



Étude comparative de différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques chez les bactéries du groupe *Bacteroides fragilis* ayant acquis un ou plusieurs mécanismes de résistance

Bénédicte Langlois

► To cite this version:

Bénédicte Langlois. Étude comparative de différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques chez les bactéries du groupe *Bacteroides fragilis* ayant acquis un ou plusieurs mécanismes de résistance. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03439326

HAL Id: dumas-03439326

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03439326>

Submitted on 22 Nov 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.



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

THESE

Spécialité DES Biologie Médicale

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 2019

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Etude comparative de différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques chez les bactéries du groupe *Bacteroides fragilis* ayant acquis un ou plusieurs mécanismes de résistance

**Présentée par
Bénédicte LANGLOIS**

**Soutenue publiquement le 15 janvier 2021
devant le jury composé de**

M. Jean-Christophe GIARD	PU, Université de CAEN	Président du jury
M. François GUERIN	PH, CHU de RENNES	Directeur de thèse
M. Olivier JOIN-LAMBERT	PU-PH, CHU de CAEN	Examineur
Mme. Martine PESTEL-CARON	PU-PH, CHU de ROUEN	Examineur

Thèse dirigée 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

Directrice administrative adjointe
Madame Emmanuelle BOURDON

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
GIARD Jean-Christophe.....Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie.....Pharmacie galénique
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.....Biologie cellulaire et moléculaire,
Biochimie, Cancérologie
DHALLUIN Anne.....Bactériologie, Virologie, Immunologie
ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR.....Parasitologie, Mycologie médicale
GROO Anne-Claire.....Pharmacie galénique
KIEFFER Charline.....Chimie médicinale

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) – HDR	Biologie clinique
LAPORTE-WOJCIK Catherine	Chimie bio-inorganique
LEBAILLY Pierre – HDR	Santé publique
LECHEVREL Mathilde – HDR	Toxicologie
LEGER Marianne	Physiologie, Pharmacologie
LEPAILLEUR Alban – HDR	Modélisation moléculaire
N'DIAYE Monique	Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique
PAIZANIS Eleni	Physiologie, Pharmacologie
PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima	Chimie organique et thérapeutique
POTTIER Ivannah	Chimie et toxicologie analytiques
PREVOST Virginie – HDR	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
QUINTIN Jérôme	Pharmacognosie
RIOULT Jean-Philippe	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
SINCE Marc	Chimie analytique
VILLEDIEU Marie – HDR	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

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

JOURDAN Jean-Pierre	
----------------------------	--

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Christophe GIARD, je tiens à vous remercier de me faire l'honneur d'être le président de cette thèse. Merci pour votre disponibilité, mais également pour tous les conseils que vous m'avez donnés tout au long de mon parcours d'interne.

A Monsieur le Docteur François GUERIN, je souhaite te remercier chaleureusement pour l'encadrement de cette thèse. Merci de m'avoir proposé ce sujet, que j'ai réalisé avec beaucoup de plaisir et duquel j'ai énormément appris. Merci pour le temps que tu as passé à m'expliquer et me guider tout au long de ce travail, pour ta bonne humeur et ta présence.

A Monsieur le Professeur Olivier JOIN-LAMBERT, je vous remercie d'avoir accepté que je travaille sur ce sujet de thèse, mais aussi pour votre temps, votre investissement, pour toute l'aide que vous m'avez apportée pour les corrections de ce travail, sans laquelle celui-ci n'aurait pas eu cette rigueur.

A Madame la Professeure Martine PESTEL-CARON, je vous remercie de me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse et à l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Je tiens également à vous remercier pour l'enseignement de bactériologie que vous m'avez donné au cours de mes études en pharmacie au sein de l'université de Rouen.

A toute l'équipe du laboratoire de bactériologie du CHU de Caen, qui m'a formé à cette exigeante discipline qu'est la microbiologie. Merci à Julie, Damasie, Marguerite, Claire, Christophe pour votre formation au sein du laboratoire.

A monsieur le Professeur Simon LE HELLO, je souhaite vous remercier pour ce que vous m'avez appris et m'apprendrez encore, mais aussi pour m'avoir donné la chance de découvrir un peu plus le monde de la bactériologie.

Aux membres des équipes de recherche de l'U2RM et du GRAM 2.0, merci pour votre bonne humeur et votre bienveillance. A Marine, merci pour ton inconditionnel enthousiasme et nos sessions bavardages qui m'ont remontés le moral plus d'une fois.

A Michel AUZOU, un énorme merci à toi Zouzou, pour ton aide pendant cette thèse. Merci d'être le puits de savoir que tu es !

A tous mes enseignants de pharmacie, qui sont intervenus au cours mes études. Merci de tout ce que vous m'avez appris.

Merci aux co-internes qui ont partagé un morceau de chemin avec moi. A Hugo, mon indéfectible co-interne avec qui j'ai traversé mes premières deux années d'internat et partagé mes pauses café. A Agathe, maintenant devenue Docteur Gagathe, avec qui j'ai grandi en bactériologie.

A François et Elsa, grâce à qui j'ai trouvé ma voie. Je vous suis infiniment reconnaissante pour tout ce que vous m'apportez tant professionnellement que personnellement. Merci pour tout ce que vous m'avez appris. Merci pour tous ces précieux moments passés ensemble et du soutien que vous m'avez fourni.

A mes amis de longue date, Hélène, Mélia, Charlotte, Régis, Alexandre, Hugues avec qui j'ai passé tant de temps depuis le collège. A Claire, avec qui j'ai partagé les bancs de la fac, Grégoire, Adeline, Nico, Clément, Charlie, Sandrine, Damien, Théo, Gaspard, Florian, merci d'être un groupe d'amis si soudé.

A ma famille et belle-famille que je vois si peu. Merci à tous d'avoir toujours été présents aux moments importants de ma vie. A Corinne et Michel, qui m'ont accueilli chaleureusement au sein de leur famille.

A mes parents, merci de votre présence, votre soutien sans faille et vos encouragements dans mes études mais aussi dans mon quotidien. Merci d'avoir cru en moi. Merci à vous de m'avoir aidé à parcourir tout ce chemin et arriver ici aujourd'hui.

A ma sœur Claire, merci pour tous les moments que nous avons partagés et tous ceux que nous partagerons encore. Sois certaine que je serai toujours là pour toi.

A Donovan, présent depuis tant d'années maintenant. Je ne te remercierai jamais assez de ton soutien et la patience dont tu fais preuve avec moi. Merci d'avoir toujours été présent et de m'avoir suivi jusqu'ici !

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES ABREVIATIONS	8
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES FIGURES.....	10
INTRODUCTION	11
A. GENERALITES	11
B. HABITAT NATUREL ET MODE DE VIE DES BACTERIES ANAEROBIES	14
C. PATHOGENICITE	16
D. LE GENRE BACTEROIDES	19
1. <i>Taxonomie</i>	20
2. <i>Culture et identification</i>	21
a. Caractéristiques biochimiques et morphologiques	21
b. Culture et anaérobiose	23
c. Identification bactérienne.....	25
3. <i>Facteurs de virulence</i>	26
4. <i>Résistances naturelles et acquises aux antibiotiques</i>	27
a. Sensibilité des germes anaérobies aux antibiotiques	27
b. Sensibilité et molécules antibiotiques de référence dans les infections à <i>Bacteroides</i> spp.	27
c. Résistances naturelles.....	28
d. Résistances acquises aux antibiotiques	30
E. METHODES D’EVALUATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES GERMES ANAEROBIES	33
1. <i>Définitions</i>	33
2. <i>Méthode de référence : la dilution en milieu solide</i>	34
3. <i>Méthodes corrélées à la méthode de référence</i>	34
a. Diffusion en milieu gélosé.....	34
b. Microdilution en milieu liquide.....	35
c. E-test.....	35
4. <i>Recommandations actuelles pour la réalisation de l’antibiogramme des Bacteroides spp.</i>	35
OBJECTIFS	38
MATERIEL ET METHODE	39
A. ÉPIDÉMIOLOGIE CLINIQUE ET RESISTANCE ACTUELLE DES <i>BACTEROIDES</i> DU GROUPE <i>FRAGILIS</i> AU CHU DE CAEN.....	39
B. COLLECTION DE SOUCHES	39
C. CULTURE DES SOUCHES DE <i>B. FRAGILIS</i>	40
1. <i>Milieux de culture</i>	40
2. <i>Anaérobiose</i>	40
D. METHODE D’IDENTIFICATION BACTERIENNE.....	41
E. DETECTION DES GENES DE RESISTANCES PAR AMPLIFICATION GENIQUE (PCR)	41
1. <i>Gènes recherchés et amorces</i>	42
2. <i>Extraction de l’ADN bactérien</i>	44
3. <i>PCR</i>	44
F. METHODES D’ANTIBIOGRAMMES	45
1. <i>Méthode de référence : dilution en milieu solide par Steers</i>	46
2. <i>Méthode de diffusion de disques en milieu solide</i>	48
3. <i>Microdilution en milieu liquide : méthode Sensititre™</i>	48
4. <i>Microdilution en milieu liquide : Micronaut-S™</i>	49
5. <i>Tests complémentaires : mesure des CMI par E-tests</i>	49
G. INTERPRETATION ET EVALUATION DES METHODES.....	49
RESULTATS	52
A. ÉPIDÉMIOLOGIE CLINIQUE ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES <i>BACTEROIDES</i> DU GROUPE <i>FRAGILIS</i> AU CHU DE CAEN	52
B. CARACTERISATION DE LA COLLECTION DE SOUCHES ETUDIEES	54
1. <i>Identification des isolats</i>	54

2.	<i>Sensibilité selon la méthode de référence (Steers).....</i>	54
3.	<i>Caractérisation génétique de la résistance.....</i>	56
C.	ÉVALUATION DES METHODES ANTIBIOGRAMMES :	59
1.	<i>Méthode par diffusion de disques en milieu solide.....</i>	59
2.	<i>Évaluation de la méthode de microdilution en milieu liquide</i>	63
a.	Distribution des CMI observées	63
b.	Évaluation du système Sensititre™	64
c.	Évaluation du système Micronaut-S™	65
d.	Synthèse.....	67
D.	COMPARAISON GENOTYPE-PHENOTYPE DE LA RESISTANCE.....	68
1.	<i>Fréquence de mise en évidence des gènes de résistance.....</i>	68
2.	<i>Corrélation phénotype-génotype avec la méthode de référence.....</i>	69
a.	βlactamines.....	69
b.	Clindamycine.....	73
c.	Métronidazole.....	76
	DISCUSSION	78
A.	LIMITES GENERALES DES METHODES ANTIBIOGRAMMES	78
B.	BIAIS ET LIMITES DE L'ETUDE	79
C.	COMPARAISON A LA METHODE DE REFERENCE ET PROFIL GENETIQUE	80
D.	ANTIBIOGRAMME ET ALGORITHME DECISIONNEL	83
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	85
	BIBLIOGRAPHIE	86

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

ARN : Acide Ribo Nucléique

ATCC : *American Type Culture Collection*

BBA : *Brucella Blood Agar*

BET : Bromure d'ETHidium

BHI : *Brain Heart Infusion*

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CO₂ : Dioxyde de carbone

dNTP : désoxyriboNucléoside TriPhosphate

EUCAST : *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FDA : *Food and Drug Administration*

LPS : LipoPolySaccharides

MALDI-TOF MS : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometer*

MATE : *Multidrug And Toxic compound Extrusion*

MH : Mueller-Hinton

MLSA : *Multi Locus Sequence Analysis*

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

O₂ : Dioxygène

pb : paires de bases

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

TAE : TRIS Acétate EDTA

TS : Tryptone Soja

UFC : Unité Formant Colonie

LISTE DES TABLEAUX

TABEAU 1 : CLASSIFICATION DES PRINCIPAUX PHYLUM ET GENRES BACTERIENS ANAEROBES PRESENTANT UN INTERET MEDICAL	13
TABEAU 2 : PREVALENCE DES GERMES ANAEROBES DANS DES INFECTIONS COURANTES	16
TABEAU 3 : SITES D'INFECTIONS FREQUENTS ET GENRES ANAEROBES ASSOCIES.....	19
TABEAU 4 : LISTE DES ESPECES DE <i>BACTEROIDES</i> ET <i>PARABACTEROIDES</i>	21
TABEAU 5 : PRINCIPALES RESISTANCES ET CARACTERISTIQUES DE BACILLES A GRAM NEGATIF ANAEROBIE ..	22
TABEAU 6 : SENSIBILITES DE 1 218 <i>BACTEROIDES</i> DU GROUPE <i>FRAGILIS</i> ISOLES DE 2005 A 2007 AUX ÉTATS-UNIS D'APRES SNYDMAN ET AL. (2010)	29
TABEAU 7 : GENES IMPLIQUES DANS LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DANS LE GROUPE <i>B. FRAGILIS</i>	32
TABEAU 8: LISTE DES ANTIBIOTIQUES ET CHARGE DES DISQUES A TESTER POUR LES GERMES ANAEROBES, A GRAM POSITIF ET NEGATIF, SELON LE CA-SFM 2013 ET 2020	37
TABEAU 9 : RESULTATS DE L'ALIGNEMENT DES DIFFERENTS GENES <i>NIM</i> AVEC LES AMORCES « UNIVERSELLES »	43
TABEAU 10 : MIX POUR PCR CLASSIQUE	44
TABEAU 11 : DIAMETRES ET CONCENTRATIONS CRITIQUES PROPOSES LE CA-SFM ET LE CLSI.....	50
TABEAU 12 : SOUCHES CLINIQUES DU GROUPE <i>FRAGILIS</i> ET RESISTANCES ASSOCIEES SUR L'ANNEE 2018 ET 2019 AU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE DU CHU DE CAEN (CA-SFM 2013)	53
TABEAU 13 : REPARTITION DES PRELEVEMENTS A VISEE DIAGNOSTIQUE DANS LESQUELS UN ISOLAT DE <i>BACTEROIDES</i> DU GROUPE <i>FRAGILIS</i> A ETE ISOLE AU CHU DE CAEN EN 2018 ET 2019.....	53
TABEAU 14 : PROFIL DE SENSIBILITE DES 55 <i>BACTEROIDES</i> DU GROUPE <i>FRAGILIS</i> AVEC LA METHODE DE REFERENCE (STEERS) INCLUANT LA SOUCHE DE REFERENCE ATCC	55
TABEAU 15 : REPARTITION DES SOUCHES RESISTANTES EN FONCTION DES ESPECES DE <i>BACTEROIDES</i> EN STEERS.....	56
TABEAU 16 : EVALUATION DE LA DIFFUSION DE DISQUES EN MILIEU SOLIDE	60
TABEAU 17 : CMI ₅₀ ET CMI ₉₀ POUR 55 <i>BACTEROIDES</i> DU GROUPE <i>FRAGILIS</i> SELON LA DILUTION EN MILIEU SOLIDE (REFERENCE) ET LES DEUX METHODES DE MICRODILUTION.	63
TABEAU 18 : SYSTEME SENSITITRE™ : EVALUATION DES DISCORDANCES MINEURES, MAJEURES ET TRES MAJEURES EN FONCTION DE L'INTERPRETATION DU CA-SFM ET DU CLSI.....	64
TABEAU 19 : SYSTEME MICRONAUT-S™ : EVALUATION DES DISCORDANCES MINEURES, MAJEURES ET TRES MAJEURES EN FONCTION DE L'INTERPRETATION DU CA-SFM ET DU CLSI.....	66
TABEAU 20 : FREQUENCES OBSERVEES DES GENES DE RESISTANCE EN FONCTION DE L'ESPECE AU SEIN DE LA COLLECTION DE 55 <i>BACTEROIDES</i>	68
TABEAU 21 : CMI (MG/L) DES βLACTAMINES MESUREES PAR DILUTION EN MILIEU SOLIDE ET GENES DE RESISTANCE.	70
TABEAU 22 : CMI (MG/L) AUX CARBAPENEMES (DILUTION EN MILIEU SOLIDE) ET GENES DE RESISTANCE AUX βLACTAMINES.....	71
TABEAU 23 : COMPARAISON ET INTERPRETATION SELON LE CA-SFM DES CMI MEROPENEME ET IMPENEME CHEZ NEUF SOUCHES <i>CFIA</i> POSITIVES	72
TABEAU 24 : CMI, DIAMETRES D'INHIBITION ET GENES DE RESISTANCE A LA CLINDAMYCINE (CLI)	74
TABEAU 25 : CMI, DIAMETRES D'INHIBITION ET GENES DE RESISTANCE AU METRONIDAZOLE (MTR)	77

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : PRINCIPAUX GENRES BACTERIENS PRESENTS DANS LES MICROBIOTES DE L'HOMME.....	15
FIGURE 2 : TAXONOMIE BACTERIENNE NON-EXHAUSTIVE DES <i>BACTEROIDETES</i>	20
FIGURE 3 : CARACTERES D'IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX <i>BACTEROIDES</i> DU GROUPE <i>FRAGILIS</i>	23
FIGURE 4 : LISTE DES MOLECULES TESTEES PAR CHACUNE DES METHODES	45
FIGURE 5 : PHOTOS DE L'ENSEMENCEUR MULTIPLE DE TYPE STEERS UTILISE AU CHU DE CAEN.....	47
FIGURE 6 : PHOTO D'UNE GELOSE <i>BRUCELLA</i> ENSEMENCEE PAR L'ENSEMENCEUR MULTIPLE DE TYPE STEERS	47
FIGURE 7 : PCR EN POINT FINAL, GEL A 2 % D'AGAROSE, LECTURE UV, GENE <i>MEFA</i>	57
FIGURE 8 : REPARTITION DES DIAMETRES MESURES EN FONCTION DES CMI DEFINIES PAR LA METHODE DE REFERENCE	62
FIGURE 9 : REPARTITION DES CMI OBTENUES PAR DILUTION EN MILIEU SOLIDE DE L'IMPENEME ET DU MEROPENEME EN FONCTION DE LA PRESENCE DU GENE <i>CFIA</i>	72
FIGURE 10 : GENES DE RESISTANCE AUX MACROLIDES, DIAMETRES D'INHIBITION ET CMIS PAR LA DILUTION EN GELOSE (METHODE DE REFERENCE - STEERS) DE LA CLINDAMYCINE.	75

INTRODUCTION

A. GENERALITES

Les bactéries dites anaérobies ont été découvertes par Louis Pasteur lors de ses travaux sur la fermentation à la fin du XIXème siècle (1–3). Elles constituent un groupe fonctionnel bactérien capable de survivre et de se multiplier en milieu anaérobie, c'est-à-dire dans une atmosphère à taux réduit en oxygène (O₂). Elles tirent leur énergie de la fermentation des sucres et de la photosynthèse. Cette caractéristique fait d'elles des bactéries relativement difficiles à isoler avec les méthodes de culture bactérienne classiques, certaines étant même non-cultivables. Ces espèces bactériennes sont des composantes importantes des microbiotes humains, mais sont également responsables d'infections profondes, notamment le genre *Bacteroides*.

La taxonomie des bactéries a subi de nombreux remaniements depuis le début des années 2000 avec l'analyse du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S et l'accès massif au séquençage complet du génome (WGS) des bactéries et du microbiote humain (4). Les anaérobies n'ont pas fait exception : des reclassifications et des changements de nomenclature ont été réalisés. Des phylums et genres ont été créés et réorganisés. *Propionibacterium acnes* est devenu *Cutibacterium acnes* et *Clostridium difficile*, *Clostridioides difficile*. Les bactéries dites anaérobies sont présentes dans de nombreux phylums : le phylum des *Bacteroidetes* avec les *Bacteroides*, *Prevotella* ou encore *Porphyromonas*, le phylum *Actinobacteria* regroupe les genres *Cutibacterium* et *Actinomyces*, les *Veillonella*, *Clostridium* et *Clostridioides* appartiennent au phylum des *Firmicutes*. Certaines classifications, plus simples, restent tout de même invariables comme la classification selon leurs degrés de tolérance à l'oxygène, la classification morphologique selon la coloration de Gram et la production de spores.

Toutes les bactéries se développant dans une atmosphère anaérobie n'ont pas les mêmes capacités de tolérance à l'oxygène et aux composés ou dérivés chimiques oxygénés. L'oxygène et les dérivés oxygénés sont toxiques pour elles car elles ne possèdent pas ou en quantité insuffisante les mécanismes de détoxification nécessaires tels les catalases, les peroxydases ou les superoxydes dismutases (5,6). En cas de contact avec une atmosphère oxygénée, il y aura donc une accumulation de composés oxygénés, hautement nocif. Pour les espèces les plus sensibles, cette

concentration de composés toxiques va conduire à la mort bactérienne. Tandis que celles ayant un niveau de tolérance plus élevé, grâce à la présence de mécanisme rudimentaire d'élimination des éléments oxygénés, seront en capacité de survivre mais ne pourront plus se multiplier. Ci-dessous, est présentée la première classification, en fonction de leurs niveaux de sensibilité à l'oxygène (6–8) :

- Les *anaérobies extrêmes* ne tolèrent pas une exposition de plus de quelques secondes à l'oxygène, comme *Peptostreptococcus anaerobius*.
- Les *anaérobies stricts* ne tolèrent pas une exposition à l'oxygène de plus d'une heure et se multiplient avec un taux d'oxygène inférieur à 0,5 %, comme *Fusobacterium nucleatum*.
- Les *anaérobies modérés* ont une tolérance à des expositions allant de 2 à 8h en l'air ambiant et se multiplient dans une atmosphère contenant entre 2 et 8 % d'oxygène, comme le genre *Bacteroides*.
- Les *anaérobies aéro-tolérants* tolèrent des expositions prolongées à l'oxygène. Ils sont capables de se multiplier en atmosphère aérobie de façon plus lente et possèdent des mécanismes de détoxification aux espèces réactives oxygénées, toutefois, ils n'utilisent pas l'oxygène pour produire de l'énergie. Leur croissance est plus rapide à des taux inférieurs à 8 % d'oxygène, à l'exemple de *Clostridium perfringens* qui tolère une exposition de 72h à l'oxygène.
- Les *anaérobies facultatifs* sont des bactéries ayant le matériel enzymatique pour une respiration aérobie et anaérobie, ils tolèrent les deux types d'atmosphères et peuvent s'y multiplier, comme les *Streptococcus* spp., en utilisant la respiration aérobie ou la fermentation pour produire de l'énergie en fonction de leur milieu.
- Les *microaérophiles* tolèrent et utilisent de faibles concentrations en oxygène (0,1 à 0,3 mg/L). A trop forte ou trop faible concentration, leur survie n'est pas assurée.

En ce qui concerne la morphologie, plusieurs structures sont présentes dans ce groupe : des bacilles et des cocci prenant la coloration de Gram mais également des spirochètes (de l'ordre des *Spirochetales*, classe des *Spirochaetae*, phylum des *Spirochaetes*) dont le genre majeur est le genre *Treponema*. Ces bactéries sont de forme hélicoïdale, mobiles, non colorables au Gram, non cultivables et s'observent au microscope à fond noir (9,10).

La classification des principaux genres bactériens anaérobies selon leurs caractéristiques morphologiques observables à la coloration de Gram ou au microscope à fond noir est présentée dans le **Tableau 1**. Les genres listés sont ceux que l'on retrouve le plus fréquemment en médecine humaine (11,12).

Tableau 1 : Classification des principaux phylum et genres bactériens anaérobies présentant un intérêt médical

ACTINOBACTERIA			
BACILLE		COCCI	
Gram négatif	Gram positif	Gram négatif	Gram positif
<i>Alloscardovia</i>	Non sporulé <i>Actinomyces</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Cutibacterium</i> <i>Mobiluncus</i> <i>Trueperella</i>	-	-
BACTEROIDETES			
BACILLE		COCCI	
Gram négatif	Gram positif	Gram négatif	Gram positif
<i>Bacteroides</i> <i>Parabacteroides</i> <i>Capnocytophaga</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i>	-	-	-
FIRMICUTE			
BACILLE		COCCI	
Gram négatif	Gram positif	Gram négatif	Gram positif
-	Sporulé <i>Clostridioides</i> <i>Clostridium</i> Non sporulé <i>Lactobacillus</i> <i>Eubacterium</i>	<i>Megasphaera</i> <i>Veillonella</i>	<i>Anaerococcus</i> <i>Finegoldia</i> <i>Micromonas</i> <i>Parvinonas</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Peptoniphilus</i>
FUSOBACTERIA			
BACILLE		COCCI	
Gram négatif	Gram positif	Gram négatif	Gram positif
<i>Fusobacterium</i> <i>Leptotrichia</i>	-	-	-
PROTEOBACTERIA			
BACILLE		COCCI	
Gram négatif	Gram positif	Gram négatif	Gram positif
<i>Bilophila</i> <i>Campylobacter</i>	-	-	-
SPIROCHAETES			
<i>Treponema</i>			

B. HABITAT NATUREL ET MODE DE VIE DES BACTERIES ANAEROBIES

Les bactéries dont le métabolisme ne nécessite pas d'oxygène sont retrouvées dans l'environnement : des niches comme les sédiments marins, le fond des océans ou le sol. Elles sont également présentes dans les flores commensales des animaux et de l'Homme, principalement la muqueuse oro-pharyngée, digestive et vaginale (2,7). Les microbiotes de l'Homme se définissent par l'ensemble des micro-organismes vivant sur ses surfaces externes et internes, incluant bactéries, virus, champignons et parasites. Ils ont fait l'objet de nombreuses études visant à les cartographier. Les travaux visant à analyser les microbiotes bactériens dérivent principalement du séquençage de banques d'amplicons du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S. Les microorganismes et leur proportion varient selon les flores et les sites. La distribution des espèces dépend notamment de leurs tolérances à l'oxygène ; aussi, la flore cutanée sera plus susceptible de contenir des bactéries anaérobies modérées comme les *Cutibacterium* spp., les flores naso-pharyngées ou digestives contiendront des espèces moins tolérantes à l'oxygène comme les *Fusobacterium* spp. ou les *Porphyromonas* spp. (13,14). La **Figure 1** représente les principaux genres bactériens présents dans les microbiotes humains.

Le microbiote digestif est riche en espèces bactériennes avec plus de 35 000 espèces recensées. Les germes anaérobies y sont majoritaires avec principalement des espèces appartenant au phylum des *Firmicutes* et *Bacteroidetes* où ils jouent un rôle majeur dans la digestion des sucres et protéines. Les anaérobies nichés dans le tractus intestinal varient avec l'âge, l'alimentation mais aussi selon les différents étages digestifs. Aussi, leur répartition n'est pas homogène tout au long du tube digestif : la biomasse bactérienne augmente tout au long du tube digestif et les espèces changent. Des *Lactobacillus* spp., seront retrouvés au niveau de l'estomac tandis que des *Bacteroides* spp. et *Bifidobacterium* spp. seront les espèces principales du colon (15).

La flore naso-pharyngée contient, elle aussi, des germes anaérobies. Ils sont présents sur la muqueuse buccale et participent à la formation de la plaque dentaire. Les genres les plus présents sont les *Porphyromonas*, les spirochètes, les *Actinomyces* et les *Fusobacterium* (16).

Au niveau cutané, les *Cutibacterium* spp. sont les anaérobies les plus fréquents. Leurs proportions varient selon le site : *Cutibacterium acnes* est présent dans les zones grasses du corps, c'est-à-dire au niveau de la tête, du cou et du dos. En seconde place des anaérobies les plus fréquents de la peau se trouve les bactéries du phylum

des *Bacteroidetes* et ordre des *Bacteroidales*. Celles-ci se trouvent au niveau des grands plis comme l'aîne, les aisselles, les plis des coudes ou les plis interdigitaux. Il est toutefois à noter que les bactéries du phylum des *Bacteroidetes* sont en proportions inférieures aux autres genres bactériens présents dans ces sites (17).

Les bactéries anaérobies sont également naturellement présentes dans les flores génitales féminines. La composition de cette flore varie en fonction de l'âge, des taux d'hormones, du cycle menstruel. Les *Lactobacillus* spp. et *Bifidobacterium* spp. sont les espèces majoritaires chez la femme pré-ménopausée (18,19).

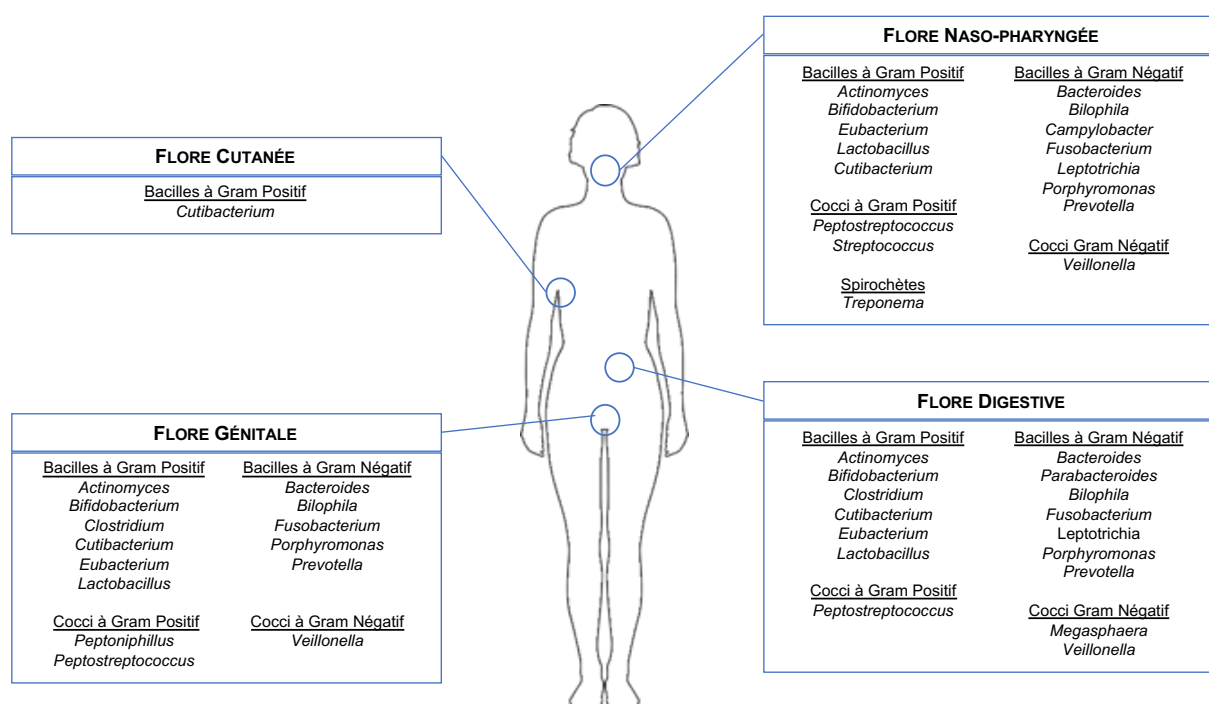


Figure 1 : Principaux genres bactériens présents dans les microbiotes de l'Homme.

Elles peuvent être responsables d'infections profondes et contribuer à la formation d'abcès. Les principaux genres isolés en pathologies infectieuses humaines sont ceux retrouvés dans les flores commensales. Leur pathogénicité résulte principalement de lésions ou de ruptures de la barrière cutanéomuqueuse provoquant un passage de bactéries des diverses flores vers des secteurs normalement stériles. La prévalence des germes anaérobies dans les infections courantes est rapportée dans le **Tableau 2** (20). Il s'agit principalement d'infections polymicrobiennes pouvant être subaigües ou chroniques.

Tableau 2 : Prévalence des germes anaérobies dans des infections courantes (20)

Infections	Prévalence
Sinusites et otites moyennes chroniques	> 50 %
Infections dentaires et orales	90-100 %
Suppurations pleuro-pulmonaires	> 75 %
Infections intra-abdominales	50-90 %
Infections gynécologiques	50-75 %
Abcès mammaires non-puerpéraux	50-80 %
Pied diabétique	85-95 %

C. PATHOGENICITE

Les germes anaérobies sont considérés comme des pathogènes opportunistes qui nécessitent la rupture de barrières naturelles de l'hôte pour provoquer un sepsis. L'origine des infections est généralement endogène avec un passage au travers des muqueuses à partir des sites riches en bactéries anaérobies. Les morsures ou les blessures sont également la cause d'infections à germes anaérobies. Dans ces situations, des germes anaérobies exogènes, atypiques, peuvent être retrouvés. Ils appartiennent à la flore buccale d'animaux ou bien de l'environnement (13,21).

Certaines espèces anaérobies sont particulières car leur pathogénicité est liée uniquement ou principalement à la production de toxines. Nous citerons ici quelques exemples (5) :

- *C. difficile*, responsable de diarrhées post antibiotiques et de colites pseudomembraneuses
- *C. tetani*, agent du tétanos, maladie mortelle en l'absence de traitement
- *C. botulinum*, responsable du botulisme et de toxi-infections alimentaires
- *C. perfringens*, à l'origine de gangrènes gazeuses

Hormis ces quelques exceptions, la majorité des espèces responsables d'infections sont présentes dans les flores commensales de l'Homme et deviennent pathogènes à la faveur d'une condition favorable et peuvent être responsables d'un large panel d'infections (13,20,22).

Bactériémies : Les bactériémies à anaérobies représentent 5 à 15 % de l'ensemble des bactériémies. Dans 50 à 75 % des cas, des *Bacteroides* du groupe

fragilis sont isolés. Le taux de mortalité est extrêmement élevé dans ces infections, où un taux de 50 % est rapporté.

Infections intra-abdominales : Il s'agit d'infections poly-microbiennes prenant leur source dans la flore digestive. Le déroulement de l'infection se fait en deux phases, en synergie avec germes aérobies et anaérobies : d'abord une péritonite à germes aérobies (*Escherichia coli* le plus souvent) créant un environnement hypoxique, favorisant la formation d'un abcès à germes anaérobies (*Bacteroides* est le genre le plus fréquent).

Infections ostéo-articulaires : Elles peuvent être d'origine hématogène ou bien liées à un traumatisme, une blessure ou une morsure contiguë à l'articulation ou l'os ou encore post-chirurgicale. Dans tous les cas, les signes de l'infection sont tardifs et surviennent à distance de l'élément déclencheur. Ses infections sont souvent chroniques et nécessitent une prise en charge chirurgicale associée à une antibiothérapie adaptée. Le genre *Bacteroides* est le plus souvent retrouvé dans les infections articulaires des pieds et mains (23).

Infections du tractus génital féminin : La flore vaginale est dominée par les *Lactobacillus* spp. et *Bifidobacterium* spp. Toutefois, ces genres sont exceptionnellement associés à des infections gynécologiques. Les infections de types vaginoses et endométrites sont rencontrées lors de dysbioses de la flore génitale au cours desquels des germes anaérobies du microbiote digestif viennent déséquilibrer la flore locale. Ces dysbioses sont aussi rapportées comme vecteurs d'anomalies de la grossesse (naissance prématurée, retard structuro-pondéral). Dans le cas des *Bacteroides*, ceux-ci sont le plus souvent retrouvés dans les infections associées à un abcès génital.

Infections de la peau et des tissus mous : abcès, des ulcères ou encore de la cellulite ou de la fasciite nécrosante (dermohypodermes nécrosantes), sont le plus souvent consécutives à des morsures ou des blessures. Les germes anaérobies isolés dans ces plaies sont originaires de la flore buccale, cutanée ou de l'environnement. Les infections de type pied diabétiques peuvent également être citées dans ce paragraphe. Dans ces différents cas, les infections sont polymicrobiennes et les bactéries présentes au niveau des lésions constituent un microbiote à part entière où les germes anaérobies jouent un rôle clef dans l'entretien de la plaie.

Infections pleuro-pulmonaires : Les anaérobies sont impliqués dans des abcès, empyèmes ou encore nécroses pulmonaires, infections ou surinfections de lésions préexistantes dans lesquelles un microenvironnement anaérobie a pu se créer. Les germes anaérobies qui y prédominent sont ceux de la flore oropharyngée. Dans les

pneumopathies d'inhalation, les *Bacteroides* spp. sont les plus fréquemment isolées, suivies des anaérobies de la flore buccale ou digestive. Nous pourrions citer une pathologie particulière, l'actinomyose, qui associe des actinomycètes (classiquement *Actinomyces israelii*) à d'autres bactéries pathogènes de la flore oropharyngée.

Méningite et abcès cérébraux (ou empyème cérébral) : ces infections sont rares et souvent secondaires à une autre infection. Les bactéries anaérobies sont retrouvées dans 50 % des abcès d'origine bactérienne et *B. fragilis* représente 30 % de ces infections.

Maladies inflammatoires chroniques associées à des germes anaérobies : Parmi les maladies inflammatoires dues à une prolifération de germes anaérobies, l'acné, la maladie de Verneuil ou hidrosadénite suppurée et la périodontite chronique sont les diagnostics les plus fréquemment évoqués. L'acné prédomine au niveau des zones grasses du corps où prédomine *Cutibacterium acnes*. Il a été montré que certains complexes clonaux pro-inflammatoires sont associés à la maladie. La maladie de Verneuil prédomine par contre au niveau des grands plis du corps. Elle se caractérise par une inflammation de la peau et la formation chronique d'abcès au niveau des follicules pilo-sébacés qui évoluent de manière chronique. La physiopathologie est mal connue mais plusieurs études ont montré que les genres *Prevotella*, *Porphyromonas* et *Fusobacterium* sont associés aux lésions (24,25). La périodontite chronique est une pathologie sévère du sillon gingivo-dentaire. Elle associe les mêmes agents pathogènes au niveau du genre.

Il est important de souligner que les infections à germes anaérobies sont souvent polymicrobiennes, associant des germes anaérobies et anaérobies facultatifs. Dans l'exemple des infections digestives comme par exemple les péritonites, les germes anaérobies seront retrouvés avec des entérobactéries dans la majorité des cas. Il en est de même pour les infections ostéo-articulaires, 50 % des infections à anaérobies sont polymicrobiennes (26). L'antibiothérapie devra donc couvrir plusieurs types de germes.

Tableau 3 : Sites d'infections fréquents et genres anaérobies associés (20,23)

Les genres en gras sont les genres prédominant dans les infections citées

Localisation	Infections	Principaux genres
Tête et cou	Abcès cérébraux	<i>Actinomyces</i> <i>Bacteroides</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Prevotella</i>
	Infection dentaire	<i>Capnocytophaga</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i>
	Abcès tête et cou	<i>Bacteroides</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Prevotella</i>
Bactériémie		<i>Bacteroides</i> <i>Clostridium</i>
Pulmonaire	Suppuration pleurale Abcès pulmonaire	<i>Bacteroides</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Prevotella</i>
Digestive	Intra-abdominale Appendicite	<i>Bacteroides</i> <i>Fusobacterium</i>
Génitale	Vaginose Endométriose	<i>Bacteroides</i> <i>Clostridium</i> <i>Gardnerella</i> <i>Prevotella</i>
Peau et tissu mou	Lésion cutanée : Morsure, blessure	<i>Bacteroides</i> <i>Cutibacterium</i> <i>Clostridium</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Prevotella</i>
	Pied diabétique	<i>Bacteroides</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i>
Ostéo-articulaire	Arthrite septique Ostéomyélite	<i>Bacteroides</i> <i>Clostridium</i> <i>Cutibacterium</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Peptostreptococcus</i>
	Arthrite septique sur prothèse	<i>Bacteroides</i> <i>Cutibacterium</i>

D. LE GENRE BACTEROIDES

Découvert par Veillon et Zuber en 1898, le premier représentant du genre des *Bacteroides* est *Bacteroides fragilis*. Il s'agit de bacilles à Gram négatif appartenant au

groupe des bactéries anaérobies. Présent dans la flore digestive, il s'agit du genre le plus fréquemment isolé dans les infections à anaérobie chez l'Homme. C'est également le plus étudié car relativement facile à cultiver.

1. Taxonomie

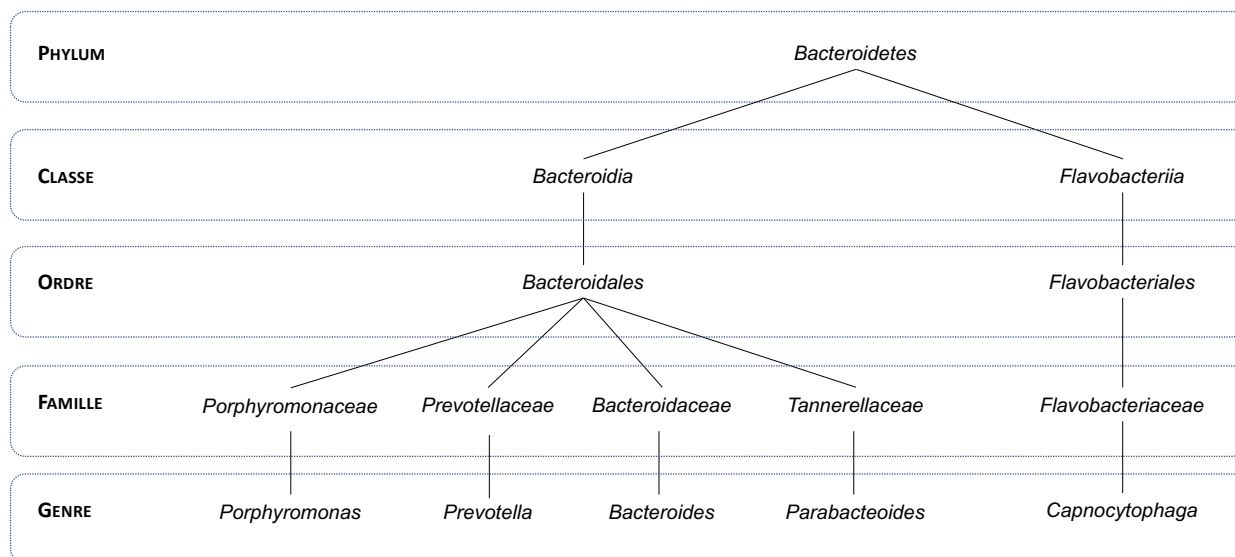


Figure 2 : Taxonomie bactérienne non-exhaustive des *Bacteroidetes*

Le genre *Bacteroides* appartient au phylum des *Bacteroidetes*, classe des *Bacteroidia*, ordre des *Bacteroidales*, famille des *Bacteroidaceae* (**Figure 2**). Après de nombreux remaniements de taxonomie, le groupe *Bacteroides fragilis* représente aujourd'hui l'intégralité des *Bacteroides* connus et comptabilise plus d'une quarantaine d'espèces. Récemment, le genre *Parabacteroides* a été séparé des *Bacteroides* grâce à l'analyse de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 16S : les espèces *B. distasonis*, *B. merdae* et *B. goldsteinii* ont été reclassées en *Parabacteroides distasonis*, *P. merdae* et *P. goldsteinii*, appartenant à l'ordre des *Bacteroidales* (27). Une liste non-exhaustive des espèces de *Bacteroides* et *Parabacteroides* est présentée dans le **Tableau 4**.

Les *Bacteroides* prédominent dans la flore digestive. Les principales espèces retrouvées sont : *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. uniformis*, *B. salyersae*, *B. ovatus* (13,28). Il est à noter également que *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* et *B. ovatus* sont les espèces anaérobies les plus fréquentes en infectiologie humaine.

Tableau 4 : Liste des espèces de *Bacteroides* et *Parabacteroides*

<i>Bacteroides</i>	<i>Parabacteroides</i>
<i>B. acidifaciens</i> ; <i>B. caccae</i>	<i>P. distasonis</i>
<i>B. coprocola</i> ; <i>B. coprosuis</i>	<i>P. goldsteinii</i>
<i>B. dorei</i> ; <i>B. eggerthii</i>	<i>P. merdae</i>
<i>B. finegoldii</i> ; <i>B. fragilis</i>	
<i>B. helcogenes</i> ; <i>B. intestinalis</i>	
<i>B. johnsonii</i> ; <i>B. massiliensis</i>	
<i>B. nordii</i> ; <i>B. ovatus</i>	
<i>B. plebeius</i> ; <i>B. uniformis</i>	
<i>B. salyersai</i> ; <i>B. stercoris</i>	
<i>B. thetaiotaomicron</i> ; <i>B. pyogenes</i>	
<i>B. vulgatus</i>	

Les techniques utilisées pour la classification bactérienne sont nombreuses et sont en perpétuelle évolution, remettant continuellement en cause la nomenclature et la taxonomie. Basée initialement sur les caractères biochimiques, le profil de résistance à certains antibiotiques (vancomycine, kanamycine) et la morphologie des bactéries, la classification est devenue de plus en plus fine grâce à des approches moléculaires qui permettent d'analyser et comparer des panels de gènes précis comme le *Multilocus sequence analysis* (MLSA) des *Bacteroides* spp. reposant sur la comparaison de cinq gènes de ménage (*dnaJ*, *gyrB*, *hsp60*, *recA*, *rpoB*) et l'ARN r16S. La taxonomie actuelle fait appel au séquençage du génome entier des *Bacteroides* avec un calcul direct des taux de GC% de plus de cinq millions de paires de bases et par comparaison des ARN r16S et du MLSA (27,29).

2. Culture et identification

a. Caractéristiques biochimiques et morphologiques

Le groupe *B. fragilis* se compose de bacille à Gram négatif anaérobies modérés pouvant se développer dans une atmosphère constituée de 2 à 8 % d'oxygène (1). Ces bacilles aux extrémités arrondies sont non-sporulés, non-mobiles, non-pigmentés et possèdent des propriétés glucidolytiques. Ils se différencient des autres anaérobies par certaines caractéristiques biochimiques : ils sont résistants à la bile, à la vancomycine, à la kanamycine et à la colistine. Ces caractéristiques morphologiques

et biochimiques permettent de les différencier des autres bacilles à Gram négatif anaérobie, comme les *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* ou encore *Leptotrichia* (**Tableau 5**) (11,30).

Tableau 5 : Principales résistances et caractéristiques de bacilles à Gram négatif anaérobie

	<i>Bacteroides</i>	<i>Capnocytophaga</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Leptotrichia</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Porphyromonas</i>
Vancomycine	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Vert
Kanamycine	Orange	Vert	Vert	Vert	Orange	Orange
Colistine	Orange	Orange	Vert	Vert	V	Orange
Bile	Orange	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
Pigmentation noire	Vert	Vert	Vert	Vert	V	Orange

Orange : Possède le caractère – Vert : Ne possède pas le caractère - V : Variable

Au sein du groupe *fragilis*, les bacilles présentent des propriétés de dégradation des sucres, des propriétés biochimiques et des profils de résistance différents. Par exemple, *B. fragilis* et *B. vulgatus* seront indole négatif tandis que *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* dégradent le tryptophane. Un arbre représentant l'identification des *Bacteroides* du groupe *fragilis* par leurs propriétés glucidolytiques est présenté dans la **Figure 3** (5,31).

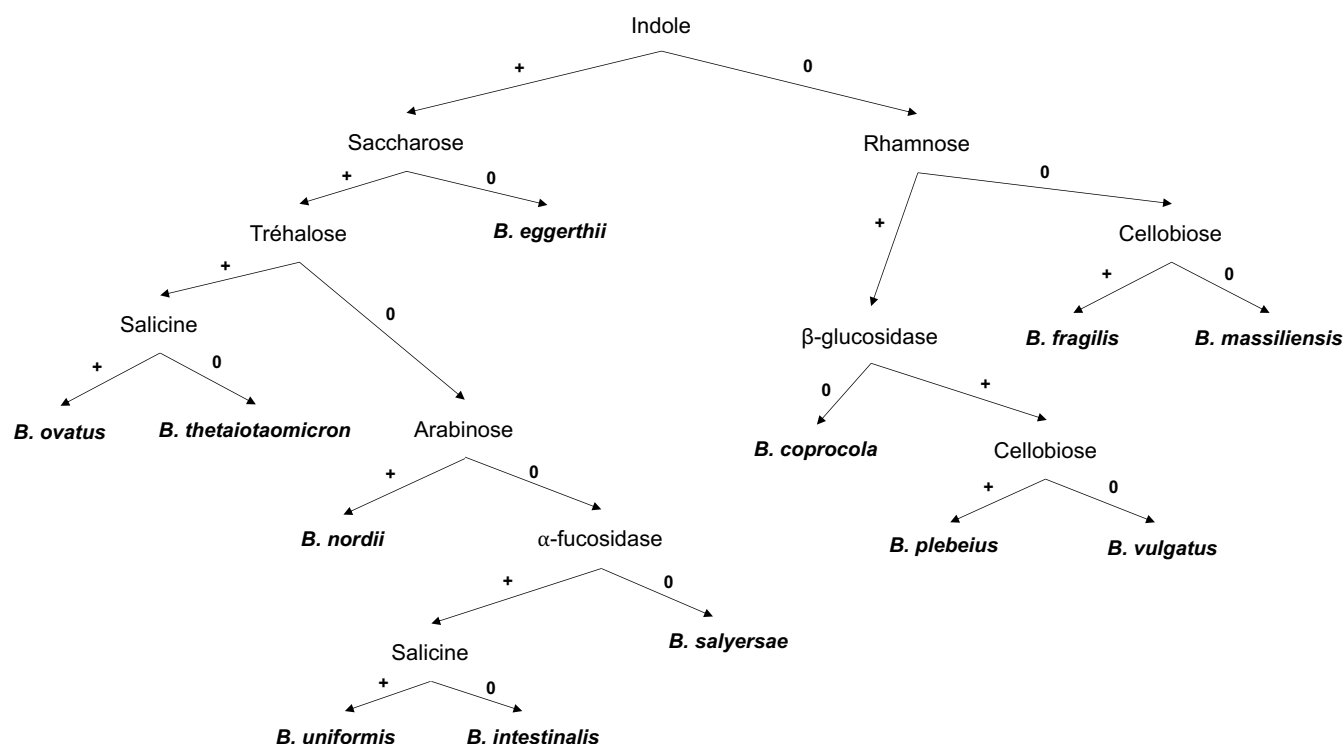


Figure 3 : Caractères d'identification des principaux *Bacteroides* du groupe *fragilis*

b. Culture et anaérobiose

La culture des bactéries anaérobies est un travail qui demande une maîtrise parfaite de l'atmosphère dans laquelle les germes pourront se développer. Une anaérobiose non maîtrisée peut aboutir à un retard ou une absence de croissance bactérienne, voire à une perte définitive de la souche.

Historiquement, ces espèces étaient cultivées en plaçant une bougie dans une jarre ou bien selon la méthode des tubes étanches aux gaz décrite par Hungate et *al.* (32). Ces méthodes fastidieuses ont été remplacées par des techniques actuelles plus simples. Aujourd'hui, l'anaérobiose est assurée par des automates créant des atmosphères pauvres en oxygène (par exemple : Anoxomat®, Bact-R plus® (Sobioda)) ou bien des sachets à base de charbon actif capable d'absorber l'oxygène (Par exemple : Genbag, bioMérieux, France). Des jarres ou des sacs hermétiques servent alors à enfermer les milieux de culture et maintenir une atmosphère anaérobie. D'autres systèmes plus optimisés existent, il s'agit des chambres d'anaérobiose ou « boîtes à gants ». L'atmosphère est contrôlée par un automate injectant un mélange de gaz dépourvu d'oxygène. Ces systèmes perfectionnés permettent une prise en charge des échantillons intégralement en anaérobiose et ainsi d'augmenter la chance

d'isoler les espèces anaérobies les plus fragiles. L'enceinte de la chambre est accessible grâce à des gants (6,8).

La plupart des germes anaérobies requièrent des milieux de croissance enrichis. Les *Bacteroides* sont les germes anaérobies les moins exigeants. Capables de fermenter des sucres complexes, un milieu contenant des polysaccharides tel de l'amidon, de la pectine ou encore de l'hémicellulose leur conviendra, les sucres simples ne sont pas nécessaires à leur survie. Une source directe de nitrate et de sulfure est importante. En effet, les *Bacteroides* ont une capacité réduite à obtenir les nitrates à partir des acides aminés et ne peuvent pas réduire les sulfates en sulfures. Quant à l'hémine, elle n'est pas indispensable à la culture des *Bacteroides*, mais accélère très nettement le temps de croissance. Des milieux de croissance plus simples peuvent donc suffire à leur croissance. Dans ce cas, le temps de doublement sera affecté et la croissance bactérienne sera plus lente (33).

Bien que les *Bacteroides* soient moins exigeants, leur culture est tout de même plus longue que celle des germes isolés habituellement au laboratoire. Le temps de doublement du genre *Bacteroides* peut être de 30 à 60 minutes dans un milieu favorable. Des petites colonies seront formées en 24h et 48h seront requis pour obtenir des colonies de taille plus conséquente (33,34).

Des milieux enrichis en sang permettent une meilleure croissance des isolats. Les milieux de cultures sont divisés en deux types : les milieux sélectifs et les non-sélectifs.

Les milieux sélectifs : les infections à germe anaérobies étant polymicrobiennes, des milieux sélectifs sont utiles pour faciliter leur isolement en primo-culture. Leur caractère sélectif est obtenu grâce à l'incorporation dans les géloses d'antibiotiques ou des biocides inhibant la pousse des bactéries non désirées (35). Nous pourrions citer :

- Le milieu *Kanamycin-Vancomycin-Lacked Blood* (KVLB ou LKV) : sélectif des bactéries à Gram négatif
- Le milieu *Bacteroides Bile Esculin* (BBE) : sélectif de *Bacteroides fragilis*
- Le milieu Tryptone-Soja enrichi en sang et néomycine : limite la croissance du *Staphylococcus aureus* et d'une partie des *Enterobacteriaceae*

Les milieux non-sélectifs ont pour but de stimuler la croissance des bactéries en culture pure. L'utilisation de ces géloses nécessite que les souches bactériennes aient été isolées au préalable. Ils sont utilisés pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques

ou simplement favoriser la croissance bactérienne. Les milieux non-sélectifs les plus utilisés sont présentés ci-dessous (35) :

- Le milieu *Brucella* (caséine, peptone, extrait de levure, dextrose, sodium chloride et bisulfide) enrichi avec 5% de sang de cheval, vitamine K1 et hémine sous forme de géloses ou bouillon (BBA™ (bioMérieux, France) ou BBL™ *Brucella* (BD, Allemagne) sont utilisées pour la croissance des bactéries anaérobies strictes et autres germes exigeants.
- Le milieu Wilkins-Chalgren (caséine, peptone, extrait de levure, glucose, gélatine, arginine et pyruvate) enrichi avec 5% de sang de cheval est un milieu utilisé pour les anaérobies à croissance rapide.
- Les géloses Columbia avec 5% de sang de mouton (COS™, bioMérieux, France) sont également utilisées pour la croissance des germes exigeants.

Le milieu recommandé actuellement par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) et le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) pour l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies est un milieu complexe et riche de type *Brucella* enrichi en sang de cheval, en vitamine K1 et en hémine (36).

c. Identification bactérienne

Plusieurs méthodes sont utilisables pour l'identification des bactéries : les méthodes phénotypiques conventionnelles, la spectrophotométrie de masse de type MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass spectrometry*) et les méthodes moléculaires.

L'aspect à la coloration de Gram, la mobilité ou encore la sporulation, la morphologie et la pigmentation des colonies, permettent d'orienter l'identification bactérienne. Les méthodes d'identification conventionnelles sont basées sur la détermination des caractères biochimiques ainsi que le profil de résistance aux antibiotiques. Les caractères biochimiques et la sensibilité à certains antibiotiques clefs peuvent être déterminés par des galeries d'identification spécifiques aux anaérobies (Exemple : Galerie API Rapid 32A, bioMérieux). Elles permettent une identification allant jusqu'à l'espèce pour le genre *Bacteroides* (31).

Les méthodes de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS permettent une identification rapide et robuste de la majorité des espèces bactériennes anaérobies. L'identification se fait grâce à la comparaison de spectres protéiques extraits des

isolats bactériens à une bibliothèque de spectres rattachés à des espèces connues. Il est indispensable de veiller à la qualité de la librairie d'identification (changement régulier de nomenclature, augmentation du nombre de spectres) afin d'assurer un résultat le plus fiable possible (37,38).

Enfin les méthodes dites moléculaires consistent à identifier les espèces en analysant certains gènes. Deux techniques sont applicables aux *Bacteroides* : l'analyse de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 16S ou la technique MLSA spécifiques aux *Bacteroides*. Ces techniques sont plus longues et coûteuses que les deux précédentes. Elles sont principalement utilisées lorsque les techniques de routine sont mises en défaut ou bien à des fins de recherche (39).

Aujourd'hui, la méthode la plus utilisée en routine est la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS. Les caractéristiques morphologiques et biochimiques ont toutefois encore leur place pour l'orientation dans l'identification des bactéries.

3. Facteurs de virulence

B. fragilis est le plus commun des germes anaérobies isolés dans les infections à germes anaérobies chez l'Homme (13). Bien qu'ils soient physiologiquement présents dans les microbiotes humains et participent à leur bon fonctionnement, comme digestion des sucres du bol alimentaire, les *Bacteroides* du groupe *fragilis* possèdent de nombreux facteurs de virulence qui expliquent leur pathogénicité. Premièrement, ces bactéries possèdent des structures leur permettant d'adhérer aux tissus épithéliaux (*pili*, *fimbriae*, agglutinines, capsule) ; deuxièmement, elles sont capables de se protéger et contourner le système immunitaire de l'hôte grâce à leur capsule et leurs lipopolysaccharides (LPS) ; troisièmement, elles produisent des enzymes cytotoxiques pouvant amener à la destruction des tissus les entourant (collagénase, hyaluronidase) (13,20,40). Certaines souches produisent des entérotoxines qui détruisent les jonctions serrées de la barrière épithéliale digestive et provoquent des diarrhées (41).

4. Résistances naturelles et acquises aux antibiotiques

a. Sensibilité des germes anaérobies aux antibiotiques

Les germes anaérobies sont habituellement sensibles à un grand nombre de classes d'antibiotiques : incluant les β lactamines sauf l'aztréonam et les céphalosporines de 4^{ème} et 5^{ème} génération, la clindamycine, la rifampicine, le chloramphénicol. Seules les fluoroquinolones de dernière génération (moxifloxacin, délafloxacin) sont actives sur les germes anaérobies.

Contrairement à ces molécules, les antibiotiques de la famille des nitroimidazolés (métronidazole, ornidazole) sont uniquement actifs sur les germes anaérobies, les seules espèces naturellement résistantes étant les bacilles à Gram positif aérotolérants (*Cutibacterium*, *Propionibacterium*, *Actinomyces* spp). Ils sont donc rarement utilisés en monothérapie.

b. Sensibilité et molécules antibiotiques de référence dans les infections à *Bacteroides* spp.

Les classes d'antibiotiques efficaces sur les *Bacteroides* du groupe *fragilis* et pouvant être initiées en cas de suspicion d'infection anaérobie sont définies par les *guidelines* du CLSI et CA-SFM/EUCAST. La liste principale contient quatre classes antibiotiques :

- Nitroimidazolés : métronidazole
- β lactamines : pénicilline avec inhibiteur de pénicillinases (ticarcilline-acide clavulanique, pipéracilline-tazobactam) et carbapénème (méro-pénème, imipénème)
- Macrolides : clindamycine
- Fluoroquinolones : moxifloxacin

Du fait du profil de résistance naturelle des *Bacteroides* du groupe *fragilis* décrite ci-après, le traitement probabiliste des infections pouvant impliquer les *Bacteroides* du groupe *fragilis* et germes aérobies-anaérobies facultatifs associés, repose sur l'utilisation d'une β lactamine associée à un inhibiteur de pénicillinases en monothérapie, ou d'une céphalosporine de 3^{ème} génération associée au métronidazole.

c. Résistances naturelles

Les *Bacteroides* du groupe *fragilis* sont naturellement résistants à plusieurs familles antibiotiques.

Résistance aux aminosides : comme toutes les bactéries anaérobies strictes, les *Bacteroides* présentent une résistance naturelle aux aminosides du fait de l'absence de chaîne respiratoire membranaire. En effet, la chaîne respiratoire est nécessaire pour permettre le transport actif des aminosides dans les cellules bactériennes, au travers de la membrane cytoplasmique. Sans elle, les molécules ne peuvent atteindre leur cible ribosomale.

Résistance naturelle aux β lactamines : spécifique du genre *Bacteroides*, la quasi-totalité des souches sont résistantes aux aminopénicillines, aux céphalosporines de 1^{ère}, 2nd (céfamandole et céfuroxime) et 3^{ème} génération. Ceci est le fait de la production d'une β -lactamase, chromosomique codée par *cepA*. Cette enzyme est particulière : il s'agit d'une céphalosporinase inhibée par les inhibiteurs de pénicillinases. Cette β -lactamase *cepA* appartient aux sérine- β -lactamases de classe A de la classification d'Ambler *et al.*, mais fait en revanche partie des céphalosporinases à spectre étendu de type 2E de la classification de Bush *et al.* Son activité est similaire à celle des cefuroximases retrouvées chez *Proteus vulgaris* (42). Il est à noter que *cepA* n'est pas systématiquement retrouvé dans le génome des bactéries du groupe *fragilis*. Il est présent chez 78,9 % à 90 % des *Bacteroides* du groupe *fragilis* en Europe et son taux d'expression n'est pas corrélé à la CMI (36,43,44).

Hétérogénéité de la résistance aux antibiotiques au sein du groupe *fragilis* : le profil de sensibilité aux antibiotiques n'est pas homogène au sein des espèces du groupe *Bacteroides fragilis*, comme le rapporte le **Tableau 6** issu de l'étude de Snyderman *et al.* (2010) faite sur plus de 1000 isolats de *Bacteroides* du groupe *fragilis*. On constate notamment que les CMI₅₀ et CMI₉₀ de l'espèce *B. fragilis* pour l'association pipéracilline-tazobactam sont plus faibles de deux à quatre dilutions par rapport à celles des autres espèces. Ce constat est également visible avec les CMI₅₀ de *B. vulgatus* pour la moxifloxacine qui se situent deux à quatre dilutions au-dessus de celles des autres membres du groupe. Ces variations de sensibilités sont également rapportées dans d'autres études (13,45). Les pourcentages de résistance

aux antibiotiques en fonction des espèces sont également des indicateurs de l'hétérogénéité des sensibilités : le pourcentage de résistance à la céfoxitine varie entre 4,1 % des isolats testés pour *B. fragilis* à 17,9 % pour *B. ovatus*. De même, la résistance aux carbapénèmes semble être plus élevée chez *B. uniformis* avec 1,7% des isolats testés résistants contre une quasi-absence de résistance dans les autres espèces.

Tableau 6 : Sensibilités de 1 218 *Bacteroides* du groupe *fragilis* isolés de 2005 à 2007 aux États-Unis d'après Snyderman *et al.* (2010)

Espèce (Nombre d'isolats)	FOX	TZP	IMP	MEM	CLI	MOX
<i>Bacteroides fragilis</i> (650)						
CMI gamme (mg/mL)	2–128	<0,25 –>128	0,125–>16	<0,125–1	<0,5–>128	0,125–64
CMI ₅₀ (mg/mL)	16	0,5	0,25	0,25	1	1
CMI ₉₀ (mg/mL)	32	2	0,5	1	128	16
Résistance, (%)	4,1	0,6	0,3	1,2	23,9	32,1
<i>Bacteroides ovatus</i> (133)						
CMI gamme (mg/mL)	8–128	0,5–32	<0,125–8	<0,125–8	<0,5–>128	0,5–128
CMI ₅₀ (mg/mL)	32	4	0,25	0,25	2	4
CMI ₉₀ (mg/mL)	64	8	1	1	>128	32
Résistance, (%)	17,9	0	0	0	45,5	38,8
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (290)						
CMI gamme (mg/mL)	4–>128	0,5–>128	<0,125–8	<0,125–8	<0,5–>128	0,25–64
CMI ₅₀ (mg/mL)	32	8	0,25	0,25	4	2
CMI ₉₀ (mg/mL)	32	16	1	1	>128	32
Résistance, (%)	6,8	0,6	0	0	39,8	33
<i>Bacteroides uniformis</i> (58)						
CMI gamme (mg/mL)	2–64	0,5–16	0,25–16	0,125–32	0,5–128	0,5–128
CMI ₅₀ (mg/mL)	16	2	0,25	0,25	4	8
CMI ₉₀ (mg/mL)	32	8	1	1	>128	32
Résistance, (%)	10,2	0	1,7	1,7	49,2	40,7
<i>Bacteroides vulgatus</i> (87)						
CMI gamme (mg/mL)	2–64	0,5 –>128	<0,125–8	0,125–4	<0,5–128	0,25–128
CMI ₅₀ (mg/mL)	8	4	0,5	0,5	1	16
CMI ₉₀ (mg/mL)	32	16	2	2	>128	64
Résistance, (%)	7,4	1,1	0	0	42,6	56,4

Sensibilités interprétées selon les valeurs critiques du CLSI – FOX : céfoxitine, TZP : pipéracilline-tazobactam, IMP : imipénème, MEM : méropénème, CLI : clindamycine, MOX : moxifloxacine

d. Résistances acquises aux antibiotiques

Des résistances aux antibiotiques de première ligne, tel le métronidazole ou la clindamycine, ont été observées depuis plusieurs années. Il en est de même pour les antibiotiques de seconde intention comme les carbapénèmes. Les principaux gènes de résistance aux pénicillines, macrolides, métronidazole, quinolones et tétracyclines sont colligés dans le **Tableau 7**.

Résistance aux β lactamines. Les β lactamines actives sur les germes anaérobies jouent un rôle majeur dans la prise en charge de ces infections du fait de leur large spectre incluant les germes aéro-anaérobies facultatifs associés qui sont résistants au métronidazole. Du fait de leur résistance naturelle aux céphalosporines, les pénicillines avec inhibiteurs de pénicillinases ou les carbapénèmes seront les β lactamines recommandées pour les *Bacteroides* du groupe *fragilis*. Ces molécules bactéricides ont pour cible d'action la paroi bactérienne en inhibant la synthèse du peptidoglycane.

En plus du gène *cepA*, qui est naturellement associé au genre *Bacteroides*, d'autres gènes de résistance aux β lactamines peuvent être acquis. Le gène *cfxA*, confère une résistance à la céfoxitine et aux aminopénicillines de haut niveau, il était présent chez 17 % des *Bacteroides* spp. en Europe en 2006. Le gène *cfiA* est à l'origine de la résistance aux carbapénèmes par production d'une métalloenzyme, β lactamase de classe B, échangeable par séquence d'insertion. Il est présent chez 1 à 5 % des *B. fragilis* en Europe. Ces deux gènes confèrent des résistances enzymatiques aux β lactamines (11).

Résistance aux MLS (Macrolides Lincosamides Streptogramines). Les macrolides sont des molécules bactériostatiques de haut poids moléculaire. Ils inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien.

Les résistances aux macrolides ont été largement étudiées et de nombreuses familles de gènes de résistance sont connues. Chez les *Bacteroides* spp., les gènes fréquemment rencontrés dans la résistance aux macrolides sont : *ermF*, *linA*, *mefA* et la famille *msr*. Ces gènes sont responsables de résistance via divers mécanismes : l'efflux grâce à des pompes (*mefA*, *msr*), la modification de cible par méthylation ribosomale modifiant le site de fixation des macrolides (*ermF*) ou encore la dégradation enzymatique des macrolides (*linA*) (46). Les gènes *ermF* et *linA* sont les gènes principalement retrouvés dans le cas des résistances aux macrolides chez *Bacteroides*

fragilis. Les macrolides, et notamment la clindamycine, ont été largement utilisés pour traiter les infections à germes anaérobies dès les années 1950. Les résistances sont aujourd'hui très répandues en Europe, où plus de 30 % des souches de *B. fragilis* possèdent un mécanisme de résistance à la clindamycine (45). La résistance à la clindamycine peut être observable sur l'antibiogramme dans certains cas uniquement après 48h d'incubation. Une lecture précoce risque d'engendrer le rendu d'une fausse sensibilité (36).

Résistance au métronidazole. Le métronidazole est l'antibiotique de référence à activité anti-anaérobies. Il s'agit d'une prodrogue qui est activée grâce à des donneurs d'électrons intracellulaires présents uniquement chez les bactéries anaérobies et chez certains protozoaires. Les dérivés actifs du métronidazole ont pour cible l'ADN bactérien. Ils entraînent des ruptures simples et doubles brins qui perturbent sa réplication, ce qui va conduire à la mort cellulaire bactérienne.

Les résistances au métronidazole sont rares mais semblent en augmentation depuis le début des années 1980. Elles représentaient 1 à 4 % des souches de *Bacteroides* du groupe *fragilis* en Europe en 2010, en fonction des études (45,47), contre une quasi absence au début des années 1980 (48). Plusieurs mécanismes sont connus : pompes d'efflux et nitroréduction. Dans certains cas, aucun mécanisme n'a encore été identifié. De manière générale, la résistance *via* les gènes *nim A-I*, est la plus fréquente. Cette famille de gènes est à l'origine de la synthèse d'une enzyme nitro-imidazole réductase, capable de réduire les groupes nitrés et ainsi de les rendre non toxiques (49). Ces gènes peuvent être chromosomiques ou plasmidiques, et donc échangeable de *Bacteroides* à *Bacteroides*. Ils sont proches les uns des autres avec plus de 70 % d'homologie. Il est également à noter, que plusieurs études ont mis en évidence que la présence de gène *nim* dans le génome des *Bacteroides* spp. n'était pas systématiquement synonyme d'augmentation des CMI au métronidazole (50).

Résistance aux fluoroquinolones. Les quinolones ont pour cible d'action l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Leur mécanisme d'action est l'inhibition de ces enzymes, ce qui entraîne des erreurs de réplication et un fort taux de mutation sur l'ADN. Seul la moxifloxacin a une activité importante sur les germes anaérobies. En 2006, les résistances aux quinolones en Europe, notamment à la moxifloxacin dépassaient les 10 %. Plusieurs mécanismes sont en cause : i) la mutation de cible (mutation au niveau de *gyrA*), II) les pompes d'efflux (par exemple présence de *bexA* codant pour une pompe de type MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*)). A

noter que chez *B. thetaiotaomicron*, l'hyperexpression de *bexA* est constitutif et confère une résistance naturelle bas niveau aux fluoroquinolones (11,13). Le gène *bexA* peut également être retrouvé chez d'autre espèce.

Résistance aux tétracyclines. Les tétracyclines sont des molécules qui ont été largement utilisées dans les années 1950 à 1970. Leur cible d'action est le ribosome où elles empêchent l'élongation de l'ARN. Des gènes résistances aux tétracyclines sont également connus. Dans le groupe *fragilis*, elles sont principalement dues à *tetQ*, qui confère une protection ribosomale empêchant la liaison de la molécule à son site ribosomal (13).

Tableau 7 : Gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques dans le groupe *B. fragilis*.

Gènes	Molécules principalement touchées	Mécanismes	Sources
<i>cfxA</i>	Céfoxitine	Enzymatique <i>Céphalosporinase</i>	(51)
<i>cfiA</i>	Carbapénèmes	Enzymatique <i>Métalloenzyme</i>	(51)
<i>cepA</i>	Pénicillines A Céphalosporines	Enzymatique <i>Céphalosporinase</i>	(44)
<i>ermB, ermF, ermG</i>	MLS	Méthylation de la cible ribosomale (ARN 23s ou 50s)	(46)
<i>linA</i>	MLS	Enzymatique <i>O-nucleotidyltransférase</i>	(46)
<i>mefA, msrSA</i>	MLS	Efflux : pompe	(46)
<i>nim</i>	Métronidazole	Enzymatique <i>5-nitroimidazole réductase</i>	(49)
<i>bexA</i>	Quinolones	Efflux : pompe MATE	(43)
<i>gyrA</i>	Quinolones	Modification de cible : Mutation de <i>GyrA</i>	(52)
<i>tetQ</i>	Tétracycline	Protection ribosomale	(13)

MLS : Macrolides Lincosamides Streptogramines

E. METHODES D'EVALUATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES GERMES ANAEROBIES

1. Définitions

L'antibiogramme est une méthode qualitative, qui permet de déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées en culture pure. Cet outil est essentiel en médecine anti-infectieuse car il permet d'optimiser les traitements antibiotiques et de les adapter en cas de résistance.

Quelle que soit la méthode, l'antibiogramme a pour objectif d'évaluer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'un ou plusieurs antibiotiques sur un isolat bactérien. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique inhibant la croissance bactérienne dans des conditions d'inoculum et de culture standardisées. Si on s'intéresse à une collection de souches, la CMI₅₀ est la concentration minimale inhibitrice médiane et la CMI₉₀ la concentration d'antibiotique qui inhibe la croissance de 90 % des souches. Les méthodes actuellement utilisées dans les laboratoires pour évaluer la CMI d'une souche vis à vis d'un antibiotique sont la diffusion en milieu solide (disques ou bandelettes chargées d'un gradient d'antibiotique) et la microdilution en milieu liquide.

Après mesure de CMI, il est possible de définir si les souches sont sensibles (S), sensibles à forte posologie (I) ou résistantes (R) en fonction des concentrations critiques définies par des données PK/PD et d'efficacité clinique. Ces techniques fournissent donc un résultat qualitatif (S, I, R) à partir de données quantifiables (CMIs approchées en milieu liquide ou par méthode de E-test, ou diamètre d'inhibition par la méthode de diffusion en gélose).

Différentes méthodes existent pour mesurer la sensibilité aux antibiotiques. La méthode de référence pour les germes à croissance aérobie est la macrodilution en milieu liquide. Pour les germes anaérobies, il s'agit de la dilution en milieu gélosé solide. Ces méthodes de détermination des CMI ne sont pas utilisables en routine du fait de leur lourdeur, et des alternatives ont été développées. Pour la méthode de diffusion des disques en gélose, il s'agit des diamètres d'inhibition de croissance. Pour la microdilution en milieu liquide ou la méthode E-test, il s'agit de CMIs approchées. Dans tous les cas, comme pour toute méthode de mesure, les méthodes utilisées en routine sont soumises à des erreurs ou imprécisions qui doivent être connues.

2. Méthode de référence : la dilution en milieu solide

La technique utilisée comme référence pour les germes anaérobies est la dilution en milieu solide, inventée en 1959 par Edward Steers. Il s'agit d'une méthode manuelle de détermination de CMI en dilution en milieu solide. Cette technique est longue, fastidieuse et ne peut pas être réalisée en routine. Elle est essentiellement pratiquée par des centres de référence et à visées de recherche. La technique est la suivante : des géloses sont additionnées d'antibiotiques à des concentrations croissantes, pour constituer une gamme d'au moins dix dilutions par molécule à tester. Chaque boîte est ensuite inoculée avec un ensemenceur multiple de type Steers où 30 à 100 souches pourront être évaluées en simultanée, en fonction du modèle d'ensemenceur. La lecture se fait gélose par gélose et la CMI est définie à la première gélose où la croissance bactérienne disparaît (53).

L'inconvénient majeur de cette technique est le temps de réalisation : les géloses enrichies en antibiotique sont préparées manuellement, extemporanément et une dizaine de boîtes de pétri seront nécessaires pour l'évaluation de chaque molécule. L'avantage réside dans la capacité de tester plusieurs dizaines de souches par gélose grâce à l'ensemenceur multiple.

3. Méthodes corrélées à la méthode de référence

Plusieurs techniques pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques sont utilisées dans les laboratoires de microbiologie en routine. Deux techniques seront développées dans cette thèse : l'antibiogramme par diffusion et les CMI par microdilution en milieu liquide.

a. Diffusion en milieu gélosé

Cette méthode est simple et manuelle. Elle consiste à déposer des disques imprégnés d'une molécule antibiotique sur une gélose préalablement inoculée avec une suspension bactérienne calibrée. Après une incubation à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, le profil de sensibilité aux antibiotiques est ensuite déterminé en mesurant le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne autour des disques. Ils sont interprétés selon des diamètres critiques de référence définis par le CA-SFM/EUCAST (36).

Cette technique a pour avantage d'être peu coûteuse et facilement réalisable en routine de laboratoire. Sa limite principale est la lecture qui est dépendante du lecteur et de la qualité de l'inoculum bactérien initial. La diffusion est la technique utilisée en première intention au CHU de Caen pour les germes anaérobies.

b. Microdilution en milieu liquide

Les techniques de mesure des CMI par microdilution en milieu liquide sont considérées comme plus précises et sont relativement récentes pour les anaérobies. Elles peuvent être manuelle ou semi-automatique si la lecture se fait par spectrophotométrie ou turbidimétrie. Les antibiotiques sont dilués dans du bouillon de culture dans des plaques de 96 puits. L'inoculation se fait avec des suspensions bactériennes calibrées et la lecture est réalisée à 24 ou 48h d'incubation. La CMI est définie par le premier puits qui ne présente pas de croissance bactérienne pour la molécule. Les plaques utilisées pour la pratique courante sont des plaques commercialisées, permettant de balayer un panel réduit, mais ciblé de molécules utilisables en médecine. La lecture peut être simplifiée grâce à l'utilisation de lecteur de plaque.

L'avantage de cette technique est la facilité de lecture des CMI, plus franche que la lecture de diamètre par la technique de diffusion. Le principal inconvénient est le coût de cette technique, faisant que seules les souches présentant des résistances ou un profil inhabituel seront testées avec cette méthode. Les méthodes en microdilution ne sont à l'heure recommandées que pour tester les *Bacteroides* du groupe *fragilis* et sont considérées comme équivalentes à la méthode de dilution en milieu gélosé par le CLSI.

c. E-test

La méthode consiste à déposer une bandelette chargée en antibiotique, dont le gradient de concentration augmente sur sa longueur, sur une gélose préalablement inoculée comme pour un antibiogramme par diffusion de disques. La CMI est lue à 48 h (CASFM) et correspond au point de contact entre la bandelette et la base de l'ellipse de croissance du film bactérien.

4. Recommandations actuelles pour la réalisation de l'antibiogramme des *Bacteroides* spp.

Deux référentiels principaux sont utilisés pour définir les bonnes pratiques de réalisation et d'interprétation des antibiogrammes. En France, jusqu'à 2013, le référentiel national était celui du CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie). A partir de 2014, le CA-SFM a adopté le référentiel européen de l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*),

avec certaines adaptations devenant le CA-SFM-EUCAST (36). Le second référentiel est le référentiel américain, le CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (54).

Il est à noter que les recommandations d'antibiogramme pour évaluer la susceptibilité des bactéries anaérobies strictes dispensées par le CA-SFM/EUCAST ont évolué entre l'année 2013 et 2020. En 2013, la liste standard et complémentaire de molécules à tester, pour les germes anaérobies, comprenait 21 molécules et a été réduite à 13 molécules en 2020 (https://resapath.anses.fr/resapath_uploadfiles/files/Documents/2013_CASFM.pdf). Ainsi, les céphalosporines, les macrolides sauf la clindamycine, le linézolide et une partie des pénicillines ont disparu. Des changements dans les charges des disques ont été également faits : pour le métronidazole, changement de 16 µg à 5 µg et pour la pipéracilline-tazobactam, changement de 75/10 µg à 30/6 µg. Pour le contrôle interne de qualité des méthodes utilisées, une souche de référence *B. thetaiotaomicron* (ATCC 79741) est recommandée et des valeurs cibles de sensibilité aux antibiotiques définies. Les valeurs seuils pour la cefoxitine ont par ailleurs disparu entre les deux versions et celles de l'imipénème ont été remaniées avec une réduction de la CMI critique haute passant de 8 à 4 mg/L.

La liste des molécules présentée dans le **Tableau 8** est celle applicable à toutes les bactéries anaérobies, Gram positif et négatif confondu. Dans le cas des *Bacteroides* du groupe *fragilis*, l'amoxicilline et la vancomycine ne sont pas des antibiotiques dont le résultat est nécessaire.

Recommandations du CLSI : Le référentiel américain définit deux techniques d'antibiogramme applicables aux bactéries anaérobies : la dilution en milieu solide et la microdilution en milieu liquide. Les recommandations sont les suivantes :

- la dilution en milieu gélosé pour tous les anaérobies en utilisant une gélose *Brucella* additionnée d'hémine (5 µg/mL), de vitamine K1 (1 µg/mL), et de 5 % de sang de mouton laqué
- pour le groupe des *Bacteroides fragilis* uniquement, le CLSI recommande la microdilution en milieu liquide avec le bouillon *Brucella* supplémenté d'hémine (5 µg/mL), vitamine K1 (1 µg/mL), et sang de mouton laqué (5 % v/v).

L'inoculum est réalisé avec une suspension bactérienne équivalent à 0,5 McFarland pour obtenir 10⁵ UFC par spot en dilution en gélose et 10⁶ UFC/mL en microdilution en milieu liquide. La durée d'incubation est de 46 à 48h pour la microdilution et de 42 à 48h pour la dilution en milieu solide à 36°C ± 1°C, en atmosphère anaérobie.

Recommandations actuelles du CA-SFM/EUCAST : Les recommandations européennes sont les mêmes que celles émises par le CLSI pour la microdilution en milieu liquide et la dilution en milieu solide.

Cependant, Le CA-SFM/EUCAST ne précise pas que la microdilution n'est applicable que sur le groupe *Bacteroides fragilis* et propose également la méthode par diffusion en milieu solide. Le milieu utilisé est la gélose *Brucella* additionnée de vitamine K1 (1 mg/L), d'hémine (5 mg/L) et de 5 % de sang de mouton. L'inoculum est de 1 McFarland en bouillon Schaedler ou *Brucella*. L'incubation se fait en atmosphère anaérobie à $35 \pm 2^\circ\text{C}$, 24 à $48 \pm 4\text{h}$. Pour la clindamycine, la lecture doit se faire après 48h d'incubation.

Les bactéries anaérobies sont des germes difficilement cultivables, nécessitant des milieux enrichis, une atmosphère contrôlée et un délai de croissance plus long. Aussi l'antibiogramme en sera tout autant complexifié.

Tableau 8: Liste des antibiotiques et charge des disques à tester pour les germes anaérobies, à Gram positif et négatif, selon le CA-SFM 2013 et 2020

CASFM 2013		CASFM/EUCAST 2020	
Molécules	Charge (µg)	Molécules	Charge (µg)
Standards			
Amoxicilline	25	Amoxicilline	25
Amoxicilline-clavulanate	20/10	Amoxicilline-clavulanate	20/10
Imipénème	10	<u>Pipéracilline-tazobactam</u>	<u>30/6</u>
Céfoxitine	30	Imipénème	10
Métronidazole	16	<u>Métronidazole</u>	<u>5</u>
Clindamycine	2	Clindamycine	2
Vancomycine	30	Moxifloxacine	5
		Vancomycine	30
Complémentaires			
Ticarcilline ou Pipéracilline	75		
Ticarcilline / clavulanate	75/10		
ou			
Pipéracilline / tazobactam	75/10		
Céfotaxime	30	Ertapénème	10
Spiramycine	100	Tigécycline	15
Pristinamycine	15	Linézolide	30
Tigécycline	15	Rifampicine	30
Linézolide	30	Chloramphénicol	30
Chloramphénicol	30		
Colistine	10		
Ofloxacine	5		
Moxifloxacine	5		
Rifampicine	30		

OBJECTIFS

Face à l'augmentation croissante de la résistance aux antibiotiques des bactéries anaérobies, la caractérisation précise du profil de susceptibilité des isolats *in vitro* et la mise en évidence des mécanismes impliqués sont indispensables pour adapter l'antibiothérapie de façon optimale et surveiller leurs évolutions.

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer la fiabilité des méthodes d'antibiogrammes facilement réalisables en routine au laboratoire, sur une collection d'isolats cliniques européens de *Bacteroides* du groupe *fragilis* ayant acquis un ou plusieurs mécanismes de résistance en comparaison à la méthode de référence, la dilution en milieu solide de type Steers. Les différentes méthodes évaluées étaient : i) la diffusion sur milieu solide, ii) la microdilution en milieu liquide, avec l'évaluation de deux kits commerciaux, le Sensititre™ ANAERO3 (ThermoFisher Scientific, USA) et le Micronaut-S™ Anaerobes MIC (Bruker, Allemagne). Les catégories cliniques (S/I/R) de chaque antibiotique pour chaque souche ont été ensuite comparées aux résultats obtenus par la méthode de référence en utilisant la méthode des taux de concordance.

Les objectifs secondaires étaient de décrire l'épidémiologie clinique et le niveau de résistance actuel des *Bacteroides* du groupe *fragilis* isolés au CHU de Caen, et d'évaluer la corrélation génotype-phénotype de la résistance sur la collection de souche européenne utilisée.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

A. ÉPIDÉMIOLOGIE CLINIQUE ET RESISTANCE ACTUELLE DES *BACTEROIDES* DU GROUPE *FRAGILIS* AU CHU DE CAEN

Une extraction informatique de tous les *Bacteroides* du groupe *fragilis*, isolés au laboratoire de microbiologie du CHU de Caen sur les années 2018 et 2019, a été faite via le logiciel TD NexLabs® (TechniData, France). Les espèces, les infections associées et le profil de sensibilité des isolats ont été colligés afin de déterminer l'épidémiologie globale du CHU. La sensibilité des souches était évaluée en routine par la méthode de diffusion en milieu solide et interprétée selon les valeurs du CA-SFM de 2013. Les données de sensibilité pour les associations amoxicilline-acide clavulanique et pipéracilline-tazobactam ainsi que pour le métronidazole, la clindamycine et l'imipénème ont été relevées.

B. COLLECTION DE SOUCHES

Pour évaluer au mieux la fiabilité des méthodes testées, une sélection de souches cliniques résistantes a été constituée au CHU de Caen. Plusieurs souches ont été envoyées par les centres hospitaliers universitaires de Toulouse, Strasbourg, Groningen (Pays-Bas) et Odense (Danemark). Les souches étaient conservées à -80°C en bouillon glycérolé. Les isolats sélectionnés pour ce travail étaient des *Bacteroides* du groupe *fragilis*, ayant des résistances acquises à au moins une classe antibiotique (métronidazole, macrolide, pénicilline avec inhibiteur de pénicillinases ou carbapénème). Au total, 54 souches cliniques de *Bacteroides* du groupe *fragilis* ont été testées pendant cette thèse. La collection de souches était ainsi composée de 41 *B. fragilis*, 7 *B. thetaiotaomicron*, 3 *B. vulgatus*, 2 *B. ovatus*, 1 *B. salyersiae* et 1 *B. uniformis*.

La souche de contrôle utilisée était l'ATCC 25285 de *Bacteroides fragilis*. Cette souche nous a permis de valider la reproductibilité de nos antibiogrammes. Elle a également été utilisée comme témoin négatif pour la caractérisation génétique de la collection. En effet, cette souche possède uniquement un gène de résistance *cepA* produisant une céphalosporinase de faible activité, sans autre gène de résistance associé (55).

Les souches ont été envoyées par les laboratoires détenteurs dans des milieux de transport protégeant les germes anaérobies. Les kits utilisés étaient : eSwab™

Regular (Copan, Italie) ou Sigma Transwab™ (MWE, Royaume-Uni). Tous les envois ont été réceptionnés dans les 48h. Au laboratoire du CHU de Caen, les écouvillons de transport étaient déchargés sur des géloses Columbia et incubés 24 à 48h en atmosphère anaérobie. Après confirmation de l'identification, les souches ont été souchées et conservées en BHI glycérolé à -80°C.

Certaines souches transmises (Laboratoires Danois et Hollandais) étaient déjà caractérisées en matière de gènes de résistance aux antibiotiques (*cepA*, *cfxA*, *cfiA*, *ermF*, *ermB*, *mefA*, *nim*). Ces souches nous ont servi de témoins positifs lors des PCR d'identification des gènes de résistances. Les profils génétiques de ces souches sont présentés dans l'**Annexe 1**.

C. CULTURE DES SOUCHES DE *B. FRAGILIS*

1. Milieux de culture

Les souches de *Bacteroides* ont été systématiquement repiquées à partir des aliquots congelés sur gélose au sang Columbia. Pour la réalisation des antibiogrammes, les milieux *Brucella*, gélose et bouillon et Wilkins-Chalgren en bouillon ont été utilisés selon les recommandations du CASFM ou des industriels pour la microdilution en milieu liquide (Sensititre™ et Micronaut-S™).

2. Anaérobiose

La culture en anaérobiose a été réalisée en jarres hermétiques et transparentes (Mart Microbiology BV, Pays-Bas). Un mélange de gaz est injecté dans les jarres par l'Anoxomat® Mark II (modèle AN2CTS, Mart Microbiology BV, Pays-Bas).

Le système Anoxomat® est un système simple, rapide et efficace, capable de créer des atmosphères à taux réduit en oxygène. Le principe est le suivant : les cultures sont introduites dans une jarre hermétique dans un portoir de rangement avec un catalyseur. Une fois la jarre convenablement fermée, l'Anoxomat® est relié à une valve présente sur le couvercle de la jarre via un tuyau transportant les gaz. Différents modèles de portoirs existent afin de pouvoir contenir des boîtes rondes, carrées ou encore des plaques de culture.

Dans un premier temps, l'automate fait le vide dans la jarre afin de réduire le taux d'oxygène. Dans un second temps, il injecte un mélange de gaz prédéfini. Le mélange utilisé est composé de : 0,2 % d'O₂, 5 % de CO₂, 9,9 % de H₂ et 84,9 % de N₂. Ce cycle vide-remplissage est répété trois fois afin d'assurer un taux minimal en oxygène.

Des tests de qualité d'étanchéité et de catalyse sont effectués par l'automate et des tests d'anaérobiose sont faits manuellement avec des bandelettes de contrôle (Anaer Indicator®, bioMérieux, France). Le catalyseur a pour rôle d'éliminer les traces d'oxygène et de maintenir le taux d'oxygène faible. Il s'agit de sachet de granules de palladium réagissant avec l'oxygène. Il doit être régénéré après chaque utilisation par chauffage à 100°C pendant une heure.

D. METHODE D'IDENTIFICATION BACTERIENNE

Toutes les identifications ont été confirmées par technologie MALDI-TOF MS Microflex (Bruker, Allemagne) dès le premier repiquage. Cette technologie permet une identification rapide et simple des isolats en trois étapes : l'ionisation des protéines bactériennes par un laser, l'analyse des fragments protéiques ionisés par spectrophotométrie de masse et enfin l'analyse du spectre obtenu.

Les souches pures de *Bacteroides* spp. ont été déposées sur les cibles d'une plaque d'identification MALDI-TOF MS puis recouverte d'une solution appelée "matrice". La matrice, une fois cristallisée, permet d'assurer l'ionisation des protéines bactériennes lorsque le laser vient frapper le dépôt. Les fragments protéiques ionisés obtenus sont ensuite analysés par un spectrophotomètre de masse qui établit un spectre protéique en fonction de la masse et la charge des fragments ionisés (m/z). L'identification est obtenue par comparaison informatique automatisée du spectre obtenu à ceux d'une bibliothèque de spectre d'espèces bactériennes (56). Le système Bruker fournit alors un score qui permet d'évaluer la fiabilité de l'identification bactérienne obtenue.

Cette technique est simple, mais nécessite des souches fraîches en culture pure. Pour chaque souche, l'identification a été faite jusqu'au rang de l'espèce avec un score répétable et supérieur à 2.

E. DETECTION DES GENES DE RESISTANCES PAR AMPLIFICATION GENIQUE (PCR)

La recherche des gènes de résistance à différentes familles antibiotiques a été réalisée par amplification génique ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR) en point final puis révélation par migration sur gel d'agarose.

1. Gènes recherchés et amorces

Une liste non-exhaustive des gènes de résistance connus chez les *Bacteroides* spp. a été recherchée. Ces gènes correspondent à ceux principalement retrouvés dans ce genre en Europe et dont l'augmentation est observée depuis plusieurs années. Des amorces spécifiques à chaque gène ont été choisies d'après l'étude de Eitel et *al.* réalisé en 2013 (43). Au total 11 gènes de résistance ont été recherchés, touchant les β lactamines (*cepA*, *cfxA*, *cfiA*), les macrolides (*msrSA*, *mefA*, *linA*, *ermB*, *ermF*, *ermG*), le métronidazole (*nim*) et les quinolones (*bexA*). Le gène *msrSA* appartient à la famille de pompe d'efflux *msr* notamment retrouvée chez les *Staphylococcus* spp. Il présente une forte homologie avec les autres allèles de la famille *msr*. La séquence des amorces et les programmes d'amplification sont présentés dans l'**Annexe 2**.

Les amorces utilisées étaient spécifiques des gènes recherchés à l'exception des amorces du gène *nim* où un unique couple a été utilisé pour détecter ses différents allèles. Pour vérifier la capacité de ces amorces à s'hybrider avec les gènes *nim*, un alignement des séquences nucléotidiques des 14 allèles de *nim* (*nim A* à *J*), décrit dans la base de données *Center for Genomic Epidemiology*, a été fait contre les amorces utilisées. Le résultat de l'alignement pour chaque allèle est présenté dans le **Tableau 9**. On constate que le couple d'amorces ne s'hybride pas ou très peu avec les allèles *nimJ*, *nimC*, *nimD* ainsi qu'un variant de *nimE*.

**Tableau 9 : Résultats de l'alignement des différents gènes *nim* avec les amorces
« universelles »**

**Alignement avec BLAST® de l'amorce en sens *forward* avec les séquences nucléotidiques des
14 allèles de *nim***

Gène	Référence	Maximum Score	Total Score	Couverture	Expert Value	Identité (%)
<i>nimE</i>	AJ244018	48.1	48.1	92%	4,00E-10	100.00
<i>nimE</i>	AJ515145	48.1	48.1	92%	4,00E-10	100.00
<i>nimH</i>	KX576455	48.1	62.4	100%	4,00E-10	100.00
<i>nimI</i>	FJ940883	48.1	91.2	92%	4,00E-10	100.00
<i>nimI</i>	FJ940884	48.1	91.2	92%	4,00E-10	100.00
<i>nimI</i>	FJ940886	48.1	91.2	92%	4,00E-10	100.00
<i>nimI</i>	FJ940887	48.1	91.2	92%	4,00E-10	100.00
<i>nimI</i>	FJ940889	48.1	91.2	92%	4,00E-10	100.00
<i>nimA</i>	X71444	40.1	54.5	76%	1,00E-07	100.00
<i>nimE</i>	AM042593	38.2	38.2	88%	4,00E-07	95.65
<i>nimB</i>	X71443	32.2	46.6	100%	2,00E-05	91.67
<i>nimD</i>	X76949	32.2	46.6	92%	2,00E-05	91.67
<i>nimC</i>	X76948	20.3	51.0	96%	0.090	100.00
<i>nimJ</i>	NZ_JH815495	20.3	53.0	57%	0.090	92.86

**Alignement avec BLAST® de l'amorce en sens *reverse* avec les séquences nucléotidiques des
14 allèles de *nim***

Gène	Référence	Maximum Score	Total Score	Couverture	Expert Value	Identité (%)
<i>nimE</i>	AJ244018	30.2	30.2	100%	8,00E-05	91.30
<i>nimE</i>	AJ515145	30.2	44.6	100%	8,00E-05	91.30
<i>nimH</i>	KX576455	30.2	44.6	100%	8,00E-05	91.30
<i>nimI</i>	FJ940889	30.2	64.9	100%	8,00E-05	91.30
<i>nimA</i>	X71444	24.3	24.3	86%	0.005	90.00
<i>nimI</i>	FJ940883	22.3	57.0	100%	0.019	93.33
<i>nimI</i>	FJ940884	22.3	57.0	100%	0.019	93.33
<i>nimI</i>	FJ940886	22.3	57.0	100%	0.019	93.33
<i>nimI</i>	FJ940887	22.3	57.0	100%	0.019	93.33
<i>nimB</i>	X71443	20.3	20.3	60%	0.075	92.86
<i>nimJ</i>	NZ_JH815495	16.4	30.7	65%	1.2	100.00
<i>nimD</i>	X76949	14.4	14.4	30%	4.6	100.00
<i>nimC</i>	X76948	-	-	-	-	-
<i>nimE</i>	AM042593	-	-	-	-	-

Maximum Score : le score d'alignement entre les séquences le plus élevé, calculé en prenant en compte les concordances entre les nucléotides, les *mismatches* et les *gaps*.

Total Score : la somme des scores d'alignement de tous les segments d'une même séquence de sujets.

Couverture : le pourcentage de la longueur de la séquence nucléotidique qui est incluse dans les segments alignés.

Expert value : Test statistique de probabilité d'alignement des séquences. La valeur E devrait être très proche de zéro.

Identité : pourcentage d'identité le plus élevé entre segments alignés.

2. Extraction de l'ADN bactérien

L'ADN bactérien a été extrait avec la solution InstaGene Matrix™ (Bio-Rad, États-Unis). Des colonies, préalablement cultivées 24 h sur gélose Columbia, ont été mises dans 200 µl de solution InstaGene™ en microtubes *DNAfree*. Les tubes ont été placés 30 à 45 minutes au bain-marie à 56°C puis 8 minutes à 96°C. Une fois le chauffage terminé, les aliquots ont été centrifugés 1 minute à 14 000 tours/minute. Les surnageants ont été conservés à -20°C.

La quantification de la quantité d'ADN et la vérification de la qualité de l'extraction a été faite avec le Nanodrop One (ThermoFisher, États-Unis) pour chaque extrait.

3. PCR

Des PCR en point final ont été réalisées pour déterminer la présence des gènes d'intérêt. L'amplification a été faite avec le MasterMix *DreamTaq green* (ThermoFisher, États-Unis) contenant la *DreamTaq* ADN polymérase, des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTPs), du chlorure de magnésium et un tampon coloré en vert. La préparation du Mix final est rapportée dans le **Tableau 10**. Les réactions de PCR se sont déroulées selon les programmes décrits dans l'**Annexe 2** avec le thermocycleur T100™ de BioRad (États-Unis).

Tableau 10 : Mix pour PCR classique

Mix	Volume (1 échantillon)
Amorce <i>Forward</i> (20 µmol)	1 µL
Amorce <i>Reverse</i> (20 µmol)	1 µL
MasterMix <i>DreamTaq green</i> ™	6,25 µL
Eau <i>DNA free</i>	2,25 µL
Extrait d'ADN	2 µL
Total	12,5 µL

Une migration par électrophorèse des produits d'amplification a été ensuite réalisée sur gel d'agarose à 2 % tamponné par du TRIS Acétate EDTA (TAE) et additionné de bromure d'éthidium (BET). La lecture du gel se fait sous lumière ultraviolette. Le QuickLoad® 100bp DNA ladder (BioLabs, États-Unis) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Pour neuf des gènes recherchés, un témoin positif était inclus dans les séries de PCR. Pour deux des gènes (*linA* et *msrSA*), aucun témoin positif n'était disponible au laboratoire. Les produits d'amplification pour ces

deux gènes, ont été envoyés pour séquençage afin de confirmer leur présence. Les séquences des amplicons ont été comparées à la base de données « ResFinders » (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) pour confirmer l'identité des gènes.

F. METHODES D'ANTIBIOGRAMMES

La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée par quatre méthodes au cours de ce travail de thèse. La méthode en diffusion et deux méthodes de microdilution en milieu liquide ont été comparées à la méthode de référence. La liste des molécules évaluées varie d'une méthode à l'autre (**Figure 4**). Les méthodes industrielles de microdilution en milieu liquide sont pan-genre, certaines molécules ne présentent donc pas d'intérêt pour le genre *Bacteroides*. L'ampicilline ou amoxicilline, l'amoxicilline-acide clavulanique, la pipéracilline-tazobactam, l'imipénème, la clindamycine et le métronidazole sont les seules molécules communes aux quatre méthodes.

Figure 4 : Liste des molécules testées par chacune des méthodes

Antibiotiques	Diffusion (μ g)	Sensititre™ (μ g/mL)	Micronaut-S™ (μ g/mL)	Steers (μ g/mL)
Pénicilline G		0,06 - 8	0,06 - 8	
Amoxicilline ou Ampicilline	25	0,25 - 32	0,06 - 8	0,125 - 64
Amoxicilline/Acide clavulanique	20/10	0,25/12 - 32/16	0,5/ 0,25 - 64/32	0,125/0,06 - 64/32
Pipéracilline	75	16 - 128		0,5 - 256
Pipéracilline/Tazobactam	75/10	16/4 - 128/4	1/4 - 128/4	0,5/4 - 256/4
Ertapénème			0,125 - 16	
Imipénème	10	0,06 - 128	0,5 - 64	0,125 - 64
Meropenème			0,5 - 64	0,06 - 32
Cefoxitine	30	0,5 - 64		0,5 - 256
Clindamycine	2 UI	0,5 - 64	0,06 - 8	0,125 - 64
Erythromycine		1 - 128		
Métronidazole	16	0,5 - 32	0,25 - 32	0,125 - 64
Moxifloxacin		0,12 - 8	0,06 - 8	0,03 - 64
Vancomycine	30	2 - 8	2 - 8	
Tétracycline		2 - 16		
Doxycycline			0,125 - 16	
Tigécycline			1 - 8	
Chloramphénicol	30	2 - 16		0,25 - 64

Pour la diffusion, la charge des disques (μ g) est indiquée. Pour les autres méthodes, les gammes de concentration (mg/L) testées au sein des systèmes sont indiquées.

1. Méthode de référence : dilution en milieu solide par Steers

La dilution en milieu solide est la technique de référence pour la détermination de CMI des germes anaérobies recommandée par la FDA (*Food and Drug Administration*) et reprise par le CLSI et la CA-SFM/ EUCAST. Elle est utilisée par les centres de référence et permet d'évaluer avec fiabilité la sensibilité de plusieurs souches bactériennes simultanément. La technique est longue, toutes les géloses contenant des concentrations croissantes de chaque antibiotique sont tout d'abord préparées manuellement, chacune d'entre elle correspondant à un point de gamme (53).

Cette technique demande l'utilisation d'un ensemenceur multiple de type Steers (**Figure 5**). L'automate disponible au CHU est le modèle Denley Multipoint Inoculator (Denley, Angleterre). L'appareil est composé d'un bloc de tiges d'un diamètre de 2 mm et d'un moteur électrique commandé par une pédale.

Une impulsion sur la pédale va déclencher un cycle d'ensemencement en deux étapes. Dans un premier temps, les tiges vont plonger dans les cupules d'une plaque à 96 puits contenant chacune une suspension bactérienne différente calibrée à une densité optique de 0,5 McFarland. Dans un second temps, le bloc de tiges ira se positionner à la surface de la gélose pour déposer environ 1 µl de suspension bactérienne. L'opération est répétée pour chaque gélose à ensemer. Le bloc de tiges est stérilisé par bain d'éthanol et est flambé avant utilisation.

Les suspensions bactériennes (une par souche) ont été préparées en sérum physiologique à une densité optique de 0,5 McFarland, puis déposées dans une plaque de 96 puits en suivant un plan défini.

Les géloses ont été préparées extemporanément afin de réaliser une gamme de dilutions de dix points, soit dix géloses par antibiotique à tester. Les antibiotiques testés étaient l'amoxicilline, l'association amoxicilline-acide clavulanique, la pipéracilline, l'association pipéracilline-tazobactam, la céfoxitine, l'imipénème, le méropénème, la clindamycine, métronidazole et la moxifloxacin (**Figure 4**). Les solutions d'antibiotiques diluées de deux en deux en eau distillée ont été incorporées au 1/10^{ème} dans le milieu gélosé *Brucella* encore en fusion (56°C) pour obtenir les concentrations finales souhaitées.

Après refroidissement, les géloses ont été ensemencées par ordre croissant de concentration en antibiotiques. Entre chaque série de géloses additionnées en antibiotique, une gélose sans antibiotiques était ensemencée comme contrôle positif de croissance (**Figure 6**).

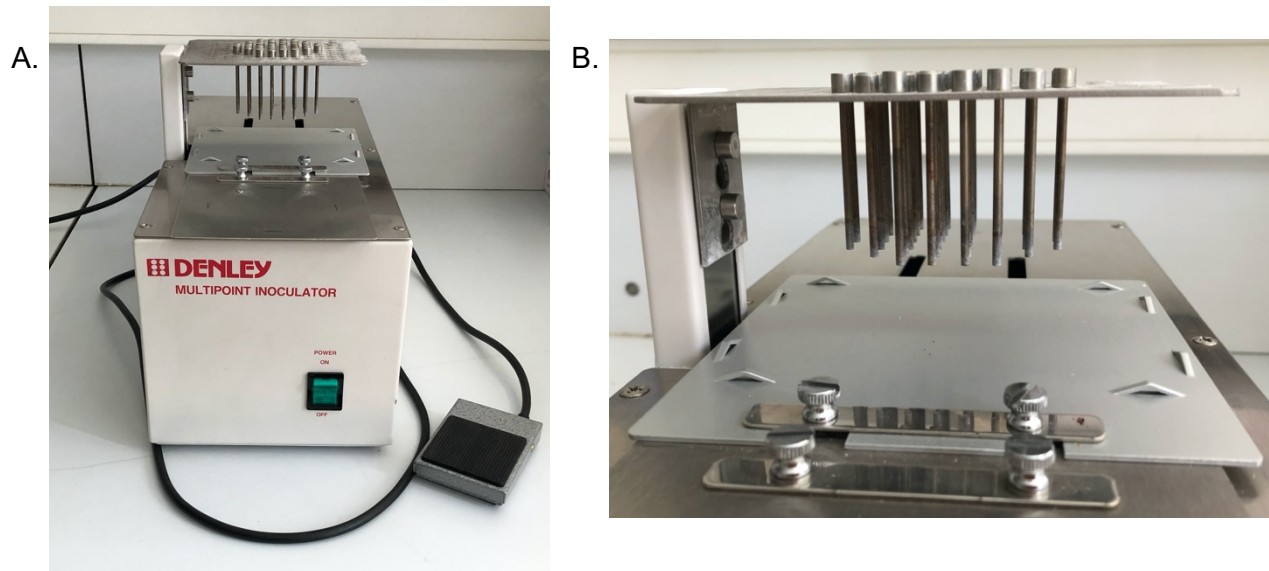


Figure 5 : Photos de l'ensemenceur multiple de type Steers utilisé au CHU de Caen.

A. Automate complet avec commande à pied. B. Bloc de tiges d'ensemencement.

La lecture a été faite après 48h d'incubation à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ en anaérobiose. La CMI correspondait pour chaque souche à la première concentration où la croissance bactérienne n'était pas visible.

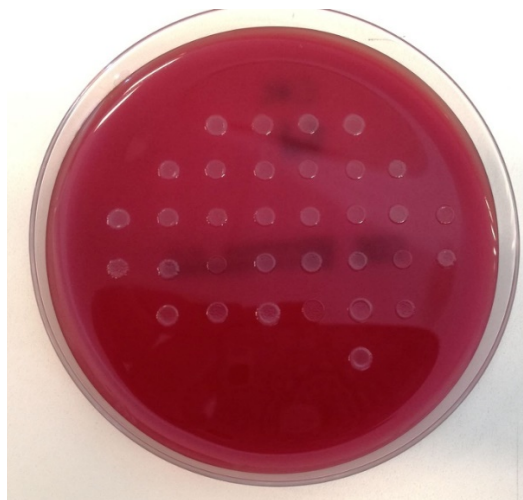


Figure 6 : Photo d'une gélose *Brucella* ensemencée par l'ensemenceur multiple de type Steers

Cette technique a donc été utilisée pour déterminer les CMI de référence de ces souches et pour les classer en catégories cliniques S/I/R. Les valeurs obtenues pour chaque couple souche/antibiotique ont également été comparées aux valeurs obtenues par microdilution en milieu liquide et ont servi de référence pour la comparaison génotype/phénotype de résistance.

2. Méthode de diffusion de disques en milieu solide

La méthode de diffusion en milieu solide consiste à déposer des disques imprégnés d'antibiotique (BioRad, France) à la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche bactérienne testée. Les molécules contenues dans les disques diffusent verticalement et horizontalement au sein de la gélose, créant un gradient de concentration. La sensibilité est évaluée par mesure du diamètre d'inhibition de croissance bactérienne autour des disques. La liste des antibiotiques et leur charge sont présentées dans la **Figure 4**.

L'antibiogramme a été réalisé sur gélose *Brucella* (BBA, bioMérieux, France) et incubé 48 h à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ en atmosphère anaérobie. L'inoculum bactérien, calibré à 1 McFarland en bouillon Schaedler a été uniformément réparti sur les géloses grâce à un écouvillon. Cinq géloses rondes, portant chacune trois disques, ont été utilisées pour un antibiogramme complet. Une figure de l'antibiogramme est visible en **Annexe 3**. La lecture des boîtes a été réalisée à 48 h d'incubation par le SIRscan (I2A, France) et vérifiée visuellement.

3. Microdilution en milieu liquide : méthode Sensititre™

Les plaques Sensititre™ ANAERO3 sont standardisées pour déterminer la CMI des germes anaérobies, Gram positif et négatif, à quatorze antibiotiques dont la liste est présentée en **Figure 4** et le plan de plaque en **Annexe 4**.

Le kit Sensititre™ se compose de plaques de 96 puits avec 95 puits de concentrations croissantes en antibiotique et d'un puits contrôle sans antibiotique. Le milieu de croissance est un bouillon *Brucella* (11 ml) prêt à l'emploi. La préparation a été faite selon les recommandations du fabricant. Brièvement, une suspension bactérienne calibrée à 0,5 McFarland a été réalisée en sérum physiologique puis diluée au 1/100^{ème} dans le bouillon *Brucella* (100 µl dans 11 ml de bouillon *Brucella*). Chaque puits a ensuite été ensemencé par 100 µl de bouillon préalablement inoculé à l'aide d'un distributeur automatique : AIM™ (ThermoFisher scientific, USA). La plaque a été couverte par un film de protection perforé. L'incubation a été réalisée en jarre anaérobie à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 48 h. La lecture des puits présentant une croissance bactérienne a ensuite été faite avec le lecteur de plaque Vizion® (Trek diagnostic systems, USA).

4. Microdilution en milieu liquide : Micronaut-S™

Les plaques Micronaut-S™ anaérobies permettent de déterminer la sensibilité à treize antibiotiques et sont utilisables pour les bactéries anaérobies à Gram positif et négatif. La liste des molécules testées est présentée en **Figure 4** et le plan de plaque en **Annexe 5**.

Les kits sont composés de plaques 96 puits et de bouillon Wilkins-Chalgren en tube de 11,5 ml. La préparation a été faite selon les recommandations du fournisseur. Après obtention d'une suspension bactérienne calibrée à 0,5 McFarland en sérum physiologique, 200 µl de cette suspension ont été ajoutés au bouillon Wilkins-Chalgren. La plaque a été ensemencée avec 100 µl de bouillon par puits et couverte par un film de protection perforé. La plaque a ensuite été incubée 48 h en atmosphère anaérobie. La lecture a été réalisée visuellement à 24 et 48 h, comme recommandé par le fabricant.

5. Tests complémentaires : mesure des CMI par E-tests

En cas de discordance entre les différentes méthodes, une mesure de la sensibilité de certaines souches a été déterminée également par bandelette E-test® (bioMérieux, France).

G. INTERPRETATION ET EVALUATION DES METHODES

Interprétation des valeurs mesurées avec les méthodes antibiogrammes.

Dans un premier temps, les résultats (diamètres d'inhibition ou CMI mesurées par microdilution en milieu liquide) ont été interprétés en catégories cliniques sensible (S), intermédiaire ou sensible à forte posologie (I) et résistante (R) selon les valeurs critiques du CA-SFM 2013 et du CLSI M100-S27 de 2017 (54). Pour la diffusion des disques en gélose, l'interprétation en catégorie clinique S/I/R a été réalisée selon les critères du CA-SFM/EUCAST qui est le seul à proposer des diamètres critiques pour les bactéries anaérobies (**Tableau 11**). L'imipénème a été interprété avec les valeurs critiques plus récentes du CA-SFM/EUCAST apparu dans la version 2019, à savoir R < 18 et S ≥ 24 mm pour les diamètres et S ≤ 2 mg/L et R > 4 mg/L pour les CMI.

Tableau 11 : Diamètres et concentrations critiques proposés le CA-SFM et le CLSI

Antibiotiques	CA-SFM 2013				CLSI M100 (2017)	
	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)		Concentrations critiques (mg/L)	
	≤ S	> R	≥ S	< R	≤ S	≥ R
Amoxicilline	0,5*	2*	-	-	0,5	2
Amoxicilline/ Acide clavulanique	4/2	8/2	21	17	4/2	16/8
Pipéracilline	16	16	18	18	32	128
Pipéracilline / Tazobactam	8/4	16/4	21	19 *	32/4	128/4
Imipénème	2	8 *	24	17 *	4	16
Méropénème	2	8	-	-	4	16
Cefoxitine		> 32 *	-	-	16	64
Clindamycine	4	4	15	15	2	8
Moxifloxacine	1	2	21	18	2	8
Métronidazole	21*	21*	4	4	8	32
Chloramphénicol	8	8	23	23	8	32

* Valeurs modifiées dans la version actuelle (CA-SFM/EUCAST 2020)

Comparaison des méthodes. Pour évaluer une nouvelle méthode d'antibiogramme, le QUAMIC (d'après les définitions de la FDA), propose de calculer les taux d'erreurs ou de discordances mineures, majeures ou très majeures de la méthode testée en comparaison avec la méthode de référence.

Une erreur mineure (Em) correspond à une souche résistante ou sensible rendue à tort de sensibilité intermédiaire et inversement ($R \leftrightarrow I$ ou $S \leftrightarrow I$). Le taux d'Em correspond au pourcentage de ces souches au sein de la totalité des souches étudiées. Elle est liée à la variabilité des méthodes et à l'incertitude de mesure.

Une erreur majeure (EM) correspond au rendu d'une souche résistante alors qu'elle est en réalité sensible. L'impact des EM est de ne pas pouvoir proposer à tort à un patient un traitement approprié, mais ne le confronte pas à un risque d'échec thérapeutique. Le taux d'EM correspond au pourcentage de souches sensibles faussement rendues résistantes (nombre de souches S rendues à tort résistantes divisé par le nombre total de souches sensibles).

Une erreur très majeure (ETM) correspond au rendu d'une souche sensible alors qu'elle est en réalité résistante. En cas de traitement, cette discordance peut avoir un impact clinique majeur et se solder par un échec thérapeutique. Le taux d'ETM correspond au pourcentage de souches résistantes faussement rendues sensibles (nombre de souches R rendues à tort sensibles divisé par le nombre total de souches résistantes).

Finalement, le taux de concordance global est calculé pour chaque méthode. Il correspond au nombre de discordances totales, divisé par le nombre total de souches testées.

Une méthode est dite corrélée à la méthode de référence si le taux de concordance global est supérieur à 90 %, le taux d'EM est inférieur à 3 % et le taux d'ETM à 1,5 %.

Le calcul de ces différents taux permet de définir si une méthode est fiable et appropriée pour un usage en routine.

Ces taux d'erreurs s'appliquent normalement à une population d'isolats recueillis de façon prospective et représentatifs du pourcentage de souches résistantes habituellement observées. Le taux d'erreur dépend de l'existence ou non d'une zone « I » et de la distribution des CMI de la population étudiée vis à vis des concentrations critiques :

- En absence de zone « I », il ne peut y avoir par définition que des erreurs majeures et très majeures.
- Lorsque les diamètres ou CMI mesurées sont proches des valeurs critiques, le risque d'erreur est plus élevé

L'objectif de notre étude n'était pas de refaire la validation de méthode des stratégies d'antibiogramme testées mais d'étudier leur comportement sur une population de souches résistantes, ce qui donne une meilleure appréciation des erreurs ou discordances les plus fréquentes sans pouvoir néanmoins en évaluer la fréquence réelle. De ce fait, nous ne parlerons donc pas d'erreurs mais de discordances mineures (Dm), majeures (DM) et très majeures (DTM) dans ce travail tout en gardant le même mode de calcul.

RÉSULTATS

A. ÉPIDÉMIOLOGIE CLINIQUE ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES *BACTEROIDES* DU GROUPE *FRAGILIS* AU CHU DE CAEN

Les *Bacteroides* du groupe *fragilis* isolés au laboratoire de microbiologie du CHU de Caen ont été extraits de la base de données hospitalière. En 2018, 161 souches non reliées de *Bacteroides* du groupe *fragilis* ont été identifiées chez 140 patients contre 115 isolats chez 105 patients en 2019. *B. fragilis* était l'espèce la plus fréquemment isolée (59 % des *Bacteroides* en 2018 et 71,3 % en 2019), suivie par *B. thetaiotaomicron* (28,6 % en 2018 et 8,7 % en 2019) et *B. vulgatus* (14,9 % en 2018 et 18,3 % en 2019). *B. uniformis* et *B. ovatus* étaient plus rarement isolés avec moins d'une dizaine de souches isolées par an (**Tableau 12**). D'autres espèces du groupe ont été isolées de façon sporadique : 2 *B. pyogenes* en 2018 et 1 *B. stercoris* en 2019.

Les *Bacteroides* spp. étaient principalement associés aux infections digestives et aux bactériémies, suivies par les infections gynécologiques, les infections de la peau et des tissus mous et les infections ostéo-articulaires (**Tableau 13**). Les infections du tractus urinaire, de la tête et du cou et les infections pulmonaires représentaient moins de 10 % des isolats de *Bacteroides* du groupe *fragilis* sur les deux années.

Concernant l'épidémiologie des résistances, la résistance à la clindamycine était la plus fréquente avec 37,7 % de résistance en 2018 et 50 % en 2019. Cette résistance concernait toutes les espèces de *Bacteroides* groupe *fragilis*. Les fréquences respectives des résistances aux pénicillines associées à un inhibiteur de pénicillinases, au métronidazole et à l'imipénème étaient inférieures à 5 % des souches sur les deux années (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Souches cliniques du groupe *fragilis* et résistances associées sur l'année 2018 et 2019 au laboratoire de microbiologie du CHU de Caen (CA-SFM 2013)

2018

Espèces	Nombre de souches n (%)	R AMC	R TZP	R IMP	R MTZ	R CLI
<i>B. fragilis</i>	95 (59)	1	0	1	3	19
<i>B. thetaiotaomicron</i>	26 (28,6)	0	0	0	0	8
<i>B. vulgatus</i>	24 (14,9)	0	0	0	0	7
<i>B. ovatus</i>	11 (6,8)	0	0	0	0	5
<i>B. uniformis</i>	5 (3,1)	0	0	0	0	1
Total (%)	161 (100)	1 (0,7)	0 (0)	1 (0,7)	3 (2,1)	40 (37,7)
Nombre de souches testées	-	141	141	142	141	106

2019

Espèces	Nombre de souches n (%)	R AMC	R TZP	R IMP	R MTZ	R CLI
<i>B. fragilis</i>	82 (71,3)	1	2	1	1	37
<i>B. thetaiotaomicron</i>	10 (8,7)	1	1	0	0	8
<i>B. vulgatus</i>	21 (18,3)	0	0	0	1	3
<i>B. ovatus</i>	1 (0,9)	0	1	0	0	1
<i>B. uniformis</i>	1 (0,9)	1	0	0	0	1
Total	115 (100)	3 (3)	4 (4)	1 (1)	2 (2)	50 (50)
Nombre de souches testées	-	100	100	100	100	100

R : résistant, AMC : amoxicilline/acide clavulanique, TZP : pipéracilline/tazobactam, IMP : imipénème, MTZ : métronidazole, CLI : clindamycine

Tableau 13 : Répartition des prélèvements à visée diagnostique dans lesquels un isolat de *Bacteroides* du groupe *fragilis* a été isolé au CHU de Caen en 2018 et 2019

Site, n (%)	2018	2019
Digestif	55 (34,2)	47 (40,9)
Bactériémie	50 (31,1)	30 (26,1)
Gynécologique	27 (16,8)	13 (11,3)
Peau et tissus mou	15 (9,3)	7 (6,1)
Ostéo-articulaire	7 (4,3)	9 (7,8)
Urinaire	3 (1,9)	6 (5,2)
Tête et cou	2 (1,2)	1 (0,9)
Pulmonaire	2 (1,2)	2 (1,7)

B. CARACTERISATION DE LA COLLECTION DE SOUCHES ETUDIEES

1. Identification des isolats

L'identification des 54 souches a été confirmée par la technique MALDI-TOF MS au laboratoire. Les scores obtenus étaient supérieurs à 1,8 et répétables. La collection utilisée était composée de 54 souches cliniques sélectionnées spécifiquement avec des résistances acquises et de la souche ATCC 25285 de *B. fragilis*. Six espèces étaient représentées dans la collection, la majorité des souches étaient des *B. fragilis* (41/55), *B. thetaiotaomicron* comptait sept représentants et les quatre autres espèces, *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *B. salyersiae* et *B. uniformis*, comptaient un à trois représentants chacune.

2. Sensibilité selon la méthode de référence (Steers)

Les répartitions en catégories cliniques S/I/R par antibiotique toutes espèces confondues et par espèce sont présentées dans le **Tableau 14** et le **Tableau 15**, respectivement.

Analyses globales (Tableau 14). Toutes les souches étaient de sensibilité diminuée ou résistantes à l'ampicilline (résistance naturelle). Selon les critères du CASFM, la collection de souches était caractérisée par une fréquence élevée de souches résistantes et de sensibilité diminuées (I) aux β lactamines autres que l'ampicilline (27-60%) et à la clindamycine (47%). La résistance vraie (R) aux β lactamines concernait principalement l'association amoxicilline-acide clavulanique (42%) et la pipéracilline (60%) mais aussi l'association pipéracilline-tazobactam (R : 29%, I : 13%). Vingt-deux pour cent des souches étaient résistantes à l'imipénème et 24% résistantes à la céfoxitine. La fréquence de résistance au métronidazole (R et I) était de 9% et au chloramphénicol de 4%.

Des résultats semblables étaient retrouvés en utilisant les critères du CLSI, sauf lorsque les critères d'interprétation sont trop éloignés de ceux du CASFM, ce qui est notamment le cas de l'association pipéracilline-tazobactam : 11% de souches R contre 29% selon le CASFM. Finalement, 54% des souches étaient résistantes ou de sensibilité diminuée (I) à la céfoxitine selon le CLSI.

Tableau 14 : Profil de sensibilité des 55 *Bacteroides* du groupe *fragilis* avec la méthode de référence (Steers) incluant la souche de référence ATCC

Molécules	Référentiel	Nombre d'isolats			Pourcentage de souche non S (%)
		S	I	R	
AMP	CA-SFM	NA	NA	NA	NA
	CLSI	0	1	54	100
AMC	CA-SFM	27	5	23	51
	CLSI	27	5	23	51
PIP	CA-SFM	22	0	33	60
	CLSI	27	3	25	51
TZP	CA-SFM	32	7	16	42
	CLSI	49	0	6	11
FOX	CA-SFM	42	-	13	24
	CLSI	26	16	13	54
IMP	CA-SFM	40	3	12	27
	CLSI	43	1	11	22
MTZ	CA-SFM	50	-	5	9
	CLSI	50	1	4	9
CLI	CA-SFM	29	-	26	47
	CLSI	24	5	26	56
CHL	CA-SFM	53	-	2	4
	CLSI	53	1	1	4
MOX	CA-SFM	32	10	13	42
	CLSI	42	5	8	24

AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline/acide clavulanique, PIP : pipéracilline, TZP : pipéracilline-tazobactam, IMP : imipénème, FOX : céfoxitine, MTZ : métronidazole, CLI : clindamycine, CHL : chloramphénicol, MOX : moxifloxacine
S : sensible, I : intermédiaire, R : résistant, NA : Non Applicable

Analyse de la résistance par espèce (Tableau 15). Compte-tenu du nombre d'isolats il est délicat de comparer la fréquence de la résistance selon l'espèce. Cependant, sur cette collection de souches, on peut observer que les résistances à l'imipénème et au métronidazole n'étaient retrouvées que chez *B. fragilis* et *B. vulgatus*.

Co-résistances et multi-résistance. La majorité des souches sélectionnées ne présentaient de résistance que pour une classe antibiotique (73 %). Mais certaines étaient résistantes à plus d'une classe d'antibiotiques :

- Neuf souches résistantes aux β lactamines (pénicillines et/ou carbapénème) et à la clindamycine (16,4%)

- Trois souches résistantes aux β lactamines (pénicillines et/ou carbapénème) et au métronidazole (3,5%)

- Trois souches résistantes à la clindamycine et au métronidazole (3,5%)

Aucune des souches évaluées ne présentait de résistance aux trois classes antibiotiques simultanément. Il est à noter que la seule souche identifiée *B. salyersiae* était multirésistante, sensible uniquement au métronidazole.

Tableau 15 : Répartition des souches résistantes en fonction des espèces de *Bacteroides* en Steers

Molécules	Ref.	Nombre d'isolats (%)					
		<i>B. fragilis</i> (n = 41)	<i>B. thetaiotaomicron</i> (n = 7)	<i>B. vulgatus</i> (n = 3)	<i>B. ovatus</i> (n = 2)	<i>B. uniformis</i> (n = 1)	<i>B. salyersiae</i> (n = 1)
AMP	CA-SFM	40 (97,5)	7 (100)	3 (100)	2 (100)	1 (100)	1 (100)
	CLSI	40 (97,5)	7 (100)	3 (100)	2 (100)	1 (100)	1 (100)
AMC	CA-SFM	14 (34,1)	3 (43,9)	2 (66,7)	2 (100)	1 (100)	1 (100)
	CLSI	14 (34,1)	3 (43,9)	2 (66,7)	2 (100)	1 (100)	1 (100)
PIP	CA-SFM	19 (46,3)	7 (100)	3 (100)	2 (100)	1 (100)	1 (100)
	CLSI	16 (39)	2 (28,6)	3 (100)	2 (100)	1 (100)	1 (100)
TZP	CA-SFM	8 (19,5)	4 (57,1)	1 (33,3)	1 (50)	1 (100)	1 (100)
	CLSI	4 (9,8)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
IMP	CA-SFM	10 (24,4)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
	CLSI	9 (22)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
FOX	CA-SFM	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	CLSI	10 (24,4)	2 (28,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
MTZ	CA-SFM	4 (9,8)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	CLSI	3 (7,3)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CLI	CA-SFM	18 (43,9)	3 (43,9)	3 (100)	1 (50)	0 (0)	1 (100)
	CLSI	18 (43,9)	3 (43,9)	3 (100)	1 (50)	0 (0)	1 (100)
MOX	CA-SFM	9 (22)	1 (14,3)	2 (66,7)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
	CLSI	4 (9,8)	1 (14,3)	2 (66,7)	0 (0)	0 (0)	1 (100)

Ref : Référentiel, AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline/acide clavulanique, PIP : pipéracilline, TZP : pipéracilline-tazobactam, IMP : imipénème, FOX : céfoxitine, MTZ : métronidazole, CLI : clindamycine, MOX : moxifloxacin, NA : Non Applicable

3. Caractérisation génétique de la résistance

Des PCR ont été faites afin de qualifier les mécanismes de résistance les plus fréquemment observés au sein de notre collection de 54 isolats cliniques. Onze gènes

de résistance aux antibiotiques ont été recherchés par PCR en point final. Les produits de PCR obtenus étaient des fragments de 100 à 250 paires de bases (pb) sauf pour l'amplicon du gène *cepA* mesurant environ 650 pb. Un exemple de gel est présenté dans la **Figure 7**.

Les contrôles positifs utilisés pour ces manipulations étaient des souches de *Bacteroides* (souches danoises et hollandaises) dont l'analyse avait précédemment révélé la présence des gènes d'intérêt. Lors de ces séries de PCR, la souche ATCC 25285 de *B. fragilis* s'est révélée positive uniquement à *cepA* comme attendu.

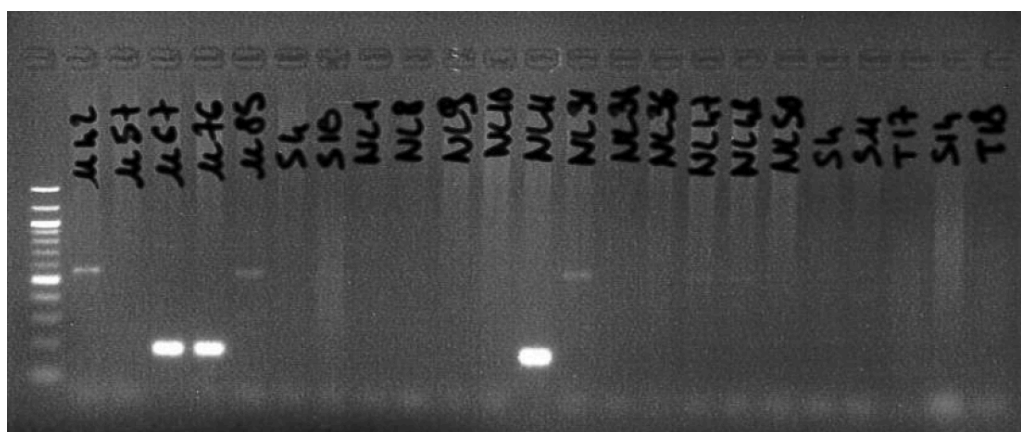


Figure 7 : PCR en point final, gel à 2 % d'agarose, lecture UV, gène *mefA*

Résistances aux β lactamines. Les trois principaux gènes recherchés pour la résistance aux β lactamines étaient le gène *cepA* codant pour la céphalosporinase chromosomique de classe A de *B. fragilis*, le gène *cfxA* codant une céphalosporinase hydrolysant la céfoxitine, et le gène *cfiA* codant pour une métallo-enzyme de classe B hydrolysant les carbapénèmes.

La PCR pour le gène *cepA* s'est révélée positive pour 26/55 (47,3 %) des *Bacteroides* du groupe *fragilis*. Toutes les souches positives à *cepA* étaient de l'espèce *B. fragilis* soit 31/41 (75,6 %) dans cette espèce. Toutes les souches préalablement caractérisées positives à *cepA* sont sorties positives en PCR sauf une souche de *B. thetaiotaomicron*. La question de la spécificité des amorces pour le gène *cepA* se pose au vu des résultats, même si le nombre d'isolats non *B. fragilis* au sein de notre collection est faible.

Pour le gène *cfxA*, conférant une résistance spécifique à la céfoxitine, 16/55 (29,1 %) souches ont été trouvées positives. Toutes les espèces du groupe *fragilis* étaient concernées. L'une des quatre souches connues positives pour le gène *cfxA* n'est pas

sortie en PCR, l'hypothèse d'une perte du gène ou d'une non-expression en l'absence de stimulation est à évoquer.

Le gène *cfiA* a été retrouvé chez 16/55 souches soit 29,1% des isolats, uniquement chez *B. fragilis*. Toutes les souches déjà caractérisées positives par les laboratoires partenaires ont été confirmées en PCR.

Résistances aux MLS. Six gènes de résistance aux MLS ont été recherchés : deux gènes codant pour des systèmes d'efflux (*mefA* et *msrSA*), un gène codant pour une nucleotidyltransférase (*linA*) et trois gènes de la famille *erm* (*B*, *F* et *G*) codant pour des méthylases.

Le gène *mefA* a été retrouvé chez 6/55 souches de *Bacteroides* et était systématiquement présent avec le gène *ermG* ou *ermF*.

Le gène *msrSA* a été retrouvé chez 5/55 isolats. Dans quatre cas, ce gène était associé avec *ermF* et une seule fois retrouvé seul.

Le gène *linA* était présent chez 14/55 souches. Dans huit de ces souches, *linA* a été retrouvé seul. Dans les six autres souches, *linA* était associé à *ermF*.

Enfin, pour la famille *erm*, le gène *ermB* était présent dans 1/55 isolat, le gène *ermG* chez 6/55 isolats et le gène *ermF* chez 20/55 souches de notre collection.

Au total, 35 souches de la collection présentaient au moins un gène de résistance aux MLS et toutes les espèces du groupe *fragilis* étaient concernées. Pour les trois gènes *erm* et *mefA*, les témoins positifs sont sortis correctement en PCR sauf une souche de *B. fragilis* où *ermF* n'a pas été retrouvé. Pour les gènes *linA* et *msrSA*, aucun témoin positif n'a été utilisé lors des PCR. Les amplicons obtenus pour ces deux gènes ont été séquencés et les résultats comparés à la base de données « Resfinder » pour confirmer leur identité. Il est à noter que ces deux gènes ne sont pas compris dans la base de données « Resfinder », mais que des gènes proches y sont présents. Les amplicons de *linA* ont montré une forte similarité avec le gène *InuA* et *msrSA* avec le gène *msrD*. Les gènes *InuA* et *msrD* sont connus pour être des gènes de résistance aux macrolides également. Ce résultat nous a conforté dans la présence de ces gènes de résistance *linA* et *msrSA* dans nos souches.

Résistances au métronidazole. Les gènes de la famille *nim*, principaux médiateurs identifiés de la résistance au métronidazole, ont été recherchés en utilisant des amorces ciblant la majorité des variants de *nim* mais pas les gènes *nimC*, *nimD* et *nimJ* comme indiqué dans les matériels et méthodes.

Au total, la PCR a été positive pour 6/55 souches. Une souche connue *nimJ* positive n'est pas sortie positive en PCR, comme attendu.

Résistances aux quinolones. Seul le gène *bexA*, codant pour un système d'efflux, a été recherché pour la résistance aux quinolones dans cette collection. Il a été retrouvé chez 7/55 isolats de la collection, uniquement chez *B. thetaiotaomicron*. Ce résultat est cohérent avec le fait que ce gène soit caractéristique de cette espèce.

C. ÉVALUATION DES METHODES ANTIBIOGRAMMES :

1. Méthode par diffusion de disques en milieu solide

Les diamètres d'inhibition des 55 souches de *B. fragilis* sont présentés en **Annexe 6** ainsi que les valeurs des CMI mesurées par dilution en milieu solide (méthode de référence - Steers). Ces résultats ont été interprétés sensibles (S), sensibles à forte posologie (I) ou résistants (R) selon les valeurs critiques du CA-SFM et du CLSI.

Le **Tableau 16** collige les discordances mineures (Dm), majeures (DM) et très majeures (DTM) ainsi que le taux de concordance global entre la technique en diffusion et la méthode de référence. Les discordances ont été évaluées pour la collection totale incluant la souche de référence puis pour les *B. fragilis* d'une part et les non-*fragilis* d'autre part. Sur sept antibiotiques testés, seulement cinq possédaient des diamètres critiques dans le CA-SFM. La **Figure 8** représente la corrélation entre les diamètres mesurés et les CMI obtenues par dilution en gélose pour chacun des antibiotiques.

Tableau 16 : Evaluation de la diffusion de disques en milieu solide

Molécules	Espèces (n)	Nombre d'isolats (%) CA-SFM			Taux de concordance
		Dm	DM	DTM	
AMC	Tout (55)	11 (20)	0 (0)	10 (43,5)	61,8 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	7 (17,1)	0 (0)	6 (42,9)	68,3 %
	Autres (14)	4 (28,6)	0 (0)	4 (44,4)	42,9 %
TZP	Tout (55)	5 (9,1)	0 (0)	3 (18,8)	85,5 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	3 (7,3)	0 (0)	1 (12,5)	90,2 %
	Autres (14)	2 (14,3)	0 (0)	2 (25)	71,4 %
IMP	Tout (55)	5 (9,1)	0 (0)	4 (33,3)	83,6 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	4 (9,8)	0 (0)	4 (40)	80,5 %
	Autres (14)	1 (7,1)	0 (0)	0 (0)	92,8 %
MTZ	Tout (55)	0 (0)	0 (0)	1 (20)	98,2 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	97,6 %
	Autres (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 %
CLI	Tout (55)	0 (0)	17 (58,6)	0 (0)	69,0 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	0 (0)	14 (60,9)	0 (0)	65,9 %
	Autres (14)	0 (0)	3 (50)	0 (0)	78,6 %

AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline/acide clavulanique, PIP : pipéracilline, TZP : pipéracilline/tazobactam, IMP : imipénème, MTZ : métronidazole, CLI : clindamycine

Dm : discordance mineure, DM : Discordance Majeure, DTM : Discordance Très Majeure

La gamme de couleur indique le niveau de concordance : Vert $\geq 90\%$, jaune : $\geq 70\%$ et $< 90\%$, orangé : $< 70\%$

Le taux de concordance global de la méthode de diffusion variait selon les familles d'antibiotiques (**Tableau 16**). Pour les β lactamines, la moins bonne concordance, de l'ordre de 60%, était observée pour l'association amoxicilline-acide clavulanique et était expliquée dans 50% des cas par des souches faussement rendues sensibles (DTM), le reste correspondant à des discordances mineures (Dm, souches R rendues I). Le taux de concordance était de 80-90% pour l'association pipéracilline-tazobactam et pour l'imipénème et s'expliquait par le même type de discordances.

L'analyse de la distribution des diamètres d'inhibition selon la CMI (**Figure 8**) montre que pour la majorité des résultats discordants, les diamètres mesurés étaient réduits (≤ 35 mm). Une augmentation des diamètres critiques pour les trois molécules permettrait d'améliorer significativement le taux de concordance de la diffusion en gélose pour les β lactamines.

Pour l'imipénème, nous pouvons noter que quatre DTM ont été retrouvées avec les *B. fragilis* tandis qu'aucune n'a pas mis en évidence pour les autres espèces de *Bacteroides* du groupe *fragilis*. Cette dissociation entre les deux groupes peut être liée à plusieurs facteurs : soit les *B. fragilis* choisis pour cette thèse présentaient plus

fréquemment des résistances aux carbapénèmes que les autres espèces, soit les résistances aux carbapénèmes en diffusion seraient plus difficiles à mettre en évidence pour les *B. fragilis* que pour les autres espèces.

Pour la clindamycine, les résultats étaient médiocres et résultaient principalement de fausses résistances (DM, 17 souches), ce qui aurait pour conséquence pratique de limiter l'utilisation de la molécule. Cette discordance a été explorée par la suite grâce à la comparaison des sensibilités phénotypiques et du profil génétique de résistance des souches. Nous verrons plus loin que ces souches présentent pour la plupart des mécanismes moléculaires de résistance de bas niveau (enzymatique), qui semblent donc mal détectés par la méthode de référence. Finalement, le taux de concordance est bon pour le métronidazole, la seule souche discordante ayant un diamètre proche des seuils limites. Un diamètre aussi réduit, même si supérieur aux diamètres critiques, devrait alerter le biologiste vers un recontrôle de l'antibiogramme et la réalisation de CMI par E-test® ou par technique microdilution en milieu liquide. Une autre possibilité serait de modifier le diamètre critique à 25 mm.

En conclusion pour la méthode de diffusion en gélose, les discordances étaient retrouvées dans les deux groupes d'espèces, *fragilis* et non-*fragilis*, et se répartissaient de façon relativement homogène sauf pour les pénicillines avec inhibiteur de pénicillinases, où l'espèce *B. fragilis* présentait des taux de concordance plus forts que les espèces non-*fragilis*. Une attention particulière devrait être portée pour le rendu de ces résultats.

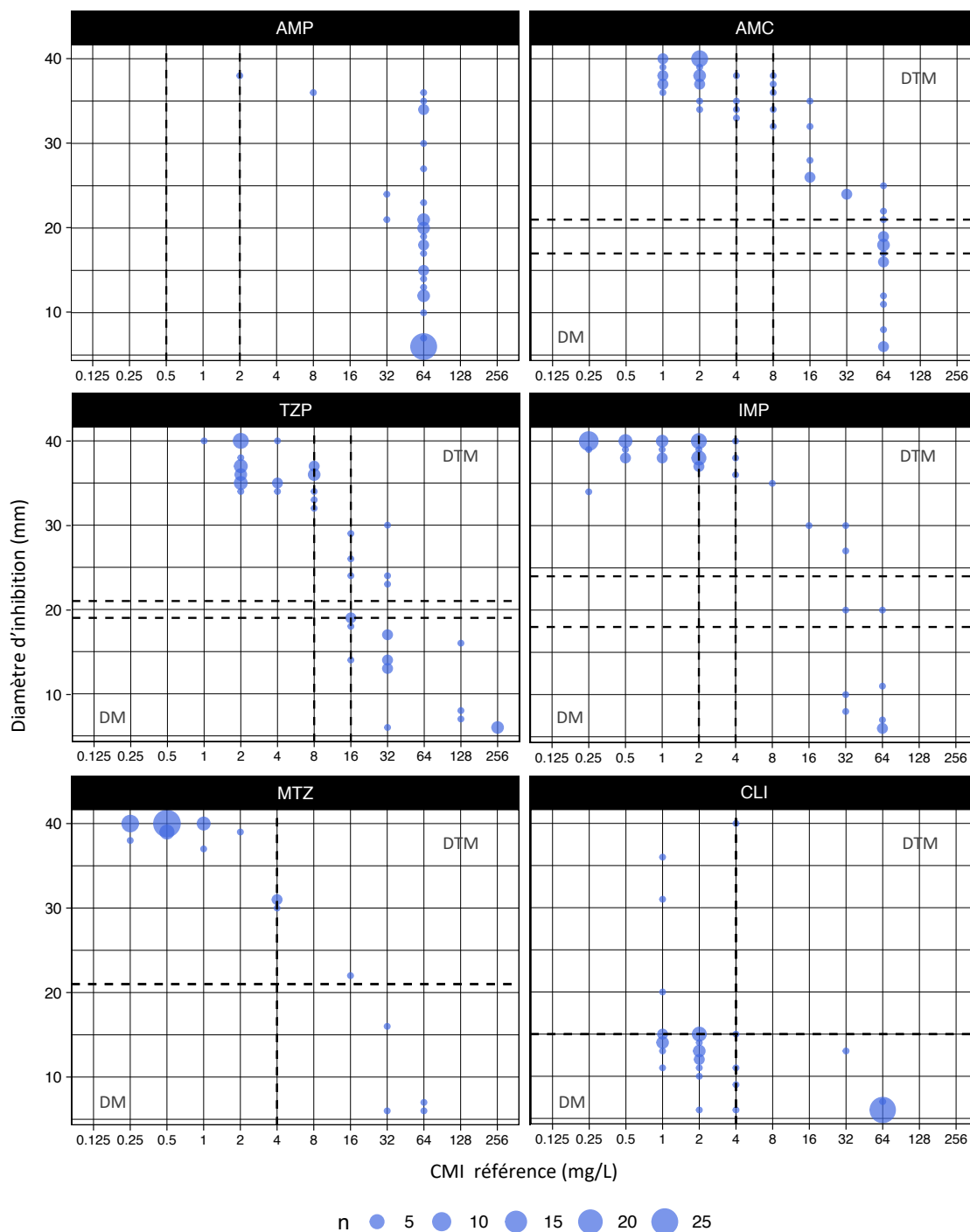


Figure 8 : Répartition des diamètres mesurés en fonction des CMI définies par la méthode de référence

La taille des points visibles sur le graphique est proportionnelle au nombre d'isolats. Les lignes en pointillés précisent les valeurs limites du CA-SFM/EUCAST, horizontalement pour la diffusion (diamètres critiques) et verticalement pour la technique de référence (concentrations critiques). L'ampicilline est présentée sur le graphique dans le but d'illustrer la répartition des diamètres par rapport aux CMI de référence, mais aucune interprétation des diamètres ne sera faite car aucun diamètre critique n'est donné par le CA-SFM 2019.

AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline-acide clavulanique, TZP : pipéracilline-tazobactam, IMP : imipénème, MTZ : métronidazole, CLI : clindamycine, DM : Discordance Majeure, DTM : Discordance Très Majeure

2. Évaluation de la méthode de microdilution en milieu liquide

a. Distribution des CMI observées

Les CMI₅₀ et CMI₉₀ obtenues par chacune des deux méthodes de microdilution et par la méthode de référence sont présentées dans le **Tableau 17**. Une différence d'au moins deux dilutions était considérée comme significative

Pour la méthode Sensititre™, des différences de CMI observées étaient visibles sur trois molécules. Pour l'amoxicilline-acide clavulanique et l'imipénème, les CMI_{50/90} observées étaient plus faibles avec la méthode en microdilution. Pour le métronidazole, la CMI₉₀ était nettement supérieure en microdilution.

Avec la méthode Micronaut-S™, les mêmes différences ont été observées pour l'amoxicilline-acide clavulanique et l'imipénème. Deux autres molécules ont révélé des CMI différentes de la technique de référence. Pour l'ampicilline, les CMI_{50/90} étaient toutes deux retrouvées à 8 mg/L, résultats plus faibles que ceux de la méthode de référence mais sans conséquence sur la catégorisation (résistance naturelle). Pour la clindamycine, la CMI₉₀ obtenue était de 8 mg/L, résultat également plus faible que celui de la méthode de référence. Pour ces deux dernières molécules, les différences de CMI₅₀ et CMI₉₀ étaient liées aux gammes de concentrations d'antibiotiques proposées dans la plaque Micronaut-S™, plafonnées à 8mg/L. Toutefois, ces gammes de concentrations réduites couvraient parfaitement les concentrations critiques et permettaient l'interprétation de la sensibilité des souches.

Tableau 17 : CMI₅₀ et CMI₉₀ pour 55 *Bacteroides* du groupe *fragilis* selon la dilution en milieu solide (référence) et les deux méthodes de microdilution.

Méthodes	CMI ₅₀ / CMI ₉₀						
	AMP	AMC	PIP	TZP	IMP	MTR	CLI
Dil. en milieu solide (mg/L)	64 / 64	8 / 64	64 / 256	8 / 128	2 / 32	0,5 / 4	4 / 64
Sensititre™ (mg/L)	32 / 32	2 / 16	32 / 128	16 / 128	0,5 / 32	1 / 32	2 / 64
Micronaut-S™ (mg/L)	8 / 8	2 / 16	-	1 / 128	0,5 / 16	0,5 / 8	4 / 8

AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline-acide clavulanique, PIP : pipéracilline, TZP : pipéracilline-tazobactam, IMP : imipénème, MTZ : métronidazole, CLI : clindamycine

b. Évaluation du système Sensititre™

Les taux de discordances du système Sensititre™ sont présentés dans le **Tableau 18**.

Tableau 18 : Système Sensititre™ : évaluation des discordances mineures, majeures et très majeures en fonction de l'interprétation du CA-SFM et du CLSI

Molécules	Espèces	Nombre d'isolats (%) CA-SFM CLSI			Taux de Concordance	
		Dm	DM	DTM	CA-SFM	CLSI
AMP	Tout (55)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	100 %	100 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	100 %	100 %
	Autres (14)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	100 %	100 %
AMC	Tout (55)	12 (21,8) 12 (21,8)	0 (0) 0 (0)	3 (13) 3 (13)	72,7 %	72,7 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	9 (22) 9 (22)	0 (0) 0 (0)	1 (7,1) 1 (7,1)	75,6 %	75,6 %
	Autres (14)	3 (21,4) 3 (21,4)	0 (0) 0 (0)	2 (22,2) 2 (22,2)	64,3 %	64,3 %
TZP	Tout (55)	40 (72,7) 0 (0)	0 (0) 2 (4,1)	0 (0) 0 (0)	NA	96,4 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	32 (78) 0 (0)	0 (0) 2 (5,4)	0 (0) 0 (0)	NA	95,1 %
	Autres (14)	8 (57,1) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	NA	100 %
IMP	Tout (55)	5 (9,1) 3 (5,5)	0 (0) 0 (0)	2 (16,7) 2 (18,2)	87,3 %	90,1 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	4 (9,8) 2 (4,9)	0 (0) 0 (0)	2 (20) 2 (22,2)	85,4 %	90,2 %
	Autres (14)	1 (7,1) 1 (7,1)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	92,9 %	92,9 %
MTZ	Tout (55)	0 (0) 2 (3,6)	5 (10) 1 (2)	0 (0) 0 (0)	90,9 %	94,5 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	0 (0) 2 (4,9)	3 (8,1) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	92,7 %	95,1 %
	Autres (14)	0 (0) 0 (0)	2 (15,4) 1 (7,7)	0 (0) 0 (0)	85,7 %	92,8 %
CLI	Tout (55)	0 (0) 6 (10,9)	0 (0) 0 (0)	2 (7,7) 1 (3,8)	96,3 %	87,3 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	0 (0) 4 (9,8)	0 (0) 0 (0)	2 (11,1) 1 (5,6)	95,1 %	87,8 %
	Autres (14)	0 (0) 2 (14,3)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	100 %	85,7 %

AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline/acide clavulanique, TZP : pipéracilline-tazobactam, IMP : imipénème, MTZ : métronidazole, CLI : clindamycine, NA : Non Applicable

Dm : discordance mineure, DM : Discordance Majeure, DTM : Discordance Très Majeure.

La gamme de couleur indique le niveau de concordance : Vert ≥ 90%, jaune : ≥ 70% et < 90%, orangé : < 70%

La plus mauvaise concordance était retrouvée pour l'amoxicilline-acide clavulanique (CA-SFM : R > 8 mg/L et CLSI : R ≥ 16 mg/L), avec trois souches résistantes classées faussement sensibles, quelque-soit le référentiel, résultant d'une sous-estimation importante de la CMI (0,5 à 4 mg/L contre 16 mg/L attendues).

La gamme de concentration de pipéracilline-tazobactam de la plaque Sensititre™ s'étend de 16/4 à 128/4 mg/L, ne permettant pas de catégoriser ces souches en « sensibles » selon le CA-SFM (CMI critiques S ≤ 8/4 mg/L et R > 16/4 mg/L). Nous pouvons tout de même noter l'absence de DTM avec ce référentiel. La gamme de concentration est en fait adaptée aux concentrations critiques élevées du CLSI (R ≥

128/4 mg/L), ce qui explique également l'absence de DTM. On remarque que deux souches ont été classées faussement résistantes (DM, CMI de 128/4 mg/L contre 32/4 mg/L attendues).

Pour l'imipénème, des DTM ont été observées avec les deux référentiels avec deux souches rendues à tort sensibles (CMI de 2 mg/L contre 8 et 32 mg/L attendues). Le nombre de Dm était plus important avec le CA-SFM en raison de concentrations critiques différentes (CA-SFM : $R > 4$ mg/L et CLSI : ≥ 16 mg/L).

La performance de la microplaque était correcte pour le métronidazole et pour la clindamycine avec des taux de concordance $> 90\%$.

Pour le métronidazole, la méthode était bien corrélée à la méthode de référence selon les critères du CLSI alors que cinq souches étaient classées en DM avec le CA-SFM (CMI de 8 à 32 mg/L pour des valeurs attendues de 1 à 4 mg/L), amenant à 10 % le taux de souches rendues résistantes à tort. Ceci est dû à des concentrations critiques différentes (CA-SFM $R > 4$ mg/L, CLSI : ≥ 32 mg/L).

Pour la clindamycine, deux souches ont été catégorisées à tort sensibles selon le CA-SFM ($S \leq 4$ mg/L et $R > 4$ mg/L, CMI de 1 et 4 mg/L pour des valeurs attendues de 32 et 64 mg/L) et une avec le CLSI ($S < 4$ mg/L et $R \geq 8$ mg/L, CMI de 4 mg/L pour une valeur attendue de 32 mg/L).

En conclusion pour la méthode de microdilution Sensititre™, les discordances étaient retrouvées dans les deux groupes d'espèces, *fragilis* et non-*fragilis*, et se répartissaient de façon relativement homogène. Pour l'association pipéracilline-tazobactam, le système Sensititre™ n'était pas adapté au référentiel CA-SFM/EUCAST mais l'était pour celui du CLSI.

c. Évaluation du système Micronaut-S™

Le résultat de l'évaluation des discordances est présenté dans le **Tableau 19**.

Tableau 19 : Système Micronaut-S™ : évaluation des discordances mineures, majeures et très majeures en fonction de l'interprétation du CA-SFM et du CLSI

Molécules	Espèces	Nombre d'isolats (%) CA-SFM CLSI			Taux de concordance	
		Dm	DM	DTM	CA-SFM	CLSI
AMP	Tout (55)	1 (1,8) 1 (1,8)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	98,2 %	98,2 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	1 (2,4) 1 (2,4)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	97,6 %	97,6 %
	Autres (14)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	100 %	100 %
AMC	Tout (55)	9 (16,4) 9 (16,4)	0 (0) 0 (0)	5 (21,7) 5 (21,7)	74,5 %	74,5 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	7 (17,1) 7 (17,1)	0 (0) 0 (0)	1 (7,1) 1 (7,1)	80,5 %	80,5 %
	Autres (14)	2 (14,3) 2 (14,3)	0 (0) 0 (0)	4 (44,4) 4 (44,4)	57,1 %	57,1 %
TZP	Tout (55)	7 (12,7) 1 (1,8)	0 (0) 2 (4,1)	7 (43,8) 0 (0)	74,5 %	94,6 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	3 (7,3) 1 (2,4)	0 (0) 2 (5,4)	1 (12,5) 0 (0)	90,2 %	92,7 %
	Autres (14)	4 (28,6) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	6 (75) 0 (0)	28,6 %	100 %
IMP	Tout (55)	4 (7,3) 2 (3,6)	0 (0) 0 (0)	2 (16,7) 2 (18,2)	89,1 %	92,7 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	4 (9,8) 1 (2,4)	0 (0) 0 (0)	2 (20) 2 (22,2)	85,4 %	92,7 %
	Autres (14)	0 (0) 1 (7,1)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	100 %	92,9 %
MTZ	Tout (55)	0 (0) 1 (1,8)	1 (2) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	98,2 %	98,2 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	0 (0) 1 (2,4)	1 (2,7) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	97,6 %	97,6 %
	Autres (14)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	100 %	100 %
CLI	Tout (55)	0 (0) 6 (10,9)	0 (0) 0 (0)	1 (3,8) 1 (3,8)	98,2 %	87,3 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	0 (0) 4 (9,8)	0 (0) 0 (0)	1 (5,6) 1 (5,6)	97,6 %	87,8 %
	Autres (14)	0 (0) 2 (14,3)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	100 %	85,7 %
MOX	Tout (55)	6 (10,9) 4 (7,3)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	89,1 %	92,7 %
	<i>B. fragilis</i> (41)	4 (9,8) 4 (9,8)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	90,2 %	90,2 %
	Autres (14)	2 (14,3) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0)	85,7 %	100 %

AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline/acide clavulanique, PIP : pipéracilline, TZP : pipéracilline-tazobactam, IMP : imipénème, MTZ : métronidazole, CLI : clindamycine, MOX : moxifloxacine

Dm : discordance mineure, DM : Discordance Majeure, DTM : Discordance Très Majeure. La gamme de couleur indique le niveau de concordance : Vert ≥ 90%, jaune : ≥ 70% et < 90%, orangé : < 70%

La performance de la microplaque Micronaut-S™ était très satisfaisante pour le métronidazole avec des taux de concordance supérieurs à 95% pour les deux référentiels et aucune DTM observée (**Tableau 19**). Une seule souche a été catégorisée à tort résistante par le CA-SFM, la CMI mesurée étant de 8 mg/L contre une CMI par la méthode de référence à 4 mg/L (R > 4 mg/L).

Pour les associations pénicilline et inhibiteur de pénicillinases, le taux de concordance n'était que de 75% pour les associations amoxicilline-acide clavulanique et pipéracilline-tazobactam, avec respectivement 5 et 7 DTM selon l'interprétation du CA-SFM. Ces discordances étaient liées à une sous-estimation importante des CMIs, principalement chez les *Bacteroides non-fragilis* (CMIs mesurées pour l'amoxicilline-acide clavulanique : 0,5/0,25 à 4/2 mg/L pour des valeurs attendues de 16/8 à 64/32

mg/L, CMI mesurées pour pipéracilline-tazobactam : 1/4 à 4/4 mg/L pour des valeurs attendues de 32/4 à 256/4 mg/L). Une attention toute particulière devrait donc être apportée pour les espèces de *Bacteroides non-fragilis* lors du rendu de résultats avec la microplaque Micronaut-S™. Pour l'association pipéracilline-tazobactam le taux de concordance globale était de 95% selon le CLSI en raison de concentrations critiques plus élevées que celles du CA-SFM.

Finalement, le taux global de concordance pour la clindamycine était correct, avec une seule DTM quelque-soit le référentiel. La souche présentant cette discordance avait une CMI mesurée de 1 mg/L en Micronaut-S™ pour une CMI de 32 mg/L par dilution en gélose. La concordance était également bonne pour la moxifloxacine. Aucune DM ni DTM n'ont été observées avec les microplaques Micronaut™ sur la collection de 55 isolats, uniquement des discordances mineures ont été retrouvées.

d. Synthèse

Diffusion en gélose. Les données obtenues montrent que la diffusion en gélose serait une méthode fiable pour les β lactamines comme pour le métronidazole si les diamètres critiques historiques du CASFM étaient optimisés pour mieux séparer les populations sensibles et résistantes. Pour la clindamycine, un fort taux de DM (souches sensibles rendues à tort résistantes) a été observé. Cette discordance pourrait s'expliquer par une incapacité de la méthode de référence à identifier certains mécanismes de résistance qui confèrent un bas niveau de résistance.

Microdilution. Les résultats obtenus par les deux méthodes d'antibiogramme sont satisfaisants pour l'ampicilline et le métronidazole. Pour les associations pénicilline et inhibiteur de pénicillinases, les taux de concordance étaient inférieurs à 80% pour l'amoxicilline-acide clavulanique en raison d'une sous-estimation des CMI. Celui de l'association pipéracilline-tazobactam variait nettement selon le référentiel utilisé, étant plus faible avec le CA-SFM/EUCAST qu'avec celui du CLSI. La conséquence était le rendu de souches catégorisées sensibles à tort. Ce fait était plus marqué chez les *Bacteroides non-fragilis*. Pour les β lactamines, à l'exception de l'imipénème, les taux de concordance étaient donc moins bons que pour les autres molécules testées. Ce problème pourrait probablement être minimisé en adaptant les valeurs critiques historiques du CA-SFM. En revanche pour la clindamycine, le taux de concordance était correct pour les techniques de microdilution. Les valeurs et interprétations obtenues pour le métronidazole n'ont pas été problématiques sur ce travail.

D. COMPARAISON GENOTYPE-PHENOTYPE DE LA RESISTANCE

Nous avons finalement tenté de définir si les différentes méthodes de détermination des sensibilités aux antibiotiques étaient aptes à suspecter la présence de gènes de résistance acquis.

1. Fréquence de mise en évidence des gènes de résistance

Au total, 11 gènes de résistance ont été recherchés dans la collection de 55 *Bacteroides* (**Tableau 20**). Pour les β lactamines, le gène *cepA* était le plus fréquent, avec 47 % des souches de la collection positive, suivi de *cfiA* (29 %) et de *cfxA* (29 %). Le gène *cfxA* était retrouvé quelque-soit l'espèce. Pour les MLS, les gènes de résistance les plus fréquents étaient *ermF* (36 %) et *linA* (25 %) dans la collection. Les autres gènes de résistance aux MLS étaient retrouvés chez 2 à 11 % des souches. Le gène *bexA*, conférant une résistance de bas niveau aux fluoroquinolones a été retrouvé chez l'ensemble des *B. thetaiotaomicron* de la collection. Enfin, 11 % des souches étaient positives à *nim*, fréquence probablement sous-estimée en raison du manque de spécificité des amorces utilisées en PCR pour certains allèles de la famille *nim*.

Tableau 20 : Fréquences observées des gènes de résistance en fonction de l'espèce au sein de la collection de 55 *Bacteroides*

	Nombre de souches	<i>cepA</i>	<i>cfxA</i>	<i>cfiA</i>	<i>msrSA</i>	<i>mefA</i>	<i>LinA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>ermG</i>	<i>bexA</i>	<i>nim</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	41	26	10	16	4	5	12	1	13	4	0	5
<i>Bacteroides ovatus</i>	2	0	2	0	0	0	1	0	1		0	0
<i>Bacteroides vulgatus</i>	3	0	2	0	0	0	1	0	2	1	0	1
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	7	0	1	0	1	1	0	0	3	1	7	0
<i>Bacteroides salyersiae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Bacteroides uniformis</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toutes espèces	55	26	16	16	5	6	14	1	20	6	7	6

<i>Bacteroides fragilis</i>	41	63%	24%	39%	10%	12%	29%	2%	32%	10%	0%	12%
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	7	0%	14%	0%	14%	14%	0%	0%	43%	14%	100%	0%
<i>Bacteroides vulgatus</i>	3	0%	67%	0%	0%	0%	33%	0%	67%	33%	0%	33%
<i>Bacteroides ovatus</i>	2	0%	100%	0%	0%	0%	50%	0%	50%	0%	0%	0%
<i>Bacteroides salyersiae</i>	1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%
<i>Bacteroides uniformis</i>	1	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Toutes espèces	55	47%	29%	29%	9%	11%	25%	2%	36%	11%	13%	11%

2. Corrélation phénotype-génotype avec la méthode de référence

a. β lactamines

Les trois gènes recherchés étaient *cepA*, gène codant pour une céphalosporinase de type céfuroximase naturelle, et deux gènes codant pour une résistance acquise, *cfxA*, codant pour une céphalosporinase active sur la céfoxitine, et *cfiA*, codant pour une carbapénémase de type métalloprotéase.

Gène *cepA*. Le phénotype de résistance naturelle associé à *cepA* comporte une résistance aux aminopénicillines et une résistance aux céphalosporines sauf à la céfoxitine. L'acide clavulanique inhibe cette céphalosporinase. Toutes nos souches, y compris celles où les gènes *cfxA* et *cfiA* n'étaient pas identifiés, étaient résistantes ou intermédiaires à l'ampicilline. Cependant, ce gène n'a été mis en évidence que dans chez 63 % des *B. fragilis* et jamais pour les autres espèces. Les CMI observées à l'ampicilline étaient les mêmes pour les souches avec ou sans le gène *cepA* (**Tableau 21**).

Gène *cfxA*. Les CMI₅₀ et CMI₉₀ de la céfoxitine étaient deux fois plus élevées pour le groupe des isolats *cfxA* positif (32 à 128 mg/L) que pour les isolats *cfxA* négatif (1 à 64 mg/L) (**Tableau 21**).

L'interprétation des CMI à la céfoxitine ne peut se faire qu'avec le CLSI de 2020, les valeurs critiques ayant été supprimées de la version actuelle du CA-SFM/EUCAST. Les résultats de sensibilité que nous avons obtenus ne sont pas corrélés systématiquement à la présence du gène *cfxA*. Sur les 16 souches possédant *cfxA*, 10 ont été interprétées comme résistantes ou de sensibilité intermédiaire à la céfoxitine par dilution en gélose et cinq en Sensititre™. Ces données corréleront avec le fait que la présence du gène *cfxA* ne confère pas systématiquement une augmentation des CMI à la céfoxitine (43,57).

Pour 19/39 des souches ne portant pas le gène *cfxA*, les CMI de la céfoxitine correspondaient à des souches résistantes ou de sensibilité intermédiaire. Cette résistance pourrait être liée à la présence du gène *cfiA* (12/19, résistance croisée) ou à d'autres mécanismes de résistance non recherchés au cours de cette thèse (pompe d'efflux, β lactamases d'autre classe).

Tableau 21 : CMI (mg/L) des β lactamines mesurées par dilution en milieu solide et gènes de résistance.

A. Souches *cepA*+ B. Souches *cepA*-

A.	N°	Souche	Espèce	Origine	AMX	AMC	PIP	PTZ	FOX	IMI	MEM	<i>cepA</i>	<i>cfxA</i>	<i>cfiA</i>
	1	ATCC 25285	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	64	2	4	2	8	0,25	0,25	+	-	-
	6	bf 11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	8	64	4	8	1	0,25	+	-	-
	7	bf 15	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	64	2	4	2	8	0,5	0,125	+	-	-
	8	bf 16	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	32	1	2	2	8	0,25	0,125	+	-	-
	11	bf n1	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	2	8	2	16	0,25	0,125	+	-	-
	14	bf n13	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	1	2	1	8	0,25	0,125	+	-	-
	15	bf n134	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	1	4	2	8	0,25	0,125	+	-	-
	16	bf n136	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	1	4	2	16	0,25	0,125	+	-	-
	17	bf n147	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	1	4	2	16	0,25	0,125	+	-	-
	18	bf n148	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	2	8	2	16	0,25	0,125	+	-	-
	19	bf n150	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	1	4	2	8	0,25	0,125	+	-	-
	23	bf s10	<i>Bacteroides fragilis</i>	Strasbourg	>64	2	8	2	8	0,25	0,125	+	-	-
	29	bf s3	<i>Bacteroides fragilis</i>	Strasbourg	>64	64	256	32	128	32	4	+	-	-
	34	bf t10	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	64	2	4	2	8	0,5	0,125	+	-	-
	35	bf t11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	32	1	4	2	8	0,25	0,125	+	-	-
	46	bf u19	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	64	2	16	2	8	1	0,125	+	-	-
	47	bf u21	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	64	2	8	2	16	0,25	0,125	+	-	-
	52	bf u42	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	4	64	8	16	0,5	0,125	+	-	-
	55	bf u76	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	2	4	2	16	0,25	0,125	+	-	-
	2	bf 03	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	8	256	8	64	2	0,5	+	+	-
	3	bf 04	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	32	256	8	8	2	0,25	+	+	-
	4	bf 06	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	8	256	8	64	2	0,25	+	+	-
	5	bf 08	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	16	256	8	32	4	0,5	+	+	-
	10	bf 25	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	2	32	4	16	0,5	0,25	+	+	-
	32	bf t01	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	>64	64	256	16	16	2	0,5	+	+	-
	54	bf u67	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	64	256	16	32	4	8	+	+	+

B.	N°	Souche	Espèce	Origine	AMX	AMC	PIP	PTZ	FOX	IMI	MEM	<i>cepA</i>	<i>cfxA</i>	<i>cfiA</i>
	12	bf n10	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	4	2	2	32	2	4	-	-	+
	20	bf n18	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	64	2	2	2	32	1	8	-	-	+
	21	bf n19	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	4	2	2	32	2	4	-	-	+
	49	bf u32	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	2	1	2	2	16	0,5	2	-	-	+
	50	bf u35	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	8	8	2	4	32	4	16	-	-	+
	13	bf n11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	4	16	8	32	8	8	-	-	+
	45	bf u18	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	64	128	32	32	32	>32	-	-	+
	38	bf t14	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	>64	64	256	256	128	64	>32	-	-	+
	39	bf t15	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	>64	64	256	128	128	64	>32	-	-	+
	40	bf t16	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	>64	64	256	16	64	32	>32	-	-	+
	44	bf u17	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	64	256	256	64	64	>32	-	-	+
	53	bf u57	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	16	256	4	32	2	4	-	-	+
	37	bf t13	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	>64	64	128	32	128	32	>32	-	+	+
	9	bf 23	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	64	256	128	128	64	>32	-	+	+
	56	bf u85	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	64	256	32	128	16	32	-	+	+
	24	bf s11	<i>Bacteroides ovatus</i>	Strasbourg	>64	64	256	16	16	2	16	-	+	-
	30	bf s4	<i>Bacteroides ovatus</i>	Strasbourg	>64	64	256	32	32	2	2	-	+	-
	41	bf t17	<i>Bacteroides salyersiae</i>	Toulouse	>64	64	256	256	64	32	1	-	-	-
	25	bf s12	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	>64	2	32	16	32	1	0,125	-	-	-
	26	bf s13	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	>64	2	32	16	64	0,5	0,25	-	-	-
	28	bf s19	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	>64	2	32	16	32	1	0,25	-	-	-
	42	bf t18	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Toulouse	64	2	32	32	32	1	0,25	-	-	-
	22	bf s1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	>64	16	64	32	32	2	0,25	-	-	-
	48	bf u23	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Danemark	>64	32	256	32	64	2	1	-	-	-
	31	bf s8	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	>64	16	256	32	32	2	0,5	-	+	-
	36	bf t12	<i>Bacteroides uniformis</i>	Toulouse	>64	64	256	32	12	2	0,25	-	+	-
	43	bf t19	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Toulouse	>64	64	256	128	8	64	>32	-	-	-
	33	bf t02	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Toulouse	>64	16	128	8	4	0,5	0,125	-	+	-
	51	bf u36	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Danemark	>64	8	256	8	32	2	0,25	-	+	-

AMX : amoxicilline, AMC : amoxicilline-acide clavulanique, PIP : pipéracilline, PTZ : pipéracilline-tazobactam, FOX : céfoxitine, IMI : imipénème, MEM : méropénème

Les souches (lignes horizontales) sont classées par espèce et par présence / absence de gène de résistance.

Gradient de couleurs des CMI : jaune pâle (CMI basse), rouge (CMI élevée).

Gène *cfiA* et carbapénèmes. Parmi les 16 isolats de *B. fragilis* possédant le gène *cfiA*, 11/16 étaient catégorisés R ou I à l'imipénème selon le CA-SFM (R < 4 mg/L) et 9/16 selon le CLSI (R < 8 mg/L) par la méthode de référence. Aucune résistance phénotypique n'était donc observée avec la technique de référence pour 5/16 souches selon le CA-SFM et 7/16 souches selon le CLSI. Il en était de même avec les méthodes de microdilution évaluées (6 à 7 souches/16 rendues R selon les référentiels). (Tableau 22).

Tableau 22 : CMI (mg/L) aux carbapénèmes (dilution en milieu solide) et gènes de résistance aux *β*lactamines

N°	Souche	Espèce	Origine	AMX	AMC	PIP	PTZ	FOX	IMI	MEM	cepA	cfxA	cfiA
14	bf_n131	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	1	2	1	8	0,25	0,125	+	-	-
8	bf_16	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	32	1	2	2	8	0,25	0,125	+	-	-
15	bf_n134	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	1	4	2	8	0,25	0,125	+	-	-
19	bf_n150	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	1	4	2	8	0,25	0,125	+	-	-
23	bf_s10	<i>Bacteroides fragilis</i>	Strasbourg	>64	2	8	2	8	0,25	0,125	+	-	-
35	bf_t11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	32	1	4	2	8	0,25	0,125	+	-	-
11	bf_n11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	2	8	2	16	0,25	0,125	+	-	-
16	bf_n136	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	1	4	2	16	0,25	0,125	+	-	-
17	bf_n147	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	1	4	2	16	0,25	0,125	+	-	-
18	bf_n148	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	2	8	2	16	0,25	0,125	+	-	-
47	bf_u21	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	64	2	8	2	16	0,25	0,125	+	-	-
55	bf_u76	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	2	4	2	16	0,25	0,125	+	-	-
33	bf_t02	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Toulouse	>64	16	128	8	4	0,5	0,125	-	+	-
7	bf_15	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	64	2	4	2	8	0,5	0,125	+	-	-
34	bf_t10	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	64	2	4	2	8	0,5	0,125	+	-	-
52	bf_u42	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	4	64	8	16	0,5	0,125	+	-	-
46	bf_u19	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	64	2	16	2	8	1	0,125	+	-	-
25	bf_s12	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	>64	2	32	16	32	1	0,125	-	-	-
1	ATCC 25285	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	64	2	4	2	8	0,25	0,25	+	-	-
10	bf_25	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	2	32	4	16	0,5	0,25	+	+	-
26	bf_s13	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	>64	2	32	16	64	0,5	0,25	-	-	-
6	bf_11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	8	64	4	8	1	0,25	+	-	-
28	bf_s19	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	>64	2	32	16	32	1	0,25	-	-	-
42	bf_t18	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Toulouse	64	2	32	32	32	1	0,25	-	-	-
3	bf_04	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	32	256	8	8	2	0,25	+	+	-
36	bf_t12	<i>Bacteroides uniformis</i>	Toulouse	>64	64	256	32	12	2	0,25	-	+	-
22	bf_s1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	>64	16	64	32	32	2	0,25	-	-	-
51	bf_u36	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Danemark	>64	8	256	8	32	2	0,25	-	+	-
4	bf_06	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	8	256	8	64	2	0,25	+	+	-
32	bf_t01	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	>64	64	256	16	16	2	0,5	+	+	-
31	bf_s8	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	>64	16	256	32	32	2	0,5	-	+	-
2	bf_03	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	8	256	8	64	2	0,5	+	+	-
5	bf_08	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	16	256	8	32	4	0,5	+	+	-
48	bf_u23	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Danemark	>64	32	256	32	64	2	1	-	-	-
41	bf_t17	<i>Bacteroides salyersiae</i>	Toulouse	>64	64	256	256	64	32	1	-	-	-
49	bf_u32	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	2	1	2	2	16	0,5	2	-	-	+
30	bf_s4	<i>Bacteroides ovatus</i>	Strasbourg	>64	64	256	32	32	2	2	-	+	-
12	bf_n10	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	4	2	2	32	2	4	-	-	+
21	bf_n19	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	4	2	2	32	2	4	-	-	+
53	bf_u57	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	16	256	4	32	2	4	-	-	+
29	bf_s3	<i>Bacteroides fragilis</i>	Strasbourg	>64	64	256	32	128	32	4	+	-	-
20	bf_n18	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	64	2	2	2	32	1	8	-	-	+
54	bf_u67	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	64	256	16	32	4	8	+	+	+
13	bf_n11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	>64	4	16	8	32	8	8	-	-	+
24	bf_s11	<i>Bacteroides ovatus</i>	Strasbourg	>64	64	256	16	16	2	16	-	+	-
50	bf_u35	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	8	8	2	4	32	4	16	-	-	+
56	bf_u85	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	64	256	32	128	16	32	-	+	+
45	bf_u18	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	64	128	32	32	32	>32	-	-	+
40	bf_t16	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	>64	64	256	16	64	32	>32	-	-	+
37	bf_t13	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	>64	64	128	32	128	32	>32	-	+	+
43	bf_t19	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Toulouse	>64	64	256	128	8	64	>32	-	-	-
44	bf_u17	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	>64	64	256	256	64	64	>32	-	-	+
9	bf_23	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	>64	64	256	128	128	64	>32	-	+	+
39	bf_t15	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	>64	64	256	128	128	64	>32	-	-	+
38	bf_t14	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	>64	64	256	256	128	64	>32	-	-	+

AMX : amoxicilline, AMC : amoxicilline-acide clavulanique, PIP : pipéracilline, PTZ : pipéracilline-tazobactam, FOX : céfoxitine, IMI : imipénème, MEM : méropénème.

Les souches (lignes horizontales) sont classées par CMI croissantes de méropénème. Gradient de couleurs des CMI : jaune pâle (CMI basse), rouge (CMI élevée).

Cette discordance entre la résistance phénotypique à l'imipénème et la présence du gène de résistance aux carbapénèmes a été explorée. Pour ce faire, il a été décidé de réaliser les CMIs du méropénème sur toutes les souches et de réaliser des E-test® imipénème et méropénème sur les souches discordantes. Les CMI aux deux carbapénèmes ont été déterminées avec deux techniques : microdilution en plaque Micronaut™ et en E-test®. Les résultats des CMI mesurées et leurs interprétations selon le CA-SFM sont présentés dans le **Tableau 23**. Au total, neuf souches ont été testées, toutes de l'espèce *B. fragilis*. La souche bf_u85 a servi de contrôle positif (*cfiA* positif et CMI à l'imipénème élevée).

Tableau 23 : Comparaison et interprétation selon le CA-SFM des CMI méropénème et imipénème chez neuf souches *cfiA* positives

Souches	CMI (mg/L)														
	E-test®				Sensititre™			Micronaut-S™				Steers			
	MEM		IMP		MEM		IMP	MEM		IMP		MEM		IMP	
bf_u85	32	R	8	R	-	4	I	32	R	4	I	32	R	16	R
bf_u32	1	S	0,047	S	-	0,5	S	1	S	0,5	S	2	S	0,5	S
bf_u35	12	R	0,25	S	-	2	S	16	R	1	S	16	R	4	I
bf_u57	6	I	0,125	S	-	0,5	S	4	I	0,5	S	4	I	2	S
bf_u67	3	I	0,38	S	-	2	S	4	I	1	S	8	I	4	I
bf_nl10	4	I	0,125	S	-	1	S	8	I	1	S	4	I	2	S
bf_nl11	8	I	0,38	S	-	2	S	16	R	2	S	8	I	8	R
bf_nl8	3	I	0,125	S	-	1	S	8	I	1	S	8	I	1	S
bf_nl9	2	S	0,19	S	-	1	S	4	I	1	S	4	I	2	S

MEM : méropénème, IMP : imipénème, S : sensible, I : sensible à forte posologie, R : résistant

MEM : S ≤ 2 mg/L, R > 8 mg/L (CA-SFM), IMP: S ≤ 2 mg/L, R > 4 mg/L (CA-SFM)

Les CMI ont donc été réalisées pour le méropénème sur toutes les souches par méthode de dilution en milieu solide afin de compléter l'analyse. La **Figure 9** représente la répartition des CMI mesurées pour les deux antibiotiques en fonction de la présence du gène *cfiA*. Les lignes en pointillés représentent les valeurs critiques du CA-SFM et la zone grise correspond à l'intervalle où les souches sont classées « I ». Avec l'imipénème, cinq souches possédant le gène *cfiA* sont catégorisées sensibles contre une seule avec le méropénème. Le méropénème a donc une capacité supérieure à mettre en évidence le gène *cfiA* et donc les diminutions de sensibilités aux carbapénèmes.

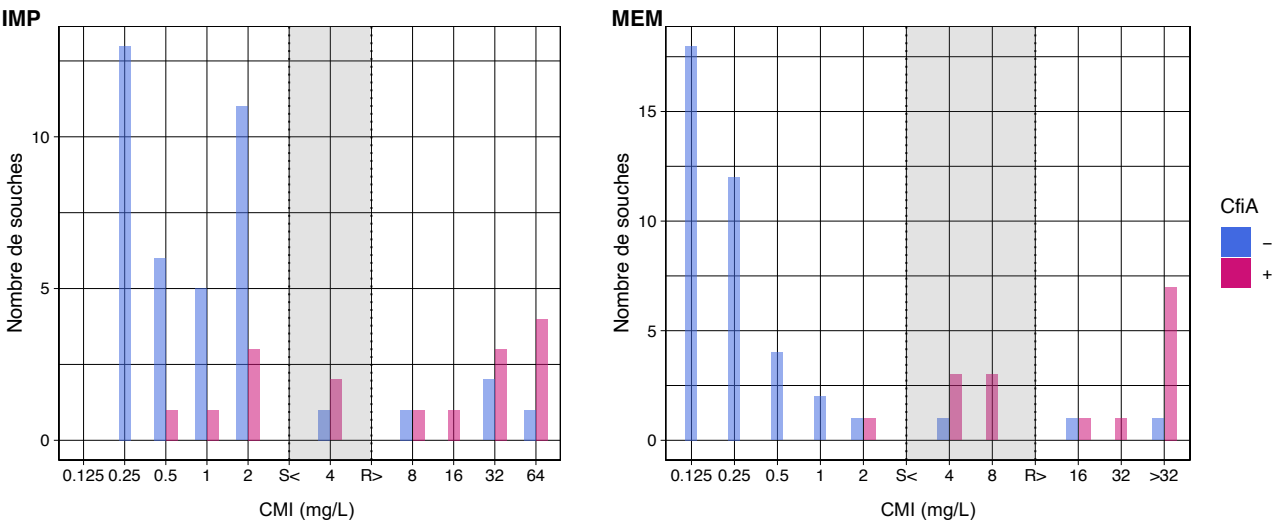


Figure 9 : Répartition des CMI obtenues par dilution en milieu solide de l'imipénème et du méropénème en fonction de la présence du gène *cfiA*

Les lignes en pointillés représentent les valeurs critiques du CA-SFM. IMP : Imipénème, MEM : méropénème

Les CMI en E-test® ont permis de détecter une diminution de sensibilités pour sept souches sur neuf avec le méropénème contre une sur neuf avec l'imipénème. Pour le Micronaut™, huit souches sur neuf sont rendues I ou R au méropénème contre seulement une avec l'imipénème. Les résistances aux carbapénèmes sont donc mieux détectées avec le méropénème. Sur l'**Annexe 7** sont visible deux bandelettes E-test®, méropénème et imipénème sur gélose BBA pour souche de *B. fragilis cfiA* positif. L'ellipse au niveau de la bandelette méropénème est beaucoup plus resserrée que celle autour de l'imipénème. Cette image a été observée pour toutes les souches *cfiA* positive.

b. Clindamycine

Le résultat des PCR réalisées pour mettre en évidence six gènes de résistance aux macrolides a été confronté aux résultats des différentes méthodes antibiogrammes (**Tableau 24**). Quelque-soit le référentiel utilisé (CA-SFM 4 mg/L et par le CLSI de 8 mg/L avec une zone intermédiaire de 2 à 8 mg/L), les souches résistantes à haut niveau (CMI $\geq$ 32 mg/L) à la clindamycine présentaient pour la plupart le gène *ermF*, souvent associé à d'autres gènes de résistance.

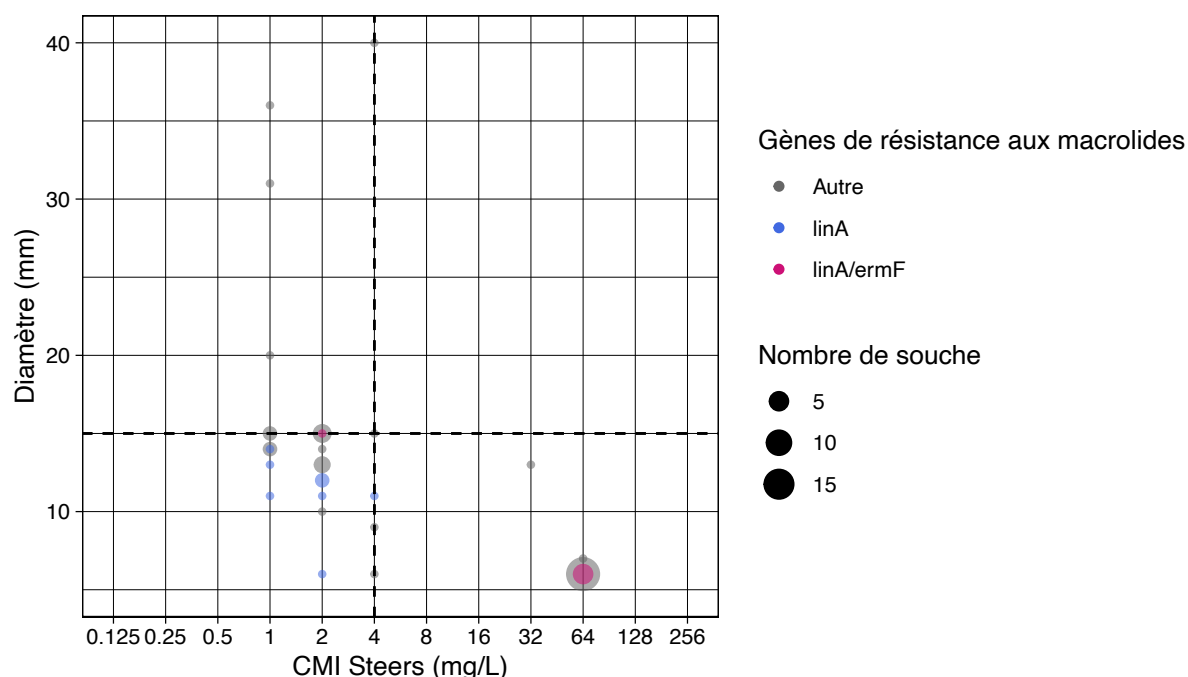
Comme cité précédemment, 17 isolats ont été catégorisés résistants par la méthode de diffusion (CA-SFM) et sensibles avec la méthode de référence (CMI $\leq$ 4 mg/L) les classant en discordances majeures. Pour 10 de ces souches, des gènes de résistance aux macrolides ont été retrouvés, principalement *linA*, et plus rarement *ermF*, *ermG*, *ermB*, *msrSA*, *mefA*.

Tableau 24 : CMI, diamètres d'inhibition et gènes de résistance à la clindamycine (CLI)

N°	Nom souche	Espèces	Origine	CLI Diffusion (mm)	CLI Sensibilité™ (mg/L)	CLI Micronaut™ (mg/L)	CLI Dilution en gelose (mg/L)	msa	mefA	linA	ermB	ermF	ermG
1	ATCC 25285	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	36	0,5	0,5	1	-	-	-	-	-	-
5	bf_08	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	31	1	0,06	1	-	-	-	-	-	-
24	bf_s11	<i>Bacteroides ovatus</i>	Strasbourg	20	0,5	0,5	1	-	-	-	-	-	-
19	bf_n150	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	15	0,5	0,5	1	-	-	-	-	-	-
35	bf_t11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	15	1	0,5	1	-	-	-	-	-	-
3	bf_04	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	14	1	0,5	1	-	-	+	-	-	-
15	bf_n134	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	14	0,5	0,5	1	-	-	-	-	-	-
36	bf_t12	<i>Bacteroides uniformis</i>	Toulouse	14	0,5	0,5	1	-	-	-	-	-	-
34	bf_t10	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	13	1	0,5	1	-	-	+	-	-	-
16	bf_n136	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	11	1	0,5	1	-	-	+	-	-	-
45	bf_u18	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	15	2	4	2	-	-	+	-	+	-
18	bf_n148	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	15	1	2	2	-	-	-	-	-	-
31	bf_s8	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	15	0,5	1	2	-	-	-	-	-	-
38	bf_t14	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	15	1	0,5	2	-	-	-	-	-	-
50	bf_u35	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	15	1	0,5	2	-	-	-	-	-	-
54	bf_u67	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	14	1	2	2	+	+	-	-	-	+
11	bf_n11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	13	1	0,5	2	-	-	-	-	-	-
14	bf_n131	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	13	1	0,5	2	-	-	-	-	-	-
44	bf_u17	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	13	1	4	2	-	-	-	-	-	-
12	bf_n110	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	12	2	2	2	-	-	+	-	-	-
53	bf_u57	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	12	2	2	2	-	-	+	-	-	-
29	bf_s3	<i>Bacteroides fragilis</i>	Strasbourg	11	1	0,5	2	-	-	+	-	-	-
21	bf_n19	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	10	4	2	2	-	-	-	-	-	-
20	bf_n18	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	6	2	2	2	-	-	+	-	-	-
9	bf_23	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	40	0,5	0,06	4	-	-	-	-	-	-
28	bf_s19	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	15	1	2	4	-	-	-	-	-	-
7	bf_15	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	11	2	1	4	-	-	+	-	-	-
42	bf_t18	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Toulouse	9	4	4	4	-	-	-	-	+	-
22	bf_s1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	6	2	2	4	-	-	-	-	-	-
49	bf_u32	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	13	1	1	32	-	-	-	-	-	-
51	bf_u36	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Danemark	7	>64	>8	>64	-	-	-	-	-	+
17	bf_n147	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	6	>64	>8	>64	-	-	+	-	+	-
30	bf_s4	<i>Bacteroides ovatus</i>	Strasbourg	6	>64	>8	>64	-	-	+	-	+	-
40	bf_t16	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	6	>64	>8	>64	-	-	+	-	+	-
43	bf_t19	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Toulouse	6	>64	>8	>64	-	-	+	-	+	-
52	bf_u42	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	6	>64	>8	>64	-	-	+	-	+	-
2	bf_03	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	6	>64	>8	>64	-	-	-	-	+	-
4	bf_06	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	6	>64	>8	>64	+	-	-	-	+	-
6	bf_11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	6	>64	>8	>64	-	-	-	-	+	-
8	bf_16	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	6	>64	>8	>64	-	-	-	-	+	-
10	bf_25	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	6	>64	>8	>64	-	-	-	-	+	-
13	bf_n111	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	6	4	>8	>64	-	+	-	-	+	-
23	bf_s10	<i>Bacteroides fragilis</i>	Strasbourg	6	>64	>8	>64	-	-	-	-	-	-
25	bf_s12	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	6	>64	>8	>64	+	+	-	-	-	+
26	bf_s13	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	6	>64	>8	>64	-	-	-	-	+	-
32	bf_t01	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	6	>64	>8	>64	-	+	-	-	+	-
33	bf_t02	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Toulouse	6	>64	>8	>64	-	-	-	-	+	-
37	bf_t13	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	6	>64	>8	>64	-	-	-	-	+	-
39	bf_t15	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	6	>64	>8	>64	-	-	-	-	+	-
41	bf_t17	<i>Bacteroides salyersiae</i>	Toulouse	6	>64	>8	>64	-	-	-	-	+	-
46	bf_u19	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	6	>64	>8	>64	+	+	-	-	-	+
47	bf_u21	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	6	>64	>8	>64	-	-	-	-	-	+
48	bf_u23	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Danemark	6	>64	>8	>64	-	-	-	-	+	-
55	bf_u76	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	6	>64	>8	>64	+	+	-	-	-	+
56	bf_u85	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	6	>64	>8	>64	-	-	-	+	-	-

Les souches (lignes horizontales) sont classées par CMI croissantes de clindamycine par la méthode de référence. La CMI maximale mesurée par le système Micronaut-S™ est de 8 mg/L. Gradient de couleurs des diamètres et CMI : jaune pâle (grand diamètre d'inhibition, CMI basse), rouge (faible diamètre d'inhibition, CMI élevée).

Figure 10 : Gènes de résistance aux macrolides, diamètres d'inhibition et CMI par la dilution en gélose (méthode de référence - Steers) de la clindamycine.



Les lignes pointillées indiquent les seuils critiques pour chacune des méthodes (CASFM). En bleu les souches présentant uniquement le gène *linA*, en magenta les souches exprimant *linA* et *ermF* et en gris les autres souches de la collection.

Les souches exprimant uniquement *linA* ont systématiquement été qualifiées résistantes en diffusion, avec des diamètres s'étendant de 6 à 14 mm ($R < 15$ mm), tandis que les CMI en Steers les a qualifiées sensibles (**Figure 10**).

La sensibilité et la spécificité des méthodes de dilution en milieu solide et de diffusion en milieu solide, pour détecter la présence de gènes de résistance, ont été calculées par rapport aux interprétations faites avec le CA-SFM. La méthode de référence avait une sensibilité de 68,6 % et une spécificité de 90 % alors que la technique en diffusion avait une sensibilité de 97,2 % et une spécificité de 55 %.

La technique de diffusion est donc plus sensible pour détecter les gènes de résistance aux macrolides mais moins spécifique. Le défaut de spécificité de la technique de diffusion pourrait être lié soit à la présence d'autres gènes de résistance inconnus pour les autres souches, ou à un faible niveau d'augmentation de CMI en comparaison aux souches sauvages.

c. Métronidazole

Pour les six souches positives à *nim*, quatre d'entre elles étaient catégorisées résistantes en Steers avec des CMI allant de 16 à 64 mg/L ($R > 4$ mg/L) et deux étaient interprétées sensibles avec les CMI à 2 et 4 mg/L (**Tableau 25**).

Une souche de notre collection possédant un gène *nimJ* n'a pas été détectée par PCR (amorces choisies non spécifiques pour ce gène), mais présentait une CMI au métronidazole de 64 mg/L en Steers. Cette souche était identifiée résistante au métronidazole avec les trois autres méthodes antibiogrammes (CA-SFM et CLSI).

La sensibilité et la spécificité des méthodes étaient respectivement les suivantes :

- | | |
|------------------------------|---------------|
| - méthode de référence | 67 % et 98 %. |
| - diffusion en gélose, | 50 % et 98 %. |
| - microdilution, Sensititre™ | 83 % et 90 % |
| - microdilution, Micronaut™ | 67 % et 98 %. |

Une des souches présentant un gène *nim* n'a été détectée par aucune des méthodes antibiogrammes et une autre a seulement été détectée par la méthode Sensititre™.

Tableau 25 : CMI, diamètres d'inhibition et gènes de résistance au métronidazole (MTR)

N°	Nom souche	Espèce	Origine	MTR Diffusion (mm)	MTR Sensibilité™ (mg/L)	MTR Micronaut™ (mg/L)	MTR Dilution en gélose (mg/L)	nim
6	bf_11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	40	0,5	0,25	0,25	-
8	bf_16	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	40	0,5	0,25	0,25	-
10	bf_25	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	40	2	0,5	0,25	-
20	bf_n18	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	40	1	0,5	0,25	-
39	bf_t15	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	40	0,5	0,25	0,25	-
41	bf_t17	<i>Bacteroides salyersiae</i>	Toulouse	40	1	0,25	0,25	-
51	bf_u36	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Danemark	40	0,5	0,25	0,25	-
54	bf_u67	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	38	0,5	0,25	0,25	-
55	bf_u76	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	40	0,5	0,25	0,25	-
1	ATCC 25285	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	40	1	0,25	0,5	-
4	bf_06	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	39	1	0,5	0,5	-
5	bf_08	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	39	1	0,25	0,5	-
7	bf_15	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	40	1	0,5	0,5	-
11	bf_n11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	40	1	0,5	0,5	-
12	bf_n10	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	39	1	0,5	0,5	-
14	bf_n131	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	40	2	1	0,5	-
15	bf_n134	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	40	1	1	0,5	-
16	bf_n136	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	40	4	0,5	0,5	-
17	bf_n147	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	40	1	1	0,5	-
18	bf_n148	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	40	2	0,5	0,5	-
19	bf_n150	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	40	1	0,25	0,5	-
21	bf_n19	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	39	2	0,5	0,5	-
22	bf_s1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	40	0,05	0,25	0,5	-
23	bf_s10	<i>Bacteroides fragilis</i>	Strasbourg	40	1	0,5	0,5	-
26	bf_s13	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	40	2	1	0,5	-
28	bf_s19	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	40	2	1	0,5	-
29	bf_s3	<i>Bacteroides fragilis</i>	Strasbourg	40	1	0,5	0,5	-
30	bf_s4	<i>Bacteroides ovatus</i>	Strasbourg	40	2	0,5	0,5	-
34	bf_t10	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	40	1	1	0,5	-
35	bf_t11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	39	1	0,5	0,5	-
37	bf_t13	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	40	1	0,5	0,5	-
40	bf_t16	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	40	1	0,5	0,5	-
42	bf_t18	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Toulouse	40	2	1	0,5	-
43	bf_t19	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Toulouse	40	1	0,25	0,5	-
46	bf_u19	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	40	2	0,5	0,5	-
47	bf_u21	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	40	1	0,5	0,5	-
48	bf_u23	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Danemark	40	1	1	0,5	-
49	bf_u32	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	40	1	0,5	0,5	-
50	bf_u35	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	40	1	0,5	0,5	-
53	bf_u57	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	40	2	0,25	0,5	-
56	bf_u85	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	40	1	0,5	0,5	-
3	bf_04	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	37	2	2	1	-
24	bf_s11	<i>Bacteroides ovatus</i>	Strasbourg	40	2	1	1	-
25	bf_s12	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	40	>32	1	1	-
31	bf_s8	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	40	2	0,5	1	-
36	bf_t12	<i>Bacteroides uniformis</i>	Toulouse	40	8	0,5	1	-
2	bf_03	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	39	4	1	2	+
13	bf_n11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	30	8	8	4	-
38	bf_t14	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	31	16	4	4	-
52	bf_u42	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	31	8	2	4	+
45	bf_u18	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	22	>32	>32	16	+
32	bf_t01	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	6	>32	>32	32	+
33	bf_t02	<i>Bacteroides vulgatus</i>	Toulouse	16	>32	>32	32	+
9	bf_23	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	7	>32	>32	>64	+
44	bf_u17	<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	6	>32	>32	64	(-) *

* Souche connue positive à *nimJ*

Les souches (lignes horizontales) sont classées par CMI croissantes de métronidazole.
Gradient de couleurs des diamètres et CMI : jaune pâle (grand diamètre d'inhibition, CMI basse), rouge (faible diamètre d'inhibition, CMI élevée).

DISCUSSION

Au cours de ce travail, nous avons comparé les résultats de sensibilité aux antibiotiques obtenus avec différentes méthodes d'antibiogramme adaptées à la routine des laboratoires de microbiologie, à la méthode de référence (Steers). Les résultats de sensibilité ont également été confrontés aux profils génétiques déterminés par PCR ciblées. Les méthodes alternatives à la méthode de référence sont validées et corrélées, selon les critères de la FDA ($DM < 3\%$; $DTM < 1,5\%$, sur des isolats de *Bacteroides* recueillis de façon prospectives. Mais, au cours de ce travail, nous avons choisi de travailler avec des souches présentant un ou plusieurs mécanismes de résistances afin de tester les limites des différentes méthodes évaluées. Notre population ne reflète pas l'épidémiologie habituelle des isolats cliniques. Les critères d'acceptabilité de la FDA n'ont donc pu pas être appliqués.

A. LIMITES GENERALES DES METHODES ANTIBIOGRAMMES

Quelle que soit la méthode antibiogramme utilisée pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques, des limites et des risques d'erreur propres aux bactéries anaérobies sont maîtrisées afin d'éviter autant que faire se peut toute DTM.

Inoculum : La calibration de l'inoculum bactérien est le premier point critique des méthodes d'antibiogrammes. En plus de cette calibration, l'inoculum est variable selon les méthodes antibiogrammes engagées pour les germes anaérobies : pour la diffusion, l'inoculum devra être calibré à 1 McFarland tandis que la microdilution et la dilution en milieu solide nécessitent un McFarland de 0,5.

Anaérobiose : La maîtrise de l'anaérobiose est le second facteur qui pourra impacter la fiabilité des résultats. Une composition imparfaite de l'atmosphère de culture impacterait la croissance bactérienne, augmentant le délai de rendu des résultats, entraînant un retard dans la prise en charge optimale des patients et dans le pire des cas, engendrerait le rendu des souches faussement sensibles ou résistantes. Un matériel en bon état (étanchéité des chambres d'anaérobiose, régénération des catalyseurs), des contrôles de qualité réguliers (antibiogramme avec des souches ATCC, contrôle de l'atmosphère anaérobie) sont importants pour vérifier la maîtrise de ces points au cours du temps.

Recommandations des sociétés savantes : Les changements de recommandations sur les antibiogrammes des bactéries anaérobies ont amené à

proposer l'utilisation de la souche de *B. thetaiotaomicron*, ATCC 29741, comme souche de contrôle. Cette récente recommandation est une véritable avancée étant donnée l'absence de ligne directrice antérieure. Dans ce travail, nous avons testé les souches anaérobies de *B. fragilis*, considérées comme facilement cultivables avec une croissance relativement rapide en comparaison à d'autres espèces anaérobies (ex : *Porphyromonas*). Ces souches sont moins sensibles à une manipulation en milieu aérobie. La croissance en atmosphère anaérobie et un temps de culture de 48h devront être tout de même respectés pour assurer la qualité des résultats. Le respect de ce temps d'incubation est notamment important pour la clindamycine, car en cas de lecture prématurée un risque de fausse sensibilité est possible.

Lecture des résultats : L'un des derniers points difficilement maîtrisables est la lecture des résultats. Pour le microdilution, la lecture semble plus franche, où le premier puits sans croissance bactérienne est considéré comme concentration minimale inhibitrice. Mais dans le cas de la diffusion, la lecture se fait par mesure de diamètre, donc au millimètre près.

En fonction de la qualité de l'inoculum de départ, de l'entretien du matériel de laboratoire, du respect des délais de culture et des recommandations des sociétés savantes, de l'expérience du lecteur, le résultat final pourra varier si tout n'est pas maîtrisé.

B. BIAIS ET LIMITES DE L'ETUDE

L'évaluation de ces différentes méthodes a nécessité de déterminer des CMI de référence qui ont été confrontées aux résultats des autres méthodes.

Une des limites que nous pourrions reprocher à ce travail est la réalisation en version unique de la détermination des sensibilités en technique de dilution en milieu solide, sans réalisation en triplicat pour vérifier les valeurs. Ce choix a été fait en fonction de la lourdeur technique et de l'impact financier de la méthode de dilution en milieu solide. En effet, cette technique nécessite la reconstitution d'un nombre important de géloses et la manipulation d'un nombre important de souches simultanément.

La mise en place et la réalisation de cette technique demande rapidité et savoir-faire. Cette expérience a été acquise au fur et à mesure des manipulations. Le manque d'expérience dans la pratique de ces techniques est donc un facteur qui peut avoir eu un impact dans la détermination de résultats.

La caractérisation génétique a permis de nous orienter dans les profils de résistance phénotypique, bien que les *B. fragilis* soit rapportées dans plusieurs articles comme des bactéries n'exprimant pas systématiquement les gènes de résistances qu'ils possèdent (43,50). La répartition des gènes de résistance et les CMI associées de nos souches de *Bacteroides* étaient cohérentes avec ce qui a déjà été rapporté dans la littérature. De plus, nous pourrions noter que certaines de nos amorces n'ont pas pu mettre en évidence tous les gènes de résistance souhaités. Ces difficultés techniques nous montrent qu'il est difficile de qualifier correctement ces isolats faisant partie d'un groupe bactérien hétérogène. Le séquençage des génomes complets serait une alternative pour caractériser la collection d'isolats.

Une comparaison de méthode a été engagée pour confronter quelques méthodes actuellement disponibles sur le marché et évaluer laquelle serait la plus adaptée à une utilisation en routine sur des bactéries particulièrement résistantes. Au terme de cette comparaison, les taux de concordance des différentes méthodes avec la méthode de référence se sont révélés relativement faibles pour les trois méthodes évaluées. Des discordances très majeures ont été constatées avec chacune des méthodes notamment pour les pénicillines avec inhibiteur de pénicillinases. Des différences entre les *Bacteroides fragilis* et non-*fragilis* ont toutefois été observées sur les pénicillines avec inhibiteur de pénicillinase pour les trois méthodes. La comparaison avec une augmentation de l'effectif serait une poursuite intéressante des travaux qui permettrait de donner plus de poids et confirmer les résultats trouvés ici.

C. COMPARAISON A LA METHODE DE REFERENCE ET PROFIL GENETIQUE

Chaque technique a présenté des avantages et les inconvénients face à la détermination des sensibilités sur cette population difficile.

Pour la méthode d'antibiogramme en diffusion sur milieu solide, la méthode reste simple, rapide à réaliser et peu coûteuse à mettre en place. La difficulté se situe dans la lecture des diamètres qui peut varier entre lecteurs notamment dans la prise en compte des doubles zones ou microcolonies. Cette lecture visuelle fait aussi la force de la méthode, car elle permet d'apprécier la pureté de l'inoculum, mais aussi des réductions de diamètres qui orienteront vers une technique de seconde ligne de détermination des CMI. Au cours de ce travail, nous avons observé que cette méthode de diffusion en milieu solide avait des avantages sur les autres méthodes notamment dans la détection de résistance aux macrolides. En effet, cette méthode semble plus fiable en permettant de mettre en évidence les résistances liées à l'expression du gène

linA en comparaison aux autres méthodes. En revanche pour cette méthode, le taux de concordance pour les pénicillines avec inhibiteur de pénicillinases, l'amoxicilline-acide clavulanique et pipéracilline-tazobactam n'est pas acceptable (<75%). Dans l'étude de comparaison de la méthode antibiogramme en diffusion aux CMI pour neuf antibiotiques, réalisée par Nagy *et al.*, les mêmes difficultés ont été rencontrées sur ces deux molécules avec une collection de presque 400 isolats. Au terme de cette comparaison, l'auteure suggérerait une vérification des résultats pour ces molécules si les diamètres mesurés sont supérieurs aux diamètres critiques, mais inférieurs à 23 mm dans le cas de l'amoxicilline-acide clavulanique et inférieurs à 25 mm à la pipéracilline-tazobactam, par une méthode de détermination des CMI (microdilution ou E-test®) (58). Cette alternative permettrait de pallier aux problèmes de discordances très majeures (souches résistantes rendues à tort sensibles).

Les résultats obtenus avec les méthodes de microdilution en milieu liquide se sont révélés assez proches. Les atouts majeurs de ces techniques sont la facilité de lecture et le gain de place. La facilité d'utilisation est améliorée si le laboratoire dispose d'un distributeur de la suspension bactérienne. Dans le cas inverse, le remplissage à la main de la plaque à l'aide d'une pipette multicanaux peut s'avérer longue et fastidieuse. La différence technique entre les deux plaques commerciales réside dans la nature du bouillon de culture utilisé, un milieu *Brucella* pour le Sensititre™ tandis que le Micronaut™ utilise un milieu Wilkins-Chalgren. La différence entre ces deux milieux se fait sur la présence de certains minéraux, mais la base reste similaire : 5 % de sang additionné de peptone, vitamine K1 et hémine. Les listes des molécules testées dans les deux kits présentent chacune des spécificités. Neuf des antibiotiques étaient communs aux deux plaques commerciales : pénicilline G, amoxicilline ou ampicilline, amoxicilline-acide clavulanique, pipéracilline-tazobactam, imipénème, clindamycine, métronidazole, moxifloxacine et vancomycine. Les autres molécules étaient spécifiques à chacun des kits commerciaux et visaient à répondre aux exigences des sociétés savantes Européennes et/ou américaines. Les listes de molécules proposées par les deux plaques commerciales couvraient parfaitement les besoins pour une utilisation clinique.

Il est à noter que depuis la réalisation de ce travail, les antibiotiques et les gammes de concentrations testés dans la plaque Sensititre™ ont été changés par le fournisseur. Initialement, la gamme de concentration de pipéracilline-tazobactam proposée (16/4 à 128/4 mg/L) ne permettait pas d'identifier les souches sensibles avec le référentiel européen. Avec la version actuelle, la pipéracilline-tazobactam est testée

de 0,25/4 à 256/4 mg/L, ce qui permet de convenablement couvrir les valeurs critiques européennes pour toutes les espèces anaérobies. Les autres changements au sein de la plaque Sensititre™ sont la disparition de la moxifloxacin et l'introduction du méropénème. Trois antibiotiques (mezlocilline, ampicilline-sulbactam, cefotétan) non commercialisés en Europe, mais disponibles aux États-Unis, sont maintenant testés sur ces plaques. Ces dernières molécules ne sont pas présentes sur les plaques Micronaut-S™, conçues en Allemagne, contrairement aux plaques Sensititre™ développées pour le marché américain.

Les résultats obtenus au cours de ce travail nous ont amené à comparer des molécules de la même famille afin de vérifier lesquels étaient les plus efficaces pour mettre en évidence phénotypiquement les mécanismes de résistance impliqués. La comparaison entre l'imipénème et le méropénème nous a conduit à constater que le méropénème permettait une meilleure détection des résistances aux carbapénèmes. L'ajout systématique de cette molécule au panel d'antibiotiques testés serait pertinent quelque-soit l'approche technique choisie. Toutefois, l'ajout du méropénème sur l'antibiogramme en diffusion n'est pour le moment pas incrémenté dans les recommandations du CA-SFM/ EUCAST.

Les deux référentiels utilisés au cours de cette thèse proposent des valeurs critiques de sensibilité qui ne sont pas systématiquement superposables. Ces différences entraînent des variations dans la catégorisation des échantillons. Nous avons noté que les interprétations faites avec les valeurs seuils du CLSI ont montré une concordance légèrement plus élevée qu'avec les interprétations proposées par le CA-SFM.

Nous noterons également l'importance d'une zone de sensibilité intermédiaire ou sensible à forte posologie aussi appelée ZIT (Zone d'Incertitude Technique) pour limiter les erreurs majeures et très majeures. En effet, en cas de distribution non-bimodale des CMI, les valeurs mesurées proches de la valeur critique seront classées en strictement R ou S sans prendre en compte l'incertitude technique.

De grands changements dans les recommandations du CA-SFM ont été faits entre les versions de 2013 et 2019. La liste des molécules à tester (l'amoxicilline n'est plus recommandée), la charge de certains disques (métronidazole et pipéracilline-tazobactam) et la détermination d'une souche ATCC *B. thetaiotaomicron*, avec des CMI cibles, pour tester les antibiogrammes anaérobies ont été définies. Toutes ces

évolutions tendent à améliorer le rendu et la fiabilité des résultats de l'antibiogramme de ces germes.

Par ailleurs, de nombreux mécanismes de résistance ne sont pas encore connus notamment pour le *B. salyersiae*. Cette espèce semble être un *Bacteroides* un peu à part dans le grand groupe de *Bacteroides fragilis* : elle semble présenter systématiquement des CMI relativement élevées à l'imipénème et faibles pour le méropénème, image inverse des autres *Bacteroides* ayant acquis le gène *cfiA*. Les mécanismes impliqués dans cette résistance ne sont pas connus et nécessitent des analyses plus poussées avec notamment un séquençage complet des génomes et la caractérisation des mécanismes impliqués.

D. ANTIBIOGRAMME ET ALGORITHME DECISIONNEL

Au cours de ce travail, nous avons tenté de mettre en place un algorithme décisionnel pour l'incrémentation de tests complémentaires aux méthodes antibiogrammes de première intention.

Dans le cas de la méthode de diffusion en milieu solide :

- **Pénicillines/aminopénicillines** : Rendre systématiquement résistant
- **Amoxicilline-acide clavulanique** et **pipéracilline-tazobactam** : Le CA-SFM recommande la détermination de CMI si le diamètre est compris dans la zone I. Nous suggérons d'augmenter ces zones à 25 mm comme le suggèrent les travaux de Nagy *et al.* et les données que nous avons obtenues au cours de ce travail.
- **Métronidazole** : Le travail que nous avons réalisé s'est basé sur les anciennes recommandations qui conseillaient l'utilisation d'un disque chargé à 16 µg. Dans ces conditions, les souches sensibles présentaient des diamètres supérieurs à 30 mm. Notre travail nous inciterait donc à contrôler les diamètres et l'identité des souches si les diamètres sont inférieurs à 30 mm. Le CA-SFM/EUCAST a proposé récemment un diamètre seuil de 15 mm pour un disque chargé à 5 µg. Il serait intéressant de vérifier la validité des nouvelles recommandations pour le métronidazole. Il sera toutefois important de rester vigilant face à des diamètres réduits pour cette molécule et d'appliquer la même démarche pour s'assurer de la sensibilité des souches.

- **Imipénème** : Le CA-SFM recommande de déterminer la CMI à l'imipénème pour les souches dont le diamètre est compris entre 18 et 23 mm. Nous suggérons de la compléter par la détermination de la CMI au méropénème si le patient doit être traité par un carbapénème (demande du clinicien, intolérance aux autres molécules, résistance aux autres classes médicamenteuses). En cas de dissociation entre la valeur des CMI du méropénème et de l'imipénème, il serait souhaitable de ne pas conseiller l'utilisation en thérapeutique des carbapénèmes.
- **Clindamycine** : nos données suggèrent que la diffusion en milieu solide est la méthode la plus sensible pour détecter les souches de sensibilité diminuée en raison d'un mécanisme d'inactivation ou d'efflux. Les résultats peuvent donc être transmis au clinicien en toute sécurité, ais au prix d'une surestimation de la résistance vraie.

Pour la microdilution en milieu liquide les tests complémentaires sont difficiles à incrémenter, car cette méthode permet de directement déterminer des CMI. Il est donc complexe de mettre en place des seuils induisant la réalisation d'une seconde détermination de CMI avec par exemple la méthode en E-test™. De plus, le coût de ces tests est relativement plus élevé et une seconde détermination de CMI demanderait un budget conséquent pour le rendu de résultats de routine. Aussi, pour les déterminations de sensibilité en routine, nous suggérons l'utilisation de l'antibiogramme par diffusion en milieu solide incrémenté de la détermination de CMI.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de comparer trois méthodes d'antibiogrammes, actuellement utilisées dans les laboratoires de biologie médicale, à la méthode de référence. Une caractérisation de profils de résistance génétique a été mise en place pour aider dans la compréhension de nos données phénotypiques. Au final, la méthode en diffusion additionnée de tests complémentaires respectant une stratégie bien définie reste l'une des approches techniques les plus fiables quant à la détermination des catégorisations des molécules fréquemment utilisées dans les infections à germes anaérobies, c'est-à-dire, le métronidazole, les macrolides et les β lactamines. Cette technique a notamment pour avantage de mettre en évidence des résistances aux macrolides qui ne sont pas détectées avec la méthode de référence ou la microdilution mais seulement par PCR. Les taux d'erreurs rendus par la méthode en diffusion pour les β lactamines sont inférieures à ceux des méthodes en microdilution mais présentent tout de même des écarts non-négligeables pour l'amoxicilline-acide clavulanique et piperacilline-tazobactam. Ces discordances pourraient être améliorées en déterminant les CMI pour les souches dont les diamètres sont proches des diamètres critiques. Une remarque est à faire sur la sensibilité aux carbapénèmes : l'imipénème ne permet pas d'appréhender de façon satisfaisante les résistances aux carbapénèmes, il serait préférable de remplacer cette molécule par le méropénème qui au cours de ce travail s'est montré plus efficace. Malheureusement, aucun diamètre limite de sensibilité n'est proposé par le CA-SFM. Concernant le métronidazole, des tests complémentaires sont à incrémenter lorsque des variations de diamètre sont visibles. Cette difficulté de mettre en évidence les mécanismes de résistance *in vitro* des isolats appartenant au *Bacteroides* du groupe *fragilis*, nécessite de mettre en place des algorithmes afin de rendre un résultat le plus juste possible.

En matière de perspectives, il serait intéressant, pour compléter ce travail, de comparer ces approches phénotypiques au séquençage complet de l'ensemble de la collection. Cela permettrait de savoir si une approche par biologie moléculaire par NGS (Next Generation Sequencing) (lorsque celle-ci sera plus accessible en routine) aiderait à répondre de façon plus précise à cette problématique de catégorisation des souches cliniques en pratique courante.

BIBLIOGRAPHIE

1. Deuxième époque : 1862 - 1877 [Internet]. Institut Pasteur. 2016 [cited 2020 Apr 24]. Available from: <https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/notre-histoire/deuxieme-epoque-1862-1877>
2. Nakano MM, Zuber P. Strict and Facultative Anaerobes: Medical and Environmental Aspects. CRC Press; 2004. 412 p.
3. Sebald M, Finegold SM. Pasteur: The Anaerobic Life and the Anaerobes. Clin Infect Dis. 1995 Jun 1;20(Supplement_2):S111–S111.
4. Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarshewski A, Chaumeil P-A, et al. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. Nat Biotechnol. 2018 Nov;36(10):996–1004.
5. Sedallian A, Dubreuil L. Généralité sur les bactéries anaérobies. In: Précis de bactériologie clinique. 2nd ed. Edition ESKA; 2007. p. 1631–46.
6. Guilhot E, Khelaifia S, La Scola B, Raoult D, Dubourg G. Methods for culturing anaerobes from human specimen. Future Microbiology. 2018 Mar;13(3):369–81.
7. Dubreuil L. Bactéries anaérobies : généralités. EMC - Biologie Médicale. 2006 Jan;1(2):1–6.
8. Nagy E, Boyanova L, Justesen US. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories. Clinical Microbiology and Infection. 2018 Nov;24(11):1139–48.
9. Olsen I, Paster BJ, Dewhirst FE. Taxonomy of spirochetes. Anaerobe. 2000 Feb;6(1):39–57.
10. Chan ECS, McLaughlin R. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. Oral Microbiol Immunol. 2000 Feb;15(1):1–9.
11. Dubreuil L. Bactéries anaérobies à Gram négatif. EMC - Biologie Médicale. 2006 Jan;1(2):1–8.
12. Dubreuil L. Bactéries anaérobies à Gram positif. EMC - Biologie Médicale. 2006 Jan;1(2):1–9.
13. Wexler HM. *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. Clinical Microbiology Reviews. 2007 Oct;20(4):593–621.
14. Hentges DJ. The Anaerobic Microflora of the Human Body. Clinical Infectious Diseases. 1993 Jun 1;16(Supplement_4):S175–80.
15. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. Physiol Rev. 2010;90:46.
16. Zijng V, van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, et al. Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. Bereswill S, editor. PLoS ONE. 2010 Feb 24;5(2):e9321.
17. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. Nat Rev Microbiol. 2011 Apr;9(4):244–53.
18. Hyman RW, Fukushima M, Diamond L, Kumm J, Giudice LC, Davis RW. Microbes on the human vaginal epithelium. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005 May 31;102(22):7952–7.
19. Lamont R, Sobel J, Akins R, Hassan S, Chaiworapongsa T, Kusanovic J, et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques: Vaginal microbiome using molecular tools. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. 2011 Apr;118(5):533–49.
20. Wexler HM. Anaerobic Infections. In: Molecular Medical Microbiology. 2nd ed. Elsevier; 2015. p. 875–97. (Academic Press; vol. 2).

21. Pfaller MA, Richter SS, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Carroll KC, et al., editors. Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition. American Society of Microbiology; 2015.
22. Brook I. Spectrum and treatment of anaerobic infections. Journal of Infection and Chemotherapy. 2016 Jan;22(1):1–13.
23. Brook I. Microbiology and management of joint and bone infections due to anaerobic bacteria. Journal of Orthopaedic Science. 2008 Mar;13(2):160–9.
24. Guet-Revillet H, Coignard-Biehler H, Jais J-P, Quesne G, Frapy E, Poirée S, et al. Bacterial Pathogens Associated with Hidradenitis Suppurativa, France. Emerg Infect Dis. 2014 Dec;20(12):1990–8.
25. Lee EY, Alhusayen R. What is hidradenitis suppurativa? Canadian Family Physician. 2017;63(2):114–20.
26. Lebowitz D, Kressmann B, Gjoni S, Zenelaj B, Grosgrin O, Marti C, et al. Clinical features of anaerobic orthopaedic infections. Infectious Diseases. 2017 Feb;49(2):137–40.
27. Sakamoto M, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2006 Jul 1;56(7):1599–605.
28. MetaHIT Consortium, Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010 Mar;464(7285):59–65.
29. Hahnke RL, Meier-Kolthoff JP, García-López M, Mukherjee S, Huntemann M, Ivanova NN, et al. Genome-Based Taxonomic Classification of *Bacteroidetes*. Front Microbiol. 2016 Dec 20;7:2003.
30. Dubreuil L, Behra-Miellet J. Bactéries anaérobies strictes : Taxonomie et bilan de sensibilité aux antimicrobiens. Médecine et Maladies Infectieuses. 2000 Mar;30(Supplement 2):77–84.
31. Jenkins SA, Drucker DB, Keaney MGL, Ganguli LA. Evaluation of the RAPID ID 32A system for the identification of *Bacteroides fragilis* and related organisms. Journal of Applied Bacteriology. 1991 Oct;71(4):360–5.
32. Hungate RE. Chapter IV A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. In: Methods in Microbiology. Elsevier; 1969. p. 117–32.
33. Bacic MK, Smith CJ. Laboratory Maintenance and Cultivation of *Bacteroides* Species. Current Protocols in Microbiology. 2008 May;9(1):13C.1.1–13C.1.21.
34. Eley A, Greenwood DF. Comparative Growth of *Bacteroides* Species in Various Anaerobic Culture Media. Vol. 19, Journal of Medical Microbiology. Microbiology Society; 1985. p. 195–201.
35. Leber AL. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 4th ed. Washington: American Society of Microbiology; 2016.
36. CASFM/EUCAST. Recommendations 2020 V.1.1 Avril [Internet]. Available from: <https://www.sfm-microbiologie.org/2020/04/07/casfm-eucast-v1-0-avril-2020/>
37. Shannon S, Kronemann D, Patel R, Schuetz AN. Routine use of MALDI-TOF MS for anaerobic bacterial identification in clinical microbiology. Anaerobe. 2018 Dec;54:191–6.
38. Lay JO. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. Mass Spectrom Rev. 2001;20(4):172–94.
39. Sakamoto M, Ohkuma M. Identification and classification of the genus *Bacteroides* by multilocus sequence analysis. Microbiology. 2011 Dec 1;157(12):3388–97.

40. Duerden BI. Virulence Factors in Anaerobes. *Clinical Infectious Diseases*. 1994 May 1;18(Supplement 4):S253–9.
41. Sears CL. The toxins of *Bacteroides fragilis*. *Toxicon*. 2001 Nov;39(11):1737–46.
42. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *AAC*. 2010 Mar;54(3):969–76.
43. Eitel Z, S3ki J, Urb3n E, Nagy E. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. *Anaerobe*. 2013 Jun 1;21:43–9.
44. Rogers MB, Parker AC, Smith CJ. Cloning and Characterization of the Endogenous Cephalosporinase Gene, *cepA*, from *Bacteroides fragilis* Reveals a New Subgroup of Ambler Class A, Beta-Lactamases. 1993;37:10.
45. Nagy E, Urb3n E, Nord CE. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011 Mar;17(3):371–9.
46. Nakajima Y. Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 1999;5(2):61–74.
47. Trevi3o M, Areses P, Dolores Pe3alver M, Cortizo S, Pardo F, Luisa P3rez del Molino M, et al. Susceptibility trends of *Bacteroides fragilis* group and characterization of carbapenemase-producing strains by automated REP-PCR and MALDI TOF. *Anaerobe*. 2012 Feb;18(1):37–43.
48. Breuil J, Burnat C, Patey O, Dublanchet A. Survey of *Bacteroides fragilis* susceptibility patterns in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1989 Jul;24(1):69–75.
49. Ghotaslou R, Bannazadeh Baghi H, Alizadeh N, Yekani M, Arbabi S, Memar MY. Mechanisms of *Bacteroides fragilis* Resistance to Metronidazole. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018 Oct;64:156–63.
50. L3fmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C. Inducible Metronidazole Resistance and *nim* Genes in Clinical *Bacteroides fragilis* Group Isolates. *AAC*. 2005 Mar;49(3):1253–6.
51. L. Dubreuil. Chapitre 48. Anan3robie s 3 Gram n3gatif. In: *Antibiogramme*. 23me 3dition. ESKA; p. 547–62.
52. Oh H, El Amin N, Davies T, Appelbaum PC, Edlund C. *gyrA* Mutations Associated with Quinolone Resistance in *Bacteroides fragilis* Group Strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Jul 1;45(7):1977–81.
53. Brook I, Wexler HM, Goldstein EJC. Antianaerobic Antimicrobials: Spectrum and Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013 Jul 1;26(3):526–46.
54. Patel JB, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2017.
55. Rogers MB. Insertional Activation of *cepA* Leads to High-Level Beta-Lactamase Expression in *Bacteroides fragilis* Clinical Isolates. *J BACTERIOL*. 1994;176:9.
56. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti J-L, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*. 2011 Jan;44(1):104–9.
57. Soki J, Gonzalez SM, Urban E, Nagy E, Ayala JA. Molecular analysis of the effector mechanisms of cefoxitin resistance among *Bacteroides* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011 Nov 1;66(11):2492–500.
58. Nagy E, Justesen US, Eitel Z, Urb3n E. Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group isolates. *Anaerobe*. 2015 Feb;31:65–71.

Annexe 1 : Caractérisation génétiques des souches danoises et hollandaises fournies par les laboratoires d'origine

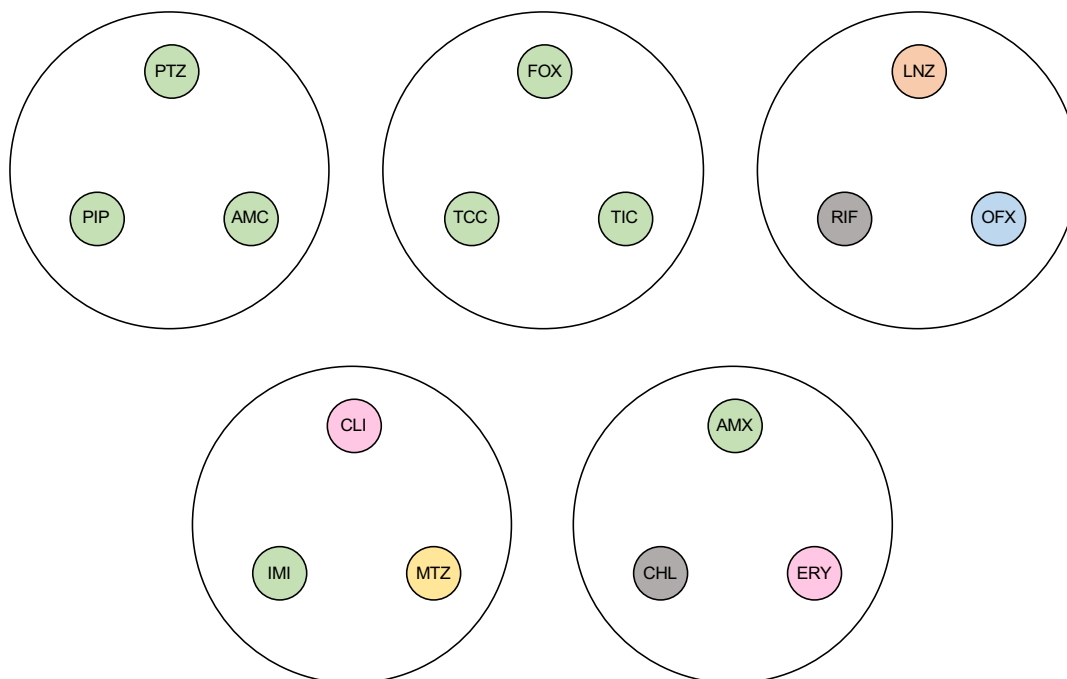
Code	Espèce	Score MALDI-TOF	Prélèvement	cepA	cfxA	cfiA	ermF	ermB	ermG	mefA	nim
bf_u17	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,4	Hémoculture	-	+	+	-	-	-	-	+
bf_u18	<i>Bacteroides fragilis</i>	1,95	Hémoculture	-	-	+	+	-	-	-	+
bf_u19	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,35	Hémoculture	+	-	-	-	-	-	+	-
bf_u21	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,14	Hémoculture	-	-	-	-	-	-	-	-
bf_u23	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2,29	Hémoculture	+	-	-	+	-	-	-	-
bf_u32	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,2	Hémoculture	-	-	+	-	-	-	-	-
bf_u35	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,14	Hémoculture	-	-	+	-	-	-	-	-
bf_u36	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2,29	Hémoculture	-	+	-	-	-	+	-	-
bf_u42	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,2	Hémoculture	+	-	-	+	-	-	-	+
bf_u57	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,24	Hémoculture	-	-	+	-	-	-	-	-
bf_u67	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,19	Hémoculture	-	+	+	-	-	-	-	-
bf_u76	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,3	Hémoculture	+	-	-	-	-	-	-	-
bf_u85	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,31	Hémoculture	-	+	+	-	+	-	-	-
bf_n1	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,32	Inconnu	+	-	-	-	NR	NR	NR	-
bf_n18	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,33	Inconnu	-	-	+	-	NR	NR	NR	-
bf_n19	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,17	Inconnu	-	-	+	-	NR	NR	NR	-
bf_n10	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,28	Inconnu	-	-	+	-	NR	NR	NR	-
bf_n11	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,3	Inconnu	-	-	+	+	NR	NR	NR	-
bf_n131	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,37	Inconnu	+	-	-	+	NR	NR	NR	-
bf_n134	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,19	Inconnu	+	-	-	-	NR	NR	NR	-
bf_n136	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,37	Inconnu	+	-	-	-	NR	NR	NR	-
bf_n147	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,42	Inconnu	+	-	-	+	NR	NR	NR	-
bf_n148	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,46	Inconnu	+	-	-	-	NR	NR	NR	-
bf_n150	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,45	Inconnu	+	-	-	-	NR	NR	NR	-

NR : Non Réalisé

Annexe 2 : Séquences des amorces des gènes de résistance de *Bacteroides* groupe *fragilis*

Gènes	Amorces 5' -> 3'	Programme (35 cycles)
<i>cepA</i>	TTTCTGCTATGTCCTGCCT ATCTTTCACGAAGACGGC	95°C 20s, 60°C 20s, 72°C 30s
<i>cfiA</i>	AATCGAAGGATGGGGTATGG CGGTCAGTGAATCGGTGAAT	95°C 20s, 59°C 20s, 72°C 30s
<i>cfxA</i>	TGACTGGCCCTGAATAATCT ACAAAAGATAGCGCAAATCC	95°C 20s, 55°C 20s, 72°C 30s
<i>ermB</i>	GCGGAATGCTTTCATCCTAA GCGTGTTTCATTGCTTGATG	95°C 20s, 59°C 20s, 72°C 30s
<i>ermF</i>	TAGATATTGGGGCAGGCAAG GGAAATTGCGGAACTGCAAA	95°C 20s, 58°C 20s, 72°C 30s
<i>ermG</i>	ATAGGTGCAGGGAAAGGTCA TGGATTGTGGCTAGGAAATGT	95°C 20s, 59°C 20s, 72°C 30s
<i>linA</i>	CTGGGGAGTGGATGTCTTGT AGTTGGCTTGTTTGGAAGTG	95°C 20s, 60°C 20s, 72°C 30s
<i>mefA</i>	ATACCCCAGCACTCAATTCTG CAATCACAGCACCCAATACG	95°C 20s, 64°C 20s, 72°C 30s
<i>msrSA</i>	GGGAACTGAAAGATGGCAAA TACGAGCCTGTTTTCGCTTT	95°C 20s, 60°C 20s, 72°C 30s
<i>bexA</i>	TAGTGTTGCTGCGATTCTG TCAGCGTCTTGGTCTGTGTC	95°C 20s, 60°C 20s, 72°C 30s
<i>nim</i>	ATGTTTCAGAGAAATGCGGCGTAAGTG GCTTCCTCGCCTGTCACGTGCTC	95°C 20s, 62°C 20s, 72°C 30s

Annexe 3 : Antibiogramme en diffusion pour bactéries anaérobies.



Abréviation	Molécule	Charge disque (µg)
PTZ	Pipéracilline-Tazobactam	75/10
AMC	Amoxicilline-Acide clavulanique	20/10
PIP	Pipéracilline	75
FOX	Céfoxitine	30
TIC	Ticarcilline	75
TCC	Ticarcilline-Acide clavulanique	75/10
LNZ	Linézolide	30
OFX	Ofloxacin	5
RIF	Rifampicine	30
CLI	Clindamycine	2
MTZ	Métronidazole	16
IMI	Imipénème	10
AMX	Amoxicilline	25
ERY	Erythromycine	15
CHL	Chloramphénicol	30

Selon les recommandations de CA-SFM 2013

Annexe 4 : Plan de plaque Sensititre™ anaérobie fourni par le fabricant.

2802111655

**SENSITITRE
ANAERO3**

Anaerobe Reference Card

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	PEN 8	AMOX 32	AUG2 32/16	P/T4 128/4	FOX 64	IMI 8	IMI 128	ERY 128	CLI 64	MRD 32	MXF 8	TET 16	PEN
B	PEN 4	AMOX 16	AUG2 16/8	P/T4 64/4	FOX 32	IMI 4	IMI 64	ERY 64	CLI 32	MRD 16	MXF 4	TET 8	AMOX AUG2 P/T4
C	PEN 2	AMOX 8	AUG2 8/4	P/T4 32/4	FOX 16	IMI 2	IMI 32	ERY 32	CLI 16	MRD 8	MXF 2	TET 4	PIP FOX
D	PEN 1	AMOX 4	AUG2 4/2	P/T4 16/4	FOX 8	IMI 1	IMI 16	ERY 16	CLI 8	MRD 4	MXF 1	TET 2	IMI CHL
E	PEN 0.5	AMOX 2	AUG2 2/1	PIP 128	FOX 4	IMI 0.5	CHL 16	ERY 8	CLI 4	MRD 2	MXF 0.5	VAN 8	ERY CLI
F	PEN 0.25	AMOX 1	AUG2 1/0.5	PIP 64	FOX 2	IMI 0.25	CHL 8	ERY 4	CLI 2	MRD 1	MXF 0.25	VAN 4	MRD POS
G	PEN 0.12	AMOX 0.5	AUG2 0.5/0.25	PIP 32	FOX 1	IMI 0.12	CHL 4	ERY 2	CLI 1	MRD 0.5	MXF 0.12	VAN 2	MXF TET
H	PEN 0.06	AMOX 0.25	AUG2 0.25/0.12	PIP 16	FOX 0.5	IMI 0.06	CHL 2	ERY 1	CLI 0.5	POS CON	POS CON	POS CON	VAN VAN

ANTIMICROBICS

Penicillin
Amoxicillin
Amoxicillin / clavulanic acid 2:1 ratio
Piperacillin / tazobactam constant 4
Piperacillin
Cefoxitin
Imipenem
Chloramphenicol
Erythromycin
Clindamycin
Metronidazole
Positive Control
Moxifloxacin
Tetracycline
Vancomycin

Annexe 5 : Plan de plaque Micronaut-S™ anaerobes MIC fourni par le fabricant.

Catalog no.		Category		Description								MERLIN Diagnostika	
E1-085-040		H		MICRONAUT-S Anaerobes MIC									
Layout		K											
1 Test													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	PEN 8	AMP 8	AMC 64/32	PIT 128/4	MER 64	IMP 64	ERT 16	MTR 32	MOX 8	CLI 8	DOX 16	TGC 8	
B	PEN 4	AMP 4	AMC 32/16	PIT 64/4	MER 32	IMP 32	ERT 8	MTR 16	MOX 4	CLI 4	DOX 8	TGC 4	
C	PEN 2	AMP 2	AMC 16/8	PIT 32/4	MER 16	IMP 16	ERT 4	MTR 8	MOX 2	CLI 2	DOX 4	TGC 2	
D	PEN 1	AMP 1	AMC 8/4	PIT 16/4	MER 8	IMP 8	ERT 2	MTR 4	MOX 1	CLI 1	DOX 2	TGC 1	
E	PEN 0,5	AMP 0,5	AMC 4/2	PIT 8/4	MER 4	IMP 4	ERT 1	MTR 2	MOX 0,5	CLI 0,5	DOX 1	VAN 8	
F	PEN 0,25	AMP 0,25	AMC 2/1	PIT 4/4	MER 2	IMP 2	ERT 0,5	MTR 1	MOX 0,25	CLI 0,25	DOX 0,5	VAN 4	
G	PEN 0,125	AMP 0,125	AMC 1/0,5	PIT 2/4	MER 1	IMP 1	ERT 0,25	MTR 0,5	MOX 0,125	CLI 0,125	DOX 0,25	VAN 2	
H	PEN 0,0625	AMP 0,0625	AMC 0,5/0,25	PIT 1/4	MER 0,5	IMP 0,5	ERT 0,125	MTR 0,25	MOX 0,0625	CLI 0,0625	DOX 0,125	GC	

[The concentrations are indicated in µg/ml]

LEGEND

AMC	Amoxicillin/clavulanic acid
AMP	Ampicillin
CLI	Clindamycin
DOX	Doxycycline
ERT	Ertapenem
GC	Growth control
IMP	Imipenem
MER	Meropenem
MTR	Metronidazole
MOX	Moxifloxacin
PEN	Penicillin G
PIT	Piperacillin/tazobactam
TGC	Tigecycline
VAN	Vancomycin

Annexe 6 : Caractéristique phénotypiques et moléculaires des 55 souches de *Bacteroides* testées : résultats bruts des diamètres et CMI mesurées avec chacune des méthodes antibiogramme testées et présence de gènes de résistance

Souche	Espèce	Origine	CMI (mg/L) et diamètres (mm) mesurés pour 5(<i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i>												Gènes de résistance							
			AMX				AMC				PIP				TZP							
			Diffusion ™ (mm)	Sensitivité ™ (mg/l)	Micronaut ™ (mg/L)	Steers (mg/l)	Diffusion ™ (mm)	Sensitivité ™ (mg/l)	Micronaut ™ (mg/L)	Steers (mg/l)	Diffusion ™ (mm)	Sensitivité ™ (mg/l)	Micronaut ™ (mg/L)	Steers (mg/l)	Diffusion ™ (mm)	Sensitivité ™ (mg/l)	Micronaut ™ (mg/L)	Steers (mg/l)	cepA	ctxA	ctxA	
ATCC 25285	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	21	16	8	64	40	0,25	0,5	2	35	16	-	4	40	16	1	2	+	-	-	
bf_03	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	6	>32	>8	>64	36	2	2	8	12	128	-	256	36	16	1	8	+	+	-	
bf_04	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	6	>32	>8	>64	24	8	8	32	6	128	-	256	33	16	1	8	+	+	-	
bf_06	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	6	>32	>8	>64	38	2	1	8	6	128	-	256	36	16	1	8	+	+	-	
bf_08	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	6	>32	>8	>64	32	4	4	16	6	128	-	256	34	16	1	8	+	+	-	
bf_11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	6	>32	>8	>64	34	1	2	8	18	64	-	64	34	16	1	4	+	-	-	
bf_15	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	19	16	>8	64	40	0,25	0,5	2	32	16	-	4	36	16	1	2	+	-	-	
bf_16	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	21	16	>8	32	39	0,25	0,5	1	31	16	-	2	37	16	1	2	+	-	-	
bf_23	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	6	>32	>8	>64	8	32	16	64	6	128	-	256	7	128	128	128	-	+	+	
bf_25	<i>Bacteroides fragilis</i>	Caen	12	>32	>8	>64	37	0,5	1	2	20	32	-	32	40	16	1	4	+	+	-	
bf_n1	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	20	16	>8	>64	37	0,5	0,5	2	36	16	-	8	35	16	1	2	+	-	-	
bf_n10	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	34	8	4	>64	33	4	2	4	33	16	-	2	37	16	1	2	-	-	+	
bf_n11	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	34	8	8	>64	34	8	2	4	35	16	-	16	37	16	1	8	-	-	+	
bf_n131	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	30	8	8	>64	40	0,25	0,5	1	37	16	-	2	40	16	1	1	+	-	-	
bf_n134	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	23	16	>8	>64	38	0,25	0,5	1	32	16	-	4	38	16	1	2	+	-	-	
bf_n136	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	21	16	>8	>64	37	0,5	0,5	1	32	16	-	4	36	16	1	2	+	-	-	
bf_n147	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	20	8	8	>64	36	0,5	0,5	1	32	16	-	4	36	16	1	2	+	-	-	
bf_n148	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	20	32	>8	>64	40	0,5	0,5	2	34	32	-	8	35	16	1	2	+	-	-	
bf_n150	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	27	8	>8	>64	38	0,25	0,5	1	37	16	-	4	40	16	1	2	+	-	-	
bf_n18	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	36	4	4	64	34	4	2	2	32	16	-	2	37	16	1	2	-	-	+	
bf_n19	<i>Bacteroides fragilis</i>	Pays-Bas	35	4	2	>64	35	4	1	4	34	16	-	2	40	16	1	2	-	-	+	
bf_s10	<i>Bacteroides fragilis</i>	Strasbourg	18	16	>8	>64	39	0,5	0,5	2	32	16	-	8	37	16	1	2	+	-	-	
bf_s3	<i>Bacteroides fragilis</i>	Strasbourg	6	>32	>8	>64	21	8	16	64	6	128	-	256	17	16	32	32	+	-	-	
bf_t01	<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	6	>32	>8	>64	16	16	16	64	6	8	-	256	29	16	1	16	+	+	-	

Annexe 6 : Suite

Souche		Espèce	Origine	CMI (mg/L) et diamètres (mm) mesurés pour 55 <i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i>												Gènes de résistance								
				AMX				AMC				PIP						TZP						
				Diffusion (mm)	Sensititre™ (mg/l)	Micronaut™ (mg/L)	Steers (mg/l)	Diffusion (mm)	Sensititre™ (mg/l)	Micronaut™ (mg/L)	Steers (mg/l)	Diffusion (mm)	Sensititre™ (mg/l)	Micronaut™ (mg/L)	Steers (mg/l)			Diffusion (mm)	Sensititre™ (mg/l)	Micronaut™ (mg/L)	Steers (mg/l)			
bf_t10		<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	21	16	8	64	40	0,25	0,5	2	32	16	-	4	34	16	1	2	+	-	<i>cepA</i>	<i>cfxA</i>	<i>cflA</i>
bf_t11		<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	24	16	>8	32	40	0,25	0,5	1	29	16	-	4	35	16	1	2	+	-			
bf_t13		<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	6	>32	>8	>64	18	8	16	64	16	128	-	128	14	128	64	32	-	+	-		
bf_t14		<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	6	>32	>8	>64	6	32	32	64	6	128	-	256	6	128	128	256	-	-	+		
bf_t15		<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	6	>32	>8	>64	17	16	16	64	17	128	-	256	16	128	128	128	-	-	+		
bf_t16		<i>Bacteroides fragilis</i>	Toulouse	12	>32	>8	>64	22	16	16	64	8	128	-	256	18	16	128	16	-	-	+		
bf_u17		<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	6	>32	>8	>64	6	32	32	64	6	128	-	256	6	128	128	256	-	-	+		
bf_u18		<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	10	>32	>8	>64	11	32	32	64	16	128	-	128	6	128	128	32	-	-	+		
bf_u19		<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	17	32	>8	64	40	0,5	0,5	2	34	16	-	16	40	16	1	2	+	-			
bf_u21		<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	18	32	>8	64	40	0,5	0,5	2	36	16	-	8	40	16	1	2	+	-			
bf_u32		<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	38	2	1	2	37	2	0,5	1	40	16	-	2	40	16	1	2	-	-	+		
bf_u35		<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	36	16	8	8	32	16	2	8	36	16	-	2	35	16	1	4	-	-	+		
bf_u42		<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	6	>32	>8	>64	38	1	1	4	26	32	-	64	36	16	1	8	+	-			
bf_u57		<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	6	>32	>8	>64	26	8	8	16	10	128	-	256	35	16	1	4	-	-	+		
bf_u67		<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	6	>32	>8	>64	19	16	16	64	6	128	-	256	24	16	1	16	+	+	+		
bf_u76		<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	6	16	>8	>64	38	0,5	0,5	2	29	16	-	4	35	16	1	2	+	-			
bf_u85		<i>Bacteroides fragilis</i>	Danemark	6	>32	>8	>64	25	16	8	64	6	128	-	256	24	16	4	32	-	+	+		
bf_s11		<i>Bacteroides ovatus</i>	Strasbourg	6	>32	>8	>64	18	16	16	64	6	128	-	256	19	16	2	16	-	+	-		
bf_s4		<i>Bacteroides ovatus</i>	Strasbourg	6	>32	>8	>64	16	16	16	64	6	128	-	256	17	16	4	32	-	+			
bf_s14		<i>Bacteroides salyersiae</i>	Strasbourg	16	16	>8	>64	32	0,5	0,5	64	18	16	-	256	28	16	2	256	-	+			
bf_t17		<i>Bacteroides salyersiae</i>	Toulouse	6	>32	>8	>64	12	32	64	64	6	128	-	256	6	128	128	256	-	-			
bf_s1		<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	14	32	>8	>64	35	0,5	0,5	16	19	16	-	64	13	16	4	32	-	-			
bf_s12		<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	15	16	>8	>64	35	1	0,5	2	18	16	-	32	26	16	2	16	-	-			
bf_s13		<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	15	16	>8	>64	38	0,5	0,5	2	22	16	-	32	19	16	2	16	-	-			

Annexe 6 : Suite

CMI (mg/L) et diamètres (mm) mesurés pour 55 <i>Bactéroïdes</i> du groupe <i>fragilis</i>																
Souche	Espèce	Origine	AMX			AMC			PIP			TZP			Gènes de résistance	
			Diffusion (mm)	Sensitivité™ (mg/l)	Micronaut™ (mg/L)	Steers (mg/l)	Diffusion (mm)	Sensitivité™ (mg/l)	Micronaut™ (mg/L)	Steers (mg/l)	Diffusion (mm)	Sensitivité™ (mg/l)	Micronaut™ (mg/L)	Steers (mg/l)	cepA	ctxA
bf_s19	<i>Bacteroïdes thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	12	16	>8	>64	38	0,5	0,5	2	17	16	-	32	-	-
bf_s8	<i>Bacteroïdes thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	6	>32	>8	>64	28	8	4	16	6	128	-	256	-	+
bf_t18	<i>Bacteroïdes thetaiotaomicron</i>	Toulouse	13	32	>8	64	40	0,5	0,5	2	20	32	-	32	-	-
bf_u23	<i>Bacteroïdes thetaiotaomicron</i>	Danemark	7	32	>8	>64	24	8	4	32	7	128	-	256	-	-
bf_t12	<i>Bacteroïdes uniformis</i>	Toulouse	6	>32	>8	>64	19	16	16	64	6	128	-	256	-	+
bf_t02	<i>Bacteroïdes vulgatus</i>	Toulouse	6	>32	>8	>64	26	4	4	16	18	64	-	128	-	+
bf_t19	<i>Bacteroïdes vulgatus</i>	Toulouse	6	>32	>8	>64	18	16	8	64	6	128	-	256	-	-
bf_u36	<i>Bacteroïdes vulgatus</i>	Danemark	6	>32	>8	>64	37	2	1	8	13	128	-	256	-	+

Annexe 6 : Suite

Souche		Espèce	Origine	CMI (mg/L) et diamètres (mm) mesurés pour 55 <i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i>										Gène de résistance antibiotique																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
				IMP					MTZ					CLI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
				Diffusion (mm)	Sensible™ (mg/l)	Micronaut™ (mg/L)	Steers (mg/l)	Diffusion (mm)	Sensible™ (mg/l)	Micronaut™ (mg/L)	Steers (mg/l)	Diffusion (mm)	Sensible™ (mg/l)	Micronaut™ (mg/L)	Steers (mg/l)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											

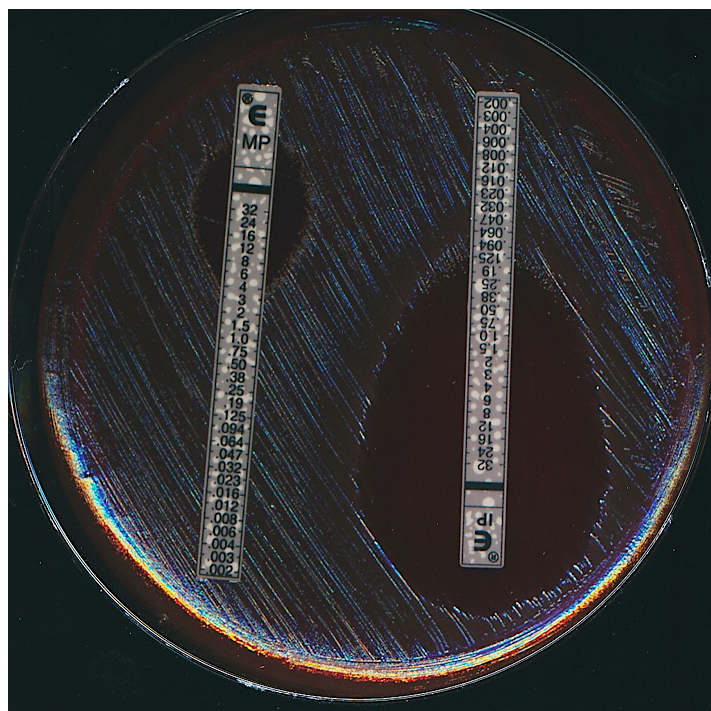
Annexe 6 : Suite

Souche Espèce		CMI (mg/L) et diamètres (mm) mesurés pour 55 <i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i>		Gène de résistance antibiotique									
		IMP			MTZ			CLI			cepA		
		Diffusion (mm)	Sensitivité TM (mg/l)	Micronaut TM (mg/L)	Steers (mg/l)	Diffusion (mm)	Sensitivité TM (mg/l)	Micronaut TM (mg/L)	Steers (mg/l)	Diffusion (mm)			
bf_t10	<i>Bacteroides fragilis</i>	40	0,06	0,5	0,5	40	1	1	0,5	13	1	0,5	1
bf_t11	<i>Bacteroides fragilis</i>	34	0,06	0,5	0,25	39	1	0,5	0,5	15	1	0,5	1
bf_t13	<i>Bacteroides fragilis</i>	10	16	32	32	40	1	0,5	0,5	6	64	8	64
bf_t14	<i>Bacteroides fragilis</i>	6	128	>64	64	31	16	4	4	15	1	0,5	2
bf_t15	<i>Bacteroides fragilis</i>	20	128	64	64	40	0,5	0,25	0,25	6	64	8	64
bf_t16	<i>Bacteroides fragilis</i>	27	8	16	32	40	1	0,5	0,5	6	64	8	64
bf_u17	<i>Bacteroides fragilis</i>	6	>128	64	64	6	32	32	64	13	1	4	2
bf_u18	<i>Bacteroides fragilis</i>	8	64	16	32	22	32	32	16	15	2	4	2
bf_u19	<i>Bacteroides fragilis</i>	40	0,25	0,5	1	40	2	0,5	0,5	6	64	8	64
bf_u21	<i>Bacteroides fragilis</i>	40	0,12	0,5	0,25	40	1	0,5	0,5	6	64	8	64
bf_u32	<i>Bacteroides fragilis</i>	40	0,5	0,5	0,5	40	1	0,5	0,5	13	1	1	32
bf_u35	<i>Bacteroides fragilis</i>	38	2	1	4	40	1	0,5	0,5	15	1	0,5	2
bf_u42	<i>Bacteroides fragilis</i>	38	0,5	0,5	0,5	31	8	2	4	6	64	8	64
bf_u57	<i>Bacteroides fragilis</i>	38	0,5	0,5	2	40	2	0,25	0,5	12	2	2	2
bf_u67	<i>Bacteroides fragilis</i>	36	2	1	4	38	0,5	0,25	0,25	14	1	2	2
bf_u76	<i>Bacteroides fragilis</i>	39	0,12	0,5	0,25	40	0,5	0,25	0,25	6	64	8	64
bf_u85	<i>Bacteroides fragilis</i>	30	4	4	16	40	1	0,5	0,5	6	64	8	64
bf_s11	<i>Bacteroides ovatus</i>	37	0,25	1	2	40	2	1	1	20	0,5	0,5	1
bf_s4	<i>Bacteroides ovatus</i>	38	0,5	1	2	40	2	0,5	0,5	6	64	8	64
bf_s14	<i>Bacteroides salyersiae</i>	40	0,12	0,5	8	40	2	1	0,5	6	4	4	64
bf_t17	<i>Bacteroides salyersiae</i>	20	8	8	32	40	1	0,25	0,25	6	64	8	64
bf_s1	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	39	0,25	0,5	2	40	0,05	0,25	0,5	6	2	2	4

Annexe 6 : Suite

CMI (mg/L) et diamètres (mm) mesurés pour 55 <i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i>																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Souche	Espèce	Origine	IMP				MTZ				CLI				Gène de résistance antibiotique																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
			Diffusion (mm)	Sensitivité TM (mg/l)	Micronaut TM (mg/L)	Steers (mg/L)	Diffusion (mm)	Sensitivité TM (mg/l)	Micronaut TM (mg/L)	Steers (mg/l)	Diffusion (mm)	Sensitivité TM (mg/l)	Micronaut TM (mg/L)	Steers (mg/l)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
bf_s12	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Strasbourg	39	4	1	1	40	32	1	1	6	64	8	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Annexe 7 : E-test® méropénème (MP) et imipénème (IP) sur une souche *cfiA* positive





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.

TITRE

ETUDE COMPARATIVE DE DIFFERENTES METHODES D'EVALUATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ LES BACTERIES DU GROUPE *BACTEROIDES FRAGILIS* AYANT ACQUIS UN OU PLUSIEURS MECANISMES DE RESISTANCE

Résumé

Les *Bacteroides* du groupe *fragilis* sont des bactéries anaérobies les plus fréquemment isolées au cours d'infections profondes et de bactériémie à germes anaérobies stricts chez l'homme. Ces infections donnent lieu à des traitements antibiotiques faisant appel au métronidazole, aux pénicillines avec inhibiteurs de pénicillinases, aux carbapénèmes ou encore aux macrolides. Malgré une prise en charge adéquate, ces infections sont à l'origine de forts taux de mortalité. De plus, depuis le début des années 2000, les résistances au sein des *Bacteroides* sont en augmentation amenant à des échecs thérapeutiques plus fréquents.

Ce travail avait pour objectif de comparer différentes méthodes antibiogrammes utilisables en routine au laboratoire, à la méthode de référence, la dilution en milieu solide avec l'ensemencement multiple de type Steers. Les méthodes évaluées étaient deux kits de microdilution en milieu liquide (Sensititre™ et Micronaut-S™) et la diffusion de disques en milieu solide. Les souches testées provenaient d'une collection européenne de 55 *Bacteroides* du groupe *fragilis* présentant des résistances à une ou plusieurs familles antibiotiques. Une recherche de 11 gènes de résistances, les plus fréquents chez les *Bacteroides*, a également été faite et rapportée au phénotype observé.

Au terme de ce travail, les résultats suggèrent que la méthode de diffusion de disques en milieu solide permettrait une meilleure détermination des résistances des *Bacteroides* spp. notamment pour les macrolides et les pénicillines avec inhibiteurs de pénicillinases à condition d'augmenter les diamètres critiques pour ces dernières. Il a également été constaté que le méropénème était plus efficace que l'imipénème dans l'identification des résistances aux carbapénèmes.

TITLE

COMPARATIVE STUDY OF DIFFERENT ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING METHODS IN BACTERIA OF THE *BACTEROIDES FRAGILIS* GROUP WHICH ACQUIRED ONE OR MORE RESISTANCE MECHANISMS

Summary

Bacteroides from the *fragilis* group are the most frequent anaerobic bacteria isolated in bacteriemia and deep infections in Humans. These infections are treated by antibiotic agents such as metronidazole, penicillins with penicillinase inhibitors, carbapenems or macrolides. Despite adequate treatment, these infections are the cause of high mortality rates. Moreover, since the early 2000s, resistance within *Bacteroides* has been increasing, leading to more frequent treatment failures.

The aim of this work was to compare different antibiotic susceptibility testing methods, used routinely in laboratories, with the reference method, the agar dilution method. The evaluated methods were two industrial kits of microplate broth microdilution method (Sensititre™ and Micronaut-S™) and the agar disk diffusion method. The strains tested came from a European collection of 55 *Bacteroides fragilis* group presenting one or more resistance mechanisms. Eleven frequent resistance genes have been searched in the collection and related to the phenotypic resistance.

At the end of this work, results suggest that the disk diffusion method was the most efficient to determine the *Bacteroides* resistance profile, in particular to macrolides and penicillins with inhibitor, if a cut-off diameters increase are made for the last one. Meropenem has also been found to be more efficient than imipenem to determine carbapenems resistance.

Mots-clés : *Bacteroides*, sensibilité, résistance, diffusion, microdilution
