la présence d'une BLSE

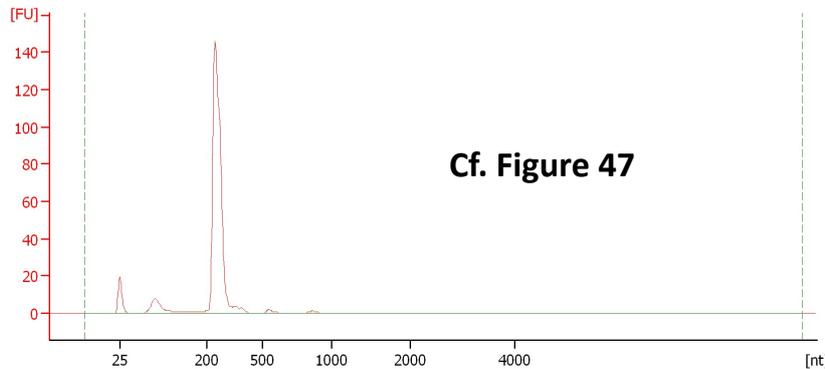
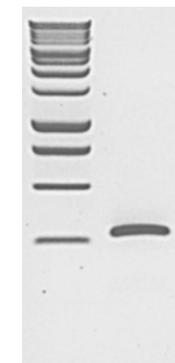
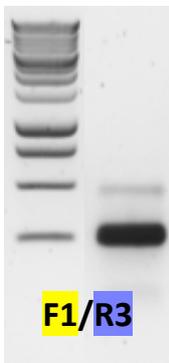
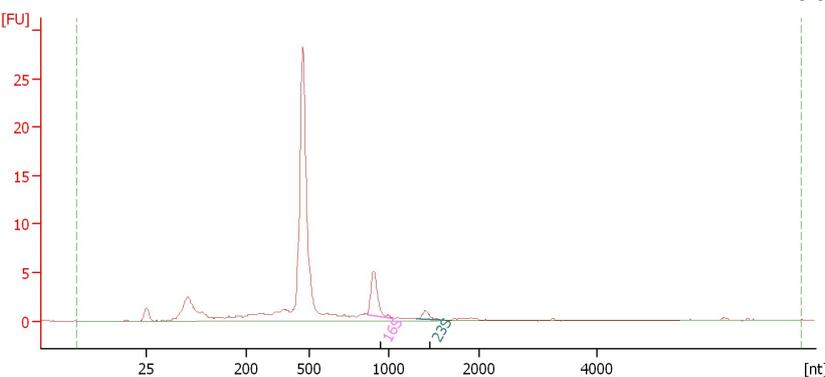
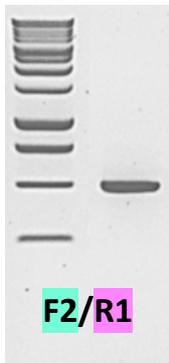
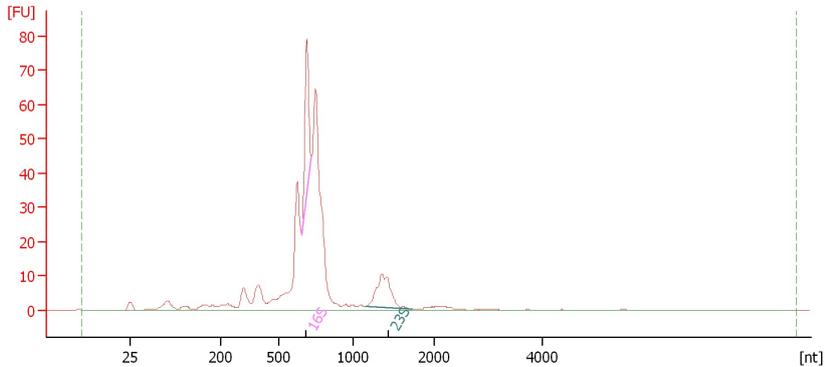
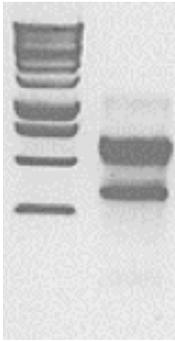
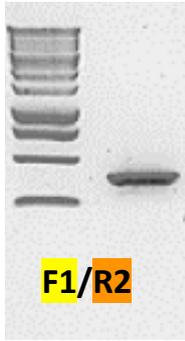
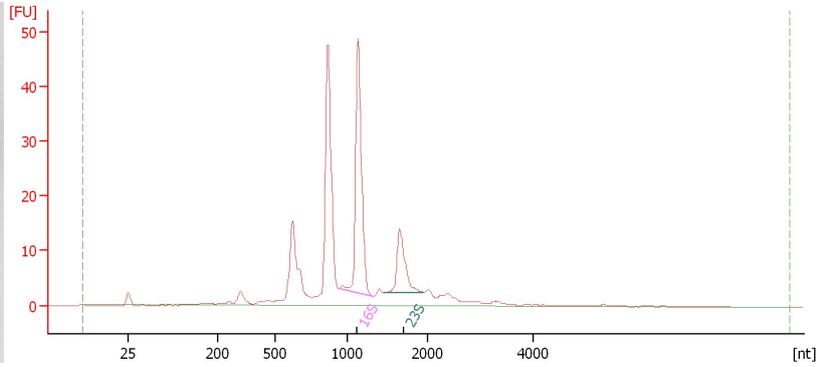
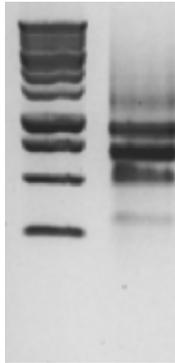
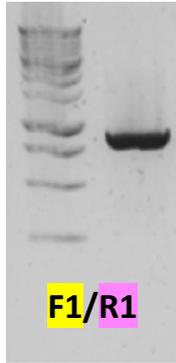
AM : Ampicilline ; TIC : Ticarcilline ; CN : Céfalexine ; FOX : Céfoxitine, ; CFM : Céfixime ; TCC : Ticarcilline-acide clavulanique (AC) ; FEP : Céfépime, CXM : Céfuroxime ; PTZ : Pipéracilline+Tazobactam ; ATM : Aztréonam ; AMC : Amoxicilline+AC ; CRO : Ceftriaxone ; MEM : Méropénème ; ETP : Ertapénème ; CAZ : Ceftazidime ; IPM : Imipénème ; GM : Gentamicine ; TM : Tobramycine ; AKN : Amikacine ; CST : Colistine ; NAL : Acide nalidixique ; OFX : Ofloxacine ; CIP : Ciprofloxacine ; SXT : Sulfaméthoxazole-Triméthoprimine (Cotrimoxazole) ; MEC : Mécillinam ; TGC : Tigécycline ; NI : Nitrofurantoïne ; FOS : Fosfomycine ; TEM : Témocilline ; PRL : Pipéracilline ; TMP : Triméthoprimine

## Annexe 6 : Différents transcrits du gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub>

Amorce	Séquence (5' → 3')
T7_CTXM15F_iv (amorce F1)	TAATACGACTCACTATAGGGTATCTTCCAGAATAAGGAATC
CTXM15R3_iv (amorce R3)	CATCACTTACTGGTGCTGCACATC
amorce F2	TAATACGACTCACTATAGGGATAACGTGGCGATGAATAA
amorce R1	TTACAAACCGTCGGTGACGATTTAGC
amorce R2	CCGCAATCGGATTATAGTTAACAAGGTC

Amorces utilisées pour les expériences de PCR en vue de la transcription *in vitro* de *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Leur localisation sur le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> est indiquée ci-après. Pour chaque couple d'amorces utilisées, un produit de PCR unique a été obtenu sur gel d'agarose (1<sup>ère</sup> image de chaque ligne), par la suite un ou plusieurs transcrit(s) a/ont été obtenu(s) sur gel d'agarose (2<sup>ème</sup> image) et sur puce Agilent® (3<sup>ème</sup> image).

TCATTGCAGCAAAGATGAAATCAATGATTTATCAAAAAATGATTGAAAGGTGGTTGTAATAATGTTACAATGTGTGAGAAGCAGTCTAAATTCT  
 TCGTGAAATAGTGATTTTGAAGCTAATAAAAAACACACGTGGAATTTAGGGACTATTCATGTTGTTGTTATTTCGTATCTTCCAGAATAAGGA  
 ATCCCATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTTACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAAC  
 GCGGACGTACAGCAAAACTTGCCTGATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTGCGCAAATA  
 CTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTCGATGTGCAGCACCCAGTAAAGTGATGGCCCGCGCGCGGTGCTGAAGAAAAGTAAAAGCGAACCGAATC  
 TGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTTACCCTGTGTAACATAAATCCGATGGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACCTGGCTGA  
 GCTTAGCGCGCGCGCGCTACAGTACAGCGATAACCGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGTAGCGTCACCGCGTTCGCC  
 CGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCTGCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGGGATCCGCGTGATACCACTTACCTC  
 GGGCAATGGCGCAAACCTTGCCTGAACTGACGCTGGGTAAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATAC  
 CACCGGTGCAGCGAGCATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGATAAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCAACGATATC  
 GCGGTGATCTGGCAAAAGATCGTGCCTGCTGATTTCTGGTCACTTACTTACCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAG  
 CGTCGGCGCTAAAATCGTCACCGACGGTTGTAA



# Références bibliographiques

---

1. Naum M, Brown EW, Mason-Gamer RJ. Is 16S rDNA a Reliable Phylogenetic Marker to Characterize Relationships Below the Family Level in the Enterobacteriaceae? *J Mol Evol.* 1 juin 2008;66(6):630-42.
2. Morales-López S, Yepes JA, Prada-Herrera JC, Torres-Jiménez A. Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. *The Journal of Infection in Developing Countries.* 30 avr 2019;13(04):265-73.
3. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, S Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the « Enterobacterales »: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* déc 2016;66(12):5575-99.
4. Taxonomy browser (Enterobacterales) [Internet]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>
5. Dees MW, Lysøe E, Rossmann S, Perminow J, Brurberg MB. *Pectobacterium polaris* sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2017;67(12):5222-9.
6. Shapiro LR, Paulson JN, Arnold BJ, Scully ED, Zhaxybayeva O, Pierce NE, et al. An Introduced Crop Plant Is Driving Diversification of the Virulent Bacterial Pathogen *Erwinia tracheiphila*. *mBio.* 02 2018;9(5).
7. COUTINHO TA, VENTER SN. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Mol Plant Pathol.* 16 mars 2009;10(3):325-35.
8. Young JM, Park D-C. Relationships of plant pathogenic enterobacteria based on partial *atpD*, *carA*, and *recA* as individual and concatenated nucleotide and peptide sequences. *Systematic and Applied Microbiology.* 30 juill 2007;30(5):343-54.
9. Blaut M. Composition and Function of the Gut Microbiome. In: Haller D, éditeur. *The Gut Microbiome in Health and Disease.* Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 5-30.
10. Stearns JC, Lynch MDJ, Senadheera DB, Tenenbaum HC, Goldberg MB, Cvitkovitch DG, et al. Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Scientific Reports.* 25 nov 2011;1(1):1-9.
11. Schierack P, Walk N, Reiter K, Weyrauch KD, Wieler LH. Composition of intestinal Enterobacteriaceae populations of healthy domestic pigs. *Microbiology.* 2007;153(11):3830-7.
12. Moon CD, Young W, Maclean PH, Cookson AL, Bermingham EN. Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *Microbiologyopen.* 17 juin 2018;7(5).
13. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* 5 sept 1997;277(5331):1453-62.
14. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum* [Internet]. 5 févr 2016 [cité 16 févr 2020];4(1). Disponible sur: <https://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012>
15. Lillington J, Geibel S, Waksman G. Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1 sept 2014;1840(9):2783-93.
16. Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Märdil S, Svanborg C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 sept 1996;93(18):9827-32.
17. Christie PJ. The Mosaic Type IV Secretion Systems. *EcoSal Plus* [Internet]. oct 2016 [cité 16 févr 2020];7(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5119655/>
18. Brunet YR, Espinosa L, Harchouni S, Mignot T, Cascales E. Imaging Type VI Secretion-Mediated Bacterial Killing. *Cell Reports.* 31 janv 2013;3(1):36-41.
19. Journet L, Cascales E. The Type VI Secretion System in *Escherichia coli* and Related Species. *EcoSal Plus* [Internet]. 1 févr 2016 [cité 16 févr 2020];7(1). Disponible sur: <https://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2015>

20. Denis F, Le Hello S, Barraud O. Chapitre 30 - Bacilles à Gram négatif aérobies et aéro-anaérobies. In: Denis F, Ploy M-C, Martin C, Cattoir V, éditeurs. *Bactériologie Médicale (Troisième Édition)*. Paris: Elsevier Masson; 2016. p. 301-87.
21. Carbonnelle É, Nassif X. Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *Med Sci (Paris)*. 1 oct 2011;27(10):882-8.
22. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*. 15 août 2009;49(4):543-51.
23. Sarff L, Mccracken G, Schiffer M, Glode M, Robbins J, Ørskov I, et al. Epidemiology of *Escherichia coli* K1 in healthy and diseased newborns. *The Lancet*. 17 mai 1975;305(7916):1099-104.
24. *Escherichia coli* O157:H7 - ScienceDirect [Internet]. [cité 19 févr 2020]. Disponible sur: <https://www-scienceirect-com.docelec.u-bordeaux.fr/science/article/pii/S0140673698012677>
25. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. janv 2010;8(1):26-38.
26. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli* | *Clinical Microbiology Reviews* [Internet]. [cité 21 févr 2020]. Disponible sur: <https://cmr.asm.org/content/26/4/822/figures-only>
27. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*. 2013;5(1):58-65.
28. Clermont O, Dixit OVA, Vangchhia B, Condamine B, Dion S, Bridier-Nahmias A, et al. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*. 2019;21(8):3107-17.
29. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. In: Dobrindt U, Hacker JH, Svanborg C, éditeurs. *Between Pathogenicity and Commensalism* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013 [cité 21 févr 2020]. p. 3-32. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_303](https://doi.org/10.1007/82_2012_303)
30. Société Française de Microbiologie. *Rémic Référentiel en microbiologie médicale 5ème édition*. 2015.
31. Montravers P, Lepape A, Dubreuil L, Gauzit R, Pean Y, Benchimol D, et al. Clinical and microbiological profiles of community-acquired and nosocomial intra-abdominal infections: results of the French prospective, observational EBIA study. *J Antimicrob Chemother*. 1 avr 2009;63(4):785-94.
32. Santé publique France. *Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, Mai-Juin 2017* [Internet]. 2018 juin. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/infections-associees-aux-soins/documents/enquetes-etudes/enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-de-sante-mai-juin-2017>
33. John JF, McNeill WF, Price KE, Kresel PA. Evidence for a chromosomal site specifying amikacin resistance in multiresistant *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 1982;21(4):587-91.
34. Macinga DR, Rather PN. The chromosomal 2'-N-acetyltransferase of *Providencia stuartii*: physiological functions and genetic regulation. *Front Biosci*. 1 févr 1999;4:D132-140.
35. Jiang S-S, Liu M-C, Teng L-J, Wang W-B, Hsueh P-R, Liaw S-J. *Proteus mirabilis* pmrI, an RppA-regulated gene necessary for polymyxin B resistance, biofilm formation, and urothelial cell invasion. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2010;54(4):1564-71.
36. Lin QY, Tsai Y-L, Liu M-C, Lin W-C, Hsueh P-R, Liaw S-J. *Serratia marcescens* arn, a PhoP-regulated locus necessary for polymyxin B resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. sept 2014;58(9):5181-90.
37. Kang KN, Klein DR, Kazi MI, Guérin F, Cattoir V, Brodbelt JS, et al. Colistin heteroresistance in *Enterobacter cloacae* is regulated by PhoPQ-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose addition to lipid A. *Mol Microbiol*. 2019;111(6):1604-16.

38. Jayol A, Saly M, Nordmann P, Ménard A, Poirel L, Dubois V. *Hafnia*, an enterobacterial genus naturally resistant to colistin revealed by three susceptibility testing methods. *J Antimicrob Chemother.* 01 2017;72(9):2507-11.
39. Pournaras S, Koumaki V, Spanakis N, Gennimata V, Tsakris A. Current perspectives on tigecycline resistance in Enterobacteriaceae: susceptibility testing issues and mechanisms of resistance. *Int J Antimicrob Agents.* juill 2016;48(1):11-8.
40. Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance. *Infect Dis Clin North Am.* juin 2016;30(2):523-37.
41. Aires JR, Nikaido H. Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* mars 2005;187(6):1923-9.
42. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci.* sept 2015;1354(1):12-31.
43. Santé publique France. Consommation d'antibiotiques en secteur de ville en France de 2009 à 2018. synthèse des indicateurs mis en ligne sur Géodes [Internet]. 2019 nov. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/infections-associees-aux-soins/documents/rapport-synthese/consommation-d-antibiotiques-en-secteur-de-ville-en-france-de-2009-a-2018.-synthese-des-indicateurs-mis-en-ligne-sur-geodes>
44. Santé publique France. Surveillance de l'antibiorésistance en établissements de santé Partie 1 - Consommation d'antibiotiques [Internet]. 2019 nov. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/infections-associees-aux-soins/documents/rapport-synthese/surveillance-de-l-antibioresistance-en-etablissement-de-sante-resultats-2018.-partie-1-consommation-d-antibiotiques>
45. Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol.* 28 déc 2011;10(2):123-36.
46. Vergalli J, Bodrenko IV, Masi M, Moynié L, Acosta-Gutiérrez S, Naismith JH, et al. Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* mars 2020;18(3):164-76.
47. Doerrler WT, Raetz CRH. ATPase Activity of the MsbA Lipid Flippase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 27 sept 2002;277(39):36697-705.
48. Lewinson O, Adler J, Poelarends GJ, Mazurkiewicz P, Driessen AJM, Bibi E. The *Escherichia coli* multidrug transporter MdfA catalyzes both electrogenic and electroneutral transport reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 févr 2003;100(4):1667-72.
49. Long F, Rouquette-Loughlin C, Shafer WM, Yu EW. Functional cloning and characterization of the multidrug efflux pumps NorM from *Neisseria gonorrhoeae* and YdhE from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2008;52(9):3052-60.
50. Boulant E, Davin-Regli A, Pagès J-M, Bolla J-M. Les pompes d'efflux, mécanisme de résistance bactérien. *Revue Francophone des Laboratoires.* 1 févr 2020;2020(519):38-49.
51. Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, van Veen HW, Pos KM, Piddock LJV, et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(9):523-39.
52. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, et al. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 19 juill 2017;32(1):917-9.
53. Ambler RP, Baddiley J, Abraham EP. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences.* 16 mai 1980;289(1036):321-31.
54. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2010;54(3):969-76.
55. Bush K. Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10).
56. CASFM / EUCAST V1.1 Avril 2020 [Internet]. Société Française de Microbiologie. 2020. Disponible sur: <https://www.sfm-microbiologie.org/2020/04/07/casfm-eucast-v1-0-avril-2020/>
57. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4).

58. Arpin C, Coulange L, Dubois V, Andre C, Fischer I, Fourmaux S, et al. Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Strains in Various Types of Private Health Care Centers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 sept 2007;51(9):3440-4.
59. Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, et al. Nationwide survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. juin 2009;63(6):1205-14.
60. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 août 2017;72(8):2145-55.
61. Robin F, Beyrouthy R, Bonacorsi S, Aissa N, Bret L, Brieu N, et al. Inventory of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in France as Assessed by a Multicenter Study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. mars 2017 [cité 9 nov 2018];61(3). Disponible sur: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01911-16>
62. Santé publique France. Bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en 2018 Mission Spare Réseau BMR-Raisin. 2019.
63. Santé publique France. Surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques en soins de ville et en établissements pour personnes âgées dépendantes [Internet]. 2019 nov. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/resistance-aux-antibiotiques/documents/rapport-synthese/surveillance-de-la-resistance-bacterienne-aux-antibiotiques-en-soins-de-ville-et-en-etablissements-pour-personnes-ages-dependantes.-annee-2018>
64. Arpin C, Dubois V, Coulange L, Andre C, Fischer I, Noury P, et al. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Community and Private Health Care Centers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 nov 2003;47(11):3506-14.
65. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2012 [cité 9 nov 2018];3. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00110/abstract>
66. Woerther P-L, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev*. oct 2013;26(4):744-58.
67. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother*. déc 2002;50(6):1031-4.
68. CNR résistance aux antibiotiques - Bilans d'activité [Internet]. [cité 21 mars 2020]. Disponible sur: <http://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/bilans-dactivite.html>
69. Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, et al. The epidemic of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *MBio*. 17 déc 2013;4(6):e00377-00313.
70. Lavollay M, Mamlouk K, Frank T, Akpabie A, Burghoffer B, Ben Redjeb S, et al. Clonal Dissemination of a CTX-M-15  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strain in the Paris Area, Tunis, and Bangui. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 juill 2006;50(7):2433-8.
71. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*. janv 2008;14:33-41.
72. Antimicrobial consumption - Annual Epidemiological Report for 2018 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2019 [cité 1 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-consumption-europe-2018>
73. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2019 [cité 1 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>
74. Edward R. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae - Second update. 2019;17.
75. Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S, Struelens MJ, Monnet DL, Albiger B, et al. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe, assessment by national experts from

- 37 countries, July 2018. Eurosurveillance [Internet]. 28 févr 2019 [cité 20 mars 2020];24(9). Disponible sur: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.9.1900123>
76. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. sept 2014;20(9):821-30.
  77. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical Infectious Diseases*. 3 avr 2018;66(8):1290-7.
  78. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis*. 15 févr 2017;215(Suppl 1):S28-36.
  79. Santé publique France. Antibiorésistance : une menace mondiale, des conséquences individuelles [Internet]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/resistance-aux-antibiotiques/documents/infographie/antibioresistance-une-menace-mondiale-des-consequences-individuelles>
  80. The review on antimicrobial resistance. Tackling drug-resistant infections globally : Final report and recommendations [Internet]. 2016. Disponible sur: <https://amr-review.org/>
  81. World Health Organization, éditeur. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014. 232 p.
  82. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. mars 2012;18(3):268-81.
  83. HCSP. Actualisation des recommandations relatives aux BHRé [Internet]. Rapport de l'HCSP. Paris: Haut Conseil de la Santé Publique; 2019 déc. Disponible sur: <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=758>
  84. De Man TJB, Lutgring JD, Lonsway DR, Anderson KF, Kiehlbauch JA, Chen L, et al. Genomic Analysis of a Pan-Resistant Isolate of *Klebsiella pneumoniae*, United States 2016. *mBio* [Internet]. 3 avr 2018;9(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5885025/>
  85. Organisation mondiale de la santé. Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens [Internet]. 2015. Disponible sur: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/fr/>
  86. OMS. Soixante-douzième assemblée mondiale de la santé Suivi des réunions de haut niveau de l'Assemblée générale des Nations Unies sur des questions relatives à la santé Résistance aux antimicrobiens [Internet]. 2019. Disponible sur: [https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA72/A72\\_18-fr.pdf](https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA72/A72_18-fr.pdf)
  87. World Health Organization. Model List of Essential Medicines 21st List [Internet]. 2019. Disponible sur: <https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>
  88. WHO. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial, including tuberculosis [Internet]. 2017. Disponible sur: [https://www.who.int/medicines/areas/rational\\_use/prioritization-of-pathogens/en/](https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/prioritization-of-pathogens/en/)
  89. Commission européenne. A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR) [Internet]. 2017. Disponible sur: [https://ec.europa.eu/health/amr/action\\_eu\\_en](https://ec.europa.eu/health/amr/action_eu_en)
  90. Comité interministériel pour la santé. Feuille de route : Maîtriser la résistance bactérienne aux antibiotiques [Internet]. 2016. Disponible sur: <http://solidarites-sante.gouv.fr/prevention-en-sante/les-antibiotiques-des-medicaments-essentiels-a-preserver/des-politiques-publiques-pour-preserver-l-efficacite-des-antibiotiques/article/lutte-et-prevention-en-france>
  91. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. janv 2019;19(1):56-66.
  92. Etude Burden BMR. Morbidité et mortalité des infections à bactéries multi-résistantes aux antibiotiques en France en 2012 [Internet]. Institut de veille sanitaire; 2015 juin. Disponible sur: <http://avibep.org/wp-content/uploads/2019/09/Etude-Burden-BMR.pdf>

93. Santé publique France. Antibiotiques et résistance bactérienne : une menace mondiale, des conséquences individuelles. nov 2019;
94. anses. Suivi des ventes d'antibiotiques vétérinaires 2018 [Internet]. 2019. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2018.pdf>
95. Société française d'hygiène hospitalière. Isolement septique Recommandations pour les établissements de soins [Internet]. 1998. Disponible sur: [https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/recommandations\\_isolement\\_septique.pdf](https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/recommandations_isolement_septique.pdf)
96. Société française d'hygiène hospitalière. Prévention de la transmission croisée : précautions complémentaires contact. 2009.
97. Haut Conseil de la Santé Publique. Prévention de la transmission croisée des Bactéries Hautement Résistantes aux antibiotiques émergentes. 2013.
98. Haut Conseil de la Santé Publique. Recommandations relatives aux mesures à mettre en œuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination. 2010.
99. Haute autorité de santé. Antibiothérapie des infections à entérobactéries et à *Pseudomonas aeruginosa* chez l'adulte : place des carbapénèmes et de leurs alternatives. 2019 mai.
100. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 14 févr 2018 [cité 6 avr 2020];31(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5967687/>
101. Emeraud C, Escaut L, Boucly A, Fortineau N, Bonnin RA, Naas T, et al. Aztreonam plus Clavulanate, Tazobactam, or Avibactam for Treatment of Infections Caused by Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019;63(5):7.
102. Davido B, Fellous L, Lawrence C, Maxime V, Rottman M, Dinh A. Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam, an Interesting Strategy To Overcome  $\beta$ -Lactam Resistance Conferred by Metallo- $\beta$ -Lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 24 août 2017 [cité 6 avr 2020];61(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5571320/>
103. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol*. avr 2019;17(4):203-18.
104. Shields RK, Chen L, Cheng S, Chavda KD, Press EG, Snyder A, et al. Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Due to Plasmid-Borne blaKPC-3 Mutations during Treatment of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 23 févr 2017 [cité 7 avr 2020];61(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5328542/>
105. World Health Organization. Antibacterial agents in clinical development [Internet]. 2019. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330420/9789240000193-eng.pdf?ua=1>
106. Haute autorité de santé. Commission de la transparence Méropénème/vaborbactam VABOREM. 2020.
107. Castanheira M, Deshpande LM, Woosley LN, Serio AW, Krause KM, Flamm RK. Activity of plazomicin compared with other aminoglycosides against isolates from European and adjacent countries, including Enterobacteriaceae molecularly characterized for aminoglycoside-modifying enzymes and other resistance mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 14 sept 2018; Disponible sur: <https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dky344/5096851>
108. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- $\beta$ -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev*. 20 2019;32(2).
109. Czaplewski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti VA, et al. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. *The Lancet Infectious Diseases*. févr 2016;16(2):239-51.
110. Ghosh C, Sarker P, Issa R, Haldar J. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends in Microbiology*. avr 2019;27(4):323-38.
111. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. mars 2011;1(2):66-85.

112. Dufour N, Debarbieux L. La phagothérapie: Une arme crédible face à l'antibiorésistance. *médecine/sciences*. avr 2017;33(4):410-6.
113. Wang Z, Zheng P, Ji W, Fu Q, Wang H, Yan Y, et al. SLPW: A Virulent Bacteriophage Targeting Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In vitro and In vivo. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 15 juin 2016 [cité 11 avr 2020];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00934/abstract>
114. Forti F, Roach DR, Cafora M, Pasini ME, Horner DS, Fiscarelli EV, et al. Design of a Broad-Range Bacteriophage Cocktail That Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Treats Acute Infections in Two Animal Models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. 19 mars 2018 [cité 11 avr 2020];62(6). Disponible sur: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02573-17>
115. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que Y-A, Resch G, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*. janv 2019;19(1):35-45.
116. Vázquez R, García E, García P. Phage Lysins for Fighting Bacterial Respiratory Infections: A New Generation of Antimicrobials. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 16 oct 2018 [cité 12 avr 2020];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02252/full>
117. Raheem N, Straus SK. Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 12 déc 2019 [cité 12 avr 2020];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02866/full>
118. Pexiganan Versus Placebo Control for the Treatment of Mild Infections of Diabetic Foot Ulcers - Study Results - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 12 avr 2020]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01594762>
119. Geng M, Ravichandran A, Escano J, Smith L. Efficacious Analogs of the Lantibiotic Mutacin 1140 against a Systemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. 1 oct 2018 [cité 12 avr 2020];62(12). Disponible sur: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01626-18>
120. Brunati C, Thomsen TT, Gaspari E, Maffioli S, Sosio M, Jabes D, et al. Expanding the potential of NAI-107 for treating serious ESKAPE pathogens: synergistic combinations against Gram-negatives and bactericidal activity against non-dividing cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 févr 2018;73(2):414-24.
121. Goderska K, Agudo Pena S, Alarcon T. Helicobacter pylori treatment: antibiotics or probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. janv 2018;102(1):1-7.
122. Mottin VHM, Suyenaga ES. An approach on the potential use of probiotics in the treatment of skin conditions: acne and atopic dermatitis. *International Journal of Dermatology*. déc 2018;57(12):1425-32.
123. Klarin B, Adolfsson A, Torstensson A, Larsson A. Can probiotics be an alternative to chlorhexidine for oral care in the mechanically ventilated patient? A multicentre, prospective, randomised controlled open trial. *Critical Care* [Internet]. déc 2018 [cité 13 avr 2020];22(1). Disponible sur: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-018-2209-4>
124. Coleman A, Cervin A. Probiotics in the treatment of otitis media. The past, the present and the future. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. janv 2019;116:135-40.
125. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine*. 31 janv 2013;368(5):407-15.
126. Huttner BD, de Lastours V, Wassenberg M, Maharshak N, Mauris A, Galperine T, et al. A 5-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a randomized clinical trial. *Clinical Microbiology and Infection*. juill 2019;25(7):830-8.
127. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Treatment Guidance Document for *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Microbiology and Infection*. mars 2014;20:1-26.
128. Hancock REW, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nature Reviews Microbiology*. avr 2012;10(4):243-54.

129. Porte R, Fougeron D, Muñoz-Wolf N, Tabareau J, Georgel A-F, Wallet F, et al. A Toll-Like Receptor 5 Agonist Improves the Efficacy of Antibiotics in Treatment of Primary and Influenza Virus-Associated Pneumococcal Mouse Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. oct 2015;59(10):6064-72.
130. Matarazzo L, Casilag F, Porte R, Wallet F, Cayet D, Faveeuw C, et al. Therapeutic Synergy Between Antibiotics and Pulmonary Toll-Like Receptor 5 Stimulation in Antibiotic-Sensitive or -Resistant Pneumonia. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 9 avr 2019 [cité 13 avr 2020];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.00723/full>
131. Sarker P, Ahmed S, Tiash S, Rekha RS, Stromberg R, Andersson J, et al. Phenylbutyrate Counteracts Shigella Mediated Downregulation of Cathelicidin in Rabbit Lung and Intestinal Epithelia: A Potential Therapeutic Strategy. *Chu HW, éditeur. PLoS ONE*. 3 juin 2011;6(6):e20637.
132. Jellbauer S, Perez Lopez A, Behnsen J, Gao N, Nguyen T, Murphy C, et al. Beneficial Effects of Sodium Phenylbutyrate Administration during Infection with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *McCormick BA, éditeur. Infection and Immunity*. sept 2016;84(9):2639-52.
133. Rekha RS, Mily A, Sultana T, Haq A, Ahmed S, Mostafa Kamal SM, et al. Immune responses in the treatment of drug-sensitive pulmonary tuberculosis with phenylbutyrate and vitamin D3 as host directed therapy. *BMC Infectious Diseases* [Internet]. déc 2018 [cité 13 avr 2020];18(1). Disponible sur: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3203-9>
134. Gestal MC, Johnson HM, Harvill ET. Immunomodulation as a Novel Strategy for Prevention and Treatment of *Bordetella* spp. Infections. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 13 déc 2019 [cité 13 avr 2020];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.02869/full>
135. leem les entreprises du médicament. Santé 2030 : une analyse prospective de l'innovation en santé [Internet]. 2019. Disponible sur: <https://www.leem.org/publication/sante-2030-une-analyse-prospective-de-linnovation-en-sante>
136. Adlbrecht C, Wurm R, Depuydt P, Spapen H, Lorente JA, Staudinger T, et al. Efficacy, immunogenicity, and safety of IC43 recombinant *Pseudomonas aeruginosa* vaccine in mechanically ventilated intensive care patients—a randomized clinical trial. *Critical Care* [Internet]. déc 2020 [cité 13 avr 2020];24(1). Disponible sur: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-020-2792-z>
137. Bézaray N, Ayad A, Dubischar K, Firbas C, Hochreiter R, Kiermayr S, et al. Safety, immunogenicity and dose response of VLA84, a new vaccine candidate against *Clostridium difficile*, in healthy volunteers. *Vaccine*. 17 mai 2016;34(23):2585-92.
138. Inoue M, Yonemura T, Baber J, Shoji Y, Aizawa M, Cooper D, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a novel 4-antigen *Staphylococcus aureus* vaccine (SA4Ag) in healthy Japanese adults. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 7 août 2018;1-10.
139. Huttner A, Hatz C, van den Dobbelen G, Abbanat D, Hornacek A, Frölich R, et al. Safety, immunogenicity, and preliminary clinical efficacy of a vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in women with a history of recurrent urinary tract infection: a randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1b trial. *The Lancet Infectious Diseases*. mai 2017;17(5):528-37.
140. Huttner A, Gambillara V. The development and early clinical testing of the ExPEC4V conjugate vaccine against uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 oct 2018;24(10):1046-50.
141. Kobayashi M, Schrag SJ, Alderson MR, Madhi SA, Baker CJ, Sobanjo-ter Meulen A, et al. WHO consultation on group B *Streptococcus* vaccine development: Report from a meeting held on 27–28 April 2016. *Vaccine*. nov 2019;37(50):7307-14.
142. Kadouri DE, To K, Shanks RMQ, Doi Y. Predatory Bacteria: A Potential Ally against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *CloECKAERT A, éditeur. PLoS ONE*. 1 mai 2013;8(5):e63397.
143. Kim J-S, Cho D-H, Park M, Chung W-J, Shin D, Ko KS, et al. CRISPR/Cas9-Mediated Re-Sensitization of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Harboring Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28 févr 2016;26(2):394-401.
144. Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature Biotechnology*. nov 2014;32(11):1141-5.

145. Hijazi S, Visaggio D, Pirolo M, Frangipani E, Bernstein L, Visca P. Antimicrobial Activity of Gallium Compounds on ESKAPE Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 10 sept 2018 [cité 14 avr 2020];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00316/full>
146. Goss CH, Kaneko Y, Khuu L, Anderson GD, Ravishankar S, Aitken ML, et al. Gallium disrupts bacterial iron metabolism and has therapeutic effects in mice and humans with lung infections. *Science Translational Medicine*. 26 sept 2018;10(460):eaat7520.
147. Khatoon N, Alam H, Khan A, Raza K, Sardar M. Ampicillin Silver Nanoformulations against Multidrug resistant bacteria. *Scientific Reports* [Internet]. déc 2019 [cité 14 avr 2020];9(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-43309-0>
148. Frei A, Zuegg J, Elliott AG, Baker M, Braese S, Brown C, et al. Metal complexes as a promising source for new antibiotics. *Chemical Science*. 2020;11(10):2627-39.
149. Baptista PV, McCusker MP, Carvalho A, Ferreira DA, Mohan NM, Martins M, et al. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria—“A Battle of the Titans”. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2 juill 2018 [cité 14 avr 2020];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01441/full>
150. Amin RM, Bhayana B, Hamblin MR, Dai T. Antimicrobial blue light inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* by photo-excitation of endogenous porphyrins: In vitro and in vivo studies: ANTIMICROBIAL BLUE LIGHT INACTIVATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. *Lasers in Surgery and Medicine*. juill 2016;48(5):562-8.
151. Dong P, Mohammad H, Hui J, Leanse LG, Li J, Liang L, et al. Photolysis of Staphyloxanthin in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Potentiates Killing by Reactive Oxygen Species. *Advanced Science*. 30 mars 2019;1900030.
152. Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Hashimoto N, Yokohira M, Matsuda Y. Development and Clinical Trials of Nucleic Acid Medicines for Pancreatic Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 29 août 2019;20(17):4224.
153. Bajan S, Hutvagner G. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells*. 7 janv 2020;9(1):137.
154. McNeer NA, Anandalingam K, Fields RJ, Caputo C, Kopic S, Gupta A, et al. Nanoparticles that deliver triplex-forming peptide nucleic acid molecules correct F508del CFTR in airway epithelium. *Nature Communications* [Internet]. nov 2015 [cité 17 avr 2020];6(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/ncomms7952>
155. Economos NG, Oyaghire S, Quijano E, Ricciardi AS, Saltzman WM, Glazer PM. Peptide Nucleic Acids and Gene Editing: Perspectives on Structure and Repair. *Molecules*. 8 févr 2020;25(3):735.
156. Lundin KE, Gissberg O, Smith CIE. Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present. *Human Gene Therapy*. août 2015;26(8):475-85.
157. Sully EK, Geller BL. Antisense antimicrobial therapeutics. *Current Opinion in Microbiology*. oct 2016;33:47-55.
158. Rasmussen L, Sperling-Petersen H, Mortensen K. Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. *Microbial Cell Factories*. 2007;6(1):24.
159. Soler-Bistué A, Zorreguieta A, Tolmasky ME. Bridged Nucleic Acids Reloaded. *Molecules*. 21 juin 2019;24(12).
160. Geinguenaud F, Guenin E, Lalatonne Y, Motte L. Vectorization of Nucleic Acids for Therapeutic Approach: Tutorial Review. *ACS Chemical Biology*. 20 mai 2016;11(5):1180-91.
161. Benizri S, Gissot A, Martin A, Vialet B, Grinstaff MW, Barthélémy P. Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications. *Bioconjugate Chemistry*. 20 févr 2019;30(2):366-83.
162. Smith CIE, Zain R. Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 6 janv 2019;59(1):605-30.
163. Bennett CF. Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annual Review of Medicine*. 27 janv 2019;70(1):307-21.

164. Khvorova A, Watts JK. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nature Biotechnology*. mars 2017;35(3):238-48.
165. Xue X-Y, Mao X-G, Zhou Y, Chen Z, Hu Y, Hou Z, et al. Advances in the delivery of antisense oligonucleotides for combating bacterial infectious diseases. *Nanomedicine*. 2018;14(3):745-58.
166. Równicki M, Wojciechowska M, Wierzba AJ, Czarnecki J, Bartosik D, Gryko D, et al. Vitamin B12 as a carrier of peptide nucleic acid (PNA) into bacterial cells. *Scientific Reports* [Internet]. déc 2017 [cité 21 avr 2020];7(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-08032-8>
167. Meng J, He G, Wang H, Jia M, Ma X, Da F, et al. Reversion of antibiotic resistance by inhibiting *mecA* in clinical methicillin-resistant *Staphylococci* by antisense phosphorothioate oligonucleotide. *The Journal of Antibiotics*. mars 2015;68(3):158-64.
168. Readman JB, Dickson G, Coldham NG. Tetrahedral DNA Nanoparticle Vector for Intracellular Delivery of Targeted Peptide Nucleic Acid Antisense Agents to Restore Antibiotic Sensitivity in Cefotaxime-Resistant *Escherichia coli*. *Nucleic Acid Therapeutics*. juin 2017;27(3):176-81.
169. Zhang Y, Ma W, Zhu Y, Shi S, Li Q, Mao C, et al. Inhibiting Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Tetrahedral DNA Nanostructure-Enabled Antisense Peptide Nucleic Acid Delivery. *Nano Lett*. 12 2018;18(9):5652-9.
170. Monserrat-Martinez A, Gambin Y, Sierceki E. Thinking Outside the Bug: Molecular Targets and Strategies to Overcome Antibiotic Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 13 mars 2019;20(6):1255.
171. Lopez C, Arivett BA, Actis LA, Tolmasky ME. Inhibition of AAC(6')-Ib-Mediated Resistance to Amikacin in *Acinetobacter baumannii* by an Antisense Peptide-Conjugated 2',4'-Bridged Nucleic Acid-NC-DNA Hybrid Oligomer. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. sept 2015;59(9):5798-803.
172. Tilley LD, Hine OS, Kellogg JA, Hassinger JN, Weller DD, Iversen PL, et al. Gene-Specific Effects of Antisense Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer-Peptide Conjugates on *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Pure Culture and in Tissue Culture. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. août 2006;50(8):2789-96.
173. Tilley LD, Mellbye BL, Puckett SE, Iversen PL, Geller BL. Antisense peptide-phosphorodiamidate morpholino oligomer conjugate: dose-response in mice infected with *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. janv 2007;59(1):66-73.
174. Hansen AM, Bonke G, Larsen CJ, Yavari N, Nielsen PE, Franzyk H. Antibacterial Peptide Nucleic Acid–Antimicrobial Peptide (PNA–AMP) Conjugates: Antisense Targeting of Fatty Acid Biosynthesis. *Bioconjugate Chemistry*. 20 avr 2016;27(4):863-7.
175. Geller BL, Marshall-Batty K, Schnell FJ, McKnight MM, Iversen PL, Greenberg DE. Gene-silencing antisense oligomers inhibit *acinetobacter* growth in vitro and in vivo. *J Infect Dis*. 15 nov 2013;208(10):1553-60.
176. Greenberg DE, Marshall-Batty KR, Brinster LR, Zarembek KA, Shaw PA, Mellbye BL, et al. Antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers targeted to an essential gene inhibit *Burkholderia cepacia* complex. *J Infect Dis*. 15 juin 2010;201(12):1822-30.
177. Mellbye BL, Puckett SE, Tilley LD, Iversen PL, Geller BL. Variations in amino acid composition of antisense peptide-phosphorodiamidate morpholino oligomer affect potency against *Escherichia coli* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 2009;53(2):525-30.
178. Tan X-X, Actor JK, Chen Y. Peptide nucleic acid antisense oligomer as a therapeutic strategy against bacterial infection: proof of principle using mouse intraperitoneal infection. *Antimicrob Agents Chemother*. août 2005;49(8):3203-7.
179. Otsuka T, Brauer AL, Kirkham C, Sully EK, Pettigrew MM, Kong Y, et al. Antimicrobial activity of antisense peptide-peptide nucleic acid conjugates against non-typeable *Haemophilus influenzae* in planktonic and biofilm forms. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(1):137-44.
180. Mitev GM, Mellbye BL, Iversen PL, Geller BL. Inhibition of Intracellular Growth of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Tissue Culture by Antisense Peptide-Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. sept 2009;53(9):3700-4.

181. Daly SM, Sturge CR, Marshall-Batty KR, Felder-Scott CF, Jain R, Geller BL, et al. Antisense Inhibitors Retain Activity in Pulmonary Models of Burkholderia Infection. *ACS Infect Dis.* 11 2018;4(5):806-14.
182. Mellbye BL, Weller DD, Hassinger JN, Reeves MD, Lovejoy CE, Iversen PL, et al. Cationic phosphorodiamidate morpholino oligomers efficiently prevent growth of *Escherichia coli* in vitro and in vivo. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* janv 2010;65(1):98-106.
183. Ghosal A, Nielsen PE. Potent Antibacterial Antisense Peptide–Peptide Nucleic Acid Conjugates Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acid Therapeutics.* oct 2012;22(5):323-34.
184. Panchal RG, Geller BL, Mellbye B, Lane D, Iversen PL, Bavari S. Peptide Conjugated Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers Increase Survival of Mice Challenged with Ames *Bacillus anthracis*. *Nucleic Acid Therapeutics.* oct 2012;22(5):316-22.
185. Howard JJ, Sturge CR, Moustafa DA, Daly SM, Marshall-Batty KR, Felder CF, et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by Peptide-Conjugated Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(4).
186. Rajasekaran P, Alexander JC, Seleem MN, Jain N, Sriranganathan N, Wattam AR, et al. Peptide nucleic acids inhibit growth of *Brucella suis* in pure culture and in infected murine macrophages. *International Journal of Antimicrobial Agents.* avr 2013;41(4):358-62.
187. Ayhan DH, Tamer YT, Akbar M, Bailey SM, Wong M, Daly SM, et al. Sequence-Specific Targeting of Bacterial Resistance Genes Increases Antibiotic Efficacy. *PLoS Biol.* 2016;14(9):e1002552.
188. Meng J, Bai H, Jia M, Ma X, Hou Z, Xue X, et al. Restoration of antibiotic susceptibility in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* by targeting *acrB* with antisense phosphorothioate oligonucleotide encapsulated in novel anion liposome. *J Antibiot.* mars 2012;65(3):129-34.
189. Santos RS, Dakwar GR, Zagato E, Brans T, Figueiredo C, Raemdonck K, et al. Intracellular delivery of oligonucleotides in *Helicobacter pylori* by fusogenic liposomes in the presence of gastric mucus. *Biomaterials.* sept 2017;138:1-12.
190. Readman JB, Dickson G, Coldham NG. Translational Inhibition of CTX-M Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase in Clinical Strains of *Escherichia coli* by Synthetic Antisense Oligonucleotides Partially Restores Sensitivity to Cefotaxime. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 24 mars 2016 [cité 9 nov 2018];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00373/abstract>
191. Sully EK, Geller BL, Li L, Moody CM, Bailey SM, Moore AL, et al. Peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomer (PPMO) restores carbapenem susceptibility to NDM-1-positive pathogens *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 20 déc 2016;dkw476.
192. Oh E, Zhang Q, Jeon B. Target optimization for peptide nucleic acid (PNA)-mediated antisense inhibition of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1 févr 2014;69(2):375-80.
193. Hegarty JP, Krzeminski J, Sharma AK, Guzman-Villanueva D, Weissig V, Stewart DB. Bolaamphiphile-based nanocomplex delivery of phosphorothioate gapmer antisense oligonucleotides as a treatment for *Clostridium difficile*. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:3607-19.
194. Nekhotiaeva N, Awasthi SK, Nielsen PE, Good L. Inhibition of *Staphylococcus aureus* gene expression and growth using antisense peptide nucleic acids. *Molecular Therapy.* 1 oct 2004;10(4):652-9.
195. Meng J, Da F, Ma X, Wang N, Wang Y, Zhang H, et al. Antisense Growth Inhibition of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Locked Nucleic Acid Conjugated with Cell-Penetrating Peptide as a Novel FtsZ Inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2015;59(2):914-22.
196. Liang S, He Y, Xia Y, Wang H, Wang L, Gao R, et al. Inhibiting the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro with antisense peptide nucleic acid conjugates targeting the *ftsZ* gene. *Int J Infect Dis.* janv 2015;30:1-6.
197. Patenge N, Pappesch R, Krawack F, Walda C, Mraheil MA, Jacob A, et al. Inhibition of Growth and Gene Expression by PNA-peptide Conjugates in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Therapy - Nucleic Acids.* 2013;2:e132.
198. Kurupati P, Tan KSW, Kumarasinghe G, Poh CL. Inhibition of Gene Expression and Growth by Antisense Peptide Nucleic Acids in a Multiresistant  $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* mars 2007;51(3):805-11.

199. Kulyté A, Nekhotiaeva N, Awasthi SK, Good L. Inhibition of *Mycobacterium smegmatis* Gene Expression and Growth Using Antisense Peptide Nucleic Acids. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2005;9(2):101-9.
200. Maekawa K, Azuma M, Okuno Y, Tsukamoto T, Nishiguchi K, Setsukinai K, et al. Antisense peptide nucleic acid–peptide conjugates for functional analyses of genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. nov 2015;23(22):7234-9.
201. Martínez-Gutián M, Vázquez-Ucha JC, Álvarez-Fraga L, Conde-Pérez K, Bou G, Poza M, et al. Antisense inhibition of *lpxB* gene expression in *Acinetobacter baumannii* by peptide–PNA conjugates and synergy with colistin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 janv 2020;75(1):51-9.
202. Meng J, Wang H, Hou Z, Chen T, Fu J, Ma X, et al. Novel anion liposome-encapsulated antisense oligonucleotide restores susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rescues mice from lethal sepsis by targeting *mecA*. *Antimicrob Agents Chemother*. juill 2009;53(7):2871-8.
203. Goh S, Loeffler A, Lloyd DH, Nair SP, Good L. Oxacillin sensitization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* by antisense peptide nucleic acids in vitro. *BMC Microbiology* [Internet]. déc 2015 [cité 21 avr 2020];15(1). Disponible sur: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/262>
204. Wang H, Meng J, Jia M, Ma X, He G, Yu J, et al. *oprM* as a new target for reversion of multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. déc 2010;60(3):275-82.
205. Abushahba MFN, Mohammad H, Thangamani S, Hussein AAA, Seleem MN. Impact of different cell penetrating peptides on the efficacy of antisense therapeutics for targeting intracellular pathogens. *Sci Rep*. 10 févr 2016;6:20832.
206. Bai H, Sang G, You Y, Xue X, Zhou Y, Hou Z, et al. Targeting RNA Polymerase Primary  $\sigma 70$  as a Therapeutic Strategy against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Antisense Peptide Nucleic Acid. *Bereswill S, éditeur. PLoS ONE*. 10 janv 2012;7(1):e29886.
207. Bai H, You Y, Yan H, Meng J, Xue X, Hou Z, et al. Antisense inhibition of gene expression and growth in gram-negative bacteria by cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids targeted to *rpoD* gene. *Biomaterials*. janv 2012;33(2):659-67.
208. Baillet J, Desvergues V, Hamoud A, Latxague L, Barthélémy P. Lipid and Nucleic Acid Chemistries: Combining the Best of Both Worlds to Construct Advanced Biomaterials. *Advanced Materials*. mars 2018;30(11):1705078.
209. Benizri S, Ferey L, Alies B, Mebarek N, Vacher G, Appavoo A, et al. Nucleoside-Lipid-Based Nanocarriers for Sorafenib Delivery. *Nanoscale Research Letters* [Internet]. déc 2018 [cité 27 avr 2020];13(1). Disponible sur: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/s11671-017-2420-2>
210. Oumzil K, Benizri S, Tonelli G, Staedel C, Appavoo A, Chaffanet M, et al. pH-Cleavable Nucleoside Lipids: A New Paradigm for Controlling the Stability of Lipid-Based Delivery Systems. *ChemMedChem*. nov 2015;10(11):1797-801.
211. Luvino D, Khiati S, Oumzil K, Rocchi P, Camplo M, Barthélémy P. Efficient delivery of therapeutic small nucleic acids to prostate cancer cells using ketal nucleoside lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. déc 2013;172(3):954-61.
212. Godeau G, Staedel C, Barthélémy P. Lipid-Conjugated Oligonucleotides via “Click Chemistry” Efficiently Inhibit Hepatitis C Virus Translation. *Journal of Medicinal Chemistry*. août 2008;51(15):4374-6.
213. Aimé A, Beztsinna N, Patwa A, Pokolenko A, Bestel I, Barthélémy P. Quantum Dot Lipid Oligonucleotide Bioconjugates: Toward a New Anti-MicroRNA Nanoplatform. *Bioconjugate Chemistry*. 21 août 2013;24(8):1345-55.
214. Karaki S, Benizri S, Mejías R, Baylot V, Branger N, Nguyen T, et al. Lipid-oligonucleotide conjugates improve cellular uptake and efficiency of TCTP-antisense in castration-resistant prostate cancer. *Journal of Controlled Release*. juill 2017;258:1-9.
215. Gissot A, Di Primo C, Bestel I, Giannone G, Chapuis H, Barthélémy P. Sensitive liposomes encoded with oligonucleotide amphiphiles: a biocompatible switch. *Chemical Communications*. 2008;(43):5550.

216. Patwa A, Gissot A, Bestel I, Barthélémy P. Hybrid lipid oligonucleotide conjugates: synthesis, self-assemblies and biomedical applications. *Chemical Society Reviews*. 2011;40(12):5844.
217. Pokhonenko O, Gissot A, Vialet B, Bathany K, Thiéry A, Barthélémy P. Lipid oligonucleotide conjugates as responsive nanomaterials for drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013;1(39):5329.
218. Vialet B, Gissot A, Delzor R, Barthélémy P. Controlling G-quadruplex formation via lipid modification of oligonucleotide sequences. *Chem Commun*. 2017;53(84):11560-3.
219. Courtney CM, Chatterjee A. Sequence-Specific Peptide Nucleic Acid-Based Antisense Inhibitors of TEM-1  $\beta$ -Lactamase and Mechanism of Adaptive Resistance. *ACS Infectious Diseases*. 12 juin 2015;1(6):253-63.
220. Zhou K, Zhou L, Lim Q 'En, Zou R, Stephanopoulos G, Too H-P. Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of *Escherichia coli* to protein overexpression by quantitative PCR. *BMC Mol Biol*. 23 avr 2011;12:18.
221. Belotserkovskii BP, Liu R, Tornaletti S, Krasilnikova MM, Mirkin SM, Hanawalt PC. Mechanisms and implications of transcription blockage by guanine-rich DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 juill 2010;107(29):12816-21.
222. Skourti-Stathaki K, Proudfoot NJ. A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes Dev*. 7 janv 2014;28(13):1384-96.
223. Belotserkovskii BP, Soo Shin JH, Hanawalt PC. Strong transcription blockage mediated by R-loop formation within a G-rich homopurine-homopyrimidine sequence localized in the vicinity of the promoter. *Nucleic Acids Res*. 20 juin 2017;45(11):6589-99.
224. Wu Y, Wu M, He G, Zhang X, Li W, Gao Y, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: A universal internal control for Western blots in prokaryotic and eukaryotic cells. *Analytical Biochemistry*. avr 2012;423(1):15-22.
225. Faheem M, Rehman MT, Danishuddin M, Khan AU. Biochemical Characterization of CTX-M-15 from *Enterobacter cloacae* and Designing a Novel Non- $\beta$ -Lactam- $\beta$ -Lactamase Inhibitor. van Veen HW, éditeur. *PLoS ONE*. 21 févr 2013;8(2):e56926.
226. Nemutlu E, Kir S, Katlan D, Beksaç MS. Simultaneous multiresponse optimization of an HPLC method to separate seven cephalosporins in plasma and amniotic fluid: Application to validation and quantification of cefepime, cefixime and cefoperazone. *Talanta*. 15 nov 2009;80(1):117-26.
227. Stone MRL, Butler MS, Phetsang W, Cooper MA, Blaskovich MAT. Fluorescent Antibiotics: New Research Tools to Fight Antibiotic Resistance. *Trends in Biotechnology*. mai 2018;36(5):523-36.
228. Pogliano J, Pogliano N, Silverman JA. Daptomycin-Mediated Reorganization of Membrane Architecture Causes Mislocalization of Essential Cell Division Proteins. *Journal of Bacteriology*. 1 sept 2012;194(17):4494-504.
229. Moisan H, Pruneau M, Malouin F. Binding of ceftaroline to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 avr 2010;65(4):713-6.
230. Kauss T, Arpin C, Bientz L, Vinh Nguyen P, Vialet B, Benizri S, et al. Lipid oligonucleotides as a new strategy for tackling the antibiotic resistance. *Sci Rep*. 23 janv 2020;10(1):1054.
231. Projet ANTILACTA (2017-2018, Inserm Transfert, MAT-API-00391-A CoPoC maturation funding) : (11500 euros- porteur T. Kauss), fonds de maturation de l'Inserm Transfert.
232. Kauss T (30%), Arpin C (30%), Nguyen PV (10%), Barthélémy P (30%) : Antisense oligonucleotides and ceftriaxone in the strategy against resistances to antibiotics : LASO system. Déclaration d'intention Inserm Transfert DI 18250 (5/09/2018), BET 19P0162 (GJ-ANR) - EP 19305585.2.
233. Tina Kauss, Corinne Arpin, Léa Bientz, Phouc Vinh Nguyen, Brune Vialet, Sebastien Benizri and Philippe Barthélémy. Lipid oligonucleotides as a new strategy for tackling the antibiotic resistance. OPT Congress (Oligonucleotide & Precision Therapeutics) March 16-19 2020, Boston (accepté, mais annulé pour cause de pandémie Covid-19).
234. Obika S, Sekine M, éditeurs. *Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2018 [cité 15 avr 2020]. Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-1912-9>

## **SERMENT DE GALIEN**

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

## **Lutte contre l'antibiorésistance : intérêt des oligonucléotides modifiés chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu**

**RESUME en français :** Les entérobactéries (comme *Escherichia coli*), productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont définies comme des pathogènes prioritaires de niveau critique selon l'Organisation Mondiale de la Santé. En effet, elles produisent des enzymes, majoritairement de type CTX-M-15, dont les gènes ont été acquis via des plasmides qui hydrolysent la plupart des  $\beta$ -lactamines comme les céphalosporines de troisième génération (C3G) couramment utilisées en clinique, ce qui mène à des impasses thérapeutiques. Outre une sensibilisation au bon usage des antibiotiques et la prévention contre les bactéries multirésistantes, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques est nécessaire et encouragée pour faire face à l'antibiorésistance.

Ce travail porte sur l'étude d'oligonucléotides conjugués à un nucléolipide (LON) en association avec la ceftriaxone (C3G), chez des souches d'*E. coli* résistantes portant une BLSE de type CTX-M-15. Nous montrons que les LON diminuent la concentration minimale inhibitrice de la ceftriaxone jusqu'à 26 fois de façon dose dépendante. Cet effet étant lié à la présence du lipide, qui permet l'entrée de l'oligonucléotide dans la bactérie ; à l'utilisation d'une chimie phosphorothioate et à un nombre adéquat de nucléotides. En l'absence de ceftriaxone, les LON n'affectent pas la croissance bactérienne. Leur mécanisme d'action a été étudié par des expériences de RT-qPCR, Western Blot et par un suivi de l'hydrolyse de la nitrocéfine, une céphalosporine chromogène. Ainsi les LON ne diminuent pas la quantité d'ARN et de protéine  $\beta$ -lactamase CTX-M-15, mais une baisse de son activité enzymatique est observée. Les LON se révèlent être une nouvelle stratégie de lutte contre l'antibiorésistance et leur application pourrait être élargie à d'autres bactéries, antibiotiques et résistances.

**MOTS-CLES :** résistance aux antibiotiques, *Escherichia coli*,  $\beta$ -lactamases à spectre étendu, oligonucléotides, nucléolipides

---

## **Tackling antibiotic resistance: Interest of modified oligonucleotides in extended-spectrum beta-lactamases-producing *Enterobacteriaceae***

**RESUME en anglais :** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* (such as *Escherichia coli*) are categorized as critical priority pathogens by the World Health Organization. Indeed, they produce enzymes, mainly CTX-M-15 type, whose genes were acquired by plasmids, which hydrolyze most of  $\beta$ -lactams such as third generation cephalosporins (3GC) widely used to treat infection, which lead to therapeutic impasses. In addition to promoting the rational use of antibiotics and prevention of transmission of multidrug-resistant bacteria, the research of new therapeutic strategies is necessary and encouraged to tackling antibiotic resistance.

This work concerns the study of nucleolipid-conjugated oligonucleotides (LON) in combination with ceftriaxone (3GC), on resistant strains of *E. coli* carrying CTX-M-15 type ESBL. We show that LONs decrease the minimum inhibitory concentration of ceftriaxone up to 26-fold in a dose-dependent manner. This effect is due to the lipid moiety, which improve cellular uptake of the oligonucleotide ; a phosphorothioate chemistry and an adequate number of nucleotides. In the absence of ceftriaxone, LONs do not affect bacterial growth. Their mechanism of action has been studied by RT-qPCR and Western Blot experiments and by monitoring the hydrolysis of nitrocefine, a chromogenic cephalosporin. Thus LONs do not decrease the amount of RNA and  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 protein but decrease its enzymatic activity. LONs are potential new strategy for tackling antibiotic resistance and their application could be extended to other bacteria, antibiotics and resistances.

**KEYWORDS :** antibiotic resistance, *Escherichia coli*, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, oligonucleotides, nucleolipids

---

**DISCIPLINE :** Biologie médicale

---

**INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :** Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité – Université de Bordeaux – 146, Rue Léo Saignat – 33076 Bordeaux Cedex