



HAL
open science

Étude de la sensibilité au céfépime de souches cliniques du complexe *Enterobacter cloacae* responsables de bactériémies

Hugo Langris

► **To cite this version:**

Hugo Langris. Étude de la sensibilité au céfépime de souches cliniques du complexe *Enterobacter cloacae* responsables de bactériémies. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-03110674

HAL Id: dumas-03110674

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03110674>

Submitted on 14 Jan 2021

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.

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES

Préparé au sein de l'Université de Caen Normandie

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie

**Étude de la sensibilité au céfépime de souches cliniques du complexe
Enterobacter cloacae responsables de bactériémies**

Présenté par
Hugo LANGRIS

**Soutenu publiquement le 18 Décembre 2019
devant le jury composé de**

M. Jean-Christophe GIARD	PU, Université de CAEN	Président du jury
M. François GUERIN	PH, CHU de CAEN	Directeur de thèse
M. Vincent CATTOIR	PU-PH, CHU de RENNES	Examineur
M. Jérôme BIZET	PH, CH Alençon-Mamers	Examineur
M. Julien ROGOWSKI	PH, CH Alençon-Mamers	Examineur

Mémoire dirigé par François GUERIN

LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques

Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD

Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative

Madame Sarah CHEMTOB

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GAUDUCHON Pascal Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Biologie cellulaire
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
RAULT Sylvain Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Chimie thérapeutique
ROCHAIS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique - HDR	Biochimie, Toxicologie
BOUET Valentine - HDR	Physiologie, Pharmacologie
CAILLY Thomas - HDR	Chimie bio-inorganique, Chimie organique

DENOYELLE Christophe - HDR

Cancérologie

DHALLUIN Anne

ELDIN de PECOULAS Philippe - HDR

GROO Anne-Claire

KIEFFER Charline

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) - HDR

LAPORTE-WOJCIK Catherine

LEBAILLY Pierre - HDR

LECHEVREL Mathilde - HDR

LEGER Marianne

LEPAILLEUR Alban - HDR

N'DIAYE Monique

clinique

PAIZANIS Eleni

PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima

POTTIER Ivannah

PREVOST Virginie - HDR

thérapeutique du patient

QUINTIN Jérôme

RIOULT Jean-Philippe

SINCE Marc

VILLEDIEU Marie - HDR

Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie,

Bactériologie, Virologie, Immunologie

Parasitologie, Mycologie médicale

Pharmacie galénique

Chimie médicinale

Biologie clinique

Chimie bio-inorganique

Santé publique

Toxicologie

Physiologie, Pharmacologie

Modélisation moléculaire

Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie

Physiologie, Pharmacologie

Chimie organique et thérapeutique

Chimie et toxicologie analytiques

Chimie analytique, Nutrition, Education

Pharmacognosie

Botanique, Mycologie, Biotechnologies

Chimie analytique

Biologie et thérapies innovantes des cancers

PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)

PRICOT Sophie

Anglais

PERSONNEL ASSOCIÉ À TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume

Pharmacie clinique

SEDILLO Patrick

Pharmacie officinale

RICHARD Estelle

Pharmacie officinale

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Remerciements

A Monsieur le **Professeur Jean-Christophe GIARD**, de me faire l'honneur de présider ce jury. Tu es le premier professeur de Bactériologie que j'ai eu, et je suis ravi de t'avoir comme président de ce jury. Merci pour tout ce que tu as pu m'apprendre pendant mes études.

A Monsieur le **Docteur François GUERIN** pour ton encadrement, ta gentillesse et ta patience. Je ne pouvais pas avoir de directeur de thèse plus attentif à mon travail. Ta rigueur, ton exigence et ton énergie m'ont permis de réaliser cette thèse. Tu m'as énormément appris en stage, notamment le matin aux antibiogrammes. Cela m'a permis de réaliser à quel point j'aime cette matière, et je mesure la chance que j'ai eue d'apprendre à tes côtés. Pour tout cela, je te serai à jamais reconnaissant. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière en terres bretonnes.

A Monsieur le **Professeur Vincent CATTOIR**, de me faire l'honneur de votre présence dans ce jury. Veuillez trouver dans ces mots l'expression de mon plus profond respect.

A Monsieur le **Docteur Jérôme BIZET**, de me faire l'honneur de faire partie de ce jury. Merci pour ton encadrement lors de ma venue à Alençon. Ton expertise en Infectiologie était inspirante et je suis honoré d'avoir appris à tes côtés. Je retiendrais également nos parties de baby endiablées !

A Monsieur le **Docteur Julien ROGOWSKI**, de me faire l'honneur de faire partie de ce jury. Merci pour tout ce que tu m'as appris, que soit en hématologie, en gestion de la qualité, sur la biologie en général. Tu m'as fait voir la Biologie Médicale d'une façon différente, et cela m'a complètement transformé dans l'implication que je mets à apprendre mon métier. Pour tout cela, je te serai à jamais reconnaissant. Merci également pour tes conseils sur la suite de ma carrière, pour les parties de baby avec Jérôme, Fred et Jo, ou encore pour les prémices de parties de bridge avec P.GROUT. Et pour les phoques !

A Anne, pour la relecture de ce travail, et pour les enseignements que tu m'as apportés à la faculté. Je te remercie et t'exprime par ces mots mon plus profond respect et ma gratitude la plus sincère.

A mes parents, pour votre aide inconditionnelle, que ce soit dans mes études ou dans ma vie. Je vous remercie des sacrifices effectués pour que je puisse réaliser tous mes projets, qu'ils soient sportifs, professionnels ou personnels. J'ai de la chance d'avoir les parents que tout enfant rêverait d'avoir. Je vous aime.

A ma Mamie, pour tout ce que tu as fait pour moi. J'ai la chance d'avoir eu la meilleure des grands-mères et d'avoir partagé beaucoup de choses avec toi. J'aurais aimé que tu puisses assister à ce jour, mais je sais que, quelque part, tu seras là.

A ma sœur Tiphaine, pour m'avoir supporté depuis 24 ans. Je suis ravi d'avoir été ton témoin de mariage et d'avoir la relation que nous avons aujourd'hui. J'associe Yéo à ces mots. Je vous aime.

A ma Tata Lydie, mon Tonton David, mes cousines Domitille et Julie, Jonathan, Chloé et Léa, pour tous les bons moments passés et à venir.

A Émilie, pour toutes tes attentions à mon égard. J'ai une chance inestimable d'avoir une marraine comme toi. Tu es un modèle pour moi.

A ma belle-famille, pour m'avoir accueilli dans votre famille comme si j'en faisais partie depuis toujours. Aux bons moments passés et à venir.

A Mathieu, mon ami, le frère que je n'ai jamais eu. Merci pour toutes ces années d'amitié. Merci pour tous les moments partagés de puis la 6^e, que ce soit à l'école, au badminton, à la fac ou pendant notre internat. Cela fait des années que nous nous suivons, et ce que j'ai gagné durant tout ce temps est inestimable : ton amitié.

A Quentin, mon trou duc préféré, mon ami. Nos chemins se sont séparés au lycée, et pourtant malgré les *miles* qui nous séparent, nous sommes toujours aussi complices. Je suis ravi de t'avoir comme témoin de mariage, ton amitié est pour moi l'une des plus belles choses que la vie m'ait offertes.

A la Boséteam et les zouettes, mille mercis. Merci pour tous ces moments passés ensemble, les soirées, les vacances, les études. Grâce à vous je compte un groupe d'amis solide. J'ai hâte d'affronter la suite de la vie avec vous. Une petite attention particulière à Charlie et Aurélian, merci pour votre aide pour mes manip. Merci aussi à Alex mon binôme de TP de toujours.

A Victor, c'est un peu grâce à toi tu le sais que j'ai passé ce concours. J'ai beaucoup de chance de t'avoir pour ami, et qui sait, peut-être finirons nous au même endroit ! Merci aussi pour nos discussions à propos de la bio ou de la vie.

Aux copains du Bad, merci pour ces moments lors des entraînements ou des tournois. Nos soirées resteront à jamais gravées dans ma mémoire.

A Nono, Gabrielle, Suzy, Clémence, Thibault, Bibi, Alexiane, Duncan, Camille et tous les copains rencontrés durant ces années.

Merci à toute l'équipe du service de Bactériologie du CHU de Caen. Merci Claire, Margueritte, Damasie, Christophe, Olivier pour tout ce que vous m'avez appris pendant mes stages. Merci à toute l'équipe technique pour les conseils que vous prodiguez aux internes.

Merci à Zouzou, Mamadou, Pépite, Stéphanie pour votre aide lors de mes manip. Je vous serai à jamais reconnaissant.

Merci à l'équipe du laboratoire du CHIC Alençon-Mamers. Mes 6 mois au laboratoire ont été excellents, et cela est dû en grande partie grâce à vous. Une attention toute particulière aux personnes du labo appréciant Walker Texas Ranger, on est d'accord c'est la meilleure série qui existe (avec MacGyver).

Merci aux collocs internes alençonnais d'avoir rendu ma seule expérience en collocation magique. Cette promotion d'AICHA restera j'en suis sûr le plus beau millésime.

Merci tout spécial à François et Elsa. Merci pour votre implication dans la formation des internes. Vos conseils et votre passion sont contagieux. J'ai de la chance de vous avoir côtoyé et d'avoir appris à vos côtés.

Merci à mes co-internes, avec une attention très particulière à toi Bénédicte. Nous avons été co-internes pendant 1 an et demi. Évoluer à tes côtés fût une chance, tant professionnellement que personnellement.

A Noémie, mon chou, ma chérie. Merci pour tout, merci de me supporter, merci de me soutenir, merci de m'accompagner depuis 7 ans maintenant. Les études m'auront permis de rencontrer ma future épouse, ce qui a bien plus de valeur que n'importe quel diplôme. J'ai hâte de commencer la suite de notre vie, et de vivre toutes les belles choses qui nous attendent. Tu es mon passé, mon présent et mon futur. Je t'aime.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Liste des tableaux	1
Liste des figures	2
Liste des abréviations	3
INTRODUCTION	4
Partie A : Généralités	5
I. <i>Enterobacter cloacae</i>	5
I.1 Caractéristiques générales.....	5
I.2 Taxonomie.....	5
I.3 Caractéristiques bactériologiques.....	9
I.4 Pathogénicité et facteurs d'opportunisme du CEC.....	10
I.5 Épidémiologie du CEC.....	11
I.6 Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	14
I.7 Épidémiologie de la résistance du CEC.....	24
II. Place du Céfépime en infectiologie à l'ère de la résistance aux antibiotiques (en cours de rédaction)	28
III. Objectifs de l'étude	60
Partie B : Travaux personnels	61
I. Matériels et Méthodes	61
I.1 Caractéristiques de la collection de souches cliniques.....	61
I.2 Caractérisation génotypique des souches de CEC.....	61
I.3 Évaluation du « <i>fitness</i> » de souches cliniques du CEC.....	62
I.4 Analyse de la virulence chez <i>Galleria mellonella</i>	63
I.5 Caractérisation phénotypique des souches de CEC.....	64
II. Résultats	70
II.1 Caractéristiques générales de la population.....	70
II.2 Répartition des clusters de notre population d'étude.....	71
II.3 Temps de génération des phénotypes et clusters de l'étude.....	71
II.4 Virulence des souches d'étude.....	72
II.5 Caractéristiques phénotypiques des souches de la collection de CEC.....	73

III. Discussion	78
III.1 Caractérisation de la collection d'étude.....	78
III.2 Phénotypes de résistance.....	79
III.3 Différentes approches d'évaluation de la sensibilité au FEP.....	80
.....	83
CONCLUSION	84
Bibliographie	85
Annexes	91

Liste des tableaux

Tableau 1 Espèces appartenant au genre <i>Enterobacter</i>	5
Tableau 2 Clusters définis à partir du séquençage partiel du gène <i>hsp60</i> (Adapté de Hoffmann & Roggenkamp, 2003 ; Beyrouthy <i>et al.</i> 2018)	6
Tableau 3 Caractères biochimiques permettant l'identification des cinq espèces du CEC et <i>L. nimipressuralis</i>	9
Tableau 4 Répartition des différents clusters du CEC : revue de la littérature. <i>E. hormaechei</i> regroupe les souches issues des C-III, C-VI, C-VII, C-VIII (Morand <i>et al.</i> 2009, Akbari <i>et al.</i> 2016, Garinet <i>et al.</i> 2018)	11
Tableau 5 Répartition par espèces (%) des bactéries responsables de bactériémies (ONERBA 2017)	12
Tableau 6 Répartition des EB responsables de bactériémies au CHU de Caen sur la période 2017-2018, en nombre d'hémocultures positives.....	13
Tableau 7 Principales mutations au niveau des gènes impliqués dans la régulation d'AmpC.	17
Tableau 8 Classification d'Ambler (Toussaint <i>et al.</i> 2015)	19
Tableau 9 Revue de la littérature : MBL identifiées chez le CEC	20
Tableau 10 Caractéristiques des souches de CEC du CHU de Caen sur la période 2012-2018	25
Tableau 11 Répartition des principales carbapénémases sur le globe	26
Tableau 12 Amorces utilisées pour la classification des souches cliniques de notre étude (Hoffmann <i>et al.</i> 2003)	62
Tableau 13 Définition des types d'erreurs et hiérarchisation (CLSI M100-S25).....	65
Tableau 14 Critères d'évaluation conformité définis par la FDA et le CLSI (Jorgensen JH <i>et al.</i> 2009, CLSI M100-S23).....	66
Tableau 15 Liste des amorces utilisées pour la caractérisation des AmpC plasmidiques (Perez-Perez <i>et al.</i> 2002)	67
Tableau 16 Amorces utilisées pour la caractérisation des souches <i>bla</i> _{CTX-M} et <i>bla</i> _{TEM} (Maina <i>et al.</i> 2012)	67
Tableau 17 Amorces utilisées pour la caractérisation des souches <i>bla</i> _{SHV} (Colom <i>et al.</i> 2003)	67
Tableau 18 Caractéristiques générales de la population d'étude	70
Tableau 19 Temps de génération des souches d'étude	71
Tableau 20 CMI ₅₀ et CMI ₉₀ des souches de l'étude	74
Tableau 21 Répartition et caractéristiques des différents clusters de l'étude (phénotype de résistance et CMI ₅₀ et CMI ₉₀ au FEP)	74
Tableau 22 Répartition des BLSE retrouvées dans notre population d'étude	75
Tableau 23 Répartition des résistances associées aux souches C3GR.....	75
Tableau 24 Recensement des types de discordances selon la classification du CLSI	75

Liste des figures

Figure 1 Arbre phylogénétique réalisé à partir des « <i>single nucleotide polymorphism</i> » (SNP) (Chavda <i>et al.</i> 2016)	7
Figure 2 Arbre phylogénétique réalisé à partir des « <i>Average Nucleotide Identity</i> » (ANI) de 1249 isolats (Sutton <i>et al.</i> 2018)	8
Figure 3 Mécanisme de formation du biofilm (d'après nosinfo.be vol XXIII n°2 2019)	10
Figure 4 Antibiogramme d'une souche de CEC présentant un phénotype sauvage	14
Figure 5 E-test à la colistine d'une souche de CEC présentant une résistance hétérogène à la colistine (D'après Napier <i>et al.</i> 2014)	15
Figure 6 Antibiogramme d'une souche de CEC présentant un phénotype hCase	17
Figure 7 Modèle d'induction transcriptionnelle d'ampC après une induction par la céfoxitine (FOX) (à gauche) ou par le céfotaxime (CTX) (à droite) chez le CEC (Guérin <i>et al.</i> 2015)	18
Figure 8 Antibiogrammes de souches de CEC ayant acquis une BLSE (ici $bla_{CTX-M15}$ à gauche, et bla_{shv-12} à droite)	19
Figure 9 Antibiogramme d'une souche de CEC ayant acquis : $bla_{CTX-M15}$, bla_{NDM-1} , bla_{OXA-1} , AAC6'-Ib-cr, $qnrB$	20
Figure 10 Antibiogramme d'une souche de CEC ayant acquis: $bla_{CTX-M15}$, bla_{OXA204} , bla_{OXA-1} , bla_{CMY-4} , AAC6'-Ib-cr, $qnrB$	21
Figure 11 Évolution de l'incidence des Entérobactéries productrices de BLSE dans les bactériémies dans les hôpitaux Français (Rapport ONERBA 2017)	24
Figure 12 Distribution géographique en Europe des EPC (38 pays) (Albiger <i>et al.</i> 2015)	27
Figure 13 Représentation des différentes phases de la croissance bactérienne	62
Figure 14 Image d'une souche de <i>E. coli</i> BLSE + par méthode des disques combinés FEP : Céfépime/ CFE : FEP+acide clavulanique (AC) / CTX : cefotaxime / CCT : CTX + AC/ CAZ : ceftazidime/ CCA : CAZ + AC	64
Figure 15 Protocole courbes de survie	68
Figure 16 Protocole d'évaluation du taux de mutants-résistants inspiré des travaux de Kohlmann <i>et al.</i> (Kohlmann <i>et al.</i> 2018)	69
Figure 17 Répartition des souches en fonction de leur cluster (par <i>hsp60</i>)	71
Figure 18 Taux de mortalité par clusters	72
Figure 19 Répartition des isolats en fonction de leur phénotype de résistance	73
Figure 20 Courbes de survie au FEP d'une souche WT (1) : ECL-04 ($CMI_{FEP}=0.06$ mg/L), hCase (2) : ECL-88 ($CMI_{FEP}=1$ mg/L) (2) et BLSE (3) : ECL-69 ($CMI_{FEP}=1$ mg/L)	76
Figure 21 Répartition des taux de mutants-résistants en fonction du phénotype	77
Figure 22 Proposition d'algorithme pour l'utilisation du FEP dans le traitement des infections à CEC	83

Liste des abréviations

APH : Aminoside phosphotransferase
ANT : Aminoside nucléotidyltransferase
AAC : Aminoside acetyltransferase
BLSE : Bêta-lactamase de spectre étendu
BMD : *Browth microdilution*
C1G/C2G/C3G/C4G : Céphalosporines de 1^e/ 2^e/ 3^e/ 4^e génération
C3GR : Résistant aux céphalosporines de 3^e génération
CEC : Complexe *Enterobacter cloacae*
CLSI : *Clinical and Laboratory Standard Institute*
CMB : Concentration Minimale Bactéricide
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
COS : Colistine
DTM : Discordance très majeure
DM : Discordance majeure
dm : Discordance mineure
DO : Densité optique
ECL : *Enterobacter cloacae*
EI : Endocardite Infectieuse
EPC : Entérobactéries productrices de carbapénémases
ESAC: *Extended-Spectrum AmpC*
EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility
FEP: Céfépime
FOS: Fosfomycine
FQ: Fluoroquinolone
hCase: Céphasloporinase hyperproduite
HR: Hétérorésistance
KO: *Knock-out*
LPS: Lipopolysaccharide
MBL: Metallo- β -lactamase
NGS: *New generation sequencing*
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
UFC : Unités Formant Colonie
USI : Unités de Soins Intensifs
WT : *Wild-type*

INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années la résistance des bactéries aux antibiotiques est un enjeu majeur pour notre société. L'utilisation massive et déraisonnée des antibiotiques dès leur mise sur le marché a mis en lumière la faculté qu'ont les bactéries à s'adapter à leur environnement, notamment par l'acquisition de mécanismes de résistances.

Alors que la résistance aux céphalosporines chez les Entérobactéries est en constante augmentation, il est important de préserver les molécules d'intérêt comme les carbapénèmes.

Dans ce contexte, le céfépime (FEP), céphalosporine de 4^e génération (C4G), peut jouer un rôle important dans la préservation des carbapénèmes, antibiotiques dits de dernier recours.

Le FEP possède une bonne stabilité vis-à-vis des céphalosporinases comme celle produite par *Enterobacter cloacae*. Développée dans les années 1980, le FEP reste une molécule de choix. Sa faible propension à sélectionner des mutants-résistants aux céphalosporines de 3^e génération constitue une de ses caractéristiques. Son utilisation dans les infections graves à germes producteurs d'une céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique) reste à ce jour d'actualité.

Ce travail a pour objectif de réévaluer la sensibilité du complexe *E. cloacae* au FEP par différentes approches, et de vérifier les si caractéristiques de cette molécule se confirment.

Partie A : Généralités

I. *Enterobacter cloacae*

I.1 Caractéristiques générales

E. cloacae (ECL) est un bacille à Gram négatif appartenant au genre *Enterobacter* et à la famille des *Enterobacteriaceae*. En matière d'habitat, le genre *Enterobacter* est principalement retrouvé au niveau des plantes, fruits, légumes mais aussi chez les insectes et dans l'eau. *Enterobacter* est aussi retrouvé au sein de la flore digestive normale de l'Homme (Halda-Alija *et al.* 2001 ; Araújo *et al.* 2002). Le genre rassemble au moins 13 espèces (Tableau 1).

Tableau 1 Espèces appartenant au genre *Enterobacter*

Espèce	Souche de référence	Référence(s)
<i>E. asburiae</i> *	LF7a	
<i>E. bugandensis</i> *	EB247	
<i>E. cancerogenus</i>	ATCC 33241T	
<i>E. cloacae</i> *	ECL 13047	Ren <i>et al.</i> , 2010
<i>E. hormaechei</i> *	ATCC49162	
<i>E. kobei</i> *	ATCC BAA260T	
<i>E. ludwigii</i> *	Ez-185-17	
<i>E. mori</i>	LMG 25706	Zhu <i>et al.</i> , 2011
<i>E. nickellidurans</i>	LMG 23000T	Manter <i>et al.</i> , 2011
<i>E. oryzendophyticus</i>	REICA_211	Hardouin <i>et al.</i> , 2013
<i>E. oryziphilus</i>	REICA_191	Hardouin <i>et al.</i> , 2013
<i>E. soli</i>	KF712489	Manter <i>et al.</i> , 2011
<i>E. xianfangensis</i> *		Gu <i>et al.</i> , 2014

*Espèces appartenant au complexe *E. cloacae* [CEC]. Source : Thèse de sciences de F. Guérin 2016

I.2 Taxonomie

I.2.1 Approche par séquençage partiel des gènes *hsp60* et *rpoB*

Créé par Hormaeche *et al.* en 1960 (Hormaeche & Edwards, 1960), le genre *Enterobacter* regroupe les espèces identifiées précédemment sous le nom de *Aerobacter aerogenes* et *cloacae*. Le genre a fait l'objet de nombreux remaniements taxonomiques au cours des 50 dernières années.

En 2003, après le séquençage des gènes *hsp60* et *rpoB* de plus de 200 souches humaines et animales de ECL et d'espèces proches, 13 clusters (C-I à C-XIII) ont été définis dont six espèces nommément désignées : *E. asburiae*, *E. kobei*, *E. cloacae*, *E. ludwigii*, *E. bugandensis*, *Lelliottia nimipressuralis* et *E. hormaechei* (Hoffmann & Roggenkamp, 2003). Le dernier cluster (C-XIV)

quant à lui a été défini récemment par Beyrouthy *et al.* (Beyrouthy *et al.* 2018). Du fait de leur homologie génétique allant de 61 à 67%, l'ensemble de ces espèces a été regroupé sous l'appellation complexe *Enterobacter cloacae* (CEC), dont la composition des clusters est colligée dans le tableau 2.

Tableau 2 Clusters définis à partir du séquençage partiel du gène *hsp60* (Adapté de Hoffmann & Roggenkamp, 2003 ; Beyrouthy *et al.* 2018)

Cluster	Espèce	Cluster	Espèce
Cluster I	<i>E. asburiae</i>	Cluster VIII	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwallti</i>
Cluster II	<i>E. kobei</i>	Cluster IX	<i>E. bugandensis</i>
Cluster III	<i>E. cloacae</i>	Cluster X	<i>L. nimipressuralis</i>
Cluster IV	<i>E. cloacae</i>	Cluster XI	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
Cluster V	<i>E. ludwigii</i>	Cluster XII	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>
Cluster VI	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>	Cluster XIII	<i>E. cloacae</i> (séquence <i>hsp60</i> variable)
Cluster VII	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i>	Cluster XIV	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>rhonae</i>

Source : Thèse de sciences de F. Guérin 2016

I.2.2 Approche par séquençage complet (NGS)

L'analyse du génome par « *new generation sequencing* » (NGS) de 351 isolats cliniques a permis d'affiner et surtout d'améliorer l'approche par séquençage partiel du gène *hsp60* (Figure 1). Chavda *et al.* ont pu ainsi catégoriser 18 groupes (de A à R) parmi lesquels il est possible de retrouver les différents clusters définis par Hoffmann *et al.* (Hoffmann & Roggenkamp *et al.* 2003, Chavda *et al.* 2016). Cette approche a été confirmée par Sutton *et al.* par l'analyse des séquences complètes de 1249 génomes permettant d'incrémenter de nouveaux clades, 22 au total (A-V) (Sutton *et al.* 2018) (Figure 2). La précision de la technique par NGS révèle les limites du séquençage partiel d'*hsp60* pour la détermination de certains clusters tels que les C-VIII, C-VI et C-XIII. De plus, les auteurs grâce à cette approche par NGS ont scindé certains clusters comme le C-VI en C-VI-A et C-VI-B (Sutton *et al.* 2018).

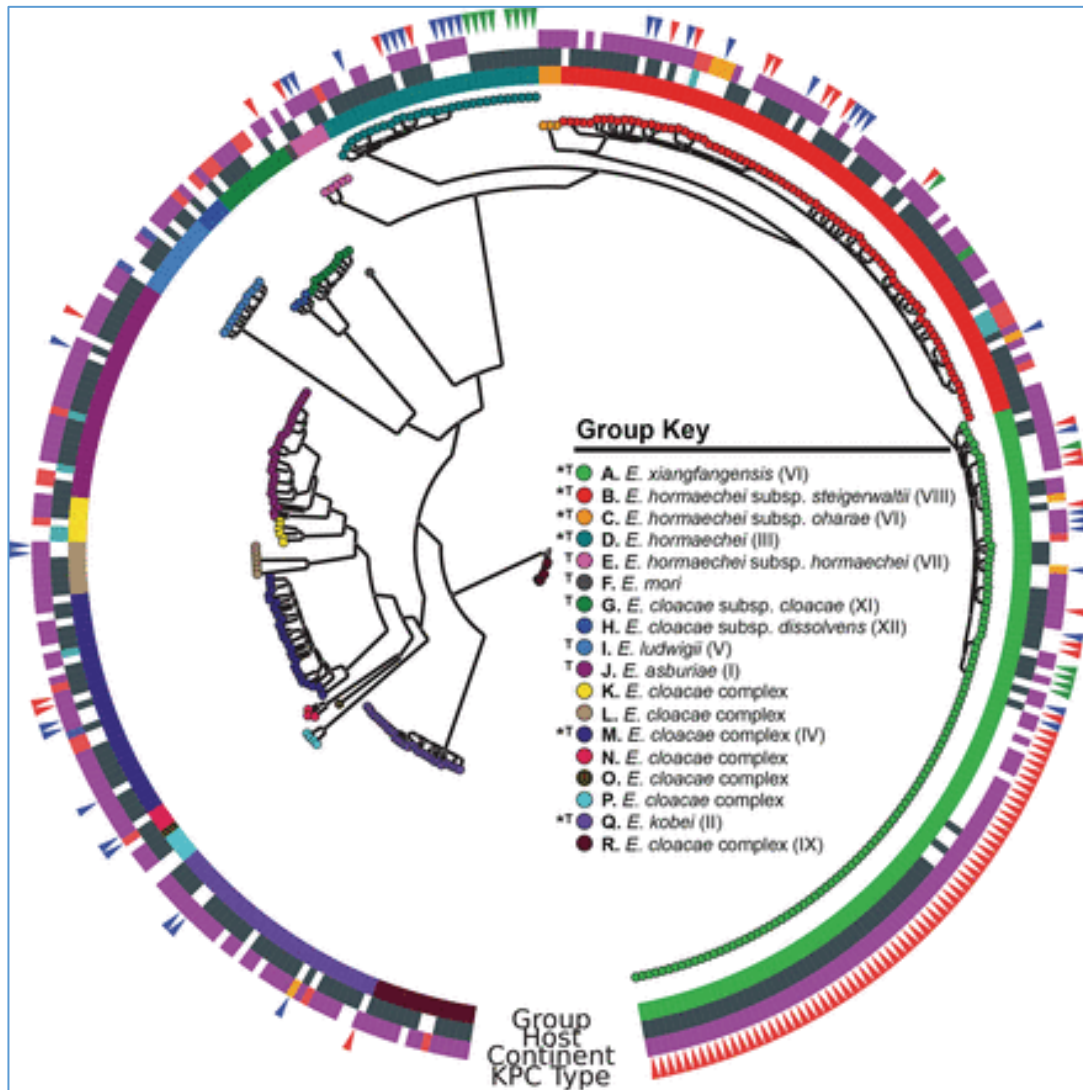


Figure 1 Arbre phylogénétique réalisé à partir des « *single nucleotide polymorphism* » (SNP) (Chavda *et al.* 2016)

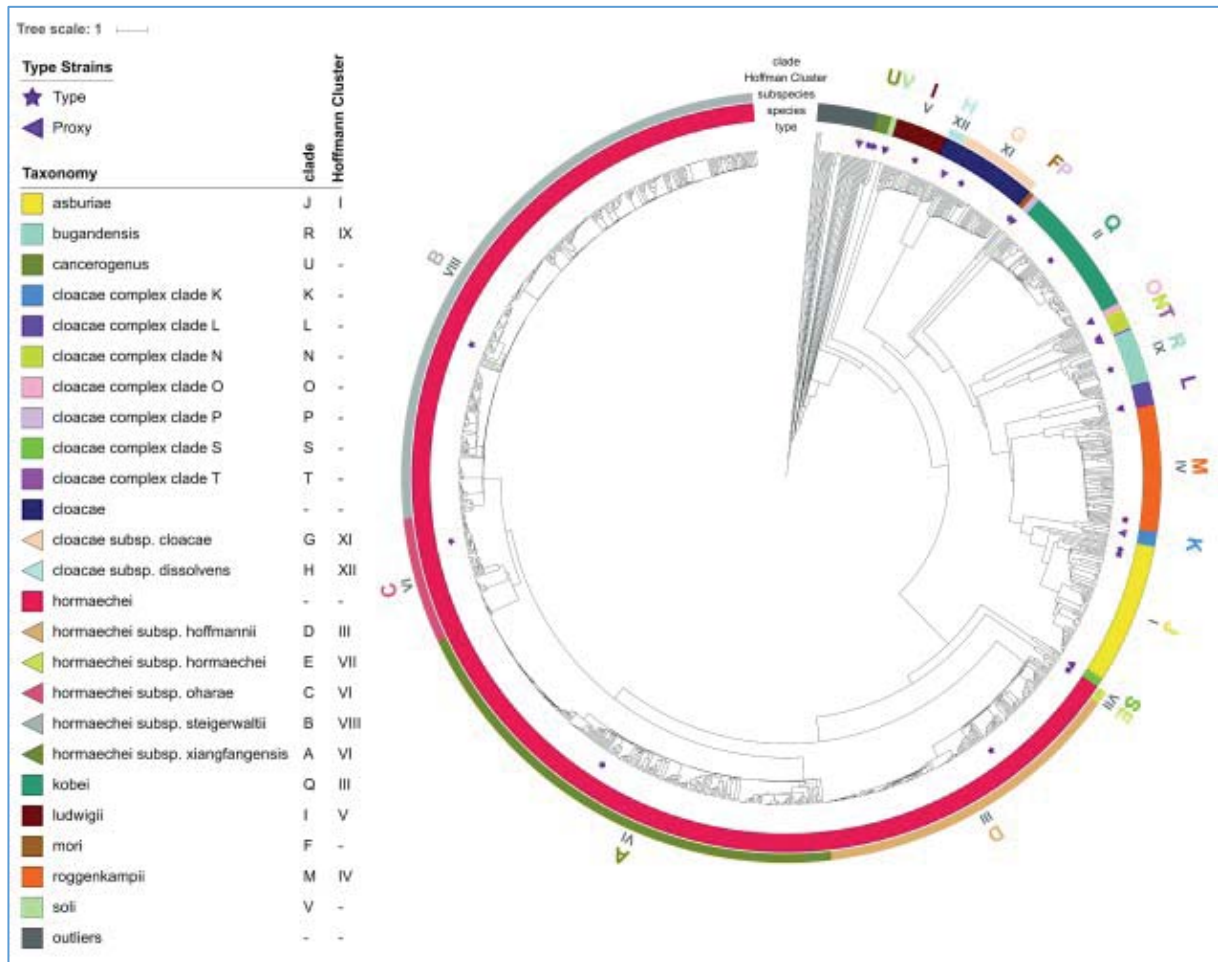


Figure 2 Arbre phylogénétique réalisé à partir des « Average Nucleotide Identity » (ANI) de 1249 isolats (Sutton *et al.* 2018)

I.3 Caractéristiques bactériologiques

Les colonies du CEC apparaissent sur géloses ordinaires après 18 heures d'incubation en atmosphère aérobie, anaérobie ou enrichie en CO₂, les colonies sont généralement bombées. Avant l'avènement de la spectrométrie de masse, l'identification était réalisée par des techniques conventionnelles par détermination des caractères biochimiques et la fermentation des sucres (Galerie API, bioMérieux®). Aujourd'hui, l'identification du CEC est réalisée en pratique courante par spectrométrie de masse (technique MALDI-TOF/MS) pour identifier les germes appartenant au CEC. Mais ces techniques (conventionnelles ou par spectrométrie de masse) ne permettent pas d'obtenir une identification précise du cluster auquel la souche appartient (à l'exception de *L. nimipressuralis* (Pavlovic *et al.* 2012)). A noter que l'utilisation de galeries complémentaires (exemple : galerie API 50CHB/E®, bioMérieux®), (Tableau 3) permet d'obtenir une réponse partielle sur l'appartenance des souches à l'un des clusters.

	Voges-Proskauer	Mobilité	Esculine	α -D-méthyl-glycosidase	α -D-méébiose	Sucrose	3-hydroxy-butyrat	3-méthyl-D-gluco-pyranose	Dulcitol	D-sorbitol	Putrescine
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>Enterobacter asburiae</i>	+/-	+/-	+	+	+/-	+	+	-	-	+/-	-/+
<i>Enterobacter hormaechei</i>	+	+/-	-	+	-/+	+	-	-	+	+	+
<i>Enterobacter kobei</i>	-	+/-	-	+	+	+	+/-	-	±	+	±
<i>Enterobacter ludwigii</i>	+	+	±	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>Lelliottia nimipressuralis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Tableau 3 Caractères biochimiques permettant l'identification des cinq espèces du CEC et *L. nimipressuralis*
 -: 0-10%; +/-: 10-20%; ±: 20-80%; +/+: 80-90%; +: 90-100%. Source : Thèse de sciences de F. Guérin 2016

Le séquençage partiel du gène *hsp60* ou *rpoB* permet de classer avec un peu plus de précision chaque souche du CEC dans un des quatorze clusters. En l'absence de résultat satisfaisant par séquençage partiel, seul le séquençage complet permet une clusterisation de façon très précise.

I.4 Pathogénicité et facteurs d'opportuniste du CEC

Le CEC, commensal du tube digestif est considéré comme un pathogène opportuniste. Comme la majorité des Entérobactéries, il possède des facteurs d'opportuniste pour survivre et s'adapter à son environnement. Il possède de nombreux flagelles nécessaires à sa mobilité (Berg *et al.* 2003 ; Macnab *et al.* 2003). Les *fimbriae* à la surface de la bactérie permettent au CEC d'augmenter son adhésion aux différentes surfaces extérieures (Liu *et al.* 2013). Comme tous les micro-organismes à Gram négatif, sa membrane externe est majoritairement composée de lipopolysaccharide (LPS), responsable notamment de l'activation de l'immunité innée (Sanders & Sanders, 1997). Enfin, le CEC fait partie des bactéries productrices de biofilm (Figure 3), composé qui complexifie les traitements quand celui-ci est produit.

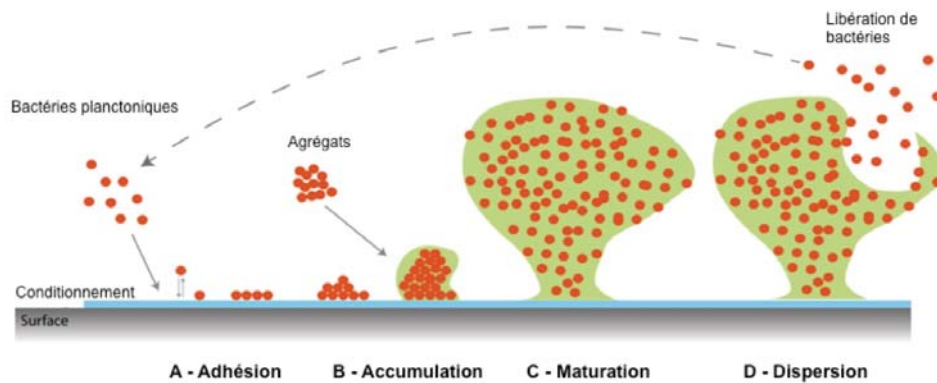


Figure 3 Mécanisme de formation du biofilm (d'après nosinfo.be vol XXIII n°2 2019)

I.5 Épidémiologie du CEC

a) Une espèce impliquée dans les infections associées aux soins

Les espèces appartenant au CEC et *Klebsiella aerogenes* (anciennement *E. aerogenes*) sont à l'origine de la majorité des infections à *Enterobacter* spp. comptant respectivement pour 65 à 75 % et 15 à 25 % des cas (Russo & Johnson, 2008).

L'implication du CEC dans les infections liées aux soins est estimée entre 5 à 10 % (Vincent *et al.* 2009). En matière de santé publique, la prise en charge thérapeutique d'une infection dans laquelle le genre *Enterobacter* est impliqué, peut s'avérer compliquée. Le CEC fait partie du groupe ESKAPE, groupe comprenant 6 espèces bactériennes (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp.) responsable de 80% des infections nosocomiales dans les unités de soins intensifs (USI) (Pendleton *et al.* 2013). Les espèces appartenant au CEC sont des pathogènes opportunistes pouvant être impliqués dans les infections nosocomiales des tractus urinaire, respiratoire, digestif, les infections méningées et post-opératoires. Le CEC a été également associé à quelques épidémies hospitalières (Bodey *et al.* 1991 ; Jarvis & Martone, 1992).

b) Prévalence des différents clusters

La répartition des différents clusters dans la littérature a été peu étudiée à ce jour. La synthèse des différentes études traitant de cette répartition est résumée dans le tableau 4 (Morand *et al.* 2009 ; Akbari *et al.* 2016 ; Garinet *et al.* 2018).

Tableau 4 Répartition des différents clusters du CEC : revue de la littérature. *E. hormaechei* regroupe les souches issues des C-III, C-VI, C-VII, C-VIII (Morand *et al.* 2009, Akbari *et al.* 2016, Garinet *et al.* 2018)

Étude	N Isolats	C-III	C-VI	C-VII	C-VIII	Complexe <i>E. hormaechei</i>	Origine des souches
Morand <i>et al.</i> 2009	52	42% (22)	15% (8)	-	33% (17)	90% (47)	Ostéo-articulaires
Akbari <i>et al.</i> 2016	50	18% (9)	50% (25)	2% (1)	12% (6)	82% (41)	Urinaires
Garinet <i>et al.</i> 2018	193	28% (54)	14% (27)	-	34% (66)	76% (147)	Urines (34%) Respiratoires (20%) Blessures (15%) Hémoculture (9%)

Les différentes études traitant de la répartition des différents clusters montrent que les principaux clusters mis en évidence chez l'Homme (C-III, C-VI et C-VIII) appartiennent aux espèces *E. hormaechei*.

c) *Enterobacter* et bactériémie

Le genre *Enterobacter* peut être impliqué dans les bactériémies. Il est en effet la 4^e cause de bactériémies (Al-Hassan *et al.* 2011). Le CEC est devenu dans les années 2000 la 3^e espèce d'Entérobactéries la plus fréquemment retrouvée dans les bactériémies. (Wang *et al.* 2017 ; Cai *et al.* 2019).

Le « *Enterobacteriaceae Sepsis Outcome Programme Annual Report* » du département de la santé Australien fait état que 6,3% de bactériémies dues aux Entérobactéries sont dues au CEC, soit la 3^e cause toutes Entérobactéries (EB) confondues (Turnidge *et al.* 2014). Les données françaises issues du rapport ONERBA classent le CEC en 4^e position des Entérobactéries responsables de bactériémies (ONERBA 2017, Tableau 5).

Tableau 5 Répartition par espèces (%) des bactéries responsables de bactériémies (ONERBA 2017)

	Année / Year																				
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Nombre de souches / N of strains	668	715	699	834	1463	1495	1429	1797	1967	1872	1213	1516	2170	2178	1880	2258	2464	2308	3403	2064	1943
Bactéries à Gram négatif / Gram-negative bacteria	45,9	46,4	44,6	49,4	54,2	57,8	58,6	59,9	59,4	63,6	59,8	60,5	59,4	55,7	55,5	60,7	53,8	57,3	59,7	60,7	60,6
<i>Escherichia coli</i>	28,6	28,7	29,9	30,8	34,4	33,6	36,2	34,4	32,2	35,6	36,1	34,9	33,8	30,2	31,2	35,6	32,0	31,7	34,4	34,3	34,3
<i>Proteus mirabilis</i>	3,7	1,5	2,1	0,8	2,3	2,7	2,4	2,4	2,6	2,2	2,1	2,2	2,3	1,8	1,9	1,9	2,2	1,8	2,0	1,7	2,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,3	3,2	3,6	3,6	2,9	4,2	3,1	4,2	4,1	3,5	3,9	4,9	4,1	4,5	3,9	4,7	4,7	4,7	5,1	6,3	6,0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,9	1,5	1,1	1,6	1,4	1,1	1,5	1,0	1,4	2,0	1,2	1,1	1,4	1,2	1,5	1,2	1,2	1,6	1,6	1,4	1,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	2,7	4,3	1,6	2,4	2,5	2,5	2,4	2,2	2,5	3,7	1,6	2,0	2,6	2,1	2,6	2,1	2,4	2,7	2,6	2,3	2,6
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,2	1,0	1,0	0,4	0,7	1,1	1,0	1,6	0,7	0,9	1	0,6	1,0	1,0	0,9	0,8	0,4	0,6	0,6	0,8	0,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,8	3,1	2,1	3,6	3,2	3,5	3,8	3,2	4,4	3,0	3,8	3,5	4,2	4,1	3,6	3,8	3,1	3,3	3,4	3,2	3,6

Au CHU de Caen sur la période 2017-2018, le CEC arrive en 2^e position des bactériémies à Entérobactéries représentant 9,5% des hémocultures positives à EB, derrière *E. coli*. (Tableau 6)

Tableau 6 Répartition des EB responsables de bactériémies au CHU de Caen sur la période 2017-2018, en nombre d'hémocultures positives

	Nombre	Pourcentage (%)
EB	2243	100%
<i>Escherichia coli</i>	1227	54.7%
CEC	213	9.5%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	165	7.4%
<i>Serratia marcescens</i>	111	4.9%
<i>Proteus mirabilis</i>	98	4.4%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	74	3.3%
<i>Citrobacter spp.</i>	68	3%
<i>Klebsiella aerogenes</i>	51	2.3%

Enfin, de rares cas d'endocardites infectieuses (EI) à CEC ont été retrouvés dans la littérature. Un cas d'EI à CEC a été décrit dans l'étude de Morpeth *et al.*, étude recensant 2761 cas d'EI à travers 28 pays et 61 hôpitaux (Morpeth *et al.* 2007). En 2012, une nouvelle publication recense les 43 cas d'EI à *Enterobacter spp.* décrits (Moon *et al.* 2012). Parmi eux, 23 cas étaient dus au CEC.

d) Focus sur la virulence du C-IX ou *E. bugandensis*

Quelques articles sur l'espèce *E. bugandensis* (C-IX) ont été publiés. Elle a été impliquée dans des épidémies en néonatalogie en Tanzanie avec une mortalité élevée d'environ 35% et est considérée comme l'espèce la plus pathogène de la famille des *Enterobacter* (Pati *et al.* 2018). Cinq isolats de cette espèce ont également été retrouvés au sein de l'ISS (*International Space Station*) (Singh *et al.* 2018). Depuis la découverte de cette espèce, deux isolats ont été rapportés en Allemagne. Le premier isolat à partir d'hémoculture pédiatrique et le second sur un écouvillonnage de gorge d'un patient de 83 ans. C'est la première fois que ce cluster a été signalé en dehors de l'Afrique (Falgenhauer *et al.* 2019).

I.6 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

I.6.1 Résistance naturelle aux antibiotiques

I.6.1.a Résistance aux β -lactamines

Le CEC possède au niveau chromosomique une β -lactamase de type céphalosporinase codée par le gène *ampC*. Elle lui confère une résistance aux aminopénicillines (AMX, AMP), à l'association amoxicilline plus acide clavulanique (AMC), aux céphalosporines de 1^{re} génération (C1G) et à la ceftazidime (Figure 4)

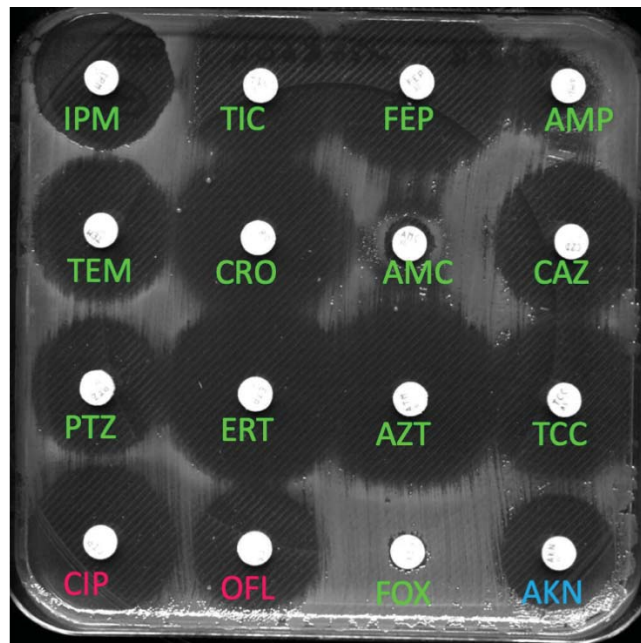


Figure 4 Antibiogramme d'une souche de CEC présentant un phénotype sauvage

IPM : imipénème/ TIC : Ticarcilline/ FEP : céfépime/ AMP : ampicilline/ TEM : Témocilline/ CRO : Ceftriaxone/ AMC : Amoxicilline+ acide clavulanique/ CAZ : Ceftazidime/ PTZ : Pipéracilline-Tazobactam/ ERT : Ertapénème/ AZT : Aztréonam/ TCC : TIC-Ac. clavulanique/ CIP : Ciprofloxacine/ OFL : Ofloxacine/ FOX : Céfoxitine/ AKN : Amikacine

La céphalosporinase *ampC* est régulée par différents gènes chromosomiques tels que :

- *ampR*, codant un régulateur transcriptionnel
- *ampD*, codant une amidase qui hydrolyse les peptides issus de la dégradation du peptidoglycane.
- *ampG*, codant une perméase intra-membranaire

Les gènes de la famille *amp* ont été découverts pour la première fois en 1967 (Hennesey *et al.* 1967). La régulation d'*ampC* est liée au recyclage du peptidoglycane, composant de la paroi bactérienne. En effet, les produits de dégradation du peptidoglycane [GlcNac-MurNac-peptides] sont transportés via AmpG du périplasma (espace situé entre les membranes externes et internes) vers le cytoplasme. NagZ dégrade ce produit en [1,6-anhydro-N-acetylmuropeptides] (muropeptide) et AmpD transforme ce catabolite en UDP-Mur-Nac-pentapeptide. Ce dernier induit l'activité répressive d'AmpR sur *ampC*. En l'absence d'antibiotiques, les UDP-pentapeptides peuvent être réintégrés au peptidoglycane et interagissent également avec AmpR, permettant ainsi une répression d'*ampC*.

I.6.1.b Résistance à la colistine

Le CEC est habituellement considéré comme sensible à la colistine. Comme les autres espèces d'entérobactéries, certaines souches peuvent présenter des mutations sur les systèmes à 2 composants que sont *phoP/phoQ* et *pmrA/pmrB* conférant une résistance à la colistine (Winfield & Groisman, 2003 ; Olaitan *et al.* 2014). Quelques auteurs dès les années 2007 ont décrit pour la première fois des souches du CEC hétérorésistantes (HR) à colistine (Figure 5) (Lo-Ten-Fo *et al.* 2007 ; Napier *et al.* 2014). L'HR se définit comme la capacité d'une partie d'une population bactérienne isogénique, à se développer en présence d'un antibiotique. Sa pertinence clinique peut être considérable du fait qu'une partie de la population bactérienne possède la capacité de se multiplier au cours de l'antibiothérapie par colistine.

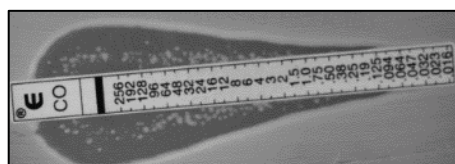


Figure 5 E-test à la colistine d'une souche de CEC présentant une résistance hétérogène à la colistine (D'après Napier *et al.* 2014)

L'HR à la colistine chez le CEC est cluster dépendant (Guérin *et al.* 2016). Sur une collection de souches, les auteurs ont montré que les souches HR à la COS appartenaient aux clusters suivants : C-I, C-II, C-IV, C-VII, C-IX, C-X, C-XI, C-XII et C-XIII. La détection de cette HR à la colistine afin d'éviter un échec thérapeutique nécessite la mise en œuvre de techniques complémentaires : CMI par BMD, géloses chromogènes, colistine NP test (Landman *et al.* 2014 ; Guérin *et al.* 2016).

I.6.1.c Résistance à la Fosfomycine.

La plupart des espèces (ou toutes ?) du CEC possèdent un gène chromosomique de type *fosA* pouvant inactiver partiellement la fosfomycine (FOS). L'identification de cette résistance naturelle a été effectuée dans une première étude à partir d'une souche canadienne de l'environnement (Xu *et al.* 2011). Les auteurs n'ayant pas réussi à la transférer par plasmide en ont alors déduit qu'il s'agissait d'un gène localisé au niveau du chromosome sur la souche de CEC étudiée (Xu *et al.* 2011). D'autres études (38^e RICAI 2018 Guérin *et al.*) ont mis en évidence une variabilité importante du gène *fosA* chez le CEC, conférant des niveaux de sensibilité variables à la FOS.

I.6.2 Résistances acquises du CEC aux antibiotiques

I.6.2.a Résistance aux β -lactamines

Les résistances acquises aux β -lactamines peuvent résulter de plusieurs mécanismes :

- mutation des gènes impliqués dans la régulation de la céphalosporinase AmpC ;
- mutation d'*ampC* conférant un phénotype dit *Extended Spectrum AmpC* (ESAC) ;
- acquisition d'une β -lactamase (Classe A-D) ;
- mutation des gènes codant les porines *ompK35/ompK36* ;
- surexpression des pompes d'efflux.

I.6.2.b Mutation des gènes impliqués dans la régulation d'AmpC

L'hyperexpression d'AmpC confère une diminution significative de la susceptibilité aux C3G, comme observé figure 6. Les principales causes de résistance aux C3G retrouvées chez les souches cliniques du CEC, résultent de mutations situées sur *ampD* conduisant à une surexpression d'AmpC (Schmidtke & Hanson, 2006). Des mutations qui touchent le gène *ampR* sont moins fréquentes, mais peuvent conduire à l'hyperproduction d'AmpC. Les principales mutations décrites dans la régulation d'AmpC sont colligées dans le tableau 7. Un exemple de phénotype retrouvé lors d'une mutation d'*ampC* est illustré par la figure 6.

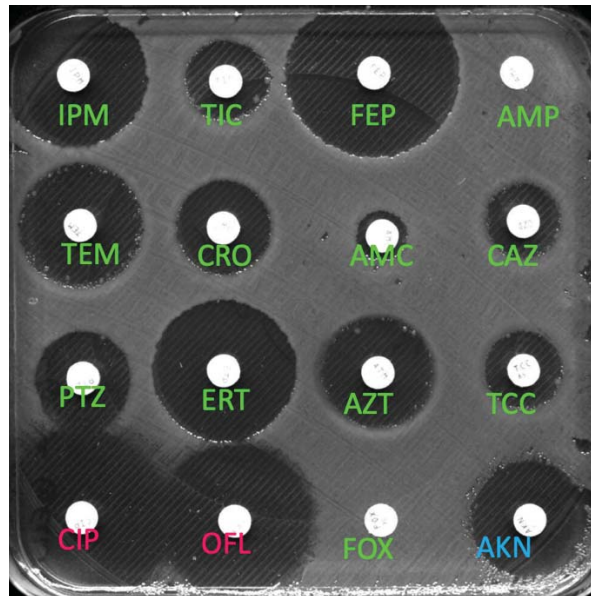


Figure 6 Antibiogramme d'une souche de CEC présentant un phénotype hCase

Tableau 7 Principales mutations au niveau des gènes impliqués dans la régulation d'AmpC.

Gènes	Mutation(s) décrite(s)	Effet sur les CMI	Référence(s) bibliographique(s)
<i>ampC</i>	Insertion de Ala211-Val212-Arg213	↑CAZ ¹ , ↑ATM ²	Nukaga <i>et al.</i> , 1995
	Délétion de SKVALA (position 289--294)	↑CAZ ¹ , ↑FEP ³	Barnaud <i>et al.</i> , 2001
<i>ampR</i>	Asp135Asn, asp135Val	↑CAZ ¹ , ↑CTX ⁴ , ↑ATM ²	
<i>ampD</i>	Ala94Pro, Asn150Ile, Leu38phe + Ala60Val, Phe63Tyr + Glu96Gln, Ile106Val + Arg108Leu + Ala122Gly	↑CAZ ¹	Kaneko <i>et al.</i> , 2005

Légende : ¹ CAZ, ceftazidime ; ²ATM, aztréonam ; ³FEP, céfépime ; ⁴CTX, Céfotaxime (Thèse de sciences F. Guérin 2016)

L'importance de ces deux gènes a été confirmée par l'étude de Guérin *et al.* (Guérin *et al.* 2015). D'autres gènes sont impliqués dans l'hyperexpression d'AmpC. L'étude de Guérin *et al.* en s'inspirant du modèle de *P. aeruginosa*, a également montré le rôle de NagZ et DacB. Les auteurs ont « revisité » la régulation d'*ampC* chez le CEC (Figure 7) (Guérin *et al.* 2015) en construisant des mutants « knock out » (KO) des différents gènes supposés impliqués dans la régulation d'*ampC* chez le CEC (*ampR*, *ampD*, *ampE* et *ampG*) ainsi que pour des homologues à certains gènes identifiés chez *P. aeruginosa* (*dacB*, *nagZ*). Les auteurs ont proposé un schéma de régulation à 2 voies β -lactamines dépendantes.

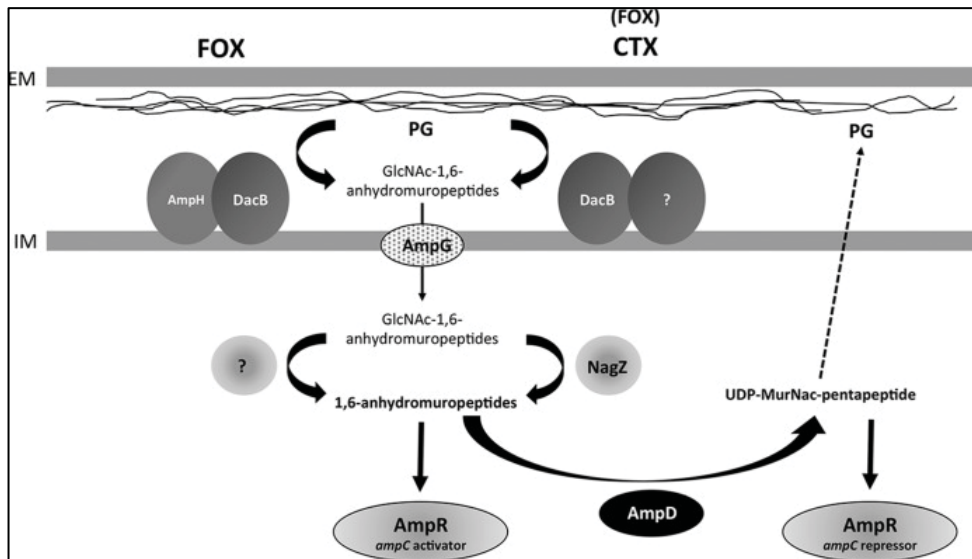


Figure 7 Modèle d'induction transcriptionnelle d'*ampC* après une induction par la céfoxitine (FOX) (à gauche) ou par le céfotaxime (CTX) (à droite) chez le CEC (Guérin *et al.* 2015)

I.6.2.c Mutation d'*ampC* conférant un phénotype ESAC

Certaines mutations au niveau du site catalytique de la céphalosporinase AmpC peuvent conduire à une affinité +/- importante envers les différentes β -lactamines et à leur hydrolyse. Ces ESAC possèdent un profil de substrat plus large que les céphalosporinases natives. Elles peuvent en plus des C3G, hydrolyser les C4G comme le FEP et le céfpirome. Certaines ESAC peuvent également hydrolyser les carbapénèmes (Mameri *et al.* 2007 ; Nordmann *et al.* 2007).

Ces ESAC sont principalement liées à des changements de conformation au sein de la boucle- Ω , l'hélice 10 et l'hélice 11 de la céphalosporinase (Nordmann *et al.* 2007). Des modifications au sein de l'hélice H-2 ont également été rapportées.

I.6.2.d Acquisition d'une β -lactamase (classe A-D d'Ambler)

Toutes les classes de β -lactamases peuvent être retrouvées chez le CEC et sont colligées dans le tableau 8 : classe A (pénicillinases, BLSE et carbapénémases), classe B (métallo- β -lactamase (MBL)), classe C (céphalosporinases) et classe D (oxacillinases) :

Tableau 8 Classification d'Ambler (Toussaint *et al.* 2015)

Type	Ambler Molecular Class	Characteristics	Examples of Enzymes
Narrow-spectrum β -lactamases ^{12,18,19}	A	Hydrolyze penicillin; produced primarily by <i>Enterobacteriaceae</i>	Staphylococcal penicillinase, TEM-1, TEM-2, SHV-1
Extended-spectrum β -lactamases ²⁰	A	Hydrolyze narrow and extended-spectrum β -lactam antibiotics	SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
Serine carbapenemases ²⁰	A	Hydrolyze carbapenems	KPC-1, IMI-1, SME-1
Métallo- β -lactamases ^{21,22}	B	Hydrolyze carbapenems	VIM-1, IMP-1, NDM-1
Céphalosporinases ^{10,23,24}	C	Hydrolyze cephamycins and some oxyimino β -lactams; inducible; chromosomally mediated	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
OXA-type enzymes ²⁵⁻²⁷	D	Hydrolyze oxacillin, oxyimino β -lactams, and carbapenems; produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA enzymes

- Classe A : Enzyme de type Pénicillinase acquise

Les pénicillinases plasmidiques de classe A à spectre étroit (ex. bla_{TEM-2} , bla_{SHV-1}) hydrolysent les aminopénicillines, les carboxypénicillines et les uréidopénicillines. Les céphalosporines ne sont pas ou très faiblement hydrolysées par ces enzymes. En revanche, l'acquisition de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) de classe A confère en plus de la résistance aux pénicillines, la résistance aux céphalosporines pouvant aller jusqu'aux C3G et C4G, aux monobactames avec des expressions variables d'une enzyme à l'autre (Figure 8). Les enzymes de type CTX-M sont majoritairement retrouvées chez le CEC (Hoffman *et al.* 2006 ; Anastay *et al.* 2013). D'autres β -lactamases peuvent hydrolyser jusqu'aux carbapénèmes ce qui est le cas pour les KPC ou les GES principalement.

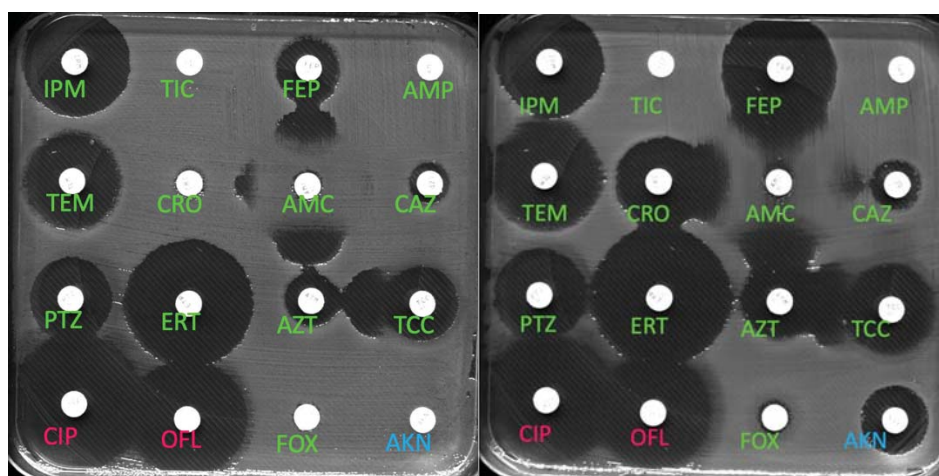


Figure 8 Antibiogrammes de souches de CEC ayant acquis une BLSE (ici $bla_{CTX-M12}$ à gauche, et bla_{SHV-12} à droite)

- Classe B : Enzymes de type MBL acquise :

Les principales MBL retrouvées chez le CEC sont *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}* et *bla_{VIM}*. Les gènes responsables de la production de carbapénémases sont encodés principalement par des éléments mobiles comme les transposons ou les plasmides (Villa *et al.* 2014). Ces éléments jouent un rôle très important dans la transmission horizontale de la résistance aux carbapénèmes. Les MBL retrouvées et déjà identifiées chez le CEC sont reportées dans le tableau 9 :

Tableau 9 Revue de la littérature : MBL identifiées chez le CEC

Type de MBL	Référence bibliographique
<i>bla_{IMP-4}</i>	Lee <i>et al.</i> 2017
<i>bla_{IMP-26}</i>	Dai <i>et al.</i> 2013
<i>bla_{IMP-8}</i>	Pang <i>et al.</i> 2016
<i>bla_{IMP-1}</i>	Aoki <i>et al.</i> 2018
<i>bla_{VIM-4}</i>	Sonnevend <i>et al.</i> 2017
<i>bla_{NDM-1}</i>	Torrez-Gonzalez <i>et al.</i> 2015

Certaines souches peuvent exprimer 2 MBL comme dans l'étude publiée par Cai *et al.* en Chine : la souche de CEC co-exprimait *bla_{IMP1}* et *bla_{NDM1}* (Cai *et al.* 2019). La figure 9 illustre l'acquisition d'une MBL de type NDM.

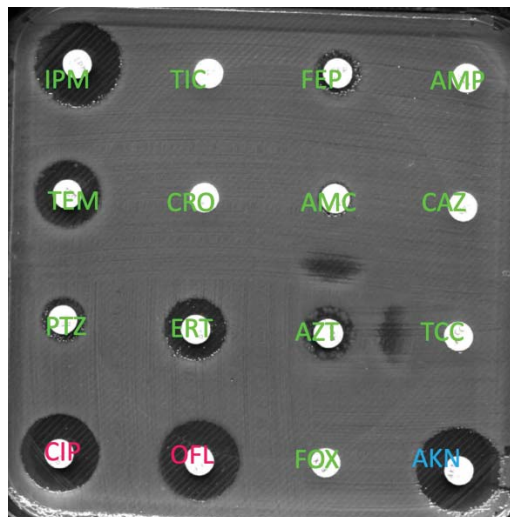


Figure 9 Antibiogramme d'une souche de CEC ayant acquis : *bla_{CTXM-15}*, *bla_{NDM1}*, *bla_{OXA1}*, AAC6'-Ib-cr, *qnrB*

- Classe C : Enzymes de type céphalosporinase acquise

Les principales AmpC plasmidiques (pAmpC) connues sont : *bla*_{DHA}, *bla*_{MIR/ACT}, *bla*_{MOX}, *bla*_{CTT}, *bla*_{ACC} et *bla*_{FOX}, dérivant d'AmpC chromosomique d'*Enterobacteriaceae*.

- Classe D : Enzyme de type Oxacillinase à activité carbapénémase

La production de *bla*_{OXA-48} est fréquemment rapportée mondialement chez les Entérobactéries depuis sa première identification chez *Klebsiella pneumoniae* (KPN) en 2001, notamment chez *E. coli*, KPN et le CEC (Messaoudi *et al.* 2019). Récemment la présence d'une nouvelle oxacillinase a été décrite chez le CEC, *bla*_{OXA-204} issue elle aussi d'une KPN (Messaoudi *et al.* 2019)(Figure 10).

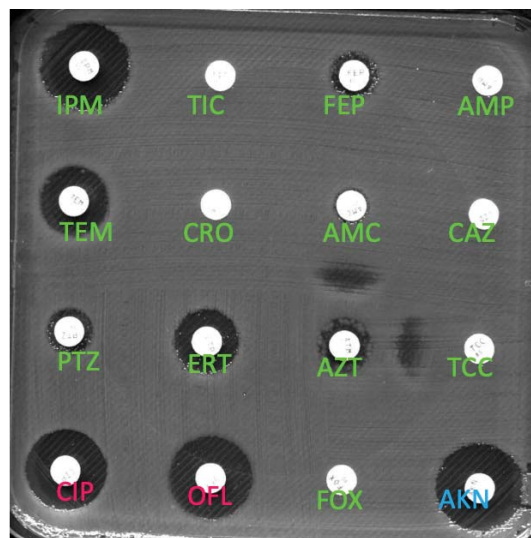


Figure 10 Antibiogramme d'une souche de CEC ayant acquis: *bla*_{CTXM15}, *bla*_{OXA204}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CMY-4}, AAC6'-Ib-cr, qnrB

a) Altération des porines OmpK35 et OmpK36 ou OmpC et OmpF

Les mutations au niveau des gènes codant les porines *ompC* et *ompF* ont pour conséquence phénotypique une augmentation des CMI aux carbapénèmes dès lors qu'elles sont associées à un autre mécanisme de résistance aux β -lactamines (BLSE et/ou hCase) (Yigit *et al.* 2002 ; Doumith *et al.* 2009 ; Lee *et al.* 2016).

La prévalence de l'altération des porines OmpC et OmpF chez le CEC serait de 6,6% des CEC selon l'étude de Jakulski *et al.* (Jakulski *et al.* 2013). De plus Cai *et al.* ont montré que la majeure partie des CEC résistants aux carbapénèmes avait une diminution de l'expression de OmpC et OmpF (le plus souvent associée à un autre mécanisme type BLSE ou hCase) ce qui montre que l'altération de ces porines semble jouer un rôle important dans la résistance du CEC aux carbapénèmes (Cai *et al.* 2019).

b) Pompes d'efflux

Chez les bactéries à Gram négatif, les pompes d'efflux participent également aux mécanismes de résistance aux antibiotiques. Quatre grands groupes de transporteurs ont été décrits : les RND (*Resistance-Nodulation -Division*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), MATE (*Mutlidrug And Toxic compound Extrusion*) et ABC (*ATP Binding Cassette*). Les pompes issues de la famille RND jouent un rôle important dans la résistance aux bactéries à Gram négatif. Ce sont des complexes tripartites constitués d'une protéine interne de la membrane (IMP), d'une protéine de fusion au niveau de la membrane périplasmique (MFP) et d'une protéine de la membrane externe (OMP). Le système d'efflux de type RND AcrAB-TolC est la pompe d'efflux la plus impliquée dans la résistance aux antibiotiques, notamment les fluoroquinolones, les macrolides, l'acide fusidique... Cependant rien n'a été montré concernant le rôle de cette pompe vis-à-vis des β -lactamines (Guérin *et al.* 2015). Un autre système d'efflux retrouvé chez le CEC dans l'étude de Ferraz-Rosa *et al.* semble être associé à la résistance aux carbapénèmes : le système AcrART, qui serait responsable d'une résistance à l'imipénème et au méropénème (Ferraz-Rosa *et al.* 2017).

I.6.2.e Résistance aux aminosides

Le CEC peut acquérir une résistance aux aminosides par acquisition d'enzymes. Les 3 principales enzymes sont :

- APH : Aminosite phosphotransférase
- ANT : Aminosite nucléotidyltransférase
- AAC : Aminosite acétyltransférase

La principale enzyme retrouvée avant les années 2015 chez le CEC, impliquée dans la résistance aux aminosides était une AAC(6') (Kim *et al.* 2011). Cette dernière confère une résistance à l'amikacine, la kanamycine, la tobramycine, et la netilmicine.

Le CEC peut également acquérir une AAC(6')-Ib-cr, conférant une résistance simultanée aux aminosides et aux fluoroquinolones par acétylation (Kim *et al.* 2009 ; Kim *et al.* 2011). Cette enzyme est actuellement fréquemment retrouvée chez le CEC, souvent en association à certaines BLSE comme les CTX-M (Piekarska *et al.* 2019). En effet Piekarska *et al.* ont notamment retrouvé comme principale association : *qnrB1+aac(6')-Ib-cr+bla_{TEM-1}+bla_{CTX-M-15}*, qui allie la production d'une BLSE, la résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones (Piekarska *et al.* 2019).

D'autres mécanismes peuvent être retrouvés mais plus rares, comme l'imperméabilité, l'efflux, l'absence de transport actif ou encore la modification de la cible.

I.6.2.f Résistance aux fluoroquinolones (FQ)

La résistance aux quinolones peut être médiée par plusieurs mécanismes :

- Mutation de l'ADN gyrase dans la région « *quinolone resistance-determining region* » (QRDR)
- Protection de la cible conférée par le gène *qnr*
- Mécanisme d'efflux

a) Résistance par mutation de la QRDR

Les quinolones agissent au niveau de l'ADN gyrase sur la Topoisomérase de type 2 nécessaire à la transcription et la réplication de l'ADN. Cette topoisomérase est composée principalement de deux gènes : *gyrA* et *gyrB*, lieu d'action des quinolones. Des mutations dans une partie de *gyrA* au niveau de la QRDR confère une résistance aux quinolones. Chez *E. coli* une altération d'une paire de base au niveau de la QRDR diminue la sensibilité aux FQ. Une double substitution d'acide aminé rend la souche résistante aux FQ (Weigel *et al.* 1998).

b) Résistance plasmidique

La résistance plasmidique conférée par le gène *qnr* aboutit à la production de protéines protégeant l'ADN de l'action des quinolones. Trois grandes familles existent (Cattoir *et al.* 2007)

- Qnr-A like (six variants), principale protéine retrouvée chez les Entérobactéries en Europe
- Qnr B (six variants), identifié pour la première fois en Europe par Cattoir *et al.* (Cattoir *et al.* 2007)
- Qnr S (deux variants)

c) Résistance par mécanisme d'efflux

Enfin les bactéries à Gram négatif disposent de systèmes actifs d'efflux non spécifiques, dont certains sont exprimés de façon constitutive, d'autres sont contrôlés et exprimés par différents systèmes de régulation globale, et enfin, d'autres sont encore inductibles par diverses mutations. Chez *E. coli*, la pompe d'efflux AcrAB-TolC, régulée par différents gènes souvent de type TetR, joue un rôle majeur dans la résistance aux fluoroquinolones. Les mutations survenant dans le gène *acrR* (répresseur de *acrAB*) augmentent l'activité de la pompe (Wang *et al.* 2001), et inversement, les mutations inactivant *marR* (répresseur de *marA*) permettent à MarA d'activer *acrAB*, *tolC*.

I.7 Épidémiologie de la résistance du CEC

I.7.1 Épidémiologie des BLSE chez le CEC

Les données issues du rapport ONERBA de 2017 font état de 40% de résistance aux céphalosporines :

- par production d'une BLSE dans 1/3 des cas
- par production d'une hCase dans 2/3 des cas

La proportion de BLSE semble augmenter dans le temps, comme nous pouvons le voir sur les données issues du rapport ONERBA (Figure 11). Ces données corroborent ce qui est observé localement au CHU de Caen (Tableau 10).

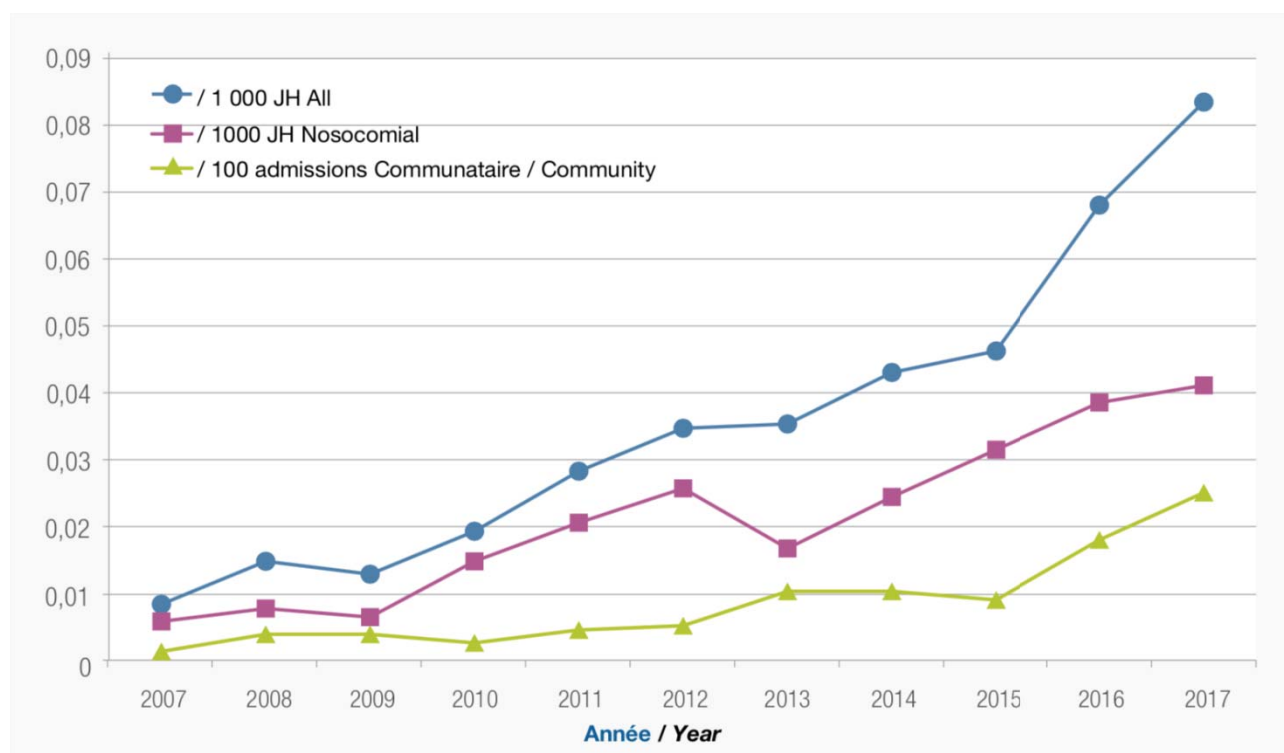


Figure 11 Évolution de l'incidence des Entérobactéries productrices de BLSE dans les bactériémies dans les hôpitaux Français (Rapport ONERBA 2017)

Tableau 10 Caractéristiques des souches de CEC du CHU de Caen sur la période 2012-2018

	2012	2013	2014	2015	2017-2018
Nombre d'isolats cliniques dédoublonnés	246	249	292	282	641
âge moyen	59	60	58	59	62
Femme	78	100	109	115	220
Homme	168	148	183	167	421
Sex Ratio	2.2	1.5	1.7	1.5	1,9
C3G R ¹	85	94	97	95	227
%C3G R ¹	34.6	37.8	33.2	33.7	35,4%
BLSE	27.0	34.0	36	47	96
%BLSE	11.0	13.7	12.3	16.7	14,9%
hCase	58.0	60.0	61	48	131
%CASE	23.6	24.1	20.9	17.0	20,4%
BLSE/%C3G R ¹	31.8	36.2	37.1	49.5	42,3%
hCase/%C3G R ¹	68.2	63.8	62.9	50.5	57,7%

Avant 2014, la proportion de CEC hCase dominait par rapport aux souches productrices de BLSE (Paterson *et al.* 2006, ONERBA 2017). Cependant, les dernières tendances vont vers une augmentation de la proportion de BLSE par rapport à l'hCase (Tableau10, Figure11).

Les principales BLSE identifiées actuellement sont les bla_{CTX-M} (76%), bla_{TEM} (28%) et bla_{SHV} (21%) respectivement chez les Entérobactéries (Abrar *et al.* 2019).

Dans l'étude de Wang *et al.* les BLSE issues de bactériémies à CEC représentent 15% de la population de l'étude. En comparaison, 10% de CEC BLSE étaient retrouvés dans les bactériémies à la même période aux USA et autour de 5% en Europe (Wang *et al.* 2017). Les BLSE retrouvées au sein de l'étude de Wang *et al.* étaient principalement de type bla_{SHV} (bla_{SHV-12}), et bla_{CTX-M} ($bla_{CTX-M-15}$ et $bla_{CTX-M-65}$) (Wang *et al.* 2017).

La $bla_{CTX-M-15}$ est la BLSE la plus fréquemment retrouvée chez le CEC en Europe et en France (Haenni *et al.* 2016). Celle-ci est fréquemment associée à d'autres mécanismes de résistance (AAC6'(Ib)-Icr, $qnrB$) conférant une résistance aux fluoroquinolones et à certains aminosides (Gentamicine...) (Piekarska *et al.* 2019). Les auteurs ont également mis en évidence la présence associée de ArmA qui va méthyler les ribosomes conférant une résistance aux aminoglycosides (Piekarska *et al.* 2019).

I.7.2 Épidémiologie des CEC producteur de carbapénémases

L'émergence de souches de CEC productrices de carbapénémases est en augmentation ces dernières années (Cremet *et al.* 2012 ; Novak *et al.* 2014), passant de moins de 1% avant 2007 pour des taux avoisinant les 8% aujourd'hui en Chine par exemple (Cai *et al.* 2019).

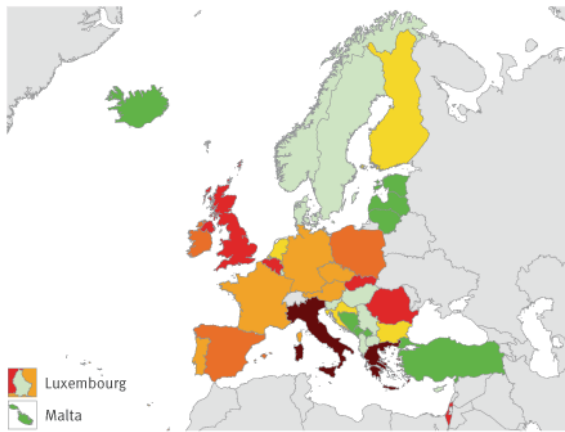
Le tableau 11 illustre la distribution géographique des MBL de façon plus globale d'après l'étude de Kazmierczak *et al.* (Kazmierczak *et al.* 2016).

Tableau 11 Répartition des principales carbapénémases sur le globe

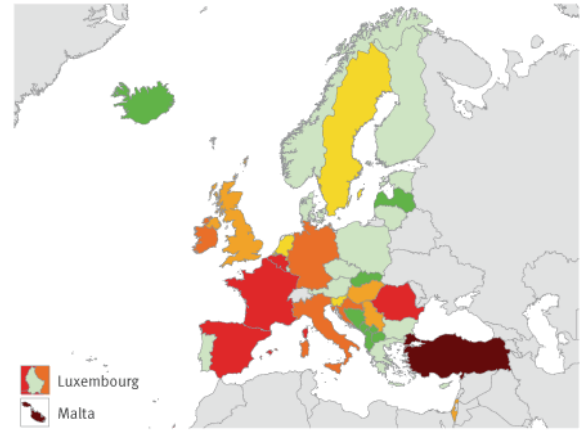
MBL	Région du monde
<i>bla</i> _{VIM}	Europe, Amérique Latine
<i>bla</i> _{IMP}	Asie-Pacifique
<i>bla</i> _{NDM}	Balkan, Afrique de l'Est

En Europe, le réseau EuSCAPE a permis d'effectuer un état des lieux sur la production de carbapénémases chez les Entérobactéries. La figure 12 issue du rapport de Albiger *et al.* (Albiger *et al.* 2015) montre en fonction des différentes classes de carbapénémases (A, B et D) la distribution des EB productrices de carbapénémases (EPC) au sein des pays Européens, sur la période 2014-2015 (Albiger *et al.* 2015).

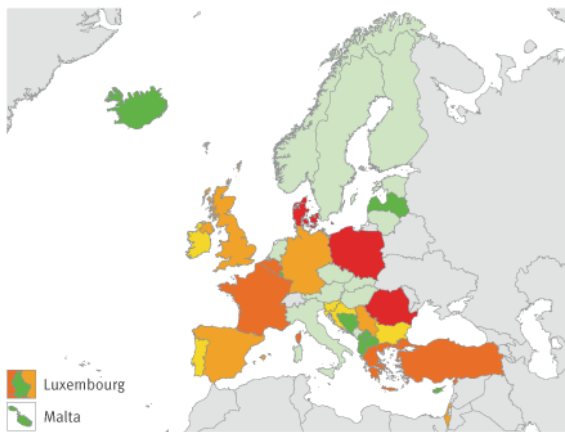
A. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)



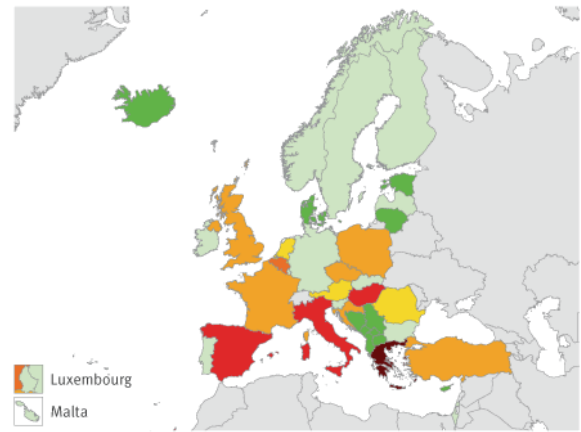
B. Oxacillinase-48 (OXA-48)



C. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)



D. Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase (VIM)



Epidemiological stages, 2014-2015

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> □ Countries not participating ■ No case reported (Stage 0) ■ Sporadic occurrence (Stage 1) ■ Single hospital outbreak (Stage 2a) | <ul style="list-style-type: none"> ■ Sporadic hospital outbreaks (Stage 2b) ■ Regional spread (Stage 3) ■ Inter-regional spread (Stage 4) ■ Endemic situation (Stage 5) |
|---|---|

Figure 12 Distribution géographique en Europe des EPC (38 pays) (Albiger *et al.* 2015)

II. Place du Céfépime en infectiologie à l'ère de la résistance aux antibiotiques (en cours de rédaction)

1 **Place du Céfépime en infectiologie**
2 **à l'ère de la résistance aux antibiotiques**

3
4 **Interest of the Cefepime in infectiology**
5 **in the era of antimicrobial resistance**

6
7
8

9 Hugo LANGRIS¹, François GUERIN¹

10 ¹CHU Côte de Nacre, Service de Microbiologie, Av. Côte de Nacre, 14033 Caen Cedex 9,
11 France

12
13

14 Téléphone : +33 (0)2-31-06-45-72

15 Fax: +33 (0)2-31-06-45-73

16 E-mail : guerin-f@chu-caen.fr

17
18

19 Texte = **XX** mots ; Résumé = **XX** mots ; *Summary* = **XX** words ; **XX**Tableaux ; **XX** Figures ;

20 **XX** références

21
22

23 **Résumé**

24 Le cefepime céphalosporine de 4^{ème} génération est doté d'un spectre d'activité *in vitro* étendu
25 contre les agents pathogènes à Gram négatif et à Gram positif. Cette β-lactamine approuvée
26 pour le traitement des infections modérées à graves à bactérie à Gram négatif, a fait l'objet de
27 nombreuses méta-analyses avec des résultats parfois contradictoires. Dans cet article, nous
28 proposons une réévaluation critique de la pharmacodynamique, de la pharmacocinétique, de la
29 gestion clinique et de l'activité *in vitro* en fonction des principaux mécanismes de résistance.
30 Dans un contexte mondial où la prévalence des souches multirésistantes augmente, le céfépime
31 constitue une alternative intéressante surtout pour la préservation des pénèmes. Ceci étant, il
32 est nécessaire autant que possible de respecter quelques recommandations en termes de
33 documentation microbiologique et de stratégies d'utilisation en matière de posologie, de voie
34 d'administration et de suivi des taux sériques.

35 **Mots-clés :** Céfépime, Céphalosporinase, C4G, PK/PD, CMI

36 **Summary**

37 Cefepime 4th generation cephalosporin has a broad spectrum of *in vitro* activity against Gram-
38 negative and Gram-positive pathogens. This β-lactam, approved for the treatment of moderate
39 or severe infections with Gram-negative bacteria, is the subject of numerous meta-analyzes with
40 sometimes contradictory results. In this paper, we propose a critical reassessment of
41 pharmacodynamics, pharmacokinetics, clinical management, and *in vitro* activity based on the
42 main resistance mechanisms. In the global context or the prevalence of multi-resistant strains,
43 cefepime is an interesting alternative for the preservation of penetrations. For this reason, it is
44 necessary to comply with certain recommendations in terms of microbiological documentation
45 and use strategies, routes of administration and monitoring of serum levels.

46

47 **Keywords:** Cefepime, Cephalosporinase, 4GC, PK/PD, MIC

48 **1. Introduction**

49 De façon bien établie, la résistance aux antibiotiques est en constante augmentation dans
50 le monde entier (Velez R & Sloand E, 2016). Elle ne concerne pas uniquement les micro-
51 organismes des hôpitaux et autres institutions médicales mais également les espèces
52 communautaires, sans lien particulier avec les établissements de santé (Kumar A *et al.*, 2005).
53 Dans ce contexte d'augmentation de la résistance aux antibiotiques, l'adaptation de
54 l'antibiothérapie aux espèces bactériennes et surtout à leur phénotype de résistance est
55 indispensable afin de préserver les molécules telles que les pénèmes et de limiter l'impact des
56 molécules à large spectre sur le microbiote. L'adaptation de l'antibiothérapie passe par la bonne
57 maîtrise des molécules antibiotiques en matière de pharmacocinétique, de pharmacodynamie
58 (PK/PD), de posologie, de voie d'administration et de valeurs critiques de concentrations
59 minimums inhibitrices (CMI). Cette maîtrise contribue à améliorer la prise en charge
60 thérapeutique et de prévenir les mutations sur les gènes conférant une baisse de sensibilité ou
61 résistance aux antibiotiques. La connaissance des principaux mécanismes de résistance
62 contribue également à anticiper l'apparition de souches cliniques multi-résistantes (MDR) et
63 ainsi d'éviter les échecs thérapeutiques.

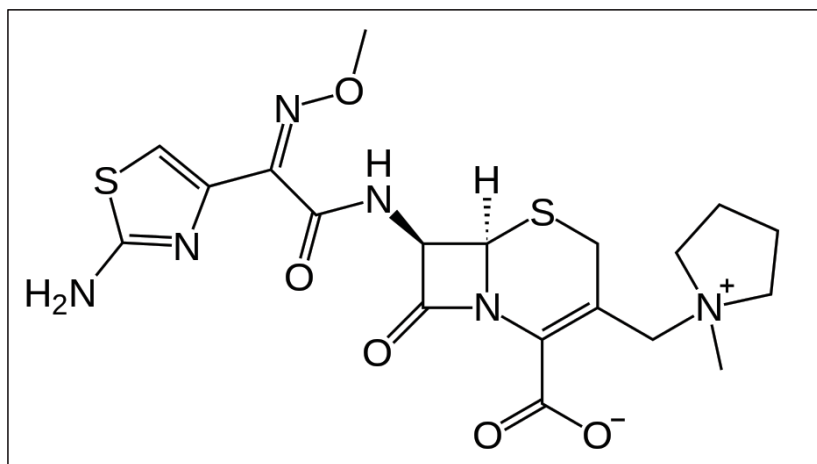
64 Le céfépime (FEP) par ses caractéristiques de stabilité, de spectre antibactérien, de
65 valeurs basales de CMI et de mécanisme d'action peut répondre à cette adaptation de
66 l'antibiothérapie tout en préservant les pénèmes et ainsi prévenir l'émergence de souches MDR.
67 Pour ce faire, il est important de le prescrire dans des situations cliniques infectieuses bien
68 définies et de le réserver à certains micro-organismes. Les modalités de son utilisation en
69 pratique courante nécessitent de tenir compte de nombreux paramètres pharmacologiques et
70 microbiologiques. Dans cette revue, nous proposons une réévaluation critique des différents
71 paramètres du FEP à maîtriser : sa pharmacodynamie, sa pharmacocinétique, sa gestion

72 clinique, ses valeurs critiques de CMI et son activité *in vitro* en fonction des principaux
73 mécanismes de résistance.

74

75 2. Structure chimique, mécanisme d'action et spectre antibactérien et activité

76 Le FEP est une molécule semi-synthétique (Figure 1). Il appartient aux céphalosporines
77 dites de 4^{ème} génération (C4G). Le FEP comme les autres β -lactamines a pour cible les protéines
78 liant la pénicilline (PLP). Ces dernières par leur activité d'endopeptidase et de carboxypeptidase
79 interviennent directement dans le métabolisme du peptidoglycane (synthèse et recyclage). Du
80 fait de sa structure zwitterionique, le FEP passe rapidement à travers les membranes
81 bactériennes, améliorant ainsi l'accès aux cibles enzymatiques (Nikaido H *et al.*, 1990 ;
82 Endimiani A *et al.*, 2008).



83

84 **Figure 1 :** Structure moléculaire du FEP.

85 Le spectre du FEP comme les autres C4G (Cefpirome) est très large et inclue les bactéries
86 à Gram positif et les bactéries à Gram négatif y compris le *Pseudomonas aeruginosa* et certains
87 germes anaérobies. Comparé à la ceftazidime, le FEP présente une meilleure activité *in vitro*
88 vis-à-vis des bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline
89 et *Streptococcus pneumoniae* (Tableau 1). Les CMI₉₀ pour la plupart la grande majorité des

90 entérobactéries sont inférieures à 0.5 mg/L à l'exception du complexe *Enterobacter cloacae* (1
 91 mg/L). Cette espèce possède une céphalosporinase chromosomique facilement déréprimable en
 92 présence de céphalosporine (Kolhmann R *et al.*, 2018).

93 **Tableau 1** : CMI₉₀ de différentes espèces bactériennes du FEP comparé à 5 autres β-lactamines (Données extraites
 94 de l'article Low *et al.* (Low DE, 1995))

Espèces bactériennes	CMI ₉₀ (mg/L)					
	Céfépime	Ceftazidime	Ceftriaxone	Imipénème	Pipéracilline	Pip/Tazo
<i>Escherichia coli</i> (200)	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	>256	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (131)	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	16	8
<i>Proteus mirabilis</i> (24)	≤0.5	≤0.5	≤0.5	2	>256	≤2
<i>Enterobacter cloacae</i> complexe (236)	1	64	>64	1	>256	64
<i>Serratia marcescens</i> (101)	≤0.5	1	4	1	32	32
<i>Morganella morganii</i> (37)	≤0.5	16	4	4	128	≤2
<i>Citrobacter freundii</i> (61)	≤0.5	16	16	1	256	32
<i>Klebsiella aerogenes</i> (49)	≤0.5	64	64	1	128	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (52)	8	4	>64	1	32	32
<i>Staphylococcus aureus</i> (106)	4	16	4	≤0.5	256	4

95 Les valeurs des CMI₅₀ ou CMI₉₀ à elles seules ne permettent pas de séparer les
 96 différentes populations de souches de sensibilité diminuée ou résistante au FEP. Ces valeurs
 97 peuvent également conduire à des biais d'interprétation du spectre en fonction de la collection
 98 étudiée. Ce que l'on peut constater dans le tableau 2 pour l'espèce *Klebsiella pneumoniae* où
 99 l'on observe des CMI₅₀ ou CMI₉₀ élevées résultant d'un biais de sélection. Pour ce faire,
 100 l'EUCAST a défini un concept qui est de considérer qu'une population de souches dites
 101 sauvages ne peut pas être artificiellement séparée en deux par des concentrations critiques. Cette
 102 distribution définit une valeur de CMI maximale pour les souches d'une espèce donnée
 103 dépourvue de mécanisme de résistance acquis. Cette valeur de CMI est dénommée
 104 *Epidemiological Cut off Values* » (ECOFF). Les données des CMI₅₀, CMI₉₀ et d'ECOFF du
 105 FEP sont colligées dans le tableau 2 (EUCAST 2019).

106

107 **Tableau 2** : CMI₅₀, CMI₉₀ et ECOFF du FEP de différentes espèces bactériennes à partir des données de
 108 l'EUCAST 2019

Espèce bactériennes	CMI en mg/L			
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	ECOFF	% sensible
<i>Escherichia coli</i>	0.064	0.5	0.125	89.5 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.5	32	0.125	56.9 %
<i>Proteus mirabilis</i>	0.064	4	0.125	85 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.125	4	0.125	80 %
<i>Serratia marcescens</i>	0.125	128	0.125	79 %
<i>Morganella morganii</i>	0.032	0.125	0.125	96.6 %
<i>Citrobacter freundii</i>	0.064	2	0.125	87.9 %
<i>Klebsiella aerogenes</i>	0.125	2	0.125	89 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	32	8	77.4 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	4	0.125	Absence de <i>cut-off</i>

109

110 A partir de ces données bactériologiques (CMI₅₀, CMI₉₀ et ECOFF), les sociétés savantes
 111 (EUCAST ou CLSI) ont établi et révisé régulièrement les concentrations critiques ou « *cut off* »
 112 du FEP qui prennent en compte également 3 autres types de données : PK, PD et efficacité
 113 clinique (**Tableau 3**).

114 **Tableau 3** : CMI critiques du FEP en fonction des « *guidelines* » utilisés (**EUCAST 2019, CLSI 2019**)

	EUCAST ¹ guidelines mg/L		CLSI ² Guidelines mg/L	
	Sensible	Résistant	Sensible	Résistant
Entérobactéries	≤1	>4	≤2	>8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≤8	>8	≤8	>16
<i>Acinetobacter</i> sp.	≤8	>16	≤8	>16
<i>Haemophilus</i> sp.	≤0.25	>0.25	≤2	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>			≤0.5	
<i>Aeromonas</i> sp.	≤2	>4	≤8	>16
Streptocoque	≤1	>2	≤1	>2

115 ¹ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing ; ² Clinical & Laboratory Standards Institute

116

117 Ces *cut off* ont évolué au cours des dernières années comme indiqué dans le **tableau 4**.
 118 Pourquoi ces *cut off* ont-ils autant évolué dans le temps ? Souvent, plusieurs raisons sont
 119 intriquées ou interagissent entre elles. (i) Les paramètres pharmacologiques PK/PD (Pic/CMI,
 120 aire sous la courbe (ASC)/CMI, résiduelle/CMI), ne sont prédictifs d'efficacité ou de prévention
 121 de la résistance qu'à la condition qu'ils atteignent des valeurs seuils réévaluées au fil du temps
 122 ou en fonction des connaissances. (ii) Les diminutions de posologie faisant suite à des

123 recommandations d'utilisation ont eu comme conséquence une diminution des *cut off*. (iii) Les
 124 études cliniques ainsi que les nouveaux mécanismes ou règles d'interprétation contribuent
 125 également à l'élaboration de nouveaux *cut off* ou à leur ajustement.

126
 127 **Tableau 4 :** Évolution des *cut-off* (CASFM/EUCAST et CLSI) du FEP pour les entérobactéries et *P. aeruginosa*
 128 au fil des années.

Société savante		CMI (mg/L)					
		CLSI		CASFM		CASFM/ EUCAST	
Année		2010	2014	2006	2008	2011	2012
Sensible	Entérobactérie	≤ 8	≤2	≤ 4	≤1	≤1	≤1
	<i>P.aeruginosa</i>	≤ 8	≤ 8	≤ 4	≤ 8	≤ 8	≤ 8
Intermédiaire	Entérobactérie	8 - 32	4-8	4-32	1-8	1-4	1-4
	<i>P.aeruginosa</i>	8- 32	8-16	4-32	-	-	-
Résistant	Entérobactérie	>32	>8	>32	>8	>4	>4
	<i>P.aeruginosa</i>	>32	>16	>32	>8	>8	>8

129
 130
 131

3. Pharmacocinétique / Pharmacodynamique [PK/PD]

132 Après administration parentérale, le FEP est largement distribué dans les tissus et les
 133 compartiments liquidiens de l'organisme. Après administration la résorption est complète et
 134 rapide (**Tableau 5**).

135 **Tableau 5 :** Concentrations plasmatiques moyennes de FEP (mg/L)

Céfépime dose	0,5 h	1,0 h	2,0 h	4,0 h	8,0 h	12,0 h
250 mg IV	20,1	10,9	5,9	2,6	0,5	0,1
500 mg IV	38,2	21,6	11,6	5	1,4	0,2
1 g IV	78,7	44,5	24,3	10,5	2,4	0,6
2 g IV	163,1	85,8	44,8	19,2	3,9	1,1
500 mg IM	8,2	12,5	12	6,9	1,9	0,7
1 g IM	14,8	25,9	26,3	16	4,5	1,4
2 g IM	36,1	49,9	51,3	31,5	8,7	2,3

136

137 La demi-vie d'élimination du FEP est de 2 heures en moyenne avec un volume moyen de
 138 distribution à l'état d'équilibre de 18 litres. La fixation aux protéines plasmatiques est inférieure
 139 à 19 % et est indépendante de la concentration sérique en FEP. Il n'a pas été observé de
 140 phénomène d'accumulation chez les sujets recevant des doses de 2 g IV toutes les 8 heures
 141 durant une période de 9 jours cependant la demi-vie d'élimination est prolongée chez

142 l'insuffisant rénal. Le FEP est peu métabolisé en N-méthylpyrrolidine N-oxyde qui est excrété
143 dans les urines, correspondant à 7 % de la dose administrée. La clairance totale moyenne est de
144 120 mL/min. La clairance rénale moyenne du FEP est de 110 mL/min, son élimination
145 s'effectue pratiquement exclusivement par voie rénale, essentiellement par filtration
146 glomérulaire. Quatre vingt cinq pourcent de la dose administrée est retrouvé sous forme
147 inchangée dans les urines. La cinétique du FEP n'est pas modifiée chez le nourrisson de plus de
148 2 mois ou l'enfant. De même, la cinétique du FEP n'est pas modifiée chez le sujet insuffisant
149 hépatique recevant une dose unique de 1 g. Par conséquent, une adaptation de posologie n'est
150 pas nécessaire.

151 Les études menées chez des sujets présentant des degrés variés d'insuffisance rénale ont
152 démontré un allongement significatif de la durée de demi-vie d'élimination (Low DE, 1995). Il
153 existe une relation linéaire entre la clairance individuelle et la clairance à la créatinine chez des
154 sujets présentant une altération de la fonction rénale. La demi-vie moyenne d'élimination chez
155 les patients dialysés (hémodialyse ou dialyse péritonéale ambulatoire continue) est comprise
156 entre 13 et 17 heures.

157

158 **4. Indications et posologies du FEP**

159 Les recommandations d'indications du FEP validées par la haute autorité de santé
160 (HAS) sont répertoriées dans le tableau 6 (HAS commission de la transparence 2006,
161 *Recommandations de Pratique Clinique Infections ostéo-articulaires sur matériel*, 2009). En
162 plus de son utilisation en antibiothérapie probabiliste dans les infections ostéo-articulaires et en
163 hématologie clinique, le FEP peut être utilisé en curatif dans les infections documentées à
164 entérobactéries productrices de céphalosporinase et à *P. aeruginosa* (Yahav D *et al.*, 2007,
165 Breilh ,D *et al.* 2000, Barberán J *et al.* 2003, Jauregui L *et al.*, 1993).

166

167 **Tableau 6** Indications de traitement par FEP

	Infection documentée	Traitement Probabiliste
		Infection associée aux soins avec antécédents d'infection à EB3 ou à <i>P. aeruginosa</i> sensible au FEP
	Infection à Entérobactérie du groupe 3 (EB3) sensible	Pneumonie nosocomiale hors réanimation si facteur de risque d'infection à <i>P. aeruginosa</i> ou ATB (AMC C3G, FQ) dans le mois précédent ou antécédents d'EB3 résistant aux C3G
Indications Validées	Infection à <i>P. aeruginosa</i> sensible	Pneumonie nosocomiale en réanimation associée ou non à la ventilation mécanique si infection précoce avec facteur de risque d'infection à <i>P. aeruginosa</i>
	Épisodes fébriles chez les patients neutropéniques	Pneumonie nosocomiale en réanimation associée ou non à la ventilation mécanique si infection tardive (> 5 jours) et sans colonisation à E-BLSE
		Infection ostéo-articulaire associée aux soins
		Neutropénie fébrile

168

169 Les posologies du FEP en fonction de l'indication sont répertoriées dans le **tableau 7**

170 (HAS commission de la transparence 2006, Recommandations de Pratique Clinique Infections

171 ostéo-articulaires sur matériel, 2009).

172 **Tableau 7** : Posologies du FEP validées en fonction de l'indication

Dose	Indications	Fréquence d'administration
1g IV	Infections respiratoires communautaires Pyélonéphrites non compliquées	2 fois par jour
	Infections sévères : - septicémies/bactériémies - pneumonies - infections urinaires compliquées - infections intra-abdominales compliquées	2 fois par jour
2g IV	Épisode fébrile chez les patients neutropéniques	2 à 3 fois par jour
	Infections sévères à <i>P. aeruginosa</i>	3 fois par jour
	Infections ostéo-articulaires	2 à 3 fois par jour

173

174

175 **5. Efficacité du FEP**

176 L'objectif des traitements par β -lactamines consiste à obtenir une concentration sérique

177 ou tissulaire supérieure à la CMI le plus longtemps possible, exprimée de la façon suivante

178 $T(BL) = ft > CMI$ (avec $T(BL)$ = temps de contact et « ft » fonction de temps). A partir des

179 modèles animaux infectieux *in vivo*, l'obtention d'une efficacité maximale pour le FEP est
 180 corrélée avec en une $T > CMI$ comprise entre 60-70% (concentrations sériques supérieures à la
 181 CMI pour 65% du temps du traitement au moins) (Kohlmann R *et al.*, 2019). L'équation peut
 182 s'exprimer ainsi : $T > CMI \geq 65\%$. La probabilité d'atteindre la cible (PTA) a été évaluée par
 183 Roos *et al.* selon un modèle mathématique stochastique de type Monte-Carlo (Asín-Prieto E *et*
 184 *al.*, 2015 ; Trang M *et al.*, 2017 ; Roos JF *et al.*, 2006). Elle permet, en fonction du $T > CMI$
 185 d'évaluer la probabilité de réussite d'un traitement ici du FEP. Roos *et al.* ont évalué la PTA en
 186 faisant varier le mode d'administration de l'antibiotique et/ou de sa posologie afin de mieux
 187 évaluer son efficacité en fonction de la CMI critique ($T > CMI$, temps au-dessus de la CMI)
 188 (Tableau 8) (Roos JF *et al.*, 2006).

189 **Tableau 8** : CMI critiques du FEP pour une probabilité d'atteindre de la cible de 70% et 90% selon les objectifs
 190 PK/PD ($T > CMI \geq 65\%$) en fonction de la dose et du mode d'administration (Roos JF *et al.*, 2006).

	CMI critiques pour un $T > CMI$ supérieur à 65%						
	IVR				IVC Dc = 0,5g		
	2g/8h	1g/4h	1g/6h	2g/12h	2g/jour	4g/jour	6g/jour
PTA 70%	8 mg/L	4 mg/L	4 mg/L	2 mg/L	4 mg/L	8 mg/L	16 mg/L
PTA 90%	4 mg/L	2 mg/L	0,5 mg/L	0,25 mg/L	4 mg/L	8 mg/L	8 mg/L

191

192 Le **tableau 8** représente les CMI critiques du FEP obtenues pour une PTA de 70% et 90%.
 193 Pour une PTA à 90%, les CMI critiques observées sont plus élevées pour une administration
 194 continue que pour une administration discontinue. Cela signifie que le mode d'administration
 195 continue remplit mieux les objectifs PK/PD d'un traitement par FEP puisqu'il permet d'obtenir
 196 des concentrations sériques supérieures à la CMI mais avec une valeur stable dans le temps.
 197 Ainsi la probabilité de réussite du traitement est plus élevée et ce même pour des souches de
 198 sensibilité diminuée. Ceci étant, ces données sont à pondérer par le fait que l'administration
 199 continue ne permet pas d'obtenir des pics sériques contrairement à l'administration discontinue.
 200 L'avantage des pics sériques est qu'ils permettent de limiter un risque d'échappement en
 201 présence de souches de sensibilité diminuée. Pour ces dernières, les pics sériques garantissent
 202 transitoirement un rapport concentration sérique nettement supérieur à 8 fois la CMI et de

203 prévenir ainsi l'apparition de mutants. Afin de pallier à cette problématique de l'administration
204 continue, il est souhaitable de prévoir une dose de charge afin de garantir une concentration
205 sérique résiduelle supérieure à 8 fois la CMI et éventuellement de doser la concentration sérique
206 en FEP (Chapuis TM *et al.*, 2010).

207 A partir des données du Tableau 8, pour un isolat clinique avec une CMI supérieure ou
208 égale à 1 mg/L, il semble difficile d'obtenir une bonne efficacité (PTA > 90%) du FEP avec
209 une administration discontinue et surtout avec un rythme d'administration supérieur à 6 heures.
210 En revanche, par voie IV continue à posologie maximum (6 g/jour), Les concentrations
211 critiques atteintes excédant 8 mg/L permettent de répondre à un épisode infectieux par une
212 souche d'entérobactérie caractérisée par une CMI au FEP inférieure ou égale à 4 mg/L. La
213 question de l'efficacité du FEP des souches proches du *cut off* (1 mg/L) peut se poser suivant
214 le mode d'administration. Afin de pallier à l'apparition de mutants résistants, la stratégie d'une
215 bithérapie (FEP + aminoside ou fluoroquinolone) ou l'augmentation de la posologie peut être
216 envisagée. Dans ce contexte, la détermination de la CMI au FEP est indispensable et le dosage
217 sérique du FEP peut également se discuter pour l'adaptation de la posologie. Une méta-analyse
218 sur l'évaluation des modes d'administration du FEP continue ou discontinue a été réalisée en
219 2015 par l'équipe de Burgess *et al.* (Burgess SV *et al.*, 2015). Cette méta-analyse montre une
220 amélioration des paramètres PK/PD avec des perfusions prolongées et continues de FEP.
221 Cependant, l'impact sur les résultats cliniques n'est pas concluant. Pour finir, les auteurs
222 suggèrent de poursuivre les études pour déterminer les stratégies optimales de posologie et
223 d'administration (Burgess SV, 2015).

224 L'efficacité du FEP évaluée par la PTA varie également en fonction de l'espèce impliquée
225 (Tableau 9) (Roos JF *et al.*, 2006). Les auteurs nous montrent que, quel que soit le germe,
226 l'efficacité du traitement dépend plus du mode d'administration que de la dose (voie IV
227 continue apparaissant comme optimale).

228

229 **Tableau 9** : Résultats concernant la PTA évaluée pour des patients de soins intensifs en opposant les modes
230 d'administration : injections continues *versus* discontinues (la cible étant une concentration sérique libre > CMI
231 pour 65% de l'intervalle posologique) (Roos JF *et al.*, 2006).
232

Dose et mode d'administration	PTA évaluée			
	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>A.baumannii</i>
Administration discontinue				
1g/4h soit	95.3%	95.3%	82.6%	57.9%
1g/6h	91.9%	91.9%	69.5%	41.5%
1g /12h	66.1%	66.1%	35.5%	11.6%
Administration continue				
2g/jour	95.2%	95.2%	81.3%	56.3%
4g/jour	96.9%	96.9%	91.7%	68.5%
6g/jour	97.9%	97.9%	94.8%	74.6%

233

234 En parallèle des études *in vitro*, une étude *in vivo* sur la pharmacocinétique du FEP,
235 menée par Chapuis *et al* (Chapuis TM *et al.*, 2010) montre la grande variabilité interindividuelle
236 du PK/PD. Les traitements par FEP de 21 patients évalués au cours de cette étude ont permis
237 de mettre en évidence la variabilité entre les individus avec de franches différences entre les
238 profils pharmacocinétiques quel que soit le mode d'administration (discontinue ou continue).
239 D'un patient à l'autre, les concentrations en FEP variaient de 2 à 3 fois au pic, et jusqu'à 40
240 fois au niveau basal 12h après la prise d'une dose de FEP en bolus (Chapuis TM *et al.*, 2010).
241 Les résultats empiriques de cette étude montraient les limites des paramètres PK/PD (pour les
242 agents pathogènes avec une CMI proche du *cut off*) pour une population de patients adultes
243 hospitalisés en unité de soins continus. Pour les auteurs, la meilleure efficacité était constatée
244 pour les doses de FEP de 2 g toutes les 12 heures chez les patients présentant une clearance à
245 la créatinine (CLC) supérieure ou égale à 50 mL/min.

246 Deux méta-analyses avant la révision des *cut off* font état de l'augmentation de la
247 mortalité lors d'infections sévères traitées par FEP en monothérapie comparé aux autres β -
248 lactamines (Paul M *et al.*, 2006 ; Yahav D *et al.*, 2007). La première méta-analyse publiée par
249 Paul *et al.* retrouve un risque-ratio (RR) de 1,26 (IC_{95%} = 1,08-1,49) soit une augmentation de
250 la mortalité de 26% pour un traitement par FEP en monothérapie en comparaison à d'autres β -

12

251 lactamines telles que l'association pipéracilline/tazobactam, ceftazidime et les pénèmes
252 (imipénème/cilastatine, méropénème) (Paul M *et al.*, 2006). La deuxième méta-analyse
253 retrouve quant à elle un RR à 1,44 (IC_{95%}= 1,06-1,94) (Yahav D *et al.*, 2007). Ces méta-analyses
254 avant la révision des *cut off* sont confirmées par l'étude de Bhat *et al.* mettant en évidence une
255 augmentation de la mortalité pour les patients traités par FEP pour une bactériémie à bacille à
256 Gram négatif avec une CMI \geq 8mg/L (Bhat SV *et al.*, 2007). Pour répondre à cette question sur
257 cette surmortalité d'un traitement par FEP en monothérapie en comparaison aux autres β -
258 lactamines, l'équipe de Kim *et al.* à la demande de la *Food and Drug Administration* (FDA) a
259 expertisé 88 essais cliniques regroupant 9467 patients traités par FEP versus 8288 patients
260 traités par une autre β -lactamine (Kim PW *et al.*, 2010). Les taux de mortalité toutes causes
261 confondues à 30 jours étaient de 6,21% (588/9467) chez les patients traités par FEP versus
262 6,00% (497/8288) chez les patients du groupe témoin traités par une autre β -lactamine. Dans
263 cette méta-analyse, les auteurs n'ont pas identifié d'augmentation statistiquement significative
264 de la mortalité chez les patients traités au FEP, par rapport à ceux traités avec d'autres β -
265 lactamines (Kim PW *et al.*, 2010). En 2010, Leibovici *et al.* contestent les critères d'inclusion
266 de cette méta-analyse commanditée par la FDA : omission de certaines études avec pour
267 conséquences des biais ayant une influence sur les résultats (Leibovici L *et al.*, 2010). Pour les
268 auteurs, le rapport de la FDA n'a pas répondu à la question de savoir si une surmortalité est liée
269 ou non à l'usage du FEP en comparaison aux autres β -lactamines. Par ailleurs, les auteurs
270 évoquent pour cette méta-analyse de la FDA d'éventuels conflits d'intérêts favorable à
271 l'industriel par le fait que certains travaux ont été subventionnés par le laboratoire Bristol-
272 Myers Squibb (BMS) commercialisant le FEP. Ces méta-analyses ont toutes été réalisées avec
273 des *cut-off* du FEP strictement compris entre 8 et 32 mg/L. L'interprétation des résultats de ces
274 travaux avant 2014 est actuellement non réévaluable du fait de la révision des *cut-off* définis
275 par le CLSI et l'EUCAST. Ces travaux ont cependant très probablement participé à la révision

276 en 2014 de ces *cut-off* (Tableau 4). Ces révisions ont eu un impact important sur les indications
277 du FEP en lien avec la détermination de sa CMI pour le germe impliqué (Hamada Y *et al.*,
278 2015). Avec les anciens *cut off*, de nombreuses entérobactéries productrices de β -lactamase à
279 spectre étendu (BLSE) pouvaient être interprétées comme sensibles et ainsi valider la possibilité
280 d'un traitement par FEP. L'objectif de cette révision des *cut off* par le CLSI a été d'éviter
281 l'utilisation du FEP pour des CMI supérieures à 8 mg/L et d'inciter les cliniciens à utiliser des
282 doses de FEP plus élevées pour les micro-organismes avec des CMI comprises entre 2 et 8
283 mg/L afin d'optimiser son PK/PD.

284 Depuis la publication des méta-analyses de Paul *et al.* en 2006 et Yahav *et al.* en 2007,
285 l'équipe d'Andreatos *et al.* en 2017 a réévalué l'efficacité et la sécurité du FEP à faible dose
286 (2g /12H) dans la gestion de la neutropénie fébrile (Andreatos N *et al.*, 2017). Cette dernière
287 méta-analyse a non seulement confirmé une surmortalité accrue du traitement par le FEP en
288 monothérapie chez les patients atteints de neutropénie fébrile. Les auteurs pour pallier à ces
289 résultats ont identifié des pistes d'amélioration de son utilisation. Plus spécifiquement, la
290 posologie du FEP peut avoir un impact important sur les résultats. La monothérapie par FEP à
291 faible dose était associée à une toxicité réduite, au détriment d'une mortalité globale accrue.
292 Cette étude suggère que les résultats pourraient être optimisés en ajustant les recommandations
293 posologiques et les indications de traitement par FEP, plutôt qu'en continuant une utilisation
294 non documentée d'un point de vue bactériologique (Andreatos N *et al.*, 2017).

295 L'évaluation de l'efficacité et la sécurité du FEP en pédiatrie a fait l'objet d'une méta-
296 analyse par l'équipe de Jan *et al.* (Jan S *et al.*, 2018). Les résultats de cette méta-analyse ne
297 mettent pas en évidence de surmortalité chez les enfants traités par FEP par comparaison aux
298 autres β -lactamines. Les auteurs retrouvant un RR à 0,88 (IC_{95%}= 0,71-1,08) pour la
299 surmortalité, et un RR de 0,98 (IC_{95%}= 0,92-1,05) pour l'échec thérapeutique, ce qui va dans le

300 même sens de la première méta-analyse réalisée à ce sujet par *Adderson et al.* (*Adderson EE et*
301 *al., 2010*).

302 **6. Toxicité, effets secondaires du FEP**

303 Plusieurs effets secondaires ont été signalés suite à l'utilisation du FEP :

- 304 • manifestations neurologiques : maux de tête, fièvre et neurotoxicité ;
- 305 • manifestations gastro-intestinales : nausée, vomissement, douleur abdominale,
306 lésion hépatique, colite, y compris la colite pseudo-membraneuse, candidose buccale ;
- 307 • manifestations au niveau de l'appareil génito-urinaire : vaginite, lésion rénale ;
- 308 • manifestations dermatologiques : irritation liée à l'injection sur site, prurit,
309 urticaire, syndrome de Stevens-Johnson et érythème ;
- 310 • manifestations hématologiques : test de Coombs positif sans hémolyse,
311 pancytopénie et anémie aplasique.

312 Comme avec d'autres β -lactamines, de rares cas d'encéphalopathies réversibles (troubles
313 de la vigilance et de la conscience pouvant aller jusqu'au coma, hallucinations, myoclonies,
314 crises convulsives) et/ou d'insuffisance rénale aiguë ont été rapportés. La plupart des cas sont
315 apparus chez l'insuffisant rénal recevant des posologies supérieures aux doses recommandées,
316 en particulier chez le sujet âgé. Généralement, les symptômes de neurotoxicité ont été
317 d'évolution favorable à l'arrêt du traitement et/ou après hémodialyse (*Isitan C et al., 2017 ; Appa*
318 *AA et al., 2017 ; Durand-Maugard C et al., 2012 ; Lamothe F et al., 2010*). Selon *Boschung-*
319 *Pasquier et al.*, chez les individus présentant des facteurs de risque de neurotoxicité au FEP,
320 tels que l'insuffisance rénale, la surveillance thérapeutique est fortement recommandée
321 (*Boschung-Pasquier L et al. 2019*). Les auteurs n'ont pas observé d'effet secondaire
322 neurotoxique en dessous d'une concentration minimale de 7,7 mg/L pour des patients recevant
323 du FEP en discontinu (2g toutes les 8 heures, avec un dosage réalisé 1 heure avant l'injection

324 suivante). En revanche pour des niveaux ≥ 38 mg/L, les auteurs ont toujours observé des effets
325 secondaires neurologiques (Boschung-Pasquier L *et al.*, 2019).

326

327 7. Sensibilité diminuée et résistance au FEP : mécanismes impliqués

328 L'évaluation de la sensibilité consiste à confronter une souche bactérienne isolée d'un
329 produit pathologique à un antibiotique dans des conditions techniques standardisées selon les
330 recommandations des sociétés savantes (CASFM/ EUCAST, 2019 ; CLSI, 2019). Cet examen
331 complexe, dépend d'un paramètre original : la souche bactérienne qui est un organisme vivant
332 dont la variabilité est difficile à maîtriser, ou même à connaître ou à prédire. Cet examen peut
333 être réalisé selon différentes méthodes, manuelles ou automatisées, en milieu solide ou en
334 milieu liquide. Ces méthodes fournissent un résultat qualitatif (Sensible, Sensible à forte
335 posologie, Résistant) à partir d'une donnée quantifiable (diamètre ou concentration en mg/L).
336 La détermination de la CMI en milieu liquide par microdilution ou *Broth Microdilution* (BMD)
337 est définie comme la méthode de référence. Les méthodes par diffusion en milieu solide à l'aide
338 de pastilles imprégnées ou de bandelettes avec un gradient de concentration sont plus faciles à
339 mettre en œuvre mais manquent souvent de sensibilité pour les souches avec un diamètre ou
340 des CMI (E-test ou méthodes automatisées) proche des valeurs critiques. Elles nécessitent de
341 déterminer dans ce cas une vraie CMI en 10 points en milieu liquide par BMD (EUCAST 2019).

342 La détermination de la CMI dans la zone dite « sensible à forte posologie » est importante
343 à réaliser pour la prise en charge thérapeutique du patient et aura un impact sur la posologie, le
344 mode d'administration, le PK/PD et la stratégie adoptée (mono ou bi-thérapie).

345 Le FEP possède une bonne activité vis-à-vis des entérobactéries et de *P. aeruginosa*. Ces
346 espèces peuvent néanmoins acquérir différents mécanismes impliqués dans la baisse de
347 sensibilité ou résistance au FEP soit par acquisition ou soit par mutation(s) de gène(s). Les
348 principaux mécanismes sont colligés dans le tableau 8.

349
350
351
352
353

Tableau 8 : Différents mécanismes pouvant être impliqués dans la résistance au FEP

Type de mécanisme	Mutation chromosomique	Acquisition
Enzymatique (β -lactamase)	<ul style="list-style-type: none">• Mutation des gènes impliqués dans la régulation d'une β-lactamase chromosomique• Mutation de la β-lactamase	β -lactamase appartenant à la classification d'Ambler (A-D) (Ambler RP, 1980)
Porines	<ul style="list-style-type: none">• Mutation au niveau des pompes limitant l'entrée du FEP dans l'espace périplasmique• Mutation des gènes régulant l'expression des porines	
Pompe d'efflux	<ul style="list-style-type: none">• Mutation au niveau des gènes codant pour les pompes• Mutation des gènes régulant l'expression des pompes d'efflux	

354

7.1. β -lactamases et FEP

355

356 La résistance bactérienne aux β -lactamines chez les bactéries à Gram négatif est due
357 principalement à la production d'enzymes (β -lactamases) capables d'hydrolyser l'anneau β -
358 lactame commun. La diversité des β -lactamases décrites (plus de 400) leur confère un spectre
359 d'activité variable allant de la simple pénicillinase à des enzymes telles que les carbapénémases.
360 Leur diffusion parmi de nombreuses espèces d'entérobactéries et de bacilles non fermentant
361 comme *Pseudomonas* spp et *Acinetobacter* spp., permet à ces différentes espèces de survivre
362 dans des environnements avec une pression antibiotique. L'acquisition par ces espèces entre
363 autres de BLSE et/ou de carbapénémases leur confère de plus une capacité de dissémination en
364 causant de nombreuses épidémies au niveau local, régional et international, ayant fréquemment
365 comme foyer d'origine les services de réanimation. Le FEP a dans ce contexte de résistance
366 une place afin de limiter l'utilisation des pénèmes et de limiter l'impact sur les microbiotes
367 (Grohs P *et al.*, 2014).

368

369 **7.1.1. β -lactamases de classe A et FEP**

370 Les β -lactamases chromosomiques ou plasmidiques TEM-1, TEM-2 et SHV-1
371 identifiées dès les années 1980 n'hydrolysent pas ou peu le FEP. Après l'introduction en
372 clinique des C3G, les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) SHV-2 et TEM-3 ont été décrites
373 conférant une réduction d'activité variable du FEP. Parallèlement à la découverte de ces BLSE,
374 de nouvelles β -lactamases ont été caractérisées et continuées à évoluer du fait d'une utilisation
375 massive des β -lactamines (Perez F *et al.*, 2007). Ces dernières années, une dissémination rapide
376 des isolats d'Entérobactéries productrices de BLSE (E-BLSE) a été rapportée dans de
377 nombreuses régions du monde et les enzymes de type CTX-M sont devenues les BLSE
378 majoritairement retrouvées (Bonnet R, 2004 ; Canton R & Coque TM, 2006).

379 Les E-BLSE peuvent représenter en fonction de l'indication une cause importante des
380 échecs thérapeutiques du FEP du fait d'une hydrolyse du noyau β -lactame (LaBombardi VJ *et*
381 *al.*, 2006, Song W *et al.*, 2005). Des cas d'échec de traitement par FEP par acquisition d'une
382 BLSE pendant l'antibiothérapie ont notamment été rapportés dans la littérature (Song W *et*
383 *al.* 2005). Néanmoins l'impact du FEP sur les E-BLSE n'est pas unanime. Un certain nombre
384 de papiers font état d'échecs cliniques et microbiologiques après traitement par FEP pour des
385 infections non urinaires à E-BLSE. D'autres études sur la prise en charge d'infection du tractus
386 urinaire ne montrent pas de différence significative entre des infections à E-BLSE traitées par
387 FEP et des patients à E-BLSE traités par d'autres antibiotiques (le plus souvent par
388 Carbapénèmes) (Kim SE *et al.*, 2018). En ce qui concerne la gestion des infections à E-BLSE,
389 les carbapénèmes semblent avoir un avantage potentiel en matière de mortalité et ce de façon
390 significative par rapport aux thérapies alternatives, mais ceci est principalement basé sur deux
391 analyses rétrospectives (Kotapati S, 2005 ; D'Angelo RG, 2016). Pour les infections graves,
392 l'étude de Lee *et al.* montre que le taux de mortalité à 30 jours chez des patients infectés à E-

393 BLSE est significativement plus bas pour des isolats avec une CMI au FEP ≤ 1 mg/L (0%)
 394 comparé à ceux présentant une CMI comprise entre 2 et 8 mg/L (40%) ou pour les CMI ≥ 16
 395 mg/L (100%) (Lee NY *et al.*, 2013).

396 L'activité du FEP est très variable d'un type de BLSE à l'autre (Nogueira K, *et al.*, 2011).
 397 Les auteurs de cette étude montrent l'importance de déterminer la CMI du FEP des isolats
 398 producteurs d'une BLSE qui peuvent être comprises entre 0.06 à plus de 64 mg/L.

399 Pour les entérobactéries ayant acquis une β -lactamase de classe A de type carbapénémase
 400 telles que KPC, GES et IMI, ces enzymes hydrolysent le FEP et la très grande majorité des
 401 souches sont catégorisées comme résistantes (Tableau 9)

	<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{OXA-48}</i>
Nombre souches étudiées	33	65	55	282
% souches sensible au céfépime	0	0	0	38
% souches sensible au céfotaxime	0	0	0	25
% souches sensible à l'aztréonam	0	11	58	44
% souches sensible à l'association pipéracilline – tazobactam	0	0	2	1

402 **Tableau 9** : taux de sensibilité évalué par la méthode des disques en milieu solide (critères CLSI) de souches
 403 d'entérobactéries productrices de carbapénémase (Huang TR *et al.*, ESCMID 2017)

404 Concernant les β -lactamases de classe A de type OXY retrouvée chez *Klebsiella oxytoca*,
 405 lorsqu'elle est hyperexprimée suite à des mutations de son régulateur, elle confère des niveaux
 406 de résistance plus élevée au FEP comme pour la ceftriaxone, l'aztréonam et l'association
 407 pipéracilline / tazobactam (Corvec S *et al.*, 2009). Les CMI sont comprises entre 2 et plus de
 408 64 mg/L.
 409

410 7.1.2. β -lactamases de classe B et FEP

411 Les β -lactamases de classe B hydrolysent la plupart des céphalosporines dont le FEP
 412 (Tableau 9).

413 7.1.3. β -lactamases de classe C et FEP

414 Tout d'abord, il est important de rappeler que le FEP est une β -lactamine stable vis à vis
 415 des β -lactamases de type céphalosporinase (AmpC) (Endimiani A *et al.*, 2008 ; Harris PN &
 416 Ferguson JK, 2012). Une des propriétés de cette molécule est sa faible propension à sélectionner

417 des mutants résistants aux C3G. En 2018, dans une première étude Kolhmann *et al.* ont montré
418 *in vitro* la forte propension de certaines espèces possédant au niveau chromosomique une AmpC
419 en présence de C3G, à sélectionner des mutants résistants aux céphalosporines (Kolhmann R *et*
420 *al.*, 2018). Les espèces étudiées étaient les suivantes : le complexe *Enterobacter cloacae*,
421 *Citrobacter freundii*, *Klebsiella aerogenes* et *Hafnia alvei* avec un taux de mutation de l'ordre
422 de 10^{-8} contrairement aux espèces *Serratia marcescens*, *Morganella morganii* avec un taux de
423 mutation de l'ordre de 10^{-9} . Les sociétés savantes en matière de prestation de conseil ont intégré
424 ces données dans leur recommandation et déconseillent l'utilisation des C3G dans la prise en
425 charge thérapeutique des souches possédant une AmpC chromosomique afin d'éviter tout
426 risque de mutation et ainsi d'échec thérapeutique (CASFM/EUCAST 2019v2). Dans une
427 deuxième étude publiée en 2019, l'équipe de Kolhmann *et al.* a déterminée la CMI du FEP des
428 couples phénotypes sauvages (WT)/mutants obtenus en présence de C3G. Les résultats obtenus
429 montrent une augmentation des CMI du FEP d'un facteur 2 à 4 pouvant faire basculer la souche
430 de sensible à sensible à forte posologie ou de sensible à forte posologie à résistante (Kolhmann
431 R *et al.*, 2019). Le FEP comme les autres C3G se caractérise par une propension à sélectionner
432 des populations de mutants de sensibilité diminuée ou résistants. L'utilisation combinée d'un
433 aminoside ou d'une fluoroquinolone pourrait être une solution afin d'obtenir un effet
434 bactéricide plus important notamment pour les infections à fort inoculum, évitant ainsi une
435 importante sélection de mutant résistant. Certaines revues font état d'une meilleure efficacité
436 de traitement lorsque le FEP est combiné à un aminoglycoside (Chaudhary M *et al.*, 2008).

437 Depuis quelques années, des souches d'entérobactéries caractérisées par des mutations au
438 niveau chromosomique du gène codant la céphalosporinase AmpC, conférant de hauts niveaux
439 de résistance aux C3G et C4G, ont été décrites (Rodríguez-Martínez JM *et al.*, 2012). Ces
440 AmpC dit de spectre étendu ou *Extended Spectrum AmpC Chromosomic* (ESAC) se
441 caractérisent au niveau protéique par des délétions d'acides aminés, des duplications ou encore

442 des substitutions au niveau de l'hélice H-10 conférant une meilleure affinité du FEP au sein du
443 site actif de l'enzyme et ainsi de son hydrolyse. (Patel HB *et al.*, 2019).

444 Le support de la céphalosporinase peut être également plasmidique. Six grandes familles
445 de céphalosporinases plasmidiques peuvent être retrouvées et confèrent en général une
446 sensibilité diminuée au FEP (Pérez-Pérez FJ *et al.*, 2002). Comme les céphalosporinases
447 chromosomiques, des mutations du gène *ampC* au niveau plasmidique peuvent conduire à des
448 pESAC et confèrent ainsi de hauts niveaux de résistance au FEP. Pires *et al.* ont identifié dans
449 une souche de *E. coli* un plasmide pESAC avec une β -lactamase de type CMY-33 dérivant de
450 CMY-2. Les CMI observées passaient de la souche *E. coli bla_{CMY-2}* d'une valeur inférieure à
451 0.5 mg/L au FEP à plus de 16 mg/L pour la souche *bla_{CMY-33}* (Pires J *et al.* 2015).

452

453 7.1.4. β -lactamases de classe D et FEP

454 Les β -lactamases de type OXA confèrent une résistance à l'ampicilline et aux C1G et sont
455 caractérisées par une forte activité hydrolytique des pénicillines M (oxacilline, cloxacilline).
456 Elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique. La plupart des β -lactamases de type
457 OXA n'hydrolysent pas de façon significative les C3G/C4G. Ceci étant, la β -lactamase de type
458 OXA-1 confère une sensibilité réduite ou une résistance au FEP avec des CMI allant de 1 à 16
459 mg/L (Torres E *et al.* 2016).

460 Parmi les oxacillinases, plusieurs ont des propriétés de BLSE bien que celles-ci
461 appartiennent souvent à la classe A. La plupart des BLSE dérivées de *bla_{OXA-10}* confèrent une
462 résistance plus élevée au céfotaxime qu'au FEP. Ceci étant, les activités enzymatiques des
463 BLSE de type OXA-10 sont très variables.

464 Quant à la production d'oxacillinase ayant une activité carbapénémase (*bla_{OXA-48}*) confère
465 une résistance variable au FEP (Tableau 9).

466

467 **7.2. Modification des porines et FEP**

468 Les entérobactéries possèdent au niveau chromosomique deux grandes porines (OmpK35
469 (ou OmpF) et OmpK36 (ou OmpC) impliquées dans la résistance aux antibiotiques et
470 antiseptiques (Doménech-Sánchez A *et al.* 1999). La perte ou l'altération d'OmpK36 confère
471 une résistance à la céfoxitine et à une résistance accrue aux céphalosporines oxyimino et
472 zwitterioniques tels que le FEP chez les souches productrices de BLSE et aux carbapénèmes
473 chez les souches produisant une β -lactamase de type AmpC (Ardanuy C *et al.*, 1998 ; Martínez-
474 Martínez L *et al.*, 1999).

475

476 **7.3. Pompes d'efflux et FEP**

477 Parmi les pompes d'efflux actif, seule la pompe de type *Revision Nodulation Division*
478 (RND) de type AcrABToIC peut être impliquée dans la diminution de la sensibilité au FEP. La
479 surexpression de cette pompe peut augmenter d'un facteur 2 à 4 les CMI (Sugawara E &
480 Nikaïdo H, 2014). A noter également que la surexpression de *marA*, un des régulateurs de la
481 pompe AcrABToIC augmente également les CMI du FEP (Yasufuku T *et al.*, 2011)

482 **8. *Pseudomonas aeruginosa* et FEP**

483 *P. aeruginosa*, bactérie à Gram négatif possède une céphalosporinase de type AmpC
484 chromosomique lui conférant une résistance naturelle aux aminopénicillines, aux C1G, C2G et
485 certaines C3G (entre autres céfixime, céfotaxime, ceftriaxone). Une autre β -lactamase de type
486 OXA-50 de spectre restreint est retrouvée au niveau chromosomique. A côté de ces β -
487 lactamases, 2 pompes majeurs d'efflux actif de type *Revision Nodulation Division* (RND)
488 pouvant être impliquées dans l'efflux des β -lactamines sont retrouvées : MexAB-OprM et
489 MexXY-OprM.

490 La surproduction de ces pompes d'efflux peut contribuer à accroître la résistance à de
491 nombreux antibiotiques entre autres le FEP (Hocquet D *et al.* 2006; Hocquet D *et al.* 2007 ;

492 Jeannot K *et al.* 2008). La surproduction du système d'efflux actif MexXY-OprM est le
493 mécanisme de résistance le plus fréquemment impliqué chez les isolats cliniques de *P.*
494 *aeruginosa* résistants au FEP (Hocquet D *et al.* 2006). La surproduction du système
495 MexXY/OprM entraîne une augmentation de la résistance aux céphalosporines zwitterioniques
496 (FEP), aux aminosides (gentamicine, amikacine) et aux fluoroquinolones. Cela se traduit par
497 une résistance de « bas niveau » au FEP (CMI comprises entre 8-16 mg/L) (Queenan AM *et*
498 *al.*, 2010).

499 Le deuxième mécanisme de résistance au FEP le plus fréquemment retrouvé résulte de
500 l'hyperexpression d'AmpC (Cabot G *et al.* 2011). Comme pour les entérobactéries, cette
501 hyperexpression est consécutive à une altération des gènes impliqués dans le remaniement du
502 peptidoglycane (Balasubramanian D *et al.* 2012). Les principales mutations sont situées au
503 niveau des gènes *ampD* et/ou *dacB* et plus rarement dans le gène *ampR* (Moya B *et al.* 2009).

504 La résistance au FEP de *P. aeruginosa* peut résulter comme les entérobactéries de
505 l'acquisition de β -lactamase(s) de type BLSE, oxacillinase et carbapénémase. La prévalence
506 des BLSE et/ou carbapénémase est faible en France (données CNR 2013-2016 antibiorésistance
507 Besançon) contrairement à des pays comme l'Inde (Kaur A *et al.* 2018). Concernant les
508 oxacillinases acquises, celles de type OXA-1 (ainsi que ses dérivés) et OXA-31 confèrent aux
509 souches de *P. aeruginosa* une résistance au FEP (Aubert D *et al.* 2001).

510 9. Perspectives

511 Afin d'accroître le spectre du FEP aux E-BLSE, son utilisation en association à un
512 inhibiteur de β -lactamase (*Bicyclic boronate* VNRX-5133 ou taniborbactam) est en cours
513 d'évaluation (Hackel M *et al.*, 2018). Le VNRX-5133 inhibe les sérine- β -lactamases (TEM,
514 SHV, CTX-M, KPC ...) et certaines métallo- β -lactamase (MBL) d'importance clinique,
515 notamment les NDM-1 et VIM-1/2. L'étude réalisée par Hackel *et al.* sur 1120 isolats cliniques
516 montre que cette association possède une activité *in vitro* largement supérieure au FEP seul,

517 à la lévofloxacine, à la combinaison pipéracilline-tazobactam ou encore au méropénème. Les
518 CMI₅₀ et CMI₉₀ de l'association FEP/VNRX-5133 (concentration du VNRX-5133 fixée à 4
519 mg/L) sont respectivement de 0.25 et 2 mg/L pour des souches d'entérobactéries résistantes au
520 FEP (> 8 mg/L). Par ailleurs, cette association s'avère être la plus efficace *in vitro* sur les
521 souches de *P. aeruginosa* (incluant les BLSE et les producteurs MBL) (Hackel M, 2018).

522 Une autre association semble également prometteuse : FEP-Enmetazobactam,
523 anciennement AAI101. Ce nouvel inhibiteur des BLSE possède une activité vis-à-vis des CTX-
524 M, TEM, SHV et autres β-lactamases de classe A par le biais d'un mécanisme d'action différent
525 de celui du tazobactam. L'enmetazobactam est un zwitterion lui conférant une capacité de
526 pénétrer plus rapidement dans la paroi des cellules à Gram négatif (Endimiani A *et al.*, 2008).
527 L'enmetazobactam restaure l'activité du FEP contre les souches de *E. coli* exprimant des β-
528 lactamases de classe A (Crandon JL, Nicolau DP, 2015 ; Papp-Wallace KM *et al.*, 2019).

529

530 Conclusion

531 Le FEP par son spectre reste une molécule de choix dans le traitement des infections de
532 certaines entérobactéries productrices de céphalosporinase et/ou de *P. aeruginosa*. Son
533 utilisation documentée et ciblée permet de limiter l'usage des pénèmes et de réduire la pression
534 de sélection des pénèmes sur le microbiote (Grohs P *et al.*, 2014)..

535 Ceci étant, les études semblent s'accorder sur la difficulté du *monitoring* du FEP du fait
536 d'une grande variabilité du PK/PD interindividuelle surtout lors d'infections graves. Les études
537 antérieures au remaniement des *cut off* évoquent une surmortalité du FEP en comparaison aux
538 autres β-lactamines. Les conclusions établies de ces méta-analyses effectuées avant 2014 se
539 basaient sur des *cut off* au FEP élevés. Des études avec des *cut off* plus bas et des
540 recommandations d'utilisation permettraient de montrer très certainement la non infériorité de

541 cette molécule. A noter que pour des CMI inférieures à 1 mg/L, la non infériorité de cette
542 molécule est bien établie.

543 Les indications du FEP sont actuellement bien établies. Ceci étant pour compléter ces
544 indications et garantir une efficacité du traitement par FEP, il est indispensable de réévaluer son
545 utilisation sur documentation microbiologique. Afin de prescrire de façon justifiée et ciblée le
546 FEP, nous proposons les recommandations suivantes pour les infections à entérobactéries et *P.*
547 *aeruginosa* :

- 548 (i) pour les entérobactéries : indication préférentielle sur les entérobactéries
549 productrices d'une céphalosporinase soit chromosomique ou plasmidique ;
- 550 (ii) en présence d'une sensibilité à forte posologie sur l'antibiogramme réalisé en
551 première intention, déterminer une CMI du FEP ;
- 552 • discuter de la bithérapie en fonction de la sévérité de l'infection et /ou si
553 inoculum élevé pour les CMI ≤ 1 mg/L pour les entérobactéries et ≤ 8 mg/L
554 pour *P. aeruginosa* ;
 - 555 • mettre en place une bithérapie pour les CMI comprises entre 1 et 4 mg/L
556 pour les entérobactéries sauf si infection du tractus urinaire ;
 - 557 • proscrire son utilisation pour les CMI strictement supérieures à 4 mg/L, pour
558 les entérobactéries et 8 mg/L pour *P. aeruginosa* ;
- 559 (iii) envisager une bithérapie en présence d'un inoculum élevé et/ou infection sévère,
560 afin d'éviter l'émergence de mutants résistants ;
- 561 (iv) discuter la posologie, le mode d'administration (continue ou discontinue), la
562 dose de charge pour les infections sévères ;
- 563 (v) prévoir un dosage sérique du FEP en cas d'insuffisance rénale ou facteurs
564 influençant le PK/PD,.

565 La place du FEP sera peut-être prochainement revue pour la prise en charge des BLSE et
566 MBL en l'associant à de nouveaux inhibiteurs prometteurs des β -lactamases.

567

568 **Déclaration d'intérêt :** L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet
569 article.

570

571 **Bibliographie**

- 572 1. Adderson EE, Flynn PM, Hoffman JM. Efficacy and safety of cefepime in pediatric patients: a systematic
573 review and meta-analysis. *J Pediatr.* 2010 Sep;157(3):490–5, 495.
- 574 2. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289: 321–31.
- 575 3. Andreatos N, Flokas ME, Apostolopoulou A, Alevizakos M, Mylonakis E. The Dose-Dependent Efficacy
576 of Cefepime in the Empiric Management of Febrile Neutropenia: A Systematic Review and Meta-
577 Analysis. *Open Forum Infect Dis.* 2017 May 24;4(3): 113.
- 578 4. Appa AA, Jain R, Rakita RM, Hakimian S, Pottinger PS. Characterizing Cefepime Neurotoxicity: A
579 Systematic Review. *Open Forum Infect Dis.* 2017 Oct 10;4(4): 170.
- 580 5. Ardanuy C, Liñares J, Domínguez MA, Hernández-Allés S, Benedí VJ, Martínez-Martínez L. Outer
581 membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities
582 of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Jul;42(7):1636-40.
- 583 6. Asín-Prieto E, Rodríguez-Gascón A, Isla A. Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic
584 (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. *J Infect Chemother.* 2015 May;21(5):319-29. doi: 10.1016
- 585 7. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM, Nordmann P. Oxacillinase-mediated resistance to
586 cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*
587 2001 Jun;45(6):1615-20.
- 588 8. Balasubramanian D, Schnepfer L, Merighi M, Smith R, Narasimhan G, Lory S, Mathee K. The regulatory
589 repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes.
590 *PLoS One.* 2012;7(3)
- 591 9. Barberán J, Gomis M, Sánchez B, Hernández-Salván J, García Del Salto L, Carroquino G, González F,
592 Hernández M. Cefepime in the treatment of osteomyelitis caused by Gram negative bacilli. *Rev Espanola*
593 *Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter.* déc 2000;13(4):366-73.

- 594 10. Bhat SV, Peleg AY, Lodise TP, Shutt KA, Capitano B, Potoski BA, et al. Failure of current cefepime
595 breakpoints to predict clinical outcomes of bacteremia caused by Gram-negative organisms. *Antimicrob*
596 *Agents Chemother.* 2007 Dec;51(12):4390–5.
- 597 11. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob*
598 *Agents Chemother.* 2004 Jan;48(1):1-14. Review.
- 599 12. Boschung-Pasquier L, Atkinson A, Kastner LK, Banholzer S, Haschke M, Buetti N, Furrer DI, Hauser
600 C, Jent P, Que YA, Furrer H, Babouee Flury B. Cefepime neurotoxicity: thresholds and risk factors. A
601 retrospective cohort study. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Jul 5. pii: S1198-743X(19)30379-9.
- 602 13. Breilh D, Boselli E, Bel JC, Chassard D, Saux MC, Allaouchiche B. Diffusion of Cefepime into
603 Cancellous and Cortical Bone Tissue. *J Chemother.* 1 janv 2003;15(2):134-8.
- 604 14. Burgess SV, Mabasa VH, Chow I, Ensom MH. Evaluating outcomes of alternative dosing strategies for
605 cefepime: a qualitative systematic review. *Ann Pharmacother.* 2015 Mar;49(3):311-22.
- 606 15. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodríguez C, Moya B, Zamorano L, Suárez C, Peña
607 C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).
608 Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream
609 infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents*
610 *Chemother.* 2011 May;55(5):1906-11.
- 611 16. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Oct;9(5):466-
612 75. Epub 2006 Aug 30. Review.
- 613 17. CASFM : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie version 2019v2 :
614 <https://www.sfm-microbiologie.org>
- 615 18. Chapuis TM, Giannoni E, Majcherczyk PA, Chioléro R, Schaller M-D, Berger MM, et al. Prospective
616 monitoring of cefepime in intensive care unit adult patients. *Crit Care.* 2010;14(2):R51
- 617 19. Chaudhary M, Shrivastava SM, Varughese L, Sehgal R. Efficacy and safety evaluation of fixed dose
618 combination of cefepime and amikacin in comparison with cefepime alone in treatment of nosocomial
619 pneumonia patients. *Curr Clin Pharmacol.* 2008 May;3(2):118-22
- 620 20. CLSI : Clinical & Laboratory Standards Institute 2019 : <https://clsi.org>
- 621 21. Commission de la transparence HAS, 2006: <https://has-sante.fr>

- 622 22. Corvec S, Cremet L, Lepelletier D, Reynaud A, Drugeon H. Overproduction of K1 enzyme in *Klebsiella*
623 *oxytoca* clinical isolates against ceftazidime, cefepime and ceftobiprole. J Chemother. 2009
624 Jun;21(3):365-6.
- 625 23. Crandon JL, Nicolau DP. *In Vitro* Activity of Cefepime/AAI101 and Comparators against Cefepime Non-
626 susceptible Enterobacteriaceae. Pathogens. 2015 Aug 18;4(3):620-5.
- 627 24. D'Angelo RG, Johnson JK, Bork JT, Heil EL. Treatment options for extended-spectrum beta-lactamase
628 (ESBL) and AmpC-producing bacteria. Expert Opin Pharmacother. 2016;17(7):953-67. doi:
629 10.1517/14656566.
- 630 25. Doménech-Sánchez A, Hernández-Allés S, Martínez-Martínez L, Benedí VJ, Albertí S. Identification
631 and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic
632 resistance. J Bacteriol. 1999 May;181(9):2726-32.
- 633 26. Durand-Maugard C, Lemaire-Hurtel AS, Gras-Champel V, Hary L, Maizel J, Prud'homme-Bernardy A,
634 Andréjak C, Andréjak M. Blood and CSF monitoring of cefepime-induced neurotoxicity: nine case
635 reports. J Antimicrob Chemother. 2012 May;67(5):1297-9.
- 636 27. Endimiani A, Perez F, Bonomo RA. Cefepime: a reappraisal in an era of increasing antimicrobial
637 resistance. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008 Dec;6(6):805-24.
- 638 28. EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2019 : www.eucast.org
- 639 29. Grohs P, Kernéis S, Sabatier B, Lavollay M, Carbonnelle E, Rostane H, Souty C, Meyer G, Gutmann L,
640 Mainardi JL. Fighting the spread of AmpC-hyperproducing Enterobacteriaceae: beneficial effect of
641 replacing ceftriaxone with cefotaxime. J Antimicrob Chemother. 2014 Mar;69(3):786-9.
- 642 30. Hackel M, Sahn D. 1360. Antimicrobial Activity of Cefepime in Combination with VNRX-5133 Against
643 a Global Collection of Enterobacteriaceae Including Resistant Phenotypes. Open Forum Infect Dis. 2018
644 Nov 26;5(Suppl 1):S416-7.
- 645 31. Hamada Y, Sutherland CA, Nicolau DP. Impact of revised cefepime CLSI breakpoints on *Escherichia*
646 *coli* and *Klebsiella pneumoniae* susceptibility and potential impact if applied to *Pseudomonas*
647 *aeruginosa*. J Clin Microbiol. 2015 May;53(5):1712-4.
- 648 32. Harris PN, Ferguson JK. Antibiotic therapy for inducible AmpC β -lactamase-producing Gram-negative
649 bacilli: what are the alternatives to carbapenems, quinolones and aminoglycosides? Int J Antimicrob
650 Agents. 2012 Oct;40(4):297-305

- 651 33. Hocquet D, Nordmann P, El Garch F, Cabanne L, Plésiat P. Involvement of the MexXY-OprM efflux
652 system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob*
653 *Agents Chemother.* 2006;50(4):1347-51.
- 654 34. Hocquet D, Berthelot P, Roussel-Delvallez M, Favre R, Jeannot K, Bajolet O, Marty N, Grattard F,
655 Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Husson MO, Couetdic G, Plésiat P. *Pseudomonas aeruginosa* may
656 accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections.
657 *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Oct;51(10):3531-6.
- 658 35. Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, Bauraing C, Jans B, Glupczynski Y. Microbiological surveillance of
659 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Belgium in 2016. ESCMID 2017, Poster P0409.
- 660 36. Isitan C, Ferree A, Hohler AD. Cefepime induced neurotoxicity: A case series and review of the literature.
661 *eNeurologicalSci.* 2017 Aug 4;8:40-43.
- 662 37. Jan S, Ragunathan B, DiBrito SR, Alabi O, Gutierrez M. Cefepime Efficacy and Safety in Children: A
663 Systematic Review and Meta-analysis. *Front Pediatr.* 2018 Mar 6;6:46.
- 664 38. Jauregui L, Matzke D, Scott M, Minns P, Hageage G. Cefepime as treatment for osteomyelitis and other
665 severe bacterial infections. *J Antimicrob Chemother.* nov 1993;32 Suppl B:141-9.
- 666 39. Jeannot K, Elsen S, Köhler T, Attree I, van Delden C, Plésiat P. Resistance and virulence of *Pseudomonas*
667 *aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.*
668 2008;52(7):2455-62.
- 669 40. Kaur A, Singh S. Prevalence of Extended Spectrum Betalactamase (ESBL) and Metallobetalactamase
670 (MBL) Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Isolated from Various Clinical
671 Samples. *J Pathog.* 2018 Oct 24;2018: 6845985.
- 672 41. Kim PW, Wu YT, Cooper C, Rochester G, Valappil T, Wang Y, Kornegay C, Nambiar S. Meta-analysis
673 of a possible signal of increased mortality associated with cefepime use. *Clin Infect Dis.* 2010 Aug
674 15;51(4):381-9.
- 675 42. Kim SA, Altshuler J, Paris D, Fedorenko M. Cefepime versus carbapenems for the treatment of urinary
676 tract infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Int J*
677 *Antimicrob Agents.* 2018 Jan;51(1):155-158.
- 678 43. Kohlmann R, Bähr T, Gatermann SG. Species-specific mutation rates for *ampC* derepression in
679 Enterobacterales with chromosomally encoded inducible AmpC β -lactamase. *J Antimicrob Chemother.*
680 2018 01;73(6):1530–6.

- 681 44. Kohlmann R, Bähr T, Gatermann SG. Effect of ampC derepression on cefepime MIC in Enterobacterales
682 with chromosomally encoded inducible AmpC β -lactamase. Clin Microbiol Infect. 2019 Sep;25(9):1158.
- 683 45. Kotapati S, Kuti JL, Nightingale CH, Nicolau DP. Clinical implications of extended spectrum beta-
684 lactamase (ESBL) producing *Klebsiella* species and *Escherichia coli* on cefepime effectiveness. J Infect.
685 2005 Oct;51(3):211-7.
- 686 46. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. Adv Drug
687 Deliv Rev. 2005 Jul 29;57(10):1486–513.
- 688 47. Labombardi VJ, Rojzman A, Tran K. Use of cefepime for the treatment of infections caused by extended
689 spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Diagn Microbiol Infect
690 Dis. 2006 Nov;56(3):313-5.
- 691 48. Lamoth F, Buclin T, Pascual A, Vora S, Bolay S, Decosterd LA, Calandra T, Marchetti O. High cefepime
692 plasma concentrations and neurological toxicity in febrile neutropenic patients with mild impairment of
693 renal function. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Oct;54(10):4360-7.
- 694 49. Lee NY, Lee CC, Huang WH, Tsui KC, Hsueh PR, Ko WC. Cefepime therapy for monomicrobial
695 bacteremia caused by cefepime-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing
696 Enterobacteriaceae: MIC matters. Clin Infect Dis. 2013 Feb;56(4):488-95..
- 697 50. Leibovici L, Yahav D, Paul M. Excess mortality related to cefepime. Lancet Infect Dis. 2010
698 May;10(5):293–4.
- 699 51. Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*.
700 Antimicrob Agents Chemother. 1995 Sep;39(9):1948-53.
- 701 52. Low DE; Canadian Antimicrobial Resistance Study Group. Comparative activity of cefepime with
702 several antimicrobials against aerobic Gram-negative and Gram-positive organisms isolated from patients
703 across Canada in 1993. Can J Infect Dis. 1995 Sep;6(5):258-62.
- 704 53. M100-S25. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational
705 Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- 706 54. Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández-Allés S, Alvarez-Díaz D, Suárez AI, Tran J, Benedí VJ,
707 Jacoby GA. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against
708 *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Jul;43(7):1669-73.

709 55. Moya B, Dötsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, Oliver A. Beta-lactam resistance
710 response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog.* 2009
711 Mar;5(3)

712 56. Nikaido H, Liu W, Rosenberg EY. Outer membrane permeability and beta-lactamase stability of dipolar
713 ionic cephalosporins containing methoxyimino substituents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990
714 Feb;34(2):337-42.

715 57. Nogueira Kda S, Daur AV, Reason IT, Gales AC, Costa LM. Cefepime versus extended spectrum β -
716 lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Braz J Infect Dis.* 2011 Mar-Apr;15(2):167-9.

717 58. Papp-Wallace KM, Bethel CR, Caillon J, Barnes MD, Potel G, Bajaksouzian S, Rutter JD, Reghal A,
718 Shapiro S, Taracila MA, Jacobs MR, Bonomo RA, Jacqueline C. Beyond Piperacillin-Tazobactam:
719 Cefepime and AAI101 as a Potent β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Combination. *Antimicrob Agents*
720 *Chemother.* 2019 Apr 25;63(5).

721 59. Patel HB, Lusk KA, Cota JM. The Role of Cefepime in the Treatment of Extended-Spectrum Beta-
722 Lactamase Infections. *J Pharm Pract.* 2019 Aug;32(4):458–63.

723 60. Paul M, Yahav D, Fraser A, Leibovici L. Empirical antibiotic monotherapy for febrile neutropenia:
724 systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Antimicrob Chemother.* 2006
725 Feb;57(2):176–89.

726 61. Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin*
727 *Pharmacol.* 2007 Oct;7(5):459-69.

728 62. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical
729 isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Jun;40(6):2153-62.

730 63. Pires J, Taracila M, Bethel CR, Doi Y, Kasraian S, Tinguely R, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. In
731 Vivo Evolution of CMY-2 to CMY-33 β -Lactamase in *Escherichia coli* Sequence Type 131:
732 Characterization of an Acquired Extended-Spectrum AmpC Conferring Resistance to Cefepime.
733 *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Dec;59(12):7483-8

734 64. Poole K, Krebes K, McNally C, Neshat S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*:
735 evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol.* 1993 Nov;175(22):7363-72.

736 65. Queenan AM, Shang W, Bush K, Flamm RK. Differential selection of single-step AmpC or efflux
737 mutants of *Pseudomonas aeruginosa* by using cefepime, ceftazidime, or ceftobiprole. *Antimicrob Agents*
738 *Chemother.* 2010 Oct;54(10):4092-7.

- 739 66. Recommandations de pratique Clinique Infections ostéo-articulaires sur matériel (prothèse, implant,
740 ostéo-synthèse), 2009 : http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/spilf/2010_osteo_long.pdf
- 741 67. Roos JF, Bulitta J, Lipman J, Kirkpatrick CMJ. Pharmacokinetic-pharmacodynamic rationale for
742 cefepime dosing regimens in intensive care units. J Antimicrob Chemother. 2006 Nov;58(5):987–93.
- 743 68. Song W, Moland ES, Hanson ND, Lewis JS, Jorgensen JH, Thomson KS. Failure of Cefepime Therapy
744 in Treatment of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. J Clin Microbiol. 2005 Sep;43(9):4891–4.
- 745 69. Sugawara E, Nikaido H. Properties of AdeABC and AdeIJK efflux systems of *Acinetobacter baumannii*
746 compared with those of the AcrAB-TolC system of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother.
747 2014 Dec;58(12):7250-7.
- 748 70. Torres E, López-Cerero L, Rodríguez-Martínez JM, Pascual Á. Reduced Susceptibility to Cefepime in
749 Clinical Isolates of Enterobacteriaceae Producing OXA-1 Beta-Lactamase. Microb Drug Resist. 2016
750 Mar;22(2):141-6
- 751 71. Trang M, Dudley MN, Bhavnani SM. Use of Monte Carlo simulation and considerations for PK-PD
752 targets to support antibacterial dose selection. Curr Opin Pharmacol. 2017 Oct;36:107-113.
- 753 72. Velez R, Sloan E. Combating antibiotic resistance, mitigating future threats and ongoing initiatives. J
754 Clin Nurs. 2016 Jul;25(13-14):1886-9.
- 755 73. Yahav D, Paul M, Fraser A, Sarid N, Leibovici L. Efficacy and safety of cefepime: a systematic review
756 and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2007 May;7(5):338–48.
- 757 74. Yasufuku T, Shigemura K, Shirakawa T, Matsumoto M, Nakano Y, Tanaka K, Arakawa S, Kinoshita S,
758 Kawabata M, Fujisawa M. Correlation of overexpression of efflux pump genes with antibiotic resistance
759 in *Escherichia coli* Strains clinically isolated from urinary tract infection patients. J Clin Microbiol. 2011
760 Jan;49(1):189-94.

III. Objectifs de l'étude

Le FEP, C4G, constitue un antibiotique majeur dans l'arsenal thérapeutique contemporain, notamment pour le traitement des infections à *Enterobacteriaceae* producteurs de β -lactamases de type céphalosporinase. L'augmentation de la résistance aux ATB est un enjeu écologique majeur à maîtriser. Le FEP, par sa stabilité vis-à-vis des céphalosporinases, permet son utilisation en thérapeutique anti-infectieuse pour des germes exprimant ou surexprimant celle-ci (selon les recommandations de l'EUCAST 2019). Dans le cas du CEC (qui possède une AmpC chromosomique pouvant être dérégulée), cela permet d'éviter l'utilisation de molécules d'intérêt que l'on préférera réserver en dernier recours comme les carbapénèmes. L'objectif étant de limiter l'émergence de résistance à ces molécules que ce soit par production de carbapénémases ou par mécanisme d'imperméabilité (altération des porines).

Les modifications des *cut-off* du FEP au cours des dernières années a permis de limiter une grande partie des échecs thérapeutiques passés. Ceci étant, il reste de nombreuses questions sur l'adaptation des bactéries sous traitement par FEP en matière d'émergence de mutants résistants.

L'objectif de notre étude sera d'évaluer la sensibilité du FEP de souches cliniques appartenant au CEC par différentes approches analytiques. Pour ce faire, nous avons dégagé plusieurs axes de travail, à partir d'une collection de souches cliniques issues de bactériémies :

- Détermination des CMI₅₀ et CMI₉₀ au FEP de souches cliniques du CEC
- Étude de l'activité bactéricide du FEP sur une partie des souches de la collection par réalisation de courbes de survie
- Évaluation de la sélection de mutants-résistants du CEC au FEP

Partie B : Travaux personnels

I. Matériels et Méthodes

I.1 Caractéristiques de la collection de souches cliniques

Cette étude a été réalisée sur une collection de souches cliniques du CEC isolées de bactériémies chez des patients hospitalisés au CHU de Caen sur la période 2017-2018. Au total, 86 souches ont été collectées. Les souches ont été préalablement identifiées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS (Bruker)) puis conservées à -80°C en bouillon cœur-cerveau (BHI) additionné de 10% de glycérol. La souche de référence utilisée dans cette étude est la souche ATCC 13047 appartenant au C-XI, dont le génome est complètement séquencé et annoté (Ren *et al.* 2010).

I.2 Caractérisation génotypique des souches de CEC

I.2.1 Identification des clusters

Après une identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS, Bruker®), le séquençage partiel du gène *hsp60* a permis de classer précisément chaque souche de la collection de CEC parmi l'un des 14 clusters. Les réactions de « *Polymerase Chain Reaction* » (PCR) en point final ont été réalisées avec la Taq polymérase (Master Mix 2X, Thermo Fisher Scientific®) selon les modalités définies par Hoffman *et al.* (Hoffmann & Rogenkamp, 2003) Les réactions ont été effectuées dans un volume total de 25 μ L en commençant par une dénaturation initiale à 95°C pendant 5min. Les échantillons sont ensuite soumis à 30 cycles de 30s à 95°C, 30 secondes à la température d'hybridation 55°C et 30s à 72°C puis à une étape d'élongation finale pendant 7 min à 72°C. Après vérification des amplicons en gel d'agarose (1%), les amplicons ont été envoyés à la plateforme de séquençage Eurofins® et analysées avec le logiciel en ligne Chromas Lite 2.01®.

Le tableau 12 collige les amorces utilisées pour la classification des souches cliniques de notre étude.

Tableau 12 Amorces utilisées pour la classification des souches cliniques de notre étude (Hoffmann *et al.* 2003)

Gène	Primer	Séquence (5' → 3')	Taille du produit (pb)
<i>hsp 60</i>	hsp60_F	GGTAGAAGAAGGCGTGGTTGGC	341
	hsp60_R	ATGCATTCGGTGGTGATCATCAG	
<i>rpoB</i>	rpoB_F	AACCAGTTCCGCGTTGGCCTGG	1088
	rpoB_R	CCTGAACAACACGCTCGGA	

Un arbre phylogénétique a été réalisé (Annexe 1) afin d'identifier à quel cluster du CEC appartenait chaque souche de notre étude (Hoffmann et Rogenkamp *et al.* 2003) à partir du logiciel de phylogénie : <http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/index.cgi>.

I.3 Évaluation du « *fitness* » de souches cliniques du CEC

Nous avons évalué le *fitness* de chaque souche clinique de CEC en triplicate dans le but de calculer le temps de doublement. Pour ce faire nous avons réalisé des courbes de croissance pour chaque souche de l'étude. Nous les avons réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre TECAN® Infinite F200 Pro pour suivre l'évolution de la croissance bactérienne dans le temps afin d'obtenir le temps de doublement à partir de la pente de croissance bactérienne, obtenue lors de la phase de croissance exponentielle.

La multiplication bactérienne suit un processus sur plusieurs phases comme décrit dans la figure 13.

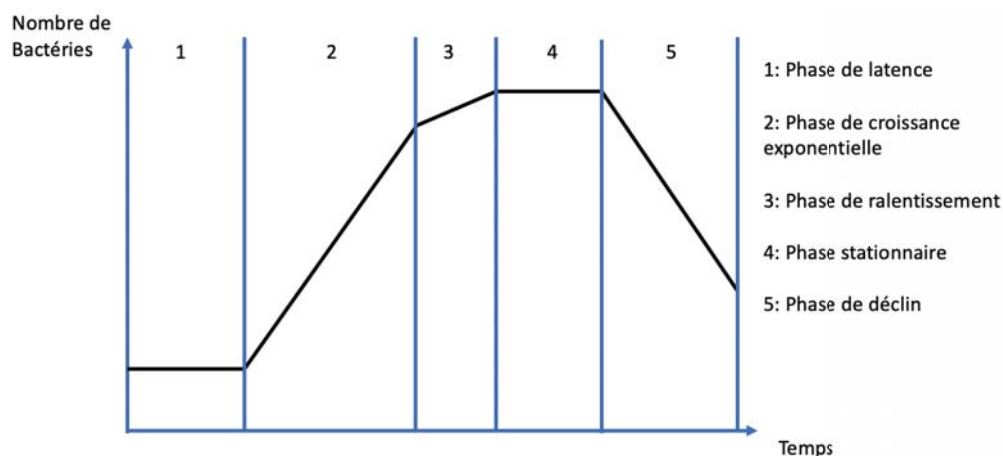


Figure 13 Représentation des différentes phases de la croissance bactérienne

La culture a été effectuée en microplaque dans 200 μL de milieu Mueller-Hinton (MH) additionné de 10 μL de suspension bactérienne ajustée à 0,5 McFarland. Immédiatement après, la plaque est incubée dans le spectrophotomètre (TECAN) à 35°C (+/-2°C) afin de suivre l'évolution de la croissance bactérienne par rapport au temps à partir de T_{min} .

Le suivi de la croissance bactérienne a été réalisé pendant 24h avec une mesure de densité optique (DO) ($\lambda= 595 \text{ nm } +/-10 \text{ nm}$) à t_0 puis toutes les 10 minutes. Les points de mesure obtenus sont colligés dans un graphique de type : $[X]=f(t)$ (avec $X= \text{DO}$).

La courbe obtenue étant sinusoïdale, nous avons effectué une transformation logarithmique telle que : $\log_{10} ([X]) =f(t)$. Ainsi nous pouvons calculer la pente maximum qui correspond à la pente de la droite lors de la phase de croissance. (Al. Hassan *et al.* 1989)

Pour déterminer le temps de génération (TG) des souches, ou temps de doublement, nous avons utilisé la formule suivante :

$$\text{TG} = \ln(2)/\mu_{\text{max}}$$

Les données ont été prétraitées dans Excel, puis analysées statistiquement à l'aide du logiciel R® pour le calcul du temps de génération.

I.4 Analyse de la virulence chez *Galleria mellonella*

La virulence des souches du CEC est évaluée à l'aide d'un modèle d'infection d'une chenille : *Galleria mellonella*. A partir d'une suspension bactérienne (DO=0,1) réalisée dans du sérum physiologique, 10 μL ont été injectés à chaque chenille, correspondant à un inoculum d'environ 5.10^6 UFC/mL. Une fois infectées, les chenilles sont placées à l'étuve (35+/- 2°C) pendant 72h. Une numération sur milieu Luria-Bertani (LB) a été effectuée pour chaque souche afin de vérifier que l'inoculum injecté soit bien standardisé. Dix chenilles par souche ont été infectées. Le taux de mortalité est calculé après dénombrement du nombre de chenilles mortes à t+24h, 48h, 72h.

I.5 Caractérisation phénotypique des souches de CEC

I.5.1 Phénotypes de la population étudiée

La sensibilité aux antibiotiques a été évaluée par la méthode de l'antibiogramme en diffusion sur milieu Muller Hinton E (MHE, bioMérieux®) (recommandations CA-SFM 2019). Les différents antibiotiques testés sont : ampicilline (AMP), amoxicilline + acide clavulanique (AMC), Ticarcilline (TIC), Ticarcilline + Acide Clavulanique (TCC), Pipéracilline-Tazobactam (PTZ), Céfalotine (CXN), Céfotaxime (CTX), Ceftriaxone (CRO), Céfépime (FEP), Céfoxitine (FOX), Aztréonam (AZT), Imipénème (IMI), Témocilline (TEM) Ciprofloxacine (CIP), Ofloxacine (OFL), Gentamicine (GEN), Amikacine (AKN), Fosfomycine (FOS), l'association Sulfamide-Triméthoprim (SXT).

Pour les souches résistantes aux C3G, la recherche de BLSE a été réalisée par la méthode des disques combinés sur gélose MHE additionnée de cloxacilline (inhibiteur des céphalosporinases à une concentration dans la gélose de 250 mg/L). L'augmentation de la zone d'inhibition autour du disque de plus de 5 mm entre une C3G et une C3G avec inhibiteur caractérisant la présence d'une BLSE (CA-SFM 2019) (Figure 14).



Figure 14 Image d'une souche de *E. coli* BLSE + par méthode des disques combinés FEP : Céfépime/ CFE : FEP+acide clavulanique (AC) / CTX : cefotaxime / CCT : CTX + AC/ CAZ : ceftazidime/ CCA : CAZ + AC

I.5.2 Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides

Nous avons réalisé pour chacune des souches de notre étude la détermination des CMI par micro dilution en milieu liquide (BMD). La gamme de concentrations testées s'étend de 0,015 mg/L à 32 mg/L.

Les concentrations minimales bactéricides (CMB) ont également été réalisées à partir des CMI. La CMB étant la plus faible concentration d'antibiotiques pour laquelle l'effet bactéricide est de 99,99% de l'inoculum initial après 18h de culture à 37°C. Ces valeurs caractérisent l'effet bactéricide d'une molécule.

I.5.3 Évaluation des performances techniques de la méthode des disques

La détermination des CMI nous a permis de vérifier s'il y avait des discordances sur la sensibilité des souches rendues par la méthode de l'antibiogramme en diffusion en comparaison aux CMI, et de les classer selon les critères définis par le CLSI (Tableau 13).

Tableau 13 Définition des types d'erreurs et hiérarchisation (CLSI M100-S25)

Type de discordance	Libellé	Définition	Terme anglo-saxon correspondant
DTM	Discordance Très Majeure	Résultat trouvé Sensible (S) alors que la souche est en réalité Résistante (R). Ce type d'erreur est dit très majeur car exposant le patient à un risque important d'échec thérapeutique	<i>Very Major Error (VME)</i>
DM	Discordance Majeure	Résultat trouvé Résistant (R) alors que la souche est en réalité Sensible (S). Ce type de résultat correspond à une perte de chance pour le patient puisque le résultat conduit à ne pas proposer un traitement efficace dont il aurait pu bénéficier, mais il n'expose pas le patient à risque d'échec thérapeutique	<i>Major Error (ME)</i>
Dm	Discordance mineure	Souche résistante ou sensible répondue à tort intermédiaire OU souche intermédiaire répondue à tort Résistante ou Sensible. Cette catégorie regroupe des types de discordances hétérogènes et sont en partie liées à l'incertitude et variation de la méthode	<i>Minor Error (mE)</i>

L'évaluation des discordances peut ensuite être réalisée en fonction des critères définis par la « *U.S Food and Drug Administration* » (FDA) ou le « *Clinical & Laboratory Standards Institute* » (CLSI) (Tableau 14).

Tableau 14 Critères d'évaluation conformité définis par la FDA et le CLSI (Jorgensen JH *et al.* 2009, CLSI M100-S23)

Critères d'évaluation des discordances	
<u>FDA</u>	<u>CLSI</u>
DTM < 1,5%	DM et DTM < 3%
DM<3%	Dm<10%
Concordance catégorielle (S, I ou R) globale > 90%	

Le calcul du taux de DTM étant : le nombre de souches rendues « Sensible » au lieu de « Résistante » divisé par le nombre de souches rendues résistantes.

Le calcul du taux de DM étant : le nombre de souches rendues « Résistante » au lieu de « Sensible » divisé par le nombre de souches sensibles.

Le calcul du taux de dm étant : le nombre de souches rendues « Intermédiaire » au lieu de « Sensible » ou « Résistant », ou « Sensible » au lieu de « Intermédiaire », ou « Résistante » au lieu de « Intermédiaire », divisé par le nombre total de souches.

I.5.4 Recherche des β -lactamases acquises

A partir des ADN extraits par Instagene® (Biorad), nous avons recherché par PCR en point final, les principales β -lactamases : bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{SHV} , et les principales $ampC$ plasmidiques pouvant être acquises.

Les amorces et références bibliographiques utilisées pour la recherche des AmpC plasmidiques sont colligées dans le tableau 15 (Perez-Perez *et al.* 2002).

Tableau 15 Liste des amorces utilisées pour la caractérisation des AmpC plasmidiques (Perez-Perez *et al.* 2002)

Enzyme	Primer	Séquence (5' → 3')	Taille amplicon (pb)
MOX-A, MOX-2, CMY-1, CMY-8 à CMY-11	MOXMF MOXMR	GCTGCTCAAGGAGCACAGAT CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520
LAT-1 à LAT4, CMY2 à CLY-7, BIL-1	CITMF CITMR	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462
DHA-1, DHA-2	DHAMF DHAMR	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT CCGTACGCATACTGGCTT	405
ACC	ACCMF ACCMR	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA TTCGCCGAATCATCCCTAGC	346
MIR-IT ACT-1	EBCMF EBCMR	TCGGTAAAGCCGATGTTGCCG CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302
FOX-1 à FOX-5b	FOXMF FOXMR	AACATGGGGTATCAGGGAGATG CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190

Nous avons caractérisé les BLSE de type CTX-M et TEM, issues de notre collection d'isolats de CEC par technique de PCR en utilisant les amorces colligées dans le tableau 16 (Maina *et al.* 2012).

Tableau 16 Amorces utilisées pour la caractérisation des souches bla_{CTX-M} et bla_{TEM} (Maina *et al.* 2012)

Gène	Primer	Séquence (5' → 3')	Taille de l'amplicon (pb)
bla_{CTX-M}	CTX-M-F	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	544
	CTX-M-R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	
bla_{TEM}	TEM-F	CTTCCTGTTTTTGCTCACCCA	717
	TEM-R	TACGATACGGGAGGGCTTAC	

La caractérisation des souches bla_{SHV} a été réalisée avec les amorces colligées dans le tableau 17 (Colom *et al.* 2003).

Tableau 17 Amorces utilisées pour la caractérisation des souches bla_{SHV} (Colom *et al.* 2003)

Gène	Primer	Séquence (5' → 3')	Taille de l'amplicon (pb)
bla_{SHV}	SHV-F	AGGATTGACTGCCTTTTTG	392
	SHV-R	ATTTGCTGATTTTCGCTCG	

I.5.5 Courbes de survie ou « *time kill-curve* » (TKC)

Nous avons sélectionné quelques souches (1 WT, 4 C3GR), afin de déterminer l'impact de concentrations croissantes de FEP sur la croissance bactérienne. Vingt μL de suspension bactérienne d'un MacFarland 0,5 ont été ajoutés à 20 mL de MH afin d'obtenir une numération de départ de $5 \cdot 10^8$ UFC/mL. Quatre concentrations en FEP ont été étudiées :

- Absence de FEP (0)
- 1xCMI (CMI)
- 4xCMI (CMI4)
- 16xCMI (CMI16)

Puis nous avons mesuré à T+0h, T+2h, T+4h, T+6h, T+8h et T+24h le nombre d'UFC pour chacun des bouillons de bactérie. Chaque TKC a été réalisé en triplicate. Le protocole est défini dans la figure 15.

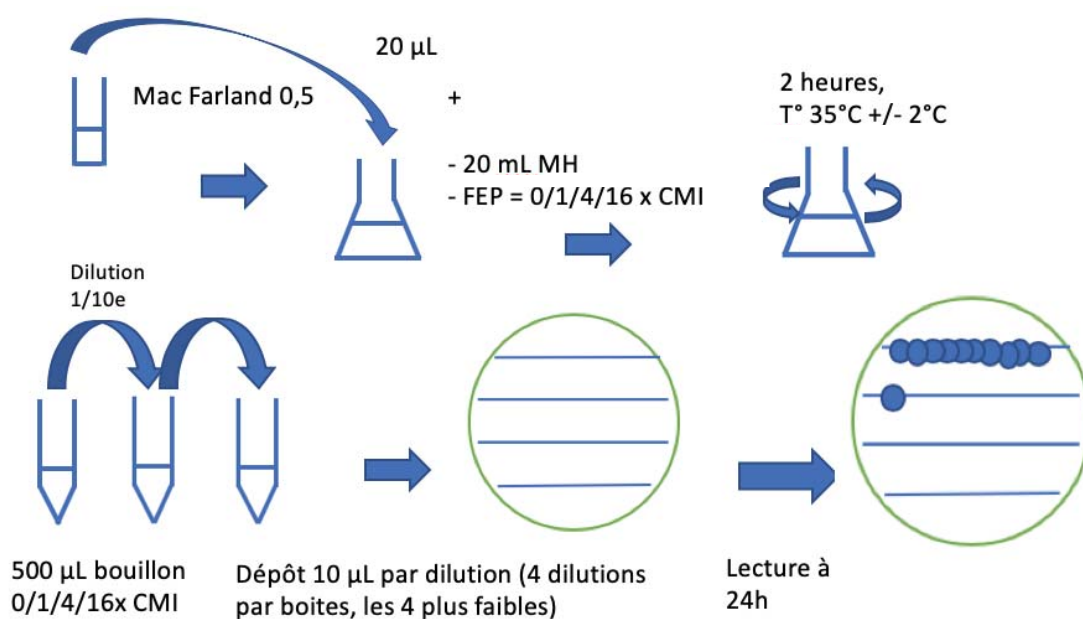


Figure 15 Protocole courbes de survie

Les données ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel PRISM®.

I.5.6 Taux de mutants résistants (MR)

La mesure du taux de mutants-résistants a été réalisée pour 14 isolats de notre collection. Nous avons réalisé ce test en triplicate sur 10 souches WT, 3 souches hCase et une souche BLSE (*bla_{SHV}*).

Seize colonies ont été repiquées individuellement sur microplaque de 96 puits contenant 200 μL de milieu LB. Après 24h d'incubation à 35°C (+/- 2°C), 100 μL de la suspension bactérienne obtenue était incorporée à 18 mL de gélose MH en surfusion (< 50°C), additionné de FEP à hauteur de 8xCMH de la souche étudiée. L'inoculum de départ incorporé aux géloses étant de 5.10^7 UFC/mL. Le protocole est résumé par la figure 16.

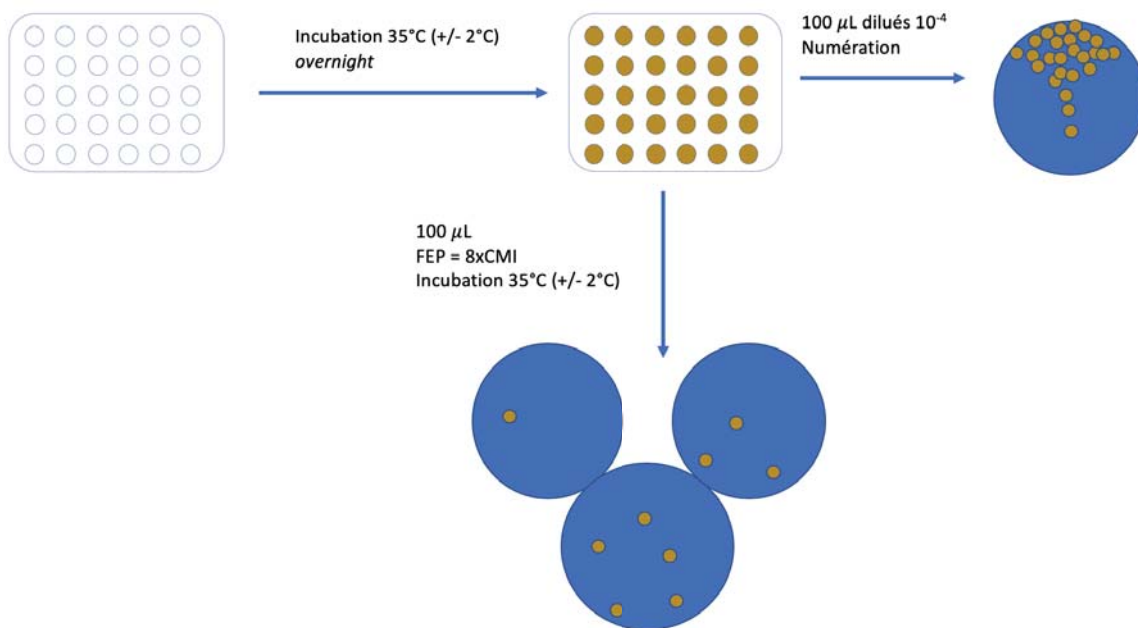


Figure 16 Protocole d'évaluation du taux de mutants-résistants inspiré des travaux de Kohlmann *et al.* (Kohlmann *et al.* 2018)

Une numération des suspensions bactériennes issues de la microplaque a été effectuée pour contrôler la standardisation de la méthode. Le site internet utilisé pour la détermination du taux de MR : <http://www.lcqb.upmc.fr/bzrates>.

II. Résultats

II.1 Caractéristiques générales de la population

Notre collection est composée de 86 isolats cliniques du CEC non reliés, issus de bactériémies diagnostiquées au CHU de Caen entre le 01/01/2017 et le 31/12/2018. Les caractéristiques générales de la collection sont colligées dans le tableau 18.

Tableau 18 Caractéristiques générales de la population d'étude

Caractéristiques	Résultats
Nombre isolats cliniques	86
Données démographiques	
Sexe	
Hommes (N)	58
Femmes (N)	28
Sexe ratio H/F	2,07
Âge moyen (ET)	65,9 (+/-14,9)
Répartition des services cliniques	
Médecine	61 (71%)
Chirurgie	6 (7%)
Réanimation	19 (22%)
Site de prélèvement des Hémocultures	
Voie Centrale	29 (33,7%)
Voie Périphérique	57 (66,3%)

Notre population d'étude est composée principalement d'hommes (67,5%) avec un sexe-ratio de 2,07. L'âge moyen de notre population d'étude est supérieur à 65 ans (+/- 14,9). Nos souches sont majoritairement issues des services de médecine et prélevées à partir d'hémocultures périphériques.

II.2 Répartition des clusters de notre population d'étude

La répartition des clusters présents dans notre étude est illustrée par la figure 17.

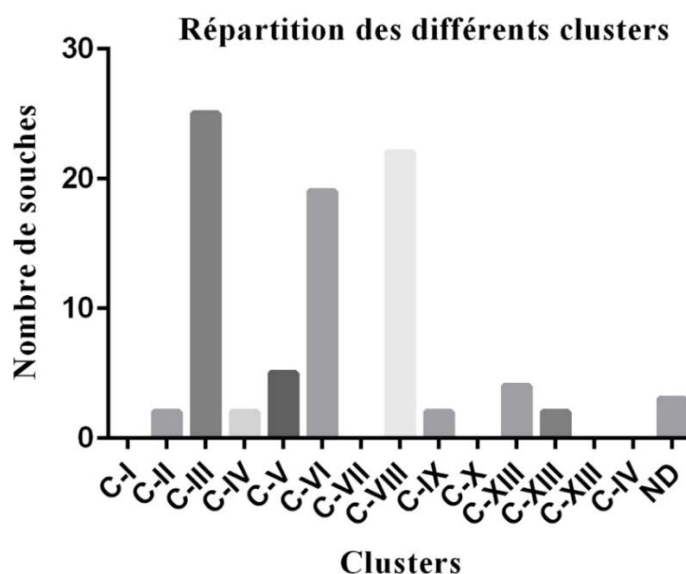


Figure 17 Répartition des souches en fonction de leur cluster (par *hsp60*)

Les 3 principaux clusters représentés sont le C-III (29%), C-VIII (25,5%) et C-VI (22,1%), ces 3 clusters appartenant tous aux espèces *E. hormaechei*. Nous nous focaliserons sur ces 3 clusters pour la suite de l'étude. Les C-I, C-VII, C-X, C-XIII et C-XIV n'ont pas été retrouvés dans notre population.

II.3 Temps de génération des phénotypes et clusters de l'étude

Les TG des souches en fonction de leur cluster et de leur phénotype sont colligés dans le tableau 19 :

Tableau 19 Temps de génération des souches d'étude

	μ TG (min)	ET (min)	Range (min)
Phénotypes			
WT	36,83	7,27	[10,92-57,24]
hCase	39,75	2	[33,38-76,2]
BLSE	40,07	5,2	[36,7-48,4]
Clusters			
C-III	38,80	8,4	[33,1-46,18]
C-VI	39,11	1,8	[30,24-47,35]
C-VIII	40.10	9,4	[33,5-76,2]

ET= écart-type ; μ TG= moyenne des temps de génération

Les temps de génération obtenus sont relativement proches allant de 37 à 40 minutes, pour un TG attendu chez les Entérobactéries entre 20 et 40 minutes (Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène 2014).

Trois souches ont un TG en dehors des bornes définies :

- ECL-05, souche WT appartenant au C-II : TG=10,9 minutes
- ECL-96 souche WT appartenant au C-VIII : TG = 57,2 minutes
- ECL-19 souche BLSE appartenant au C-VIII : TG = 76,4 minutes

Il n'a pas été observé de différence significative du temps de doublement entre les différents groupes (souches classées par clusters ou par phénotype).

II.4 Virulence des souches d'étude

La virulence des souches de CEC de l'étude a été évaluée par l'analyse de la mortalité observée sur modèle animal suite à une infection de *G. mellonella* par ces souches. Les taux de mortalité observés sont illustrés par la figure 18.

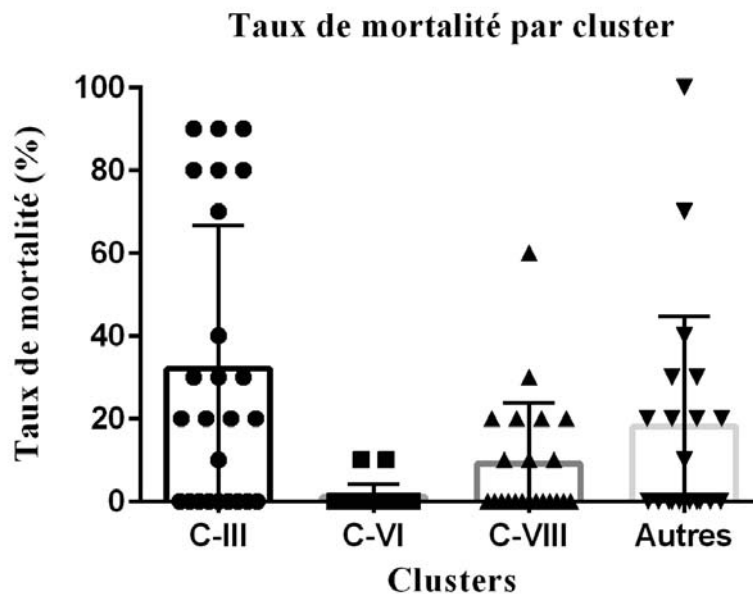


Figure 18 Taux de mortalité par clusters

Le C-III est significativement plus virulent les autres clusters. En effet, le taux de mortalité retrouvé chez *G. mellonella* est supérieur au C-VI ($p < 0.001$) et au C-VIII ($p < 0.003$).

II.5 Caractéristiques phénotypiques des souches de la collection de CEC

II.5.1 Sensibilité aux C3G

Les isolats ont été classés en fonction de leur résistance aux C3G (C3GR) en 3 grands groupes :

- Sensibles au C3G = WT
- C3GR par hCAse = hCase
- C3GR par production de BLSE = BLSE

La figure 19 illustre la répartition des différents phénotypes de notre population d'étude. Les souches ayant été classées de la façon suivante.

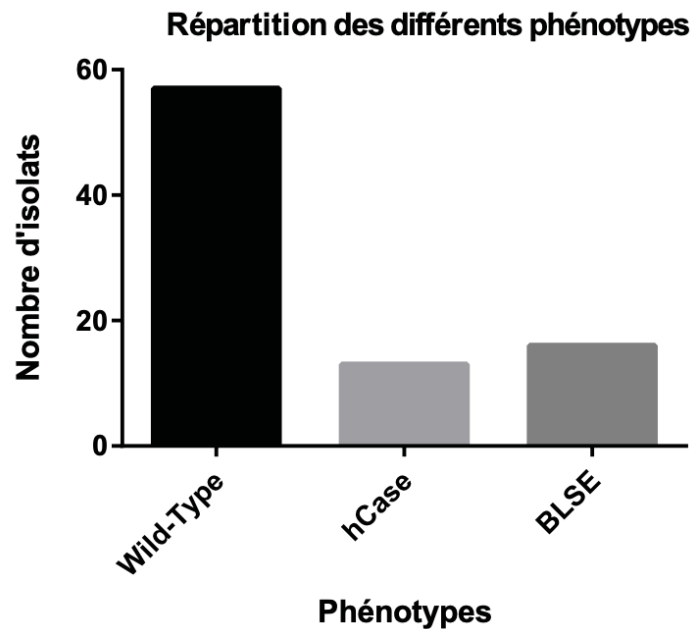


Figure 19 Répartition des isolats en fonction de leur phénotype de résistance

Nous observons ainsi 2/3 de phénotype sauvage et 1/3 de C3GR. Parmi ces dernières, 2 phénotypes sont observés : des souches hCase et BLSE. La répartition de ces deux phénotypes de C3GR est de 44,8% de souches hCase pour 55,2% de souches productrices de BLSE.

Le tableau 20 illustre les CMI_{50/90} au FEP des souches de la collection.

Tableau 20 CMI₅₀ et CMI₉₀ des souches de l'étude

	Nombre (%)	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Nombre de souches sensibles (%)
Toutes souches	86 (100%)	0,03	8	70 (81.4%)
WT	57 (67%)	0,03	0,06	57 (100%)
hCase	13 (14,8%)	0,25	1	12 (92.3%)
BLSE	16 (18,2%)	8	64	2 (12.5%)

Les CMI₅₀ et CMI₉₀ sont plus élevées pour le groupe BLSE que pour le groupe hCase ($p < 0,003$) et WT ($p < 0,003$). Le caractère « SENSIBLE » au FEP est défini pour une CMI ≤ 1 mg/L, *cut-off* de l'EUCAST. Les souches BLSE de notre étude sont significativement moins sensibles au FEP que les autres phénotypes.

Nous avons également calculé les CMI₅₀ et CMI₉₀ au FEP des 3 principaux clusters : C-III, C-VI et C-VIII (Tableau 21). La répartition des phénotypes de résistance au sein des différents clusters est également représentée dans le tableau 21.

Tableau 21 Répartition et caractéristiques des différents clusters de l'étude (phénotype de résistance et CMI₅₀ et CMI₉₀ au FEP)

Clusters	N C3GR (%)	%BLSE/Hcase	%Hcase/BLSE	CMI ₅₀	CMI ₉₀
C-III	3 (12%)	33%	67%	0,03	1
C-VI	14 (67%)	86%	14%	4	16
C-VIII	5 (23%)	60%	40%	0,03	1

Nous observons 12% de souches C3GR appartenant au C-III (pour une majorité d'hCase : 67%), 67% au C-VI (pour une majorité de BLSE : 86%) et 23% au C-VIII (pour une majorité de BLSE : 60%). Les CMI₅₀ et CMI₉₀ du C-VI sont de 4 et 16 mg/L, pour 0,03 et 1 mg/L pour les C-III et C-VIII. Les CMI du C-VI sont significativement supérieures aux C-III et C-VIII ($p < 0,003$). Une souche hCase n'a pu être clusterisée.

Les différentes BLSE observées de notre étude sont colligées dans le tableau 22 :

Tableau 22 Répartition des BLSE retrouvées dans notre population d'étude

Type de BLSE	Nombre (%)
<i>bla_{CTX-M}</i>	14 (87,5%)
<i>bla_{SHV}</i>	2 (12,5%)

En plus des *bla_{CTX-M}* et *bla_{SHV}* colligées dans le tableau 22, une *bla_{DHA}* compose également notre population d'étude.

Le tableau 23 collige les co-résistances associées à la C3GR de la collection de souches de l'étude :

Tableau 23 Répartition des résistances associées aux souches C3GR

C3GR	Co-résistance			
	Co-trimoxazole (B)	Aminosides (A)	Fluoroquinolones (FQ)	A+B+FQ
hCase	2 (15,4%)	2 (15,4%)	2 (15,4%)	1 (7,7%)
BLSE	14 (87,5%)	13 (81,3%)	9 (56,3%)	8 (50%)

100% des souches BLSE *bla_{CTX-M}* possèdent une résistance associée. 57% d'entre elles comportent une résistance associée à 3 autres classes d'antibiotiques en plus des C3G. L'ensemble des BLSE co-résistantes FQ et/ou Aminosides sont des *bla_{CTX-M}*.

II.5.2 Évaluation des erreurs analytiques de l'étude

Nous avons recensé les différentes discordances (DTM, DM et dm) entre l'antibiogramme en diffusion et les BMD dans le tableau 24.

Tableau 24 Recensement des types de discordances selon la classification du CLSI

Type de discordance	Nombre	Taux de discordance
DTM	0	0%
DM	1	1.4%
dm	4	4.7%

D'après les critères de la FDA et du CLSI, la méthode de l'antibiogramme en diffusion utilisée dans notre étude est conforme en comparaison aux mesures des CMI. Cependant, toutes les erreurs ont été réalisées pour des souches ayant des CMI autour de 1 mg/L.

II.5.3 Évaluation des courbes de survie

Pour évaluer l'activité de bactéricidie du FEP sur les isolats de l'étude nous avons effectué des courbes de survie ou « *Time-Kill Curves* » (TKC). Cela a été effectué sur 5 souches réparties de la façon suivante :

- Phénotype sauvage (1) : ECL-04 ($CMI_{(FEP)} = 0,06 \text{ mg/L}$)
- Phénotype hCase (2) : ECL-88 ($CMI_{(FEP)} = 1 \text{ mg/L}$)
- Phénotype BLSE (3) : ECL-69 ($CMI_{(FEP)} = 1 \text{ mg/L}$)

Les différents TKC sont présentés par la figure 20 :

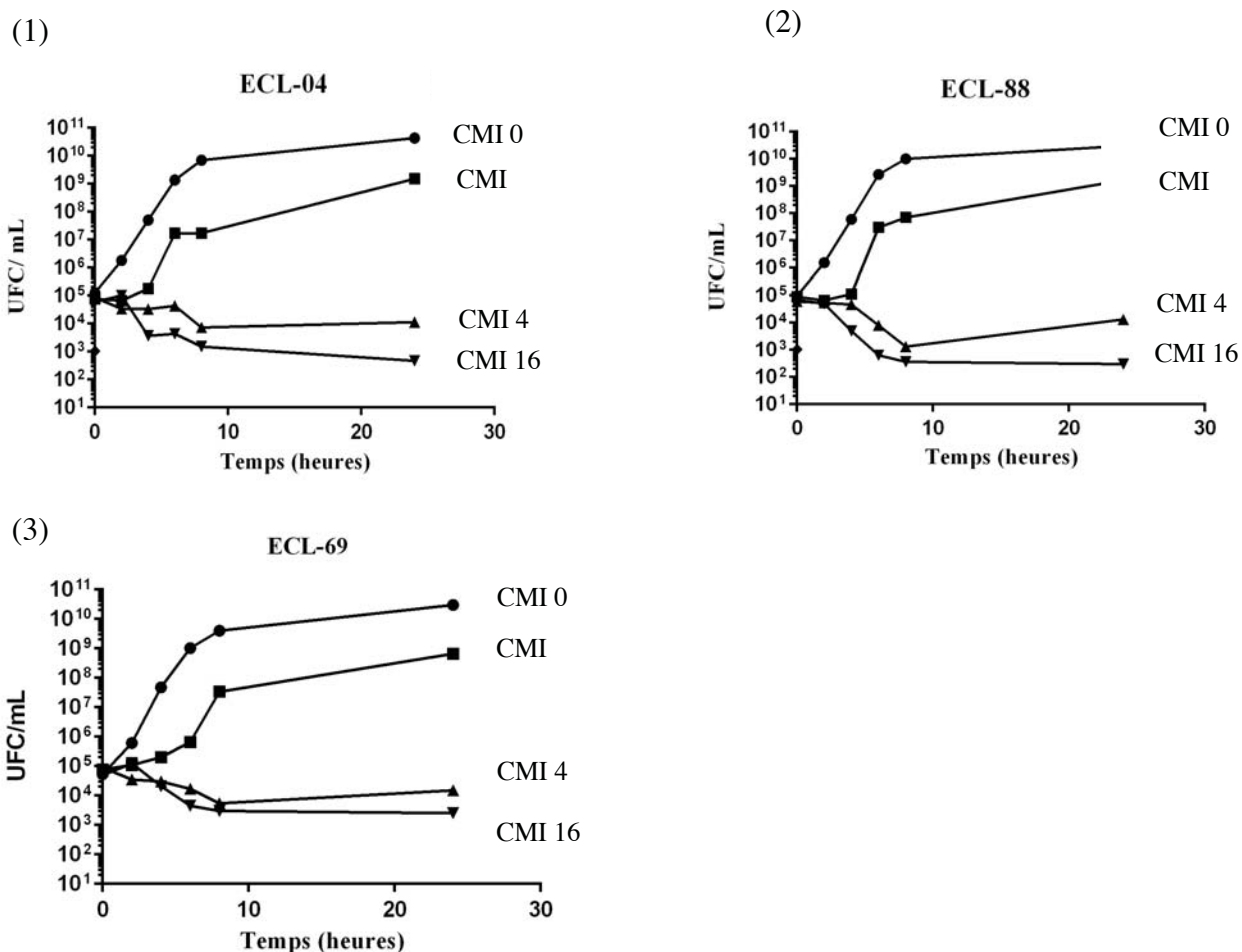


Figure 20 Courbes de survie au FEP d'une souche WT (1) : ECL-04 ($CMI_{m} = 0.06 \text{ mg/L}$), hCase (2) : ECL-88 ($CMI_{m} = 1 \text{ mg/L}$) (2) et BLSE (3) : ECL-69 ($CMI_{m} = 1 \text{ mg/L}$)

Les TKC obtenus montrent un faible effet de 0 à 4h avec une baisse du taux de croissance bactérien. A partir de t+6h, nous observons une diminution de l'inoculum bactérien à 4xCMI et 16xCMI. Les courbes obtenues mettent en avant l'effet bactéricide du FEP qui est temps dépendant. Les différentes courbes des différents phénotypes testés sont superposables (1 seule courbe hCase a de fait été représentée).

II.5.4 Évaluation des taux de mutant résistants sur une sélection de souches cliniques

Enfin, nous avons effectué des tests de mutants-résistants sur des souches sauvages (n=10), des souches hCase (n=3) ainsi que sur une souche BLSE (n=1). La figure 21 illustre les résultats obtenus.

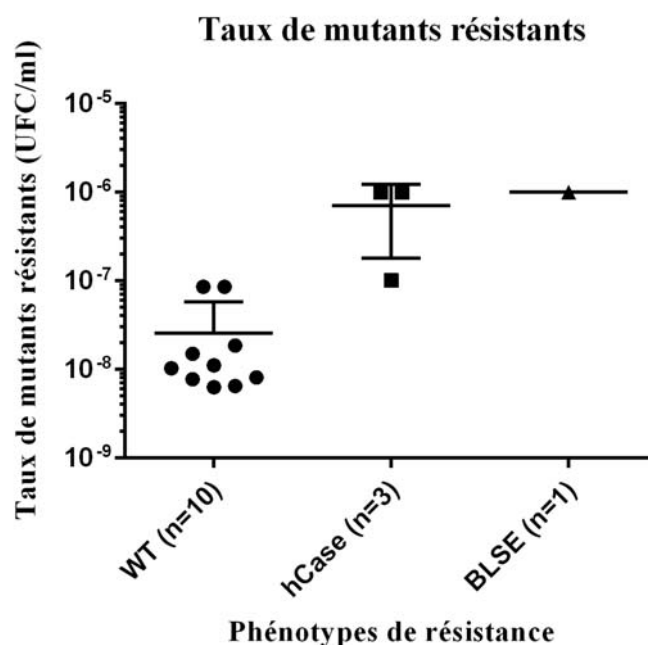


Figure 21 Répartition des taux de mutants-résistants en fonction du phénotype

Nous pouvons observer que les taux de mutants résistants obtenus pour les souches WT sont tous compris entre $6,3 \times 10^{-9}$ et $8,5 \times 10^{-8}$. Concernant les souches hCase, les souches ECL-88 et ECL-31 ($CMI_{(FEP)}=1\text{mg/L}$) les taux de mutants résistants observés sont de $2,4 \times 10^{-6}$. La souche ECL-55 ($CMI_{(FEP)}=0,5\text{mg/L}$) possède elle un taux de mutants résistants de 3×10^{-7} .

La souche BLSE quant à elle (ECL-69, $CMI_{(FEP)}=1\text{mg/L}$) possède un taux de mutants-résistants de $2,4 \times 10^{-6}$.

Les CMI des mutants-résistants obtenus n'ont pas été réalisées et sont en cours.

III. Discussion

Notre étude rétrospective a été réalisée sur une collection de 86 souches de CEC non reliées responsables de bactériémies au CHU de Caen entre le 01/01/2017 et le 31/12/2018. Les patients infectés sont majoritairement âgés ($\mu > 65$ ans) et issus de services de médecine, secteur le plus pourvoyeur de patients en nombre de lits. Nous notons que les services de réanimation sont bien représentés (22%), ce qui était attendu (Vincent *et al.* 2009)

III.1 Caractérisation de la collection d'étude

Notre collection de souches est assez fidèle à ce qui est retrouvé dans la littérature concernant la répartition des clusters. En effet, nous avons pu mettre en évidence 3 clusters principaux que sont les C-III (29%), C-VI (24.4%) et C-VIII (24.4%), appartenant tous aux espèces *E. hormaechei*. Les travaux de Morand *et al.*, Akbari *et al.* ou encore Garinet *et al.* retrouvent les mêmes proportions que ce que nous observons dans notre étude (Tableau 4). La proportion de souches appartenant au complexe *E. hormaechei* (C-III +C-VI+C-VII+C-VIII) est de 77,8%, ce qui est similaire à ce qui est rapporté dans la littérature (Tableau 4).

La virulence observée sur ces clusters à partir du modèle d'infection animal *G. mellonella*, est plus élevée chez le C-III en comparaison aux autres clusters : C-III/C-VI ($p < 0.001$), C-III/ C-VIII ($p < 0.003$). Ces résultats corroborent les données de la littérature puisqu'il est notamment retrouvé par Guerin *et al.* que le C-III est environ 3 fois plus virulent que les autres clusters (Guerin *et al.* ECCMID 2018).

Enfin nous retrouvons également 2 souches de *E. bugandensis* (C-IX), caractérisées par une virulence particulièrement plus importante dans le modèle animal *G. mellonella*. Ces deux souches de *E. bugandensis* sont plus virulentes puisque les taux de mortalité observés sur *G. mellonella* sont de 30 et 100%. Pour rappel, ce cluster est impliqué dans une épidémie en Tanzanie responsable de nombreux décès en néonatalogie. La mortalité observée lors d'une épidémie étant de 35% (Pati *et al.* 2018). Il serait intéressant de comparer les facteurs de virulence de nos souches hypervirulentes à la souche EB-247 dont les facteurs d'adaptation et de virulence sont déjà identifiés (Pati *et al.* 2018).

Enfin, le *fitness* des souches de notre étude est homogène. Aucune différence significative n'est retrouvée, que ce soit en comparant les temps de génération des clusters ou des phénotypes C3GR.

III.2 Phénotypes de résistance

Le taux de résistance du CEC aux C3G dans notre étude est similaire à ce que nous pouvons observer dans la littérature. 40% de C3GR sont rapportés dans le rapport ONERBA, 35-36% au CHU de Caen depuis 2012 et 34% de C3GR dans notre étude, dont 15% de résistance au FEP. Cependant nous observons une proportion plus importante de BLSE que d'hCase au sein de nos souches C3GR.

En effet d'après la littérature, la C3GR du CEC est principalement liée à l'hyperproduction d'une β -lactamase de type céphalosporinase (2/3) suivi de l'acquisition d'une BLSE (1/3) (Paterson *et al.* 2006) (ONERBA 2017). Dans notre étude 55% des souches du CEC C3GR sont dues à une production de BLSE contre 45% d'hCase. Néanmoins cela va dans le sens de ce qui est observé localement au CHU de Caen depuis quelques années. Le tableau 9 montre une augmentation de la proportion de BLSE chez le CEC en comparaison aux hCase, tout prélèvement confondu. En effet la proportion de CEC BLSE passe de 30% en 2012 à 43% en 2018 (avec un pic à 49% en 2015). Cela va également dans le sens de ce qui est observé au niveau national puisque les données issues du rapport ONERBA 2017 relatent une augmentation de la prévalence des BLSE (ONERBA 2017).

Enfin, la majorité des souches C3GR est recensée pour les espèces *E. hormaechei* et particulièrement pour les souches issues du C-VI (67% de C3GR dont 86% de BLSE : 100% bla_{CTX-M}), ce que nous retrouvons dans la littérature, notamment dans l'étude de Garinet *et al.* (Garinet *et al.* 2018).

Nous retrouvons de nombreuses souches productrices de BLSE qui possèdent des résistances associées aux autres classes d'antibiotiques, notamment aux quinolones et aux aminosides. En effet, 100% des souches productrices de BLSE possèdent au moins 1 résistance associée, et 57% des souches BLSE sont résistantes à la fois aux FQ et aux aminosides. Nous retrouvons cette tendance dans la littérature avec la présence notamment de l'AAC(6')Ib-cr, fréquemment associée aux souches de CEC bla_{CTX-M} et responsable d'une co-résistance FQ/aminosides (Piekarska *et al.* 2019).

La grande majorité de nos souches BLSE produit une bla_{CTX-M} (81.25%) ce qui est conforme à ce qui est retrouvé dans la littérature pour le CEC, les 2 autres souches étant des souches bla_{SHV} (Hoffman *et al.* 2006) (Anastay *et al.* 2007). Concernant les hCase, nous avons retrouvé une céphalosporinase plasmidique acquise bla_{DHA} , comme ont pu le retrouver dans leur étude avant nous Mohd Kari *et al.* (Mohd Kari *et al.* 2016).

III.3 Différentes approches d'évaluation de la sensibilité au FEP

Les CMI des souches WT et hCase ne sont pas significativement différentes lorsque nous comparons leurs CMI₅₀ et CMI₉₀. Cela s'explique par la bonne stabilité du FEP vis-à-vis des céphalosporinases. Les CMI des souches BLSE sont quant à elles significativement plus élevées que pour les souches des autres phénotypes. Les souches *bla*_{CTX-M} sont systématiquement résistantes ou de sensibilité diminuée au FEP [2-64 mg/L] dans notre étude, en se référant au *cut-off* de sensibilité de l'EUCAST : 1 mg/L. Les souches *bla*_{SHV} en revanche possèdent des CMI plus faibles (0.06 mg/L et 1 mg/L) que les souches *bla*_{CTX-M} ce qui est retrouvé dans la littérature. En effet, les souches *bla*_{SHV} sont moins affines pour le FEP et donc plus sensibles à cette C4G (Nogueira *et al.* 2011). Cependant, le peu de souches *bla*_{SHV} retrouvées dans notre étude ne nous permet pas d'avoir une représentation de la répartition des CMI chez les souches de CEC ayant acquis une *bla*_{SHV}.

III.3.1 Evaluation de la diffusion par rapport à la vraie CMI

Concernant les erreurs analytiques, il s'agissait exclusivement d'erreurs liées à des souches C3GR. En effet 100% des erreurs analytiques ont été constatées sur des souches hCase et/ou BLSE. L'erreur majeure a été constatée sur une souche *bla*_{SHV} rendue « Résistante » alors que sa CMI est de 1 mg/L.

Les conclusions de l'évaluation des discordances montre que la technique de l'antibiogramme en diffusion n'est pas discordant par rapport à la détermination des CMI. Cependant, 100% des erreurs ont été réalisées pour des souches proches du *cut-off* de 1 mg/L (d'après les critères du CLSI et de la FDA). Si la méthode des disques semble fiable pour les souches WT, la détermination de la CMI semble indispensable pour éviter toute erreur analytique en présence de souches de CEC C3GR.

Les profils obtenus par les courbes de survie expriment l'activité bactéricide du FEP qui dépend du temps. En effet, une diminution de l'inoculum n'est pas obtenue immédiatement, comme pour les aminoglycosides par exemple. Nous avons observé une diminution du taux de croissance dans les 4 premières heures, puis une diminution de l'inoculum bactérien à partir de T_{4h} en présence de concentrations de 4 et 16 fois la CMI du FEP. Les profils obtenus sont similaires quelque soit le phénotype bactérien testé, avec des courbes superposables. Autrement dit, quelque soit le phénotype de résistance identifié en diffusion, les CMI reflètent bien la sensibilité du CEC au FEP.

La mesure de la CMI du FEP pour les souches de CEC semble être indispensable pour le management du traitement des infections à CEC notamment pour les souches C3GR.

Cependant, la détermination des TKC ne permet pas d'apprécier l'impact de la sélection de CEC MR au FEP. En effet, l'inoculum de départ pour la réalisation des TKC est relativement faible ($5 \cdot 10^4$ UFC/mL), de fait nous ne savons pas avec ces techniques si la propension de sélection de MR est plus importante pour des souches ayant une valeur de CMI plus élevée. Pour palier cela, nous nous sommes inspirés des travaux de Kohlmann *et al.* afin de mesurer le taux de sélection de MR sur des souches de phénotypes différents, à partir d'un inoculum de départ de $1 \cdot 10^8$ UFC/mL (Kohlmann *et al.* 2018).

Dans notre étude, nous retrouvons au sein de nos souches WT, des taux de MR aux C3G comparables à ce que Kohlmann *et al.* ont montré ($3 \cdot 10^3$) (Kohlmann *et al.* 2018). En effet notre taux moyen de MR sur nos souches de CEC WT est de $2,8 \cdot 10^3$. En comparaison aux autres Entérobactéries productrices de céphalosporinases, le taux de MR du CEC est similaire à ce qui peut être observé chez *K. aerogenes*, le complexe *C. freundii* et *Hafnia alvei*. Cependant ce taux de MR est inférieur chez d'autres espèces productrices de céphalosporinases : *Serratia liquefaciens* ($2 \cdot 10^9$), *Providencia spp* ($2 \cdot 10^{10}$), *Serratia marcescens* et *Morganella morganii* ($5 \cdot 10^{11}$) (Kohlmann *et al.* 2018).

Nous avons également effectué ces tests sur des souches C3GR, chose qui n'avait pas été réalisée dans les travaux de Kohlmann *et al.* Les taux de MR observés sont supérieurs pour nos souches C3GR en comparaison aux souches WT. En effet, pour les souches hCase avec une CMI à 0,5 mg/L et 1 mg/L, le taux de MR observé est de $3 \cdot 10^7$ et $2,4 \cdot 10^6$ respectivement. En ce qui concerne la souche BLSE testée (CMI=1 mg/L) le taux de MR était également de $2,4 \cdot 10^6$.

Notre étude a été réalisée dans des conditions standardisées, ainsi les souches WT et C3GR ont été mises en présence d'une même proportion de FEP (8xCMI). Cependant, les taux de MR observés sont différents. Nous possédons un trop petit effectif pour effectuer des tests statistiques, néanmoins, nous observons une augmentation du taux de MR qui semble être proportionnel aux CMI des souches.

Dans leurs travaux, Kohlmann *et al.* ont démontré que les souches MR au FEP avaient la faculté d'augmenter leurs CMI de une à deux dilutions (Kohlmann *et al.* 2019). Nous ne l'avons pas réalisé dans notre étude par manque de temps, mais nous pouvons supposer que la même chose serait observée sur les souches de CEC C3GR.

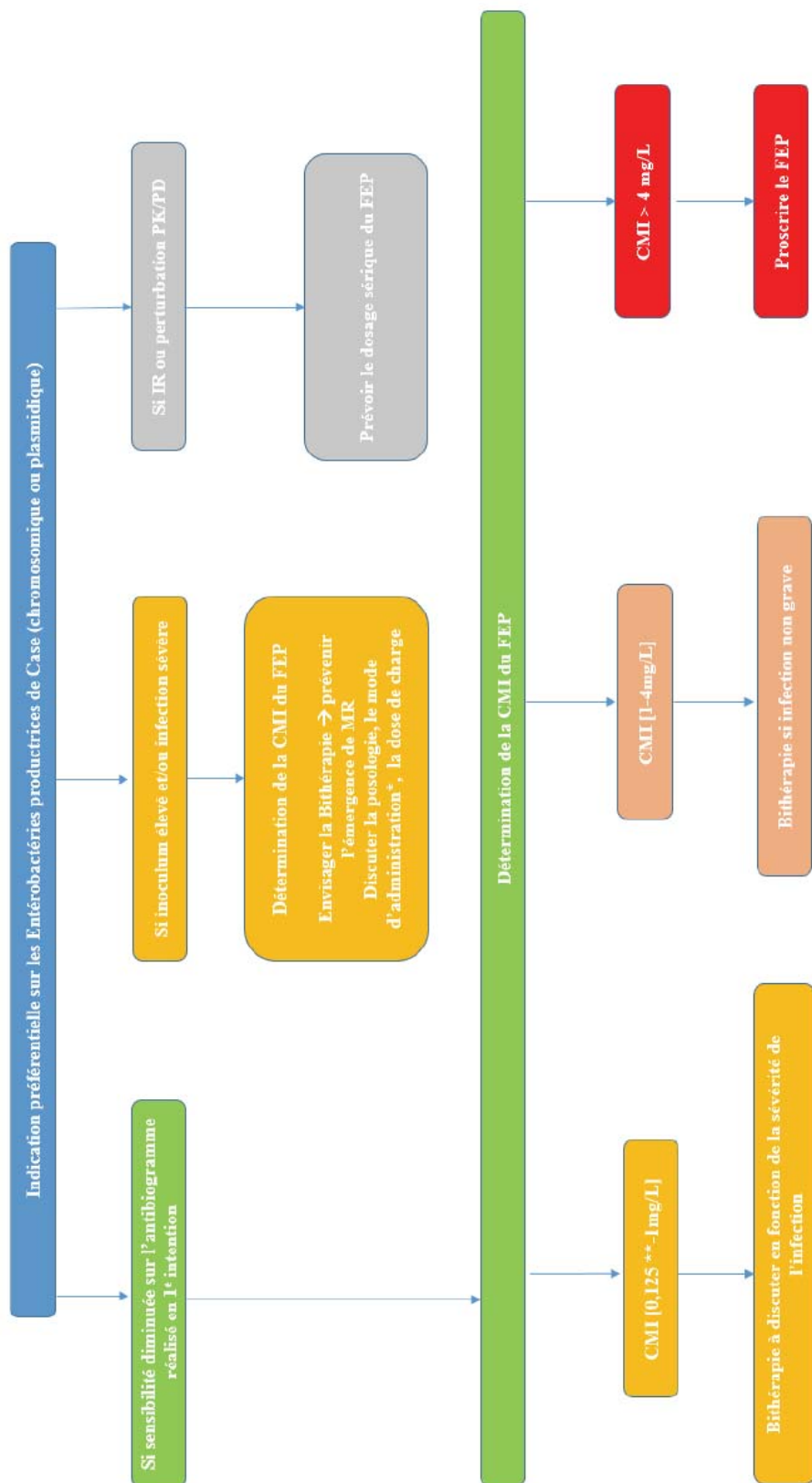
Si nous regardons le PK/PD du FEP, la concentration efficace la plus élevée qui peut-être atteinte dans l'organisme (pour une $C > CMI$ pour 60/70% du temps) est de 8 mg/L (Roos *et al.* 2006) (voir Partie II). Ainsi, lors d'infections graves, nous pouvons supposer que le traitement par FEP en monothérapie sélectionnerait une quantité importante de bactéries MR pour des souches de CMI= 0,5 mg/L et 1 mg/L. Ces MR pourraient avoir une CMI comprise entre 1 et 4 mg/L si nous extrapolons

les données de Kohlmann *et al.* Ainsi un contingent important de bactéries serait sélectionné et traité inefficacement, ceci pouvant expliquer les échecs thérapeutiques rapportés dans la littérature.

Finalement, ce qui est connu sur les C3G est retrouvé avec le FEP : il existe une forte propension de sélection de mutants-résistants. Et celle-ci est accrue avec l'augmentation de la CMI et de l'inoculum. De fait, le traitement des infections à CEC nécessite de nouvelles recommandations sur l'utilisation du FEP en fonction des différentes situations cliniques rencontrées. Ceci permettrait d'améliorer la maîtrise du FEP en limitant le risque d'échec thérapeutique.

Au regard de nos résultats et des données de la littérature, nous proposons un tableau des critères à respecter pour l'utilisation du FEP illustré par la figure 22 (page 83).

Figure 22 Proposition d'algorithme pour l'utilisation du FEP dans le traitement des infections à CEC



*: Administration continue ou répétée

** : 0,125 mg/L = valeur correspondant à l'ECOFF du CEC au FEP

CONCLUSION

Le CEC, microorganisme du groupe ESKAPE, est un pathogène opportuniste en particulier dans les infections nosocomiales. Avec l'émergence des EPC, la mise en place d'une antibiothérapie préservant les pénèmes est un enjeu important dans la prise en charge des patients infectés.

Les résultats obtenus confirment la bonne activité *in vitro* du FEP sur les souches du CEC WT. Par contre, la probabilité de sélectionner des mutants résistants au FEP est plus élevée chez les isolats hCase et BLSE avec des CMI proches de 1 mg/L. Cette capacité d'adaptation résulte très probablement de mutations au niveau des gènes impliqués dans la régulation de l'expression d'*ampC* et/ou ceux codant pour les porines Omp35 et/ou Omp36. Ceci souligne le risque potentiel d'échec thérapeutique *in vivo* en monothérapie et donc la recommandation d'une bi-antibiothérapie pour le traitement des infections sévères à CEC hCase.

La détermination du phénotype des souches de CEC est importante dans la prise en charge des patients infectés. Les méthodes de premières lignes comme l'antibiogramme par diffusion permettent facilement de catégoriser la souche comme WT. Cependant, pour les souches C3GR, il est important de déterminer les CMI exactes, notamment pour les souches hCase, et se référer à l'algorithme proposé par la figure 22.

Il faudrait cependant poursuivre cette étude et augmenter la puissance de nos tests afin de réaliser une mesure des CMI de nos MR. La relation de proportionnalité entre CMI et sélection de MR pourrait ainsi être déterminée, et l'utilisation de l'« *Epidemiological cut-off value* » (ECOFF) comme principal *cut-off* de l'arbre décisionnel du traitement du CEC par FEP pourrait être objectivée.

Bibliographie

Abrar S, Ain NU, Liaqat H, Hussain S, Rasheed F, Riaz S. Distribution of blaCTX , blaTEM , blaSHV and bla OXA genes in Extended-spectrum- β -lactamase-producing Clinical isolates: A three-year multi-center study from Lahore, Pakistan. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8:80.

Akbari M, Bakhshi B, Najar Peerayeh S. Particular Distribution of *Enterobacter cloacae* Strains Isolated from Urinary Tract Infection within Clonal Complexes. *Iran Biomed J*. 2016 Jan;20(1):49–55.

Al-Hasan MN, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Temporal trends in *Enterobacter* species bloodstream infection: a population-based study from 1998-2007. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Apr;17(4):539-45. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03277.x. PubMed PMID: 20518795; PubMed Central PMCID: PMC2972367

Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, Group the ES of C-PE (EuSCAPE) working. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Eurosurveillance*. 2015 Nov 12;20(45):30062.

Anastay M, Lagier E, Blanc V, Chardon H. Épidémiologie des bêtalactamases à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries dans un hôpital du sud de la France, 1999–2007. *Pathologie Biologie*. 2013 Apr 1;61(2):38–43.

Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W, Van Elsas JD, Van Vuurde JW, Azevedo JL. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Oct;68(10):4906–14.

Berg HC. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:19–54.

Beyrouthy R, Baretts M, Marion E, Dananché C, Dauwalder O, Robin F, et al. Novel Enterobacter Lineage as Leading Cause of Nosocomial Outbreak Involving Carbapenemase-Producing Strains. *Emerg Infect Dis*. 2018 Aug;24(8):1505–15.

Bodey GP, Elting LS, Rodriguez S. Bacteremia caused by *Enterobacter*: 15 years of experience in a cancer hospital. *Rev Infect Dis*. 1991 Aug;13(4):550–8.

Cai Y, Chen C, Zhao M, Yu X, Lan K, Liao K, et al. High Prevalence of Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacter cloacae* From Three Tertiary Hospitals in China. *Front Microbiol*. 2019;10:1610.

CASFM https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/CASFM2019_V1.0.pdf

Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrB4 Identified in France in an *Enterobacter cloacae* Clinical Isolate Coexpressing a QnrS1 Determinant. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jul;51(7):2652–3.

Chavda KD, Chen L, Fouts DE, Sutton G, Brinkac L, Jenkins SG, Bonomo RA, Adams MD, Kreiswirth BN. Comprehensive Genome Analysis of Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp.: New Insights into Phylogeny, Population Structure, and Resistance Mechanisms. *MBio*. 2016 Dec 13;7(6). pii: e02093-16. doi: 10.1128/mBio.02093-16. PubMed PMID: 27965456; PubMed Central PMCID: PMC5156309.

CLSI MA00-S23, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Third Informational Supplement

CLSI M100-S25, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Fifth Informational Supplement

Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène :
http://campus.cerimes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie_4b/site/html/cours.pdf

Colom K, Pérez J, Alonso R, Fernández-Aranguiz A, Lariño E, Cisterna R. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, bla(SHV) and blaOXA-1 genes in *Enterobacteriaceae*. FEMS Microbiol Lett. 2003 Jun 27;223(2):147-51. PubMed PMID: 12829279.

Crémet L, Bourigault C, Lepelletier D, Guillouzouic A, Juvin ME, Reynaud A, Corvec S, Caroff N. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* highlighting the interspecies transferability of the blaOXA-48 gene in the gut flora. J Antimicrob Chemother. 2012 Apr;67(4):1041-3. doi:10.1093/jac/dkr547. Epub 2012 Jan 4. PubMed PMID: 22223227.

Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter spp.* clinical isolates from the UK. J Antimicrob Chemother. 2009 Apr;63(4):659-67.

EUCAST: <https://mic.eucast.org/Eucast2>

Falgenhauer J, Imirzalioglu C, Falgenhauer L, Yao Y, Hauri AM, Erath B, et al. Whole-Genome Sequences of Clinical *Enterobacter bugandensis* Isolates from Germany. Microbiol Resour Announc. 2019 Jul 18;8(29).

Ferraz-Rosa JF, Rizek C, Marchi AP, Guimaraes T, Miranda L, Carrilho C, et al. Clonality, outer-membrane proteins profile and efflux pump in KPC- producing *Enterobacter sp.* in Brazil. BMC Microbiol [Internet]. 2017 Mar 17;17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5356252/>

Garinet S, Fihman V, Jacquier H, Corvec S, Le Monnier A, Guillard T, et al. Elective distribution of resistance to beta-lactams among *Enterobacter cloacae* genetic clusters. J Infect. 2018;77(3):178-82.

Guérin F, Isnard C, Cattoir V, Giard JC. Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated β -Lactam Resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Dec;59(12):7753-61.

Guérin F, Isnard C, Sinel C, Morand P, Dhalluin A, Cattoir V, et al. Cluster-dependent colistin hetero resistance in *Enterobacter cloacae* complex. J Antimicrob Chemother. 2016;71(11):3058-61.

Guérin F, Thèse de Sciences, 2015

Guérin F, Beyrouthy R, Auzou M, Bonnet R, Cattoir V. Étude de la sensibilité à la fosfomycine dans le complexe *Enterobacter cloacae*. 38th RICAI 2018

Guerin F, Michon J, Rochcongar G, Isnard C, Giard J-C, Cattoir V. Epidemiology and pathogenicity of *Enterobacter cloacae* complex clinical isolates recovered from bone and joint infections. ECCMID 2016

Hackel M, Sahn D. 1360. Antimicrobial Activity of Cefepime in Combination with VNRX-5133 Against a Global Collection of *Enterobacteriaceae* Including Resistant Phenotypes. Open Forum Infect Dis. 2018 Nov 26;5(Suppl 1):S416-7.

Haenni M, Saras E, Ponsin C, Dahmen S, Petitjean M, Hocquet D, et al. High prevalence of international ESBL CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* ST114 clone in animals. J Antimicrob Chemother. 2016;71(6):1497-500.

Halda-Alija L, Hendricks SP, Johnston TC. Spatial and Temporal Variation of *Enterobacter* Genotypes in Sediments and the Underlying Hyporheic Zone of an Agricultural Stream. Microb Ecol. 2001 Oct;42(3):286-94.

Hassan AL, Deschamps N, Richard J. Précision des mesures de vitesse de croissance des streptocoques lactiques dans le lait basées sur la méthode de dénombrement microbien par formation de colonies. Étude de référence avec *Lactococcus lactis*. Le Lait. 1989;69(5):433–47.

Health AGD of. *Enterobacteriaceae* Sepsis Outcome Programme annual report, 2013 [Internet]. Australian Government Department of Health; [cited 2019 Sep 18]. Available from: <https://www1.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/cda-cdi3804i.htm>

Hennessey TD. Inducible beta-lactamase in *Enterobacter*. J Gen Microbiol. 1967 Nov;49(2):277–85.

Hoffmann H, Stürenburg E, Heesemann J, Roggenkamp A. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in isolates of the *Enterobacter cloacae* complex from German hospitals. Clinical Microbiology and Infection. 2006 Apr 1;12(4):322–30.

Hoffmann H, Roggenkamp A. Population genetics of the nomenclature species *Enterobacter cloacae*. Appl Environ Microbiol. 2003 Sep;69(9):5306–18.

Hormaeche E, Edwards PR. A Proposed Genus *Enterobacter*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,. 1960;10(2):71–4.

Jarvis WR, Martone WJ. Predominant pathogens in hospital infections. J Antimicrob Chemother. 1992 Apr;29 Suppl A:19–24.

Jaskulski MR, Medeiros BC, Borges JV, Zalewsky R, Fonseca MEC, Marinowic DR, et al. Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter spp.* Int J Antimicrob Agents. 2013 Jul;42(1):76–9.

Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis. 2009 Dec 1;49(11):1749–55.

Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M, McLaughlin RE, Biedenbach DJ, Bouchillon SK, et al. Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Jan 29;60(2):1067–78.

Kim S-Y, Park Y-J, Yu JK, Kim YS, Han K. Prevalence and characteristics of aac(6')-Ib-cr in AmpC producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*: a multicenter study from Korea. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009 Mar;63(3):314–8.

Kim S-Y, Park Y-J, Yu JK, Kim YS. Aminoglycoside Susceptibility Profiles of *Enterobacter cloacae* Isolates Harboring the aac(6')-Ib Gene. Korean J Lab Med. 2011 Oct;31(4):279–81.

Kohlmann R, Bähr T, Gatermann SG. Effect of ampC derepression on cefepime MIC in Enterobacteriales with chromosomally encoded inducible AmpC β -lactamase. Clin Microbiol Infect. 2019 Sep;25(9):1158.e1–1158.e4.

Kohlmann R, Bähr T, Gatermann SG. Species-specific mutation rates for ampC derepression in Enterobacteriales with chromosomally encoded inducible AmpC β -lactamase. J Antimicrob Chemother. 2018 01;73(6):1530–6.

Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. J Clin Microbiol. 2013 Dec;51(12):4106–11.

Lee J-Y, Hong Y-K, Lee H, Ko KS. High prevalence of non-clonal imipenem-nonsusceptible *Enterobacter spp.* isolates in Korea and their association with porin down-regulation. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017 Jan;87(1):53–9.

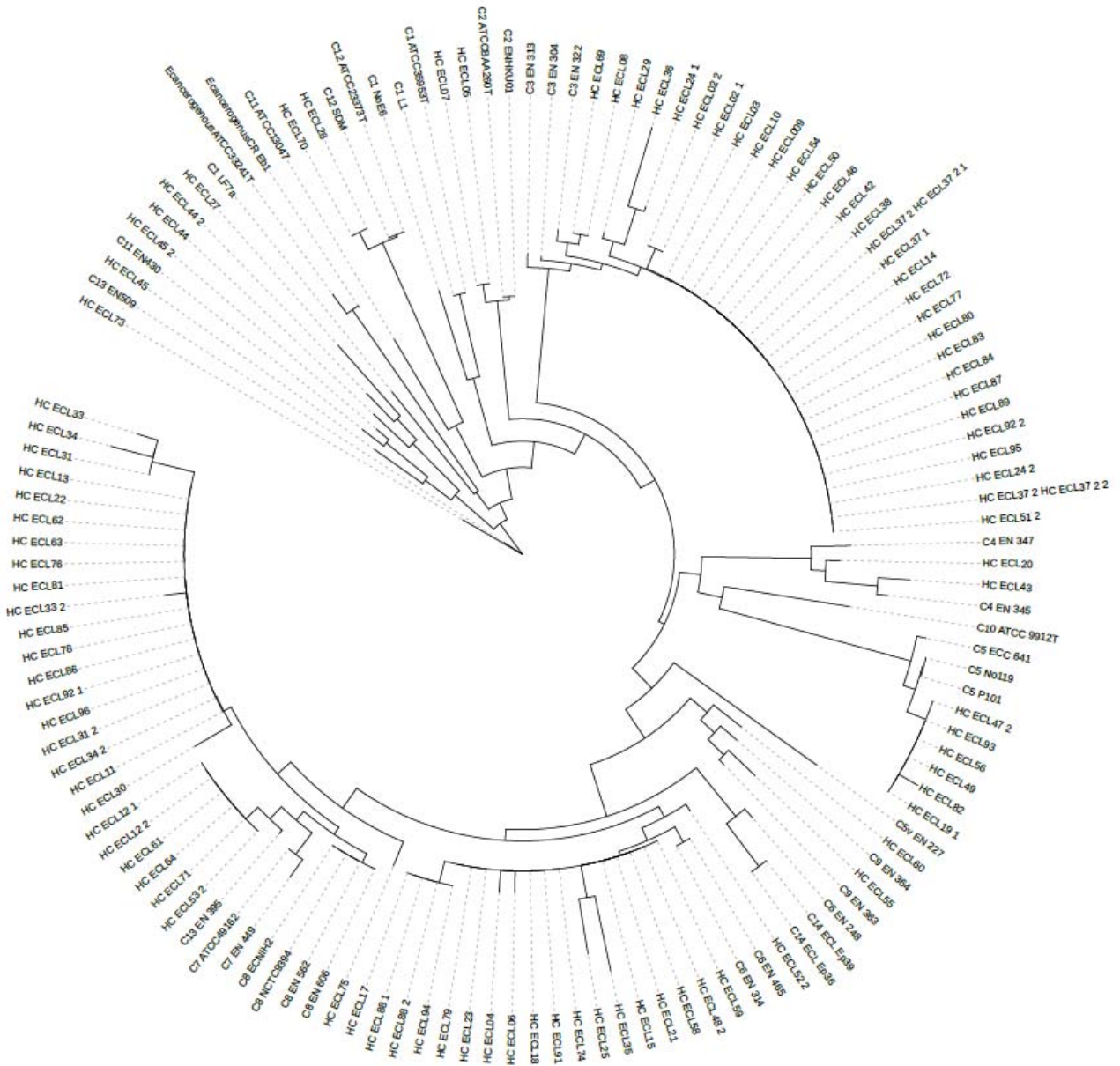
- Liu W-Y, Wong C-F, Chung KM-K, Jiang J-W, Leung FC-C. Comparative Genome Analysis of *Enterobacter cloacae*. PLOS ONE. 2013 Sep 12;8(9):e74487.
- Lo-Ten-Foe JR, de Smet AMGA, Diederens BMW, Kluymans JAJW, van Keulen PHJ. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Oct;51(10):3726–30.
- Macnab RM. How bacteria assemble flagella. Annu Rev Microbiol. 2003;57:77–100.
- Maina D, Revathi G, Kariuki S, Ozwara H. Genotypes and cephalosporin susceptibility in extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in the community. J Infect Dev Ctries. 2012 Jun 15;6(6):470–7.
- Mammeri H, Poirel L, Nordmann P. Extension of the hydrolysis spectrum of AmpC beta-lactamase of *Escherichia coli* due to amino acid insertion in the H-10 helix. J Antimicrob Chemother. 2007 Sep;60(3):490–4.
- Messaoudi A, Saras E, Grami R, Bouallègue O, Boujâafar N, Madec J-Y, et al. Emergence of OXA-204 carbapenemase in *Enterobacter cloacae*. International Journal of Antimicrobial Agents [Internet]. 2019 Sep 12; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857919302444>
- Mohd Khari FI, Karunakaran R, Rosli R, Tee Tay S. Genotypic and Phenotypic Detection of AmpC β lactamases in *Enterobacter* spp. Isolated from a Teaching Hospital in Malaysia. PLoS ONE. 2016;11(3):e0150643.
- Moon J, Smith T, Sahud AG, Bhanot N. An unusual etiology of infective endocarditis: *Enterobacter cloacae*. Journal of Infection and Chemotherapy. 2012;18(6):925–30.
- Morand PC, Billoet A, Rottman M, Sivadon-Tardy V, Eyrolle L, Jeanne L, et al. Specific Distribution within the *Enterobacter cloacae* Complex of Strains Isolated from Infected Orthopedic Implants. J Clin Microbiol. 2009 Aug;47(8):2489–95.
- Morpeth S, Murdoch D, Cabell CH, Karchmer AW, Pappas P, Levine D, et al. Non-HACEK gram-negative bacillus endocarditis. Ann Intern Med. 2007 Dec 18;147(12):829–35.
- Napier BA, Band V, Burd EM, Weiss DS. Colistin heteroresistance in *Enterobacter cloacae* is associated with cross-resistance to the host antimicrobial lysozyme. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Sep;58(9):5594–7.
- Nogueira Kda S, Daur AV, Reason IT, Gales AC, Costa LM. Cefepime versus extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Braz J Infect Dis. 2011 Mar-Apr;15(2):167–9. PubMed PMID: 21503406.
- Nordmann P, Mammeri H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. Future Microbiology. 2007 Jun;2(3):297–307.
- Novak A, Goic-Barisic I, Andrasevic AT, Butic I, Radic M, Jelic M, Rubic Z, Tonkic M. Monoclonal outbreak of VIM-1-carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in intensive care unit, University Hospital Centre Split, Croatia. Microb Drug Resist. 2014 Oct;20(5):399–403. doi: 10.1089/mdr.2013.0203. Epub 2014 Apr 9. PubMed PMID: 24716493.
- Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol. 2014;5:643.
- ONERBA: <http://onerba.org/publications/rapports-onerba/>

- Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. American Journal of Infection Control. 2006 Jun 1;34(5, Supplement):S20–8.
- Pati NB, Doijad SP, Schultze T, Mannala GK, Yao Y, Jaiswal S, et al. *Enterobacter bugandensis*: a novel enterobacterial species associated with severe clinical infection. Sci Rep. 2018 29;8(1):5392.
- Pavlovic M, Konrad R, Iwobi AN, Sing A, Busch U, Huber I. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. FEMS Microbiol Lett. 2012 Mar;328(1):46–53.
- Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013 Mar;11(3):297-308. doi:10.1586/eri.13.12. Review. PubMed PMID: 23458769.
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002 Jun;40(6):2153–62.
- Piekarska K, Zacharczuk K, Wołkiewicz T, Wolaniuk N, Rzeczowska M, Gierczyński R. Emergence of *Enterobacteriaceae* co-producing CTX-M-15, ArmA and PMQR in Poland. Adv Clin Exp Med. 2019 Feb;28(2):249–54.
- Ren Y, Ren Y, Zhou Z, Guo X, Li Y, Feng L, et al. Complete Genome Sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* Type Strain ATCC 13047. J Bacteriol. 2010 May;192(9):2463–4.
- Roos JF, Bulitta J, Lipman J, Kirkpatrick CMJ. Pharmacokinetic-pharmacodynamic rationale for cefepime dosing regimens in intensive care units. J Antimicrob Chemother. 2006 Nov;58(5):987–93.
- Russo TA, Johnson JR. Diseases Caused by Gram-Negative Enteric Bacilli. In: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine [Internet]. 20th ed. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2018. Available from: accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1160013505
- Sanders WE, Sanders CC. *Enterobacter spp.*: pathogens poised to flourish at the turn of the century. Clin Microbiol Rev. 1997 Apr;10(2):220–41.
- Schmidtke AJ, Hanson ND. Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Jun;50(6):2030–7.
- Singh NK, Bezdan D, Checinska Sielaff A, Wheeler K, Mason CE, Venkateswaran K. Multi-drug resistant *Enterobacter bugandensis* species isolated from the International Space Station and comparative genomic analyses with human pathogenic strains. BMC Microbiology. 2018 Nov 23;18(1):175.
- Sutton GG, Brinkac LM, Clarke TH, Fouts DE. *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* subsp. nov., *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* comb. nov., *Enterobacter roggenkampii* sp. nov., and *Enterobacter muelleri* is a later heterotypic synonym of *Enterobacter asburiae* based on computational analysis of sequenced *Enterobacter* genomes. F1000Res [Internet]. 2018 Jun 29;7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6097438/>
- Toussaint KA, Gallagher JC. β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations: From Then to Now. Annals of Pharmacotherapy. 2015 Jan;49(1):86–98.
- Turnidge JD, Gottlieb T, Mitchell DH, Coombs GW, Daly DA, Bell JM, et al. *Enterobacteriaceae* Sepsis Outcome Programme annual report, 2013. Commun Dis Intell Q Rep. 2014 Dec 31;38(4):E327–33.
- Villa J, Viedma E, Brañas P, Orellana MA, Otero JR, Chaves F. Multiclonal spread of VIM-1-producing *Enterobacter cloacae* isolates associated with In624 and In488 integrons located in an IncHI2 plasmid. Int J Antimicrob Agents. 2014 May;43(5):451–5.

- Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K. (2009). EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302, 2323-9
- Wang H, Dzink-Fox JL, Chen M, Levy SB. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 May;45(5):1515-21. PubMed PMID: 11302820; PubMed Central PMCID: PMC90498.
- Wang S, Xiao S-Z, Gu F-F, Tang J, Guo X-K, Ni Y-X, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of clinical *Enterobacter cloacae* bloodstream isolates in Shanghai, China. *PLoS ONE*. 2017;12(12):e0189713.
- Weigel LM, Steward CD, Tenover FC. *gyrA* Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in Eight Species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Oct;42(10):2661-7.
- Winfield MD, Groisman EA. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Jul 1;69(7):3687-94.
- Xu H, Miao V, Kwong W, Xia R, Davies J. Identification of a novel fosfomycin resistance gene (*fosA2*) in *Enterobacter cloacae* from the Salmon River, Canada. *Lett Appl Microbiol*. 2011 Apr;52(4):427-9.
- Yigit H, Anderson GJ, Biddle JW, Steward CD, Rasheed JK, Valera LL, et al. Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* is associated with decreased expression of OmpF and OmpC porin analogs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Dec;46(12):3817-22.

Annexes

Annexe 1 : Arbre phylogénétique réalisé à partir du séquençage d'*hsp60* de notre collection d'étude



Annexe 2 :

Activité du céfépime sur les souches d'hémocultures du complexe *Enterobacter cloacae* et risque

Hugo Langris¹, François Gravey², Vincent Cattoir^{3,4}, François Guérin^{1,2}

1. CHU de Caen, Service de Microbiologie, Caen, France
2. Université de Caen, GRAM 2.0, EA2656, Caen, France
3. Université de Rennes 1, Inserm U1230, Rennes, France
4. CHU de Rennes, Service de Bactériologie-Hygiène Hospitalière, Rennes, France

Objectif - Introduction : Le céfépime (FEP), céphalosporine de 4^{ème} génération, est une molécule de choix dans le traitement des infections sévères dues à entérobactéries naturellement productrices de céphalosporinases (Case) dont les souches du complexe *Enterobacter cloacae* (CEC). Une des propriétés de cet antibiotique est sa faible propension à sélectionner des mutants résistants aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) par hyperproduction de Case (hCase). Par contre, aucune donnée n'est disponible sur le risque de sélectionner des mutants résistants au FEP parmi les souches de CEC hCase.

Le but de ce travail a été de déterminer l'activité bactériostatique et bactéricide du FEP et d'évaluer *in vitro* le taux de sélection de mutants résistants au FEP sur une collection de souches du CEC isolées d'hémocultures.

Matériels et méthodes : Une collection de 86 souches cliniques uniques issues d'hémocultures entre 2017 et 2018 (identifiées par séquençage partiel du gène *hsp60*) a été étudiée. La sensibilité aux antibiotiques (avec la détection de BLSE) a été évaluée par la technique de diffusion et la CMI du FEP a été déterminée par la méthode de microdilution. Les courbes de bactéricide (à 0, 1, 4 et 16 x CMI) et l'analyse du taux de sélection de mutants résistants au FEP (à 8 x CMI) ont été réalisées avec 3 souches sauvages (WT) et 3 souches hCase (CMI FEP = 0,5-1 mg/L).

Résultats obtenus : Les CMI₅₀ et CMI₉₀ du FEP étaient de 0,03 et 8 mg/L, respectivement. A noter que 34% des souches étaient résistantes aux C3G dont 55% par production BLSE et 45% par hCase. Les profils des courbes de bactéricidie étaient similaires entre les souches WT et hCase, qu'elle que soit la concentration de FEP testée. En revanche, les taux de sélection de mutants résistants au FEP étaient significativement différents entre les souches WT ($2,8 \times 10^{-8}$) et hCase (5×10^{-7}) ($p < 0.01$).

Conclusion : Ces résultats confirment la bonne activité *in vitro* du FEP sur les souches du CEC WT. Par contre, la probabilité de sélectionner des mutants résistants au FEP est plus élevée chez les isolats hCase. Ceci souligne le risque potentiel d'échec *in vivo* en monothérapie et donc la recommandation d'une bi-antibiothérapie pour le traitement des infections sévères à CEC hCase.

Mots-clés : Complexe *Enterobacter cloacae*, hémocultures, céfépime



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé
Faculté des Sciences Pharmaceutiques

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs

Résumé

Le céfépime (FEP), céphalosporine de 4^{ème} génération, est une molécule de choix dans le traitement des infections sévères à Entérobactéries naturellement productrices de céphalosporinases (Case) comme le complexe *Enterobacter cloacae* (CEC). Une des propriétés de cet antibiotique est sa faible propension à sélectionner des mutants résistants aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) par hyperproduction de Case (hCase) chez les souches WT. Le but de notre étude a été d'évaluer la sensibilité au FEP du CEC et d'estimer in vitro le taux de sélection de mutants résistants au FEP. Pour ce faire, une collection de 86 souches cliniques uniques issues d'hémocultures au CHU de Caen entre 2017 et 2018 ont été étudiées. La sensibilité aux antibiotiques (avec la détection de BLSE) a été évaluée par la technique de diffusion en milieu solide et la CMI du FEP a été déterminée par la méthode de microdilution. Les courbes de bactéricidie et l'analyse du taux de sélection de mutants résistants au FEP (à 8 x CMI) ont été réalisés sur souches WT, hCase et BLSE. Les profils des courbes de bactéricidie étaient similaires entre les souches WT, hCase et BLSE quelle que soit la concentration de FEP testée. En revanche, les taux de sélection de mutants résistants au FEP étaient différents entre les souches WT, hCase et BLSE. Ces résultats confirment la bonne activité in vitro du FEP sur les souches du CEC WT et mettent en avant la probabilité plus élevée de sélection de mutants résistants au FEP chez les isolats hCase. Ceci souligne le risque potentiel d'échec in vivo en monothérapie et donc la recommandation d'une bi-antibiothérapie pour le traitement des infections sévères à CEC hCase.

Mots-clés : *Enterbacter cloacae* ; céfépime ; résistance aux antibiotiques ; mutants-résistants ; bactériémie

Abstract

Cefepime, 4th generation cephalosporins, is amongst the best choices for the treatment of heavy infections caused by cephalosporinase producing *Enterobacteriaceae* (hCase), including *Enterobacter cloacae* complex. One of the property of this antibiotic is its low inclination to select 3rd generation cephalosporins mutant-resistant by overproducing the Case (Case) in WT strains. This study will determine the CEC FEP susceptibility and mutant-selection rate. To do so, 86 single clinical strains from bloodcultures in CHU of CAEN between 2017-2018 has been studied. The antibiotic susceptibility (with ESBL detection) has been evaluated by the disk diffusion method and the MIC of the FEP has been determined by broth microdilution method. The bactericidal curves and the FEP mutant-resistant rates (8xMIC) were performed with wild-type strain (WT), ESBL strain and hCase strains. The bactericidal curves were similar between the WT strains and hCase, whatever the FEP concentration tested. On the other hand, the FEP mutants-selection rates were different between the WT strains, hCase and BLSE. The results confirms the good in vitro FEP activity against the CEC WT strains. But the FEP mutants-selection probability seems to be higher in the hCase isolates and ESBL isolates. It highlights the in vivo potential risk in monotherapy and recommends the bitherapy for the heavy infections caused by CEC hCase.

Keywords: *Enterobacter cloacae*; cefepime; antibiotics susceptibility; mutant-resistant; bloodstream infections