



**HAL**  
open science

# Résistance au bêta-lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa* : épidémiologie et mécanismes moléculaires

Feyrouz Sonia Sardi

► **To cite this version:**

Feyrouz Sonia Sardi. Résistance au bêta-lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa* : épidémiologie et mécanismes moléculaires. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03551546

**HAL Id: dumas-03551546**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03551546>**

Submitted on 3 Feb 2022

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenu le Jeudi 07 Octobre 2021

Par M<sup>lle</sup> **SARDI Feyrouz Sonia**

Née le 02/02/1994

À Toulouse

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017  
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

### **RÉSISTANCE AUX BETA-LACTAMINES CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*: ÉPIDÉMIOLOGIE ET MÉCANISMES MOLÉCULAIRES**

----oOo----

**JURY :**

Président : M. le Professeur Jean-Marc ROLAIN

Membres : Mme le Docteur Sophie BARON (Directrice de thèse)

M. le Docteur Grégory DUBOURG

Mme le Docteur Frédérique GOURIET



## THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenu le Jeudi 07 Octobre 2021

Par M<sup>lle</sup> **SARDI Feyrouz Sonia**  
Née le 02/02/1994  
À Toulouse

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017  
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

### **RÉSISTANCE AUX BETA-LACTAMINES CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*: ÉPIDÉMIOLOGIE ET MÉCANISMES MOLÉCULAIRES**

----oOo----

#### **JURY :**

Président : M. le Professeur Jean-Marc ROLAIN  
Membres : Mme le Docteur Sophie BARON (Directrice de thèse)  
M. le Docteur Grégory DUBOURG  
Mme le Docteur Frédérique GOURIET

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05  
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

#### **ADMINISTRATION :**

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

#### **DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

#### **PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI  
Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
M. François DEVRED  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES  
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON  
Mme Carole SIANI

## ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

**DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE**  
Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

## PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN-JAU  
Mme Florence SABATIER-MALATERRE  
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

## ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

## A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER
----------------------------	--------------------

## DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

## PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

**MAITRES DE CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

**A.H.U.**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

**ATER**

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC
---	---------------

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

**A.H.U.**

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

**ATER.**

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

## **Remerciements**

**A mon jury,**

A Monsieur le Professeur Jean-Marc ROLAIN,

Vous me faites l'honneur et le plaisir de présider ce jury de thèse. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt que vous portez à ce travail.

A Madame le Docteur Sophie BARON,

Merci de me faire l'honneur de diriger cette thèse. Du début à mon premier semestre aux mycobactéries jusqu'au prochain semestre en bactériologie, j'ai énormément appris. Je te suis énormément reconnaissante pour ta disponibilité, ta gentillesse et ta bienveillance.

A Monsieur le Docteur Grégory DUBOURG,

Merci de me faire l'honneur de siéger dans mon jury de thèse.

A Madame le Docteur Frédérique GOURIET,

Merci de me faire l'honneur de siéger dans mon jury de thèse.

**A toutes les équipes du diagnostic**, pour m'avoir accueillie dans ce laboratoire ; et à Reem qui m'a tant aidée dans ce travail.

**A tous mes co-internes.**

**A ma famille,**

**A mes amis,**

**A Anis.**

*« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »*

## Table des matières

Liste des abréviations .....	2
Liste des figures .....	4
Introduction .....	5
<b>1. Généralités .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Caractéristiques morphologiques, de culture et biochimiques .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Facteurs de virulence et biofilm .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Pathogénicité .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Terrains à risques .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Sensibilité aux antibiotiques et mécanismes de résistance .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Sensibilité aux antibiotiques et résistances intrinsèques.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2. Problématique de la résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Support des mécanismes de résistances acquises.....</b>	<b>16</b>
2.3.1. Mécanismes de résistance enzymatique .....	16
2.3.1.1 Surproduction de la céphalosporinase naturelle AmpC.....	16
2.3.1.2. Acquisition de gènes de résistance.....	17
2.3.1.2.1. Carbapénèmases .....	18
2.3.1.2.2. $\beta$ -lactamase à spectre élargi .....	20
2.3.2. Mécanisme des résistances non enzymatiques.....	22
2.3.2.1. Surproduction des systèmes d'efflux .....	22
2.3.2.2.1. MexXY-OprM.....	23
2.3.2.2.2. MexAB-OprM.....	23
2.3.2.2. Baisse de la perméabilité membranaire.....	24
<b>3. Étude de la résistance aux bêta-lactamines à l'AP-HM entre 2017 et 2021 :     prévalence et mécanismes de résistances .....</b>	<b>26</b>
<b>1.1. Matériels et méthodes .....</b>	<b>26</b>
<b>1.2. Résultats .....</b>	<b>30</b>
<b>1.3. Discussion .....</b>	<b>43</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>48</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>49</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>55</b>

## Liste des abréviations

AN:	Amikacine
ATM:	Aztréonam
BEL:	Belgium extended-spectrum $\beta$ -lactamase
BLSE:	$\beta$ -lactamase à spectre élargi
BGN:	Bacille à gram négatif
BMR :	Bactérie multi résistante
C1G:	Céphalosporine de 1 <sup>ère</sup> génération
C2G:	Céphalosporine de 2 <sup>ème</sup> génération
C3G:	Céphalosporine de 3 <sup>ème</sup> génération
CA-SFM:	Comité de l'Antibiogramme Société Française de Microbiologie
CAE:	Conduit auditif externe
CAZ:	Ceftazidime
CDC:	Center for Disease Control and Prevention
CIP:	Ciprofloxacine
CFTR:	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CMI:	Concentration minimale inhibitrice
CNR:	Centre national de Référence
CFFPR:	Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry
CTX:	Cefotaxime Munich
DO:	Doxycycline
ECDC:	European Centre for Disease Prevention and Control
EUCAST:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FEP:	Céfépime
FOS:	Fosfomycine
GES:	Guiana extended-spectrum $\beta$ -lactamase
GIM:	German imipenemase
GM:	Gentamicine
IN:	Infection nosocomiale
IPM:	Imipénème
KPC:	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
Mb:	Mégabase
MBL:	Métallo- $\beta$ -lactamase
MEM:	Méropénème
mL:	millilitre
NDM:	New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase
<i>P. aeruginosa</i> :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PARC:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistant à la ceftazidime
PAVM:	Pneumopathie acquise par ventilation mécanique
PER:	Pseudomonas Extended Resistance
PFGE:	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PSC :	Prélèvements sous cutanée
QS:	Quorum Sensing
RA:	Rifampicine
RAISIN:	Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales
RéPias:	Réseau de Prévention des infections associées aux soins
RND:	Resistance-Nodulation-Division
SARM:	Staphylococcus résistant à la méthicilline.
SFM:	Société Française de Microbiologie
SHV:	Sulphydryl variable lactamase;
SPM:	Sao Paulo metallo--lactamase
SXT:	Sulfaméthoxazole- Thrimétoprime
TEM:	Temoniera (nom du malade chez qui la première souche a été isolée)
TIC:	Ticarcilline
TCC:	Ticarcilline-Acide clavulanique
TZP:	Pipéracilline-Tazobactam
VIM:	Verona integrated-encoded MBL

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Antibiotiques actifs sur *P. aeruginosa*.

Tableau 2 : Principaux mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines du *P. aeruginosa*.

Tableau 3 : Prévalence de la résistance à la ceftazidime chez *P. aeruginosa* au sein des services.

Tableau 4 : Antibiotiques restant actifs chez les *P. aeruginosa* résistants à la ceftazidime.

Tableau 5 : Prévalence de la résistance à l'imipénème chez *P. aeruginosa* au sein des services.

Tableau 6 : Antibiotiques restant actifs chez les *P. aeruginosa* résistant à toutes les  $\beta$ -lactamines.

Tableau 7 : Résistance aux antibiotiques sur les souches de *P. aeruginosa* surproduisant la céphalosporinase AmpC.

Tableau 8 : Tests de sensibilités aux antibiotiques des 2 souches d'IMP-15 identifiées par PCR.

## Liste des figures

Figure 1 : Processus d'identification d'un isolat de *P. aeruginosa* à partir d'un prélèvement clinique.

Figure 2 : Formation du biofilm chez *P. aeruginosa*.

Figure 3 : Germes les plus fréquemment isolés chez le patient atteint de mucoviscidose en fonction de l'âge.

Figure 4 : Répartition de la résistance européenne aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa*.

Figure 5 : Répartition de la résistance européenne à la ceftazidime chez *P. aeruginosa*.

Figure 6 : A) AntibioGramme d'une souche surproduisant la céphalosporinase AmpC B) AntibioGramme d'une souche AmpC ESAC.

Figure 7 : Intégron de classe I : élément génétique mobile possédant le gène codant pour la métallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 : *bla*<sub>VIM-2</sub>.

Figure 8 :  $\beta$ -lactamase de spectre élargi et carbapénèmases identifiées chez *P. aeruginosa* en France.

Figure 9 : Répartition des carbapénèmases identifiées et disponible sur NCBI (au 11/04/2019).

Figure 10 : AntibioGramme d'une souche de *P. aeruginosa* surproduisant MexAB-OprM.

Figure 11 : A) Altération de la porine OprD impliquée dans la résistance aux carbapénèmes. B) Mécanisme à l'origine de la résistance à l'imipénème chez *P. aeruginosa* (2019-2020 CNR).

Figure 12 : AntibioGramme d'une souche de *P. aeruginosa* présentant une altération de l'oprD.

Figure 13 : A) Répartition des isolats de *P. aeruginosa* entre 2017 et 2021 selon les services B) selon l'origine des prélèvements.

Figure 14 : Répartition des souches sauvages sur la période 2017-2021.

Figure 15 : Évolution du profil de résistance aux bêta-lactamines de *P. aeruginosa* 2017-2021.

Figure 16 : Répartition des souches de *P. aeruginosa* résistantes à la ceftazidime.

Figure 17 : Répartition des souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème.

Figure 18 : Répartition des souches de *P. aeruginosa* résistantes à toutes les bêta-lactamines.

Figure 19 : Évolution entre 2017 et 2020 des souches résistantes à la ceftazidime et à l'imipénème et des souches sauvages sur les bactériémies à *P. aeruginosa*.

Figure 20 : Algorithme décisionnel pour la recherche des phénotypes de résistance à la ceftazidime.

Figure 21 : Algorithme décisionnel pour la recherche des phénotypes de résistance à l'imipénème.

## Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste humain responsable d'infections sévères chez les patients immunodéprimés, atteints de mucoviscidose et de pathologies chroniques (1). Au fil des années, les infections à *P. aeruginosa* sont devenues un problème de santé publique majeur du fait de la grande capacité de ce germe à acquérir de multiples résistances aux antibiotiques, limitant ainsi l'arsenal thérapeutique disponible. En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) classe *P. aeruginosa* comme bactérie prioritaire pour le développement de nouveaux antibiotiques. A ce jour, il est le quatrième germe nosocomial le plus isolé en France, et les infections à des isolats multi-résistants sont associées à une augmentation de la mortalité, de la durée d'hospitalisation et à un surcoût sur le système de santé (1,2).

La caractérisation de ces résistances est devenue essentielle pour garantir une prise en charge médicale efficace et prévenir la diffusion de ces résistances. Chez *P. aeruginosa*, les mécanismes de résistances sont multiples et s'additionnent, ce qui rend aujourd'hui l'interprétation des phénotypes difficile. La plupart de ces mécanismes sont d'origine chromosomique mais *P. aeruginosa* peut également acquérir des gènes de résistance par l'intermédiaire de transfert latéral de gène (TLG) incluant les transposons, qu'il peut diffuser à son tour à d'autres bactéries, entraînant un risque d'épidémie élevé. Parmi les résistances acquises enzymatiques, on note les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) et les carbapénémases. Ces enzymes ne semblent pas être le mécanisme de résistance majoritaire aux  $\beta$ -lactamines en France, mais il est important de suivre leur épidémiologie et de pouvoir les détecter afin d'isoler les patients (3). A l'inverse des entérobactéries, la détection des carbapénémases n'est pas recherchée dans notre laboratoire, en effet ce mécanisme est considéré comme étant rarement rencontré dans notre hôpital. Cependant, l'évolution parfois rapide de l'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques nous impose de mettre en place des systèmes de surveillance pour détecter ces enzymes. Dans ce travail, nous avons réalisé une étude épidémiologique de la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *P. aeruginosa* au sein de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (APHM) et étudié le support moléculaire de cette résistance. L'objectif est d'identifier les phénotypes de résistance liés à la présence de BLSE et de carbapénémases afin de sélectionner les souches nécessitant une recherche du support enzymatique de cette résistance. Pour cela, nous rappelons dans un premier temps, les caractéristiques de cette bactérie, puis nous nous concentrerons sur les résistances aux  $\beta$ -lactamines pour ensuite aborder notre étude.

# 1. Généralités

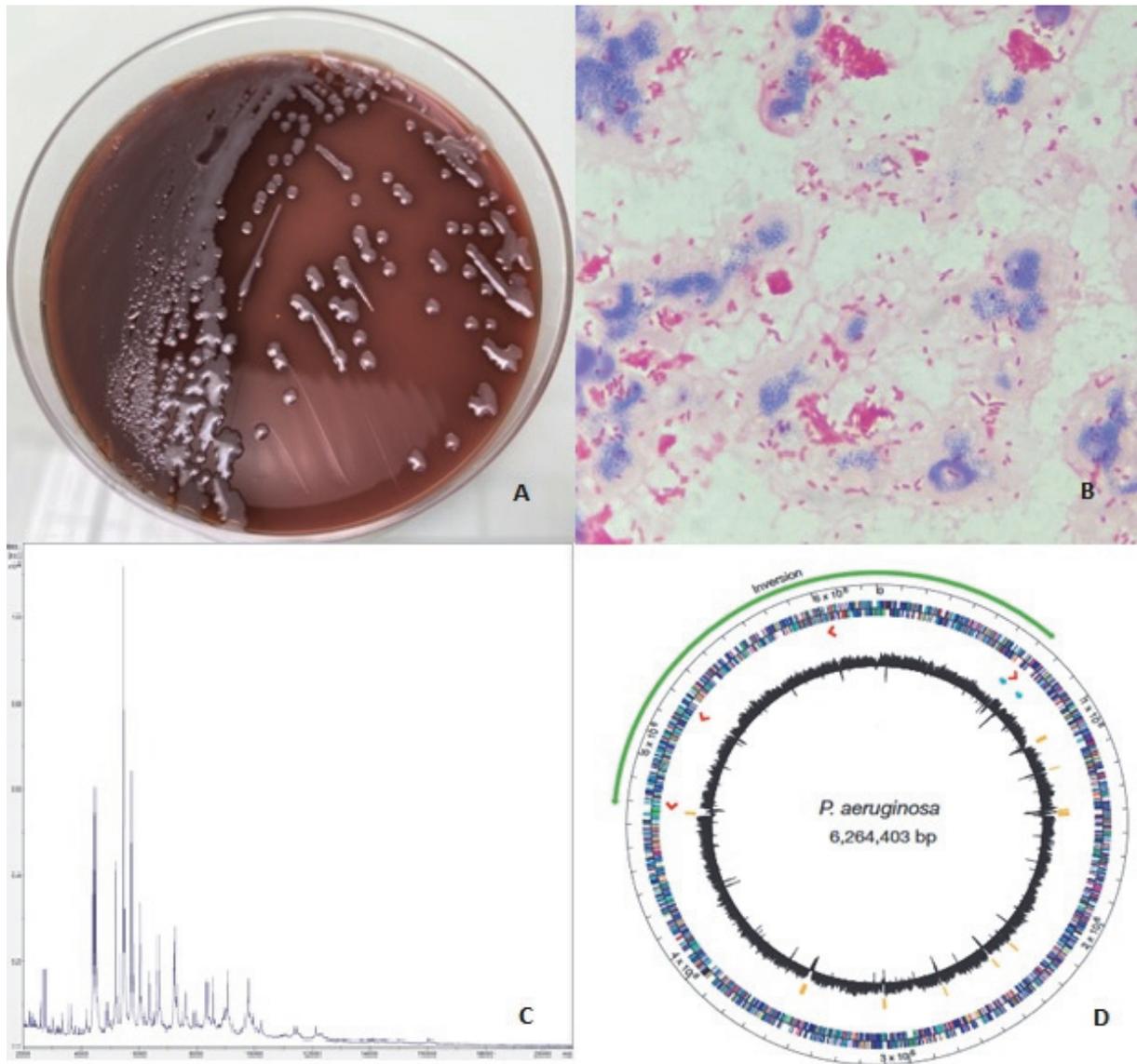
## 1.1 Caractéristiques morphologiques, de culture et biochimiques

*P. aeruginosa*, est une bactérie à Gram négatif (BGN) de la famille des *Pseudomonadaceae*, décrite pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1882 par Carle Gessard (4,5). Son autre nom « bacille pyocyanique » est donné pour sa capacité à produire des pigments de couleur bleu-vert (pyocyanine), jaune-vert (pyoverdine), ou plus rarement rouge (pyorubine) (5). Il est fréquemment retrouvé sous forme de saprophyte dans l'environnement, en particulier dans des milieux hydriques tels que les piscines, jacuzzis, lacs et eaux usées. *P. aeruginosa* a la capacité de se développer entre 25 et 42°C avec une température optimale de croissance à 37°C. Il est également présent chez les végétaux (légumes, salade, fruits...) et sur les surfaces abiotiques telles que les canalisations et les matériaux sous forme de biofilm (6).

*P. aeruginosa* est aérobic stricte et possède un métabolisme oxydatif. Il est aussi capable de se développer dans des conditions anaérobies en utilisant comme substrats les nitrates (7). Il se présente sous deux formes : une forme planctonique mobile grâce à son flagelle polaire et ses pilli, et une forme communautaire immobile responsable de la formation de biofilm.

Les méthodes diagnostiques au laboratoire nous permettent facilement de mettre en évidence ce germe. A l'examen direct, nous observons des bâtonnets réguliers et fins d'une taille comprise entre 2 et 4 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large (Figure 1, B). La culture est facile sur des milieux ordinaires à 37°C en 24h en aérobiose. Les colonies dégagent une odeur dite d'acacia dont la molécule aromatique responsable est l'o-amino-acétophénone. L'aspect des colonies présente plusieurs morphotypes : des colonies lisses, bombées et de taille moyenne (1 à 2 mm), mais également des colonies muqueuses ou luisantes (Figure 1, A). Le caractère mucoïde est la conséquence d'une surproduction d'alginate impliqué dans la formation de biofilm. Ces isolats mucoïdes sont isolés majoritairement chez les patients atteints de mucoviscidose, de bronchopneumopathie chronique obstructive et de dilatation bronchique chronique (8). L'identification des colonies est réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrice Assisted Laser Desorption Ionization) (Figure 1, C). Le MALDI-TOF permet d'établir un spectre protéique qui est ensuite comparé à une base de données de spectres de référence (9).

Le génome complet, séquencé pour la 1<sup>ère</sup> fois en 2000 par Stover et al est de 6,3 Mb pour un GC% de 66,6% avec 5 570 séquences codantes (Figure 1, D). Cette très grande complexité génomique associée à une fréquence de mutation élevée lui permet de se développer et de s'adapter à diverses niches écologiques (10).



**Figure 1** : Processus d'identification d'un isolat de *P. aeruginosa* à partir d'un prélèvement clinique : A) Colonies de *P. aeruginosa* sur gélose chocolat polyvitex (PVX) ; B) Examen direct d'une hémoculture à *P. aeruginosa*. - Coloration de Gram x500 ; C) Spectre MALDI-TOF de *P. aeruginosa*. D) Représentation circulaire du génome de *P. aeruginosa* PAO1 (10).

## 1.2 Facteurs de virulence et biofilm

Les facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* sont multiples et participent à la pathogénicité de cette bactérie. Ses fonctions d'adhérence, de motilité, de pathogénicité et de colonisation de l'hôte sont essentielles à sa survie.

*P. aeruginosa* a la capacité de former un « biofilm », ce qui limite l'efficacité des traitements et favorise la colonisation de l'hôte. Ainsi, des biofilms hautement structurés peuvent se développer chez des patients atteints d'infections chroniques : mucoviscidose, plaie chronique et rhino sinusite chronique (Figure 2). Le challenge est de diagnostiquer les infections à *P. aeruginosa* à un stade précoce, avant que le biofilm ne se développe, afin de permettre une meilleure efficacité des traitements antibiotiques (11–13).

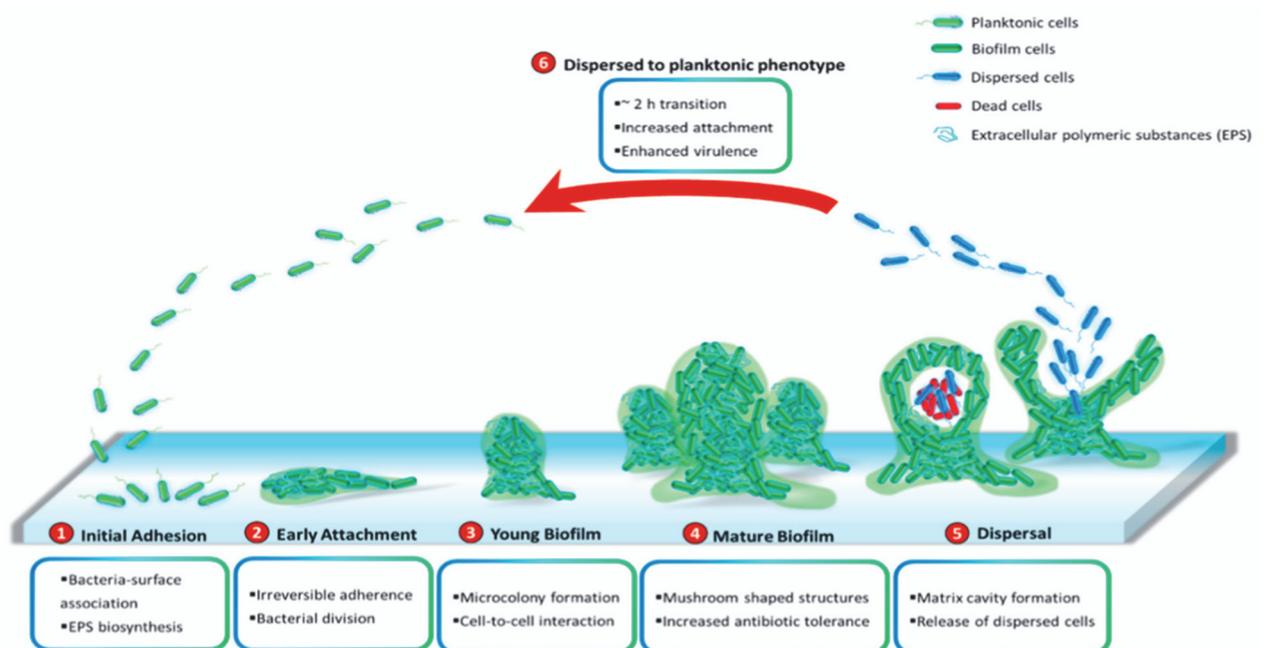


Figure 2 : Formation du biofilm chez *P. aeruginosa* (11).

## 1.3 Pathogénicité

*P. aeruginosa* est une bactérie opportuniste. Rarement pathogène chez l'immunocompétent, il est responsable d'infections chez les patients aux défenses immunitaires affaiblies.

La contamination se produit essentiellement par contact avec de l'eau contaminée. Les voies de transmission les plus à risques sont l'exposition pulmonaire par l'utilisation d'aérosols contaminés et l'exposition cutanée (exemple : pénétration d'eau contaminée des cures thermales à la suite d'une plaie) (14).

Les manifestations cliniques se manifestent par :

- Des **infections cutanées** à type de folliculite, d'onyxis, d'intertrigo, de plaies chroniques généralement secondaires à une colonisation après effraction cutanée. Il s'ensuit une prolifération bactérienne associée à un écoulement purulent verdâtre (15,16).
- Des **pneumonies** caractérisées par des dyspnées fébriles associées à une toux avec des expectorations purulentes, des frissons et de la confusion. Les patients ayant une pneumopathie acquise sur ventilation mécanique (PAVM) ont également une augmentation des sécrétions trachéo-bronchiques, ce qui diminue l'efficacité de la ventilation (17,18).
- Des **infections oculaires** se manifestant par des conjonctivites, des kératites et des abcès de cornée. L'inoculation est traumatique ou post-chirurgicale (19,20).
- Des **infections urinaires** généralement contractées à l'hôpital chez des patients à risques ou chez des patients sondés. Les infections communautaires sont moins fréquentes. La plupart des souches de *P. aeruginosa* responsables d'infections urinaires associées aux cathéters produisent des biofilms (21,22).
- Des **bactériémies** se manifestant par de la fièvre, une tachycardie et une tachypnée (23,24).
- Des **infections ORL** représentées par : les otites simples externes, otites externes malignes, l'otite moyenne et la péricondrite (25).

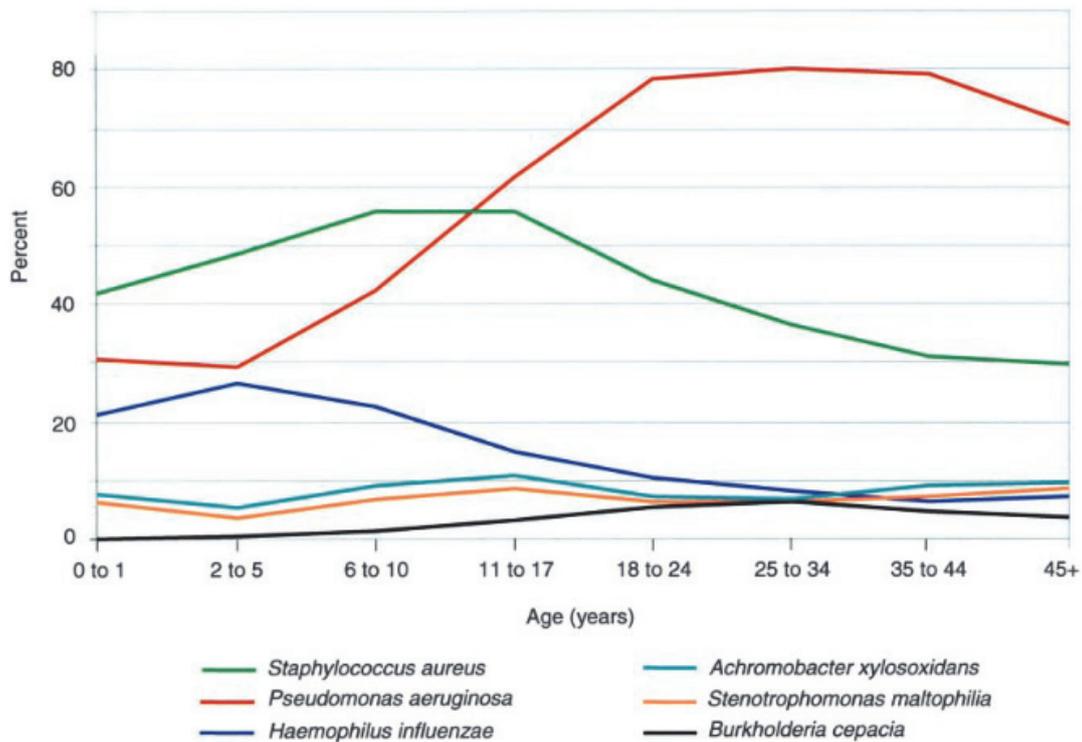
D'autres infections, plus rarement rencontrées, peuvent être causées par *P. aeruginosa* telles que des infections de **matériel**, des **méningites**, des **encéphalites**... (26,27).

#### 1.4 Terrains à risques

Les cas de colonisations ou d'infections à *P. aeruginosa* surviennent majoritairement chez des patients présentant des facteurs de risques : patients en réanimation, patients atteints de pathologies respiratoires chroniques (dont la mucoviscidose) et chez les grands brûlés.

La mucoviscidose est une maladie génétique héréditaire due à une mutation du gène Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). Cette mutation est responsable d'une modification des sécrétions bronchiques et digestives dont la viscosité devient anormale. La complication majeure est l'insuffisance respiratoire grave en réponse à une inflammation chronique de l'organisme. Le patient meurt alors de dépression respiratoire (28). *P. aeruginosa* est le 1<sup>er</sup> germe responsable d'infections chez le sujet adulte atteint de mucoviscidose (Figure

3). La colonisation du tractus respiratoire commence très tôt dans l'enfance. Cependant, le Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry (CFFPR) rapporte une diminution significative de l'incidence de *P. aeruginosa* depuis 2003, qui s'explique par une amélioration de la prise en charge visant à une éradication précoce de l'agent infectieux (29).



**Figure 3 :** Germes les plus fréquemment isolés chez le patient atteint de mucoviscidose en fonction de l'âge (29).

Le patient de réanimation présente en général de multiples comorbidités, des dérèglements physiologiques aigus graves, des formes d'immunodépression et la présence de dispositifs invasifs. Ces patients, en comparaison à la population hospitalière générale sont exposés à un risque de colonisation et d'infection accrues (8). Selon le rapport sur les infections acquises en réanimation du CDC (2017), les pneumonies acquises sont dans 97,3% des cas dues à l'intubation. En France, le 1<sup>er</sup> agent pathogène mis en cause est *P. aeruginosa* (23,1%), suivi de *Staphylococcus aureus* (18%), et *Enterobacter spp.* (13%). Le bacille pyocyanique est également le 3<sup>ème</sup> germe (12.8%) responsable de bactériémie (30).

Le grand brûlé est sujet à des infections de par la perte de la barrière cutanée, la présence de dispositifs invasifs et l'immunodépression causée par la brûlure. La zone brûlée est constituée d'une zone centrale nécrosée non vascularisée appelée « escarre ». Celle-ci est riche en

protéines coagulées favorisant la prolifération des micro-organismes. De plus, l'absence de vascularisation dans les brûlures au troisième degré sont responsables d'une absence de diffusion des antibiotiques et des polynucléaires au sein du site infectieux (26). Les infections sont la 1<sup>ère</sup> cause de mortalité dont les agents pathogènes les plus fréquemment isolés sont : *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans* ainsi que les staphylocoques à coagulase négative. *P. aeruginosa* est un agent responsable d'infections tardives puisqu'il est retrouvé chez 13,5% des isolats à la première infection contre 40% des isolats lors de la cinquième infection (31–33).

## **2. Sensibilité aux antibiotiques et mécanismes de résistance**

### **2.1. Sensibilité aux antibiotiques et résistances intrinsèques**

Le phénotype sauvage de *P. aeruginosa* est la somme de plusieurs mécanismes de résistance enzymatique ( $\beta$ -lactamases) et non enzymatique (efflux et imperméabilité) exprimés à faible niveau induisant ensemble, des résistances dites « naturelles ». Ces résistances naturelles touchent ainsi diverses  $\beta$ -lactamines dont les benzylpénicillines, les oxacillines, les aminopénicillines, les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération (C1G), les céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération (C2G), les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) et l'ertapénème.

Parmi les résistances enzymatiques, deux  $\beta$ -lactamases sont produites à bas niveau à l'état constitutif : une oxacillinase de type OXA-50 et une céphalosporinase AmpC. Le gène codant pour l'OXA-50 a été identifié pour la première fois dans la souche de référence PAO1 (gène PA5514, Genbank : NC\_002516.2) (34). Il confère une sensibilité réduite à l'amoxicilline, à la ticarcilline et au méropénème (34). L'expression du gène *ampC* codant pour la céphalosporinase AmpC (Classe C d'Ambler, classification d'Ambler, 1980) induit une résistance aux C1G, C2G, ainsi qu'aux C3G dont le céfotaxime et la ceftriaxone. Une enzyme modificateur des aminosides nommée APH(3')-IIb induit une résistance naturelle à la kanamycine, streptomycine et néomycine (3).

Les résistances non enzymatiques sont principalement médiées par l'imperméabilité membranaire (pour les substrats hydrophobes dont certaines  $\beta$ -lactamines) et l'expression de systèmes d'efflux tels que MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN.

Les antibiotiques actifs sur *P. aeruginosa* sont nombreux et sont décrits dans le tableau 1 (3,34,35).

**Tableau 1** : Antibiotiques actifs sur *P. aeruginosa*.

Famille d'antibiotiques	Agents antibiotiques
<b>Aminosides</b>	Gentamicine Tobramycine Amikacine Netilmicine
<b>Carbapénèmes</b>	Imipénème Méropénème Doripénème
<b>Céphalosporines</b>	Ceftazidime Céfépime
<b>Fluoroquinolones</b>	Ciprofloxacine Lévofloxacine
<b>Pénicillines</b> <b>Inhibiteur de <math>\beta</math>-lactamases</b>	Ticarcilline- Acide-clavulanique Pipéracilline- Tazobactam
<b>Monobactam</b>	Aztréonam
<b>Acides phosphoniques</b>	Fosfomycine
<b>Polymyxines</b>	Colistine Polymyxine B

## 2.2. Problématique de la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*

La résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* est devenue au fil des années un enjeu de santé publique majeur du fait de sa virulence et de l'échec croissant des traitements antibiotiques. Cette problématique soulève plusieurs points : les phénotypes multi-résistants qui touchent des antibiotiques clefs dont la ceftazidime et les carbapénèmes, mais également son caractère nosocomial en faisant aujourd'hui, un germe d'intérêt prioritaire.

Des mesures de surveillance épidémiologique ont été mises en place dans divers pays afin de limiter l'émergence de ces résistances. En 2018 ; 32,9% des souches de *P. aeruginosa* possédaient au moins une résistance à un des antibiotiques faisant l'objet d'une surveillance particulière : pipéracilline  $\pm$  tazobactam, fluoroquinolones, ceftazidime, aminosides et carbapénèmes (36).

Pour mieux catégoriser ces résistances, des critères ont été établis par un comité d'expert international en collaboration avec l'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) et les United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC) pour définir les profils multi-résistant chez *P. aeruginosa* :

- MDR (Multi Drug Resistant) : non-sensible à  $\geq 1$  agent dans  $\geq 3$  familles d'antibiotiques.
- XDR (Extensively Drug Resistant) : non-sensible à  $\geq 1$  dans toutes les familles d'antibiotiques mais restant  $\leq 2$ .
- PDR (Pan Drug Resistant) : Résistant à tous les antibiotiques listés (Annexe). (37)

La problématique de la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* est principalement rencontrée en milieu hospitalier. Comme énoncé précédemment, *P. aeruginosa* est un pathogène nosocomial majeur, en particulier dans les populations à risques.

Le caractère nosocomial des infections peut découler d'une colonisation des réservoirs environnementaux hospitaliers. En effet, *P. aeruginosa* peut être présent dans l'eau potable, les robinets, les siphons, les douches, les désinfectants, les endoscopes, les piscines d'hydrothérapie, les uromètres et bien d'autres milieux. Son développement sur des surfaces abiotiques sous forme de complexes d'agrégats bactériens attachés à une surface constitue un biofilm et contribue à une efficacité limitée des biocides (38,39). L'étude REA-SINK menée par RéPias a analysé environ 1 200 points d'eau provenant de différents services de réanimation. La moitié des points d'eau était contaminée par au moins une BMR/BHRe dont 8% (n=91) était représenté par des *P. aeruginosa* résistants à l'imipénème parmi lesquelles 13 étaient productrices de métallo- $\beta$ -lactamases (40). Les biofilms peuvent également se constituer à l'intérieur de l'hôte et sont associés à des infections pulmonaires chroniques ainsi qu'à des infections de matériels (dispositifs à demeure, prothèses...) (38,39).

Enfin, *P. aeruginosa* possède une très grande complexité génomique associée à une fréquence de mutation élevée lui permettant de se développer et de s'adapter à diverses niches écologiques. Elles permettent également l'acquisition de résistance à divers antibiotiques grâce à des mutations présentes sur les gènes de résistances (10).

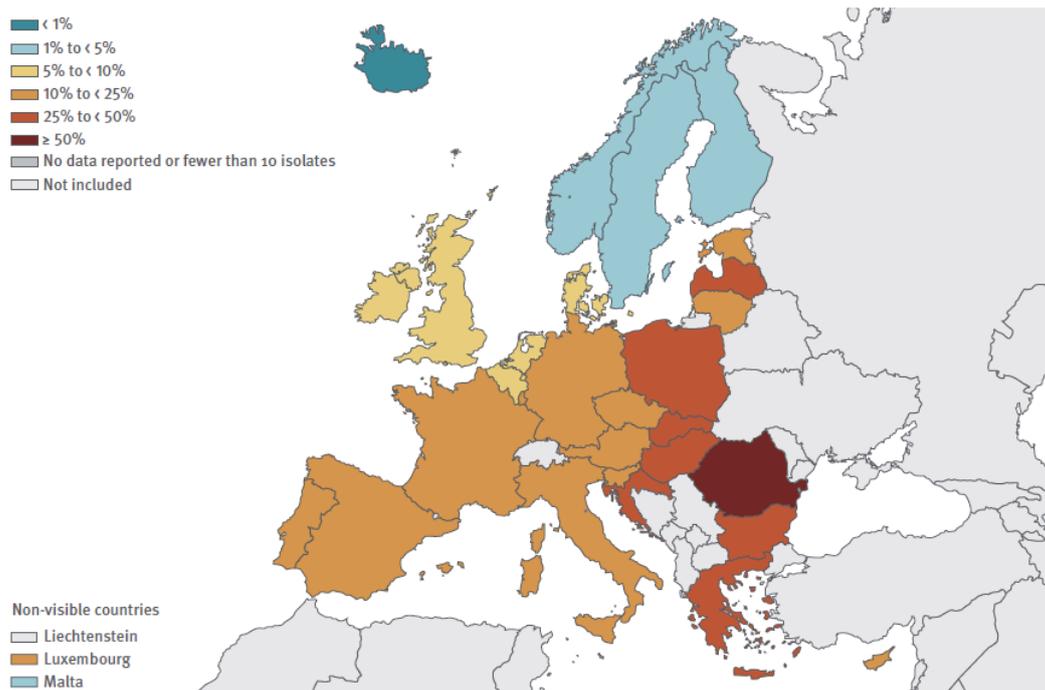
Les facteurs de risque d'infection par des souches résistantes de *P. aeruginosa* ont été identifiés comme : le séjour en réanimation, le patient grabataire, la présence de dispositifs invasifs, l'administration antérieure de céphalosporines à large spectre, d'aminosides, de carbapénèmes, de fluoroquinolones, le diabète sucré et les interventions chirurgicales. L'utilisation antérieure

d'ertapénème, carbapénème n'ayant pas une activité anti-pyocyanique, est désigné comme un facteur de résistance aux carbapénèmes (41).

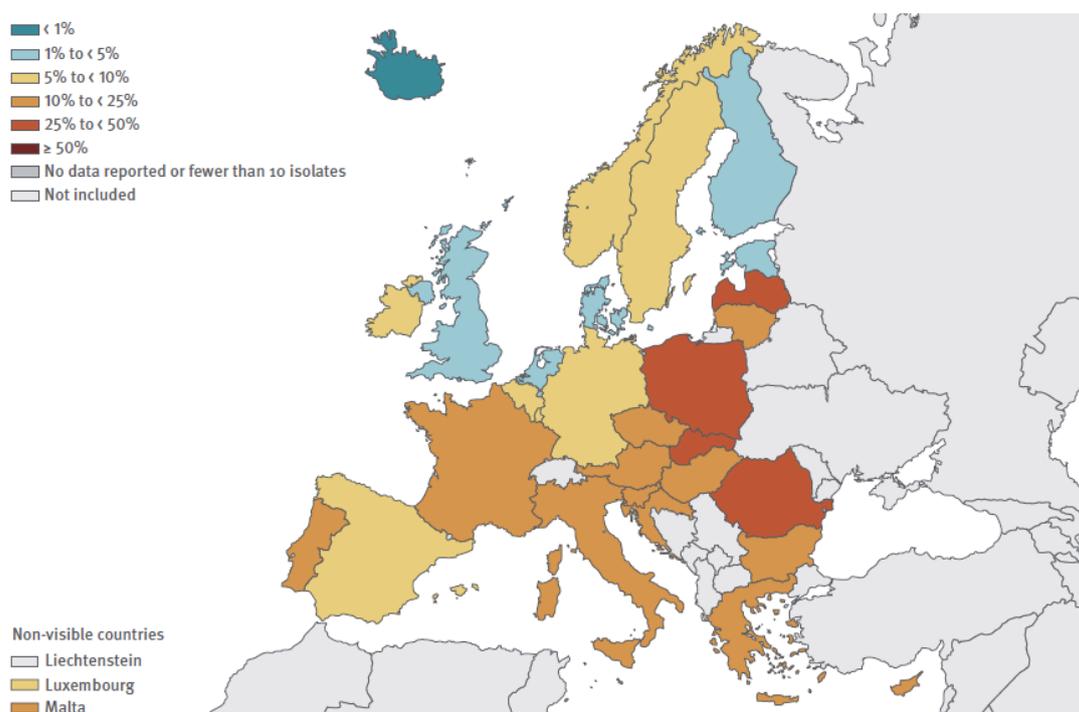
Les carbapénèmes et la ceftazidime (C3G la plus active sur *P. aeruginosa*) sont des antibiotiques clés dans le traitement des infections à *P. aeruginosa* et sont réservés aux patients atteints d'infections sévères en ambulatoire ou à un usage hospitalier dans le cadre d'infection nosocomiale, de neutropénie fébrile et d'exacerbation chez le patient atteint de mucoviscidose ou de bronchopneumopathie chronique. La résistance à ces antibiotiques peut être médiée par divers mécanismes dont la production de BLSE et/ou de carbapénémases.

Globalement, la répartition de la prévalence des résistances aux bêta-lactamines chez *P. aeruginosa* est hétérogène au sein des pays européens. En France, elle reste inférieure à la moyenne européenne. Ainsi en 2018, la résistance aux carbapénèmes représentait 18% des isolats cliniques invasifs en France et jusqu'à 55,1% en Roumanie (36) (Figure 4). En 2017, le réseau Réa-RAISIN (Réanimation - Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales) rapportait une prévalence de résistance à l'imipénème de 19,6% en France contre 25,9% en Europe. Bien que minoritairement représenté, les souches possédant une métallo- $\beta$ -lactamase sont associées à une mortalité significativement plus élevée d'un facteur 2 à 5 (42,43). Le critère majeur responsable de cette mortalité était un traitement précoce inadapté (<72h) (3). En 2018, en France, la résistance à la ceftazidime représentait 13% des isolats cliniques invasifs et jusqu'à 46,7% en Roumanie (Figure 5). En réanimation, le réseau Rea-RAISIN rapportait une prévalence de 21,6% des *P. aeruginosa* résistants à la ceftazidime en France contre 26,5% en Europe (36,44).

L'émergence des résistances à la ceftazidime et aux carbapénèmes doit être surveillée car les alternatives thérapeutiques restent limitées. Actuellement, notre laboratoire ne recherche pas les phénotypes de résistance enzymatique. Cette recherche est pourtant nécessaire pour prévenir leur diffusion et garantir une prise en charge efficace des patients. Ainsi, la connaissance de l'écologie locale de la résistance permettrait d'établir et d'adapter les recommandations de la prescription des antibiotiques. Il peut permettre également de mettre en place les mesures d'hygiène nécessaires à la limitation de la diffusion de ces résistances : isolement des patients concernés, précaution contact, hygiène des mains et décontamination de l'environnement (30,36,40,42,43,45–47).



**Figure 4 :** Répartition de la résistance européenne aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa* (36).



**Figure 5 :** Répartition de la résistance européenne à la ceftazidime chez *P. aeruginosa* (36).

## 2.3. Support des mécanismes de résistances acquises

### 2.3.1. Mécanismes de résistance enzymatique

#### 2.3.1.1 Surproduction de la céphalosporinase naturelle AmpC

La surexpression de la céphalosporinase AmpC est le mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines le plus fréquemment retrouvé chez *P. aeruginosa*. Cette céphalosporinase confère une résistance à plusieurs  $\beta$ -lactamines anti-pyocyaniques telles que la pipéracilline, la ticarcilline, la ceftazidime et l'aztréonam. La sensibilité à ces antibiotiques n'est pas rattrapée en présence d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. D'après certaines études, ce mécanisme est majoritaire et atteint 96% des souches pipéracilline/tazobactam résistantes contre 84% chez les souches résistantes à la ceftazidime (3,48).

L'expression d'AmpC est induite par des  $\beta$ -lactamines comme la cefoxitine et l'imipénème. Lors d'un traitement antibiotique par des  $\beta$ -lactamines, les *P. aeruginosa* mutants résistants possèdent de hauts niveaux de production d'AmpC, de part un phénomène de sélection, entraînant un échec de l'antibiothérapie. Plusieurs gènes de régulation sont impliqués dans la surproduction d'AmpC. La dérépression partielle ou totale du gène *ampC* est causée par des mutations dans les gènes *dacB*, *ampD*, *ampDH3* et *ampR* qui code pour le régulateur de la transcription LysR. A ce jour, 92 variants *ampC* existent, une particularité existent pour les variants dénommés ESAC (Extended Spectrum AmpC) puisqu'ils induisent une résistance de haut niveau à la ceftazidime, au ceftolozane, au céfépime et à la ticarcilline. La pipéracilline reste épargnée. Ils représentent 1,5% des isolats cliniques. (Figure 6 A, B) (26,49).

A ce jour, le gène chromosomique codant pour *ampC* n'a pas été détecté sur des plasmides chez *P. aeruginosa*, la résistance n'est ni transférable entre espèces ni au sein d'une même espèce. In vitro, la céphalosporinase AmpC est inhibée par de fortes concentrations en cloxacilline ou oxacilline. La mise en évidence d'un mécanisme de surexpression d'AmpC est permise grâce la réalisation d'un antibiogramme sur milieu gélosé de type Mueller-Hinton (MH) additionnée de 250 mg/L de cloxacilline. Elle permet ainsi de visualiser la récupération de la sensibilité aux  $\beta$ -lactamines. Cependant, certaines ESAC (portant les mutations G216R ou E221K) et la production de  $\beta$ -lactamases extrinsèques peuvent conduire à des résultats faussement négatifs. AmpC est également impliquée dans le phénotype dit de « céphalosporinase naturelle ». Il se traduit par l'apparition chez des souches sauvages d'une réduction du diamètre d'inhibition autour de la ticarcilline-acide clavulanique pouvant être intermédiaire ou résistant sans modification de la ticarcilline (restant sensible). Le mécanisme mis en cause est l'induction de la céphalosporinase *ampC* par l'acide clavulanique (3,48–50).



**Figure 6 :** A) Antibiogramme d'une souche surproduisant la céphalosporinase AmpC  
 B) Antibiogramme d'une souche AmpC ESAC (51).

### 2.3.1.2. Acquisition de gènes de résistance

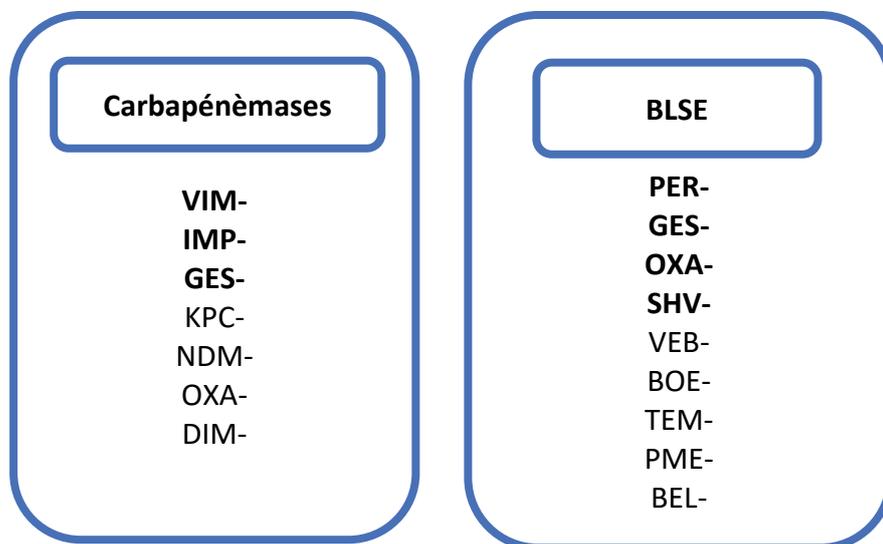
L'acquisition de gène de résistance chez *P. aeruginosa* est la conséquence d'un transfert de matériel génétique entre bactéries et plus fréquemment entre BGN (entérobactéries, *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas sp*). Ces types de transferts sont multiples et reposent sur des éléments génétiques : plasmides, transposons mais également des intégrons (52,53).

Les intégrons sont des éléments génétiques capables d'acquérir et d'exprimer des gènes de résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques. De nature immobile, ils sont localisés sur des éléments génétiques mobiles représenté par des transposons ou des plasmides. Les métallo- $\beta$ -lactamases et les BLSE ont largement été décrites comme étant localisées sur des intégrons. Ils jouent un rôle clé dans la dissémination de l'antibiorésistance aussi bien en clinique que dans l'environnement. Pour exemple, les gènes IMP et VIM se trouvent principalement dans un intégron de classe I, caractérisé par un gène d'intégrase *intI1* associé à un transposase *tnpA*. Ces gènes de métallo- $\beta$ -lactamases sont souvent associés à des gènes qui codent pour la résistance aux aminosides (*aacA4*, *aadA1*, et/*ouaadB*), aux  $\beta$ -lactamases de classe D (OXA), à la résistance aux antiseptiques (*qac $\Delta$ G*), ou à la résistance au chloramphénicol (*catB*) (Figure 7) (52,53). Les conséquences sur la prise en charge thérapeutique restent importantes puisque ces enzymes vont induire un haut niveau de résistance aux antibiotiques anti-pyocyanique.



(54,56) (Figure 9). La majorité des souches sont d'acquisition nosocomiale et la réanimation constitue le service le plus touché.

En France, le Centre National de Référence (CNR) de la résistance aux antibiotiques rapporte sur la période 2012-2015 et 2019 ; 16,2% de carbapénèmases parmi les profils multi-résistants avec une prédominance de métallo- $\beta$ -lactamase (MBL) de type VIM et IMP représentant 88,2% des carbapénèmases isolées. Les GES représentent 11,3% des carbapénèmases, mais tendent à augmenter par la diffusion d'un clone ST235 produisant le variant GES-5. Cependant, la prévalence des métallo- $\beta$ -lactamases reste faible dans notre pays puisqu'inférieure à 0,5% (3). Les métallo- $\beta$ -lactamases ont la caractéristique d'être inhibé par l'EDTA. Au laboratoire, la présence de métallo- $\beta$ -lactamases peut être suspecté devant une image de synergie entre un disque de carbapénème et un disque contenant de l'EDTA (6  $\mu$ l d'une solution à 0,5 M). L'EDTA peut être additionné au disque, une réduction de diamètre de 5 mm est prédictive de la présence d'une MBL. Les E-tests MBL (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) permettent également de détecter les métallo- $\beta$ -lactamases. L'E-test se caractérise par la présence d'une bandelette double constituée d'un côté du mérépénème (MP : 0.125 à 8  $\mu$ g/mL) seul et d'un autre côté du mérépénème associé à l'EDTA (MPI : 0,032 à 2  $\mu$ g/mL + concentration croissante d'EDTA) (54–62).



**Figure 8 :**  $\beta$ -lactamase de spectre élargi et carbapénèmases identifiées chez *P. aeruginosa* en France. (En gras = les plus fréquemment isolés).

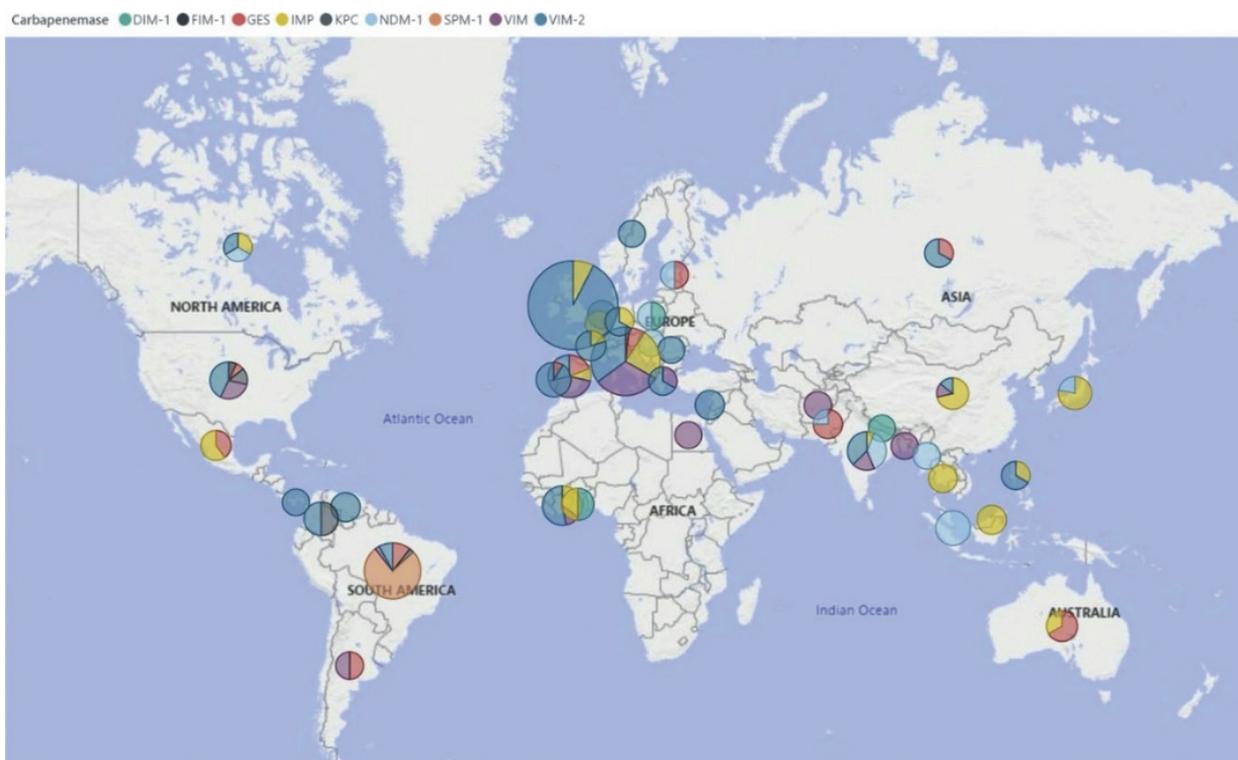


Figure 9 : Répartition des carbapénémases identifiées et disponible sur NCBI (11/04/2019), 4532 génomes correspondant à 688 carbapénémases. L'enzyme VIM-2 est distinguée des autres variant de VIM étant donné sa forte prévalence (55).

#### 2.3.1.2.2. $\beta$ -lactamase à spectre élargi

A l'inverse des entérobactéries, les recommandations européennes émises (EUCAST) pour la recherche des BLSE n'existent pas pour *P. aeruginosa* (63). La présence intrinsèque de la  $\beta$ -lactamase AmpC et sa surexpression sont un facteur limitant pour les tests phénotypiques. En effet, le niveau d'expression de la céphalosporinase AmpC interfère sur la détection des BLSE. Les BLSE sont multiples et variées, les tests de synergie restent alors un moyen très limité pour les identifier. Ceci explique des données très limitées sur la prévalence de ces infections (64).

Plusieurs BLSE ont été décrites chez *P. aeruginosa* :

- La Classe A d'Amber est représentée par les enzymes de type PER, GES, TEM, SHV, CTX-M, VEM, BEL, et PME. La plupart des BLSE de classe A ont la particularité de pouvoir être inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam. PER-1 est la BLSE la plus largement représentée en France. Cette enzyme hydrolyse la ceftazidime, l'aztréonam, le céfépime, et moindrement la pipéracilline. L'enzyme SHV2a, fréquemment rencontrée en France, possède une activité hydrolytique touchant majoritairement le céfépime en comparaison à la ceftazidime. L'enzyme GES, est également fréquente en France. Isolée initialement à Bordeaux, de multiples variants

ont ensuite étaient isolés sur notre territoire. Sa fonction repose sur l'hydrolyse de la ceftazidime, du céfépime et de la pipéracilline. Les enzymes GES et SHV-2a sont peu inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam (57).

- La classe D d'Amblar est représentée par les ES-OXA (Extended Spectrum OXAcillinases). Elles dérivent des pénicillinases à spectre restreint (OXA-1, OXA-2, OXA-10) et gagnent une activité hydrolytique vis-à-vis des C3G. Elles sont peu inhibées par l'acide clavulanique (57).

Les enzymes qui ne sont pas inhibées *in vitro* par l'acide clavulanique ne peuvent pas être détectées par des tests phénotypiques classiques. En France au cours de l'année 2019, 11,9% des souches multi-résistantes envoyées au CNR de la résistance aux antibiotiques étaient productrices de BLSE. Les BLSE représentées étaient de type OXA-, GES-, SHV-2a, PER-1, VEB-, BOE-, TEM-, PME- ou BEL-. La diversité des BLSE identifiées en France (2012-2019) est représentée dans la figure 8. Le CNR de la résistance aux antibiotiques rapporte sur la période 2012-2015, 14,9 % de BLSE parmi les phénotypes multi-résistants. La classe A d'Amblar représentait (75,7%) et la classe D (24,3%) d'Amblar. 78,3% des BLSE rapportées était représentés par SHV-2a (25,8%), GES-1(17,6%), PER-1(14%), OXA-19 (13,4%) et VEB-1a (7,5%) (55–58).

Ainsi, les principaux mécanismes de résistances aux  $\beta$ -lactamines s'expliquent par la surproduction de mécanismes intrinsèques et plus rarement par l'acquisition de matériel génétique étranger. En France, ces principaux mécanismes sont représentés dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Principaux mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines du *P. aeruginosa*.

	TIC	TCC	TZP	FEP	CAZ	IPM	MER	AN	GM	CIP
<b>Résistance intrinsèque</b>										
Céphalosporinase naturelle		R								
Surproduction $\beta$ -lactamase AmpC	R		R	S-R	R					
Surproduction MexAB-OprM	R	S-I-R					S-I			S-I-R
Surproduction MexXY-OprM				R				R	R	R
<b>Altération porine oprD</b>						I-R	S-I-R			
<b>Résistance acquise</b>										
<b>BLSE</b>										
PER-1	R		S-R	S-R	R					
SHV2-a	R		S	R	S					
GES-1	R		S-R	S-R	R					
OXA-19	R		S-R	S	R					
<b>Carbapénémases</b>										
VIM-2	R		S	S-R	R	I-R	I-R			
IMP-13	R		S	R	R	S-I	S-I			
GES-5	R		R	S-R	R	I-R	I-R			

TIC : Ticarcilline TCC : Ticarcilline-Acide clavulanique TZP : Pipéracilline-tazobactam FEP : Céfépime CAZ : Ceftazidime IPM : Imipénème MER : Méropénème AN : Amikacine GM : Gentamicine CIP : Ciprofloxacine. \* Selon les normes de la CA-SFM et sans mécanisme de résistances associées. R=Résistant ; S=Sensible.

### 2.3.2. Mécanisme des résistances non enzymatiques

#### 2.3.2.1. Surproduction des systèmes d'efflux

*P. aeruginosa* possède 12 RND (Resistance-Nodulation-Division) correspondant à des pompes d'efflux. Le rôle principal des systèmes d'efflux est de lutter contre l'accumulation de substance naturelle et toxique dans la cellule. MexAB-OprM, MexXY-OprM et MexCD-OprJ sont impliquées dans la résistance aux  $\beta$ -lactamines. Nous ne détaillerons pas MexCD-OprJ, malgré le fait que le céfépime soit son substrat, celui-ci étant rarement impliqué dans sa résistance (65).

### 2.3.2.2.1. MexXY-OprM

La surproduction du système d'efflux MexXY-OprM induit une résistance de bas niveau au céfépime (CMI = 8-16 mg/L) mais touche également les aminosides (amikacine, gentamicine, tobramycine), les fluoroquinolones, les macrolides et les cyclines. *P. aeruginosa* a une CMI alors multipliée de 2 à 8 fois des substrats de la pompe MexXY-OprM. Des résistances croisées à l'ensemble des substrats peuvent exister. Henrichfreise et *al* rapporte que lorsqu'il y a une résistance aux aminosides, celle-ci est majoritairement due à la surexpression de ce transporteur d'efflux (3,26,57,66,67).

### 2.3.2.2.2. MexAB-OprM

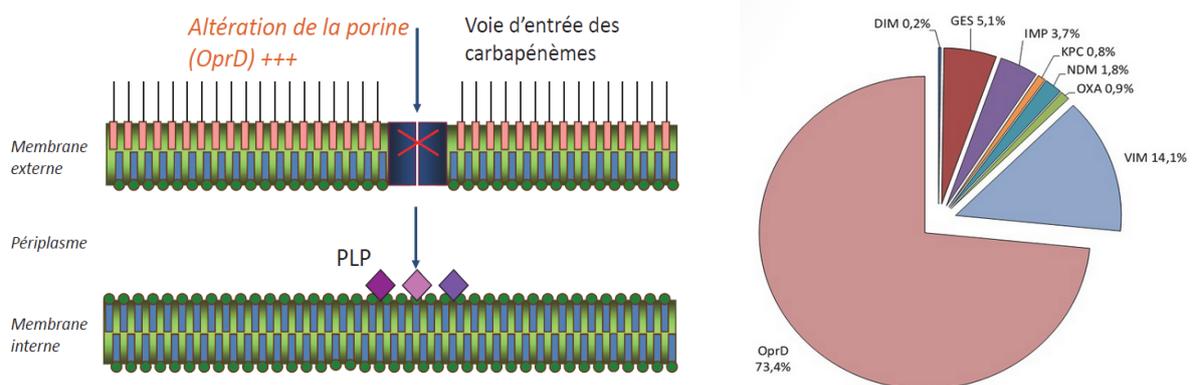
La surproduction du système d'efflux MexAB-OprM induit une résistance de bas niveau à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipénème : ticarcilline, ticarcilline-acide clavulanique, méropénème, aztréonam ainsi qu'aux fluoroquinolones (Figure 10). In vitro, le diamètre d'inhibition du disque contenant de l'aztréonam est inférieur d'au moins 4 mm à celui de la ceftazidime (3). Au niveau des carbapénèmes, cette surexpression se manifeste par une augmentation de la CMI du méropénème (de 4 à 8), ce qui lui permet de devenir sensible ou intermédiaire avec une CMI supérieure à l'imipénème (3,57,67).



**Figure 10 :** Antibiogramme d'une souche de *P. aeruginosa* surproduisant MexAB-OprM (51).

### 2.3.2.2. Baisse de la perméabilité membranaire

La porine OprD a un rôle essentiel pour le franchissement de la membrane externe de la bactérie. Les carbapénèmes utilisent majoritairement cette porine, ce qui les différencie des autres antibiotiques qui utilisent la porine OprF. En France, la résistance aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa* est largement représentée par une altération de la porine OprD2 (Figure 11). La présence de mutations dans le gène *oprD* peut induire une modification qualitative ou quantitative de la porine OprD2 entraînant l'apparition d'une résistance sélective à l'imipénème et au méropénème (Figure 11). Cette altération entraîne une augmentation de la résistance d'un facteur 4 à 32 des carbapénèmes sans affecter les autres  $\beta$ -lactamines. Ce mécanisme de résistance est souvent associé à une hydrolyse partielle induite par la céphalosporinase AmpC. Le méropénème étant plus stable face à l'hydrolyse par cette céphalosporinase, sa résistance est moins associée (1,3,57,65,68,69).



**Figure 11 :** A) Altération de la porine OprD impliquée dans la résistance aux carbapénèmes. B) Mécanisme à l'origine de la résistance à l'imipénème chez *P. aeruginosa* (2019-2020 CNR).



**Figure 12 :** Antibiogramme d'une souche de *P. aeruginosa* présentant une altération de l'oprD (51).

### **3. Étude de la résistance aux bêta-lactamines à l'AP-HM entre 2017 et 2021 : prévalence et mécanismes de résistances**

Précédemment, nous avons pu aborder la disparité de la résistance aux bêta-lactamines au sein de l'Europe. En France, le dernier rapport de l'EARS (2019) sur la résistance aux bêta-lactamines sur des souches invasives de *P. aeruginosa* rapporte une résistance à la ceftazidime de 11,5% et à l'imipénème de 12,7% (70). Les mécanismes de résistance chromosomiques sont majoritairement impliqués dans cette résistance (3). Plus rare, les mécanismes de résistances diffusibles impliquant les carbapénèmases et les BLSE existent et sont associées à des phénotypes multi-résistants. Le support de la résistance aux  $\beta$ -lactamines n'est pas systématiquement recherché dans notre hôpital, et la part des mécanismes diffusibles, donc à risque épidémique n'est pas connu. Il nous a donc paru nécessaire de réaliser un état des lieux de la prévalence de la résistance aux  $\beta$ -lactamines dans notre laboratoire et d'identifier les mécanismes impliqués.

Dans un premier temps, nous avons analysé la prévalence de la résistance aux bêta-lactamines chez le bacille pyocyanique au sein des Hôpitaux Publique de l'Assistance de Marseille (AP-HM) ; nous nous sommes en particulier intéressés à la résistance aux antibiotiques clés dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*, la ceftazidime et l'imipénème. Nous avons également déterminé les antibiotiques restants actifs sur les souches multi-résistantes et évalué la proportion de souches pan-résistantes. Dans un second temps, nous avons investigué le support moléculaire de la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez 73 souches de *P. aeruginosa* possédant une résistance à la ceftazidime et/ou à l'imipénème.

#### **1.1. Matériels et méthodes**

##### **Étude épidémiologique rétrospective de la résistance aux $\beta$ -lactamines**

Nous avons réalisé une analyse épidémiologique rétrospective de la sensibilité de *P. aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines sur la période comprise entre janvier 2017 et février 2021. Les souches de *P. aeruginosa* incluses ont été isolées à partir de prélèvements de patients ayant été hospitalisés à l'AP-HM qui comprend quatre hôpitaux universitaires : hôpital de la Timone (1500 lits), de la Conception (700 lits), Sainte-Marguerite (900 lits) et Nord (600 lits). Tous les prélèvements ont été analysés au laboratoire de microbiologie de l'Institut hospitalo-universitaire (IHU) Méditerranée Infection. Les données ont été collectées à partir du logiciel SIRweb (i2A, Montpellier, France) et analysées à l'aide du logiciel Microsoft Excel®. Pour chaque patient,

toute souche présentant un profil de sensibilité aux antibiotiques différents a été inclus dans l'étude. La sensibilité aux différentes bêta-lactamines testées, la nature des prélèvements ainsi que l'origine des services ont été analysées. Les souches catégorisées « intermédiaires » pour un antibiotique ont été considérées comme « résistantes ». De plus, les services de soins intensifs ont été considérés comme des réanimation tandis que les patients atteints de mucoviscidose ont été considérés dans une catégorie à part de la pneumologie.

Dans un deuxième temps, les souches résistantes aux carbapénèmes et/ou à la ceftazidime ont été investiguées plus largement afin de faire un bilan sur les résistances associées aux autres familles d'antibiotiques.

## **Étude du support moléculaire de la résistance aux $\beta$ -lactamines**

### **Collection de souches**

Nous avons réalisé une étude du support moléculaire des résistances observées chez des souches de *P. aeruginosa* isolées sur une période de 5 mois. Les souches présentant une résistance à la ceftazidime et/ou à l'imipénème ont été incluses dans ce travail.

### **Identification et sensibilité aux antibiotiques**

Les isolats ont été identifiés par SM-MALDI-TOF. Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés par la méthode des disques sur gélose Muller-Hinton (MH) (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). La sensibilité aux antibiotiques a été interprétée selon les règles de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) et des recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Le panel d'antibiotiques testé en première intention incluait : ticarcilline (TIC), ticarcilline-acide clavulanique (TCC), pipéracilline-tazobactam (TZP), ceftazidime (CAZ), céfépime (FEP), imipénème (IMP), méropénème (MER), aztréonam (AZT), amikacine (AK), gentamicine (GM), et ciprofloxacine (CIP). Sur les souches multi-résistantes, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du ceftolozane/tazobactam et de la ceftazidime/avibactam ont été réalisées par la méthode des E-tests (Biomérieux). La CMI de la colistine a été déterminée par méthode en microdilution (Biocentric, Bandol, France).

## Tests phénotypiques

Tous les isolats suspects d'être des BLSE ou des carbapénémases ont été soumis à un test de recherche de la surexpression de la céphalosporinase AmpC. Les souches avec suspicion d'une production de carbapénémases (co-résistance ceftazidime-carbapénèmes) ont également été testées par des E-tests MBL et les souches suspectes d'être des BLSE ont été testées pour la recherche d'une synergie entre la ticarcilline-acide clavulanique et la ceftazidime.

### *Test de recherche de céphalosporinase hyperproduite AmpC*

La recherche d'une surexpression de la céphalosporinase AmpC s'effectue à l'aide d'un milieu MH additionné de cloxacilline à une concentration de 250 mg/L. En parallèle, nous avons effectué un contrôle à l'aide d'un milieu MH simple sans cloxacilline. Une solution bactérienne préparée à 0,5 MacFarland dans du NaCl 0,85% (Biomérieux) estensemencée à l'aide d'un écouvillon. L'antibiotique testé est la ceftazidime. La lecture est réalisée après 24h d'incubation à 37°C. Une différence de diamètre de 5 mm est en faveur d'une surexpression de la céphalosporinase AmpC (57).

### *E-tests MBL (Biomérieux)*

L'E-test MBL permet de rechercher la présence d'une carbapénémase (métallo-β-lactamase). Le principe du test repose sur la mesure de la concentration d'inhibition (CI) au méropénème (MP) d'un côté et au méropénème associée à l'EDTA (MPI) d'un autre côté. Une solution contenant une souche à 0,5 Macfarland est préparée dans du NaCl 0,85% (Biomérieux). La solution est ensuiteensemencée à l'aide d'un écouvillon sur une gélose MH et l'E-test est déposé. La lecture est réalisée après 24h d'incubation à 37°C. Si le ratio CI MP/MPI est  $\geq 8$ , le phénotype MBL est suspecté. Pour une concentration d'inhibition  $MP > 8$  et  $MPI > 2$ , le résultat est non interprétable.

### *Test de synergie à la recherche d'une BLSE*

Une solution bactérienne est préparée à 0,5 MacFarland dans du NaCl 0,85% (Biomérieux) puisensemencée à l'aide d'un écouvillon sur un milieu MH. Le test de synergie repose sur l'observation d'une image de synergie dite en « bouchon de champagne » entre un disque de ticarcilline-acide clavulanique et de ceftazidime disposés à 2 cm l'un de l'autre.

## Recherche de gènes de résistance aux antibiotiques par PCR

La recherche de gènes de résistance a été réalisée par PCR en temps réel à la recherche de gènes de résistance aux carbapénèmes (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-58</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*), aux BLSE (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTXa</sub>*, *bla<sub>CTXb</sub>*, *bla<sub>PER</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*) et à la colistine (*mcr1*, *mcr2*, *mcr3*, *mcr4*, *mcr5*, *mcr8*). Les gènes *oprD*, *bla<sub>PER</sub>*, *bla<sub>GES</sub>* et *bla<sub>IMP</sub>* ont été recherchés par PCR standard. En cas de PCR standard positive, un séquençage par technique Sanger était réalisé. L'extraction de l'ADN a été effectuée sur EZ-one (Qiagen, Hilden, Allemagne) à l'aide du kit « DNA-tissues ».

### *Protocole pour les PCR temps-réel*

La réaction de PCR se fait sur un volume final de 20 µL composé de : 5 µL d'échantillon, master mix 10 µL, H<sub>2</sub>O 2µL, sonde 1 µL, amorce reverse 1µL et amorce forward 1 µL. Une première étape de synthèse de l'ADN complémentaire à 50°C est réalisée pendant 2 minutes puis s'ensuit une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 15 min. La deuxième étape repose sur une dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 1 minute, puis une phase d'hybridation/élongation à 60°C pendant 30 s. Ces étapes se répètent pendant 35 cycles.

### *Protocole pour les PCR standard*

La réaction de PCR se fait dans un volume final de 25 µL composé de : 5 µL d'échantillon, master mix 10 µL, H<sub>2</sub>O 2µL, amorce forward 1 µL, amorce reverse 1µL. Les étapes de PCR se constituent : dénaturation initiale 15 min à 96°C ; dénaturation à 94°C pendant 1 minute, phase d'hybridation à 55°C pendant 0,5 minute et phase d'élongation à 72°C pendant 2 minutes pendant 35 cycles. La dernière phase est effectuée à 72°C pendant 7 minutes (1 cycle). Après cette phase d'amplification, les amplicons sont séparés sur gel d'électrophorèse en champs pulsé.

### *Protocole pour le séquençage*

Le séquençage Sanger se déroule en plusieurs étapes. Une filtration de l'ADN est réalisée en ajoutant 100 µL d'eau DNase RNase free à 20 µL de l'amplicon de la PCR standard. On laisse ensuite aspirer l'eau pendant 20 minutes. Une étape d'agitation est réalisée en présence de 50 µL d'eau UP (ultra pure) pendant 20 minutes. Deux mix sont préparés à l'aide du kit BigDye Terminator Cycle (Applied Biosystems) : 3µL de Buffer, 2µL BigDye, 10µL d'eau, 1µ d'amorce (1 mix forward et 1 mix reverse) correspondant à un volume de 16 µL sur lequel on ajoute 4 µL d'ADN filtré disposé dans une barrette. La PCR suit le cycle suivant : dénaturation à 96°C

pendant 5 minutes suivit par 25 cycles comprenant 10 secondes à 96°C, puis l'hybridation d'une durée de 5 secondes à 55°C et ensuite l'élongation 3 minutes à 60°C. En parallèle, une plaque de Sephadex est préparée en mélangeant 300 µL d'eau UP à la poudre de Sephadex, afin qu'on puisse déposer le produit de la PCR BigDye sur la plaque. La plaque est ensuite centrifugée pendant 5 minutes, ce qui nous permet de récupérer les amplicons à séquencer. Enfin, la plaque contenant les amplicons est lancée dans le séquenceur basé sur la méthode de Sanger. Les résultats du séquençage sont analysés sur un logiciel appelé Codon Code et blastés avec des séquences de référence dans la base de données NCBI. Le pourcentage de similarité et la couverture sont déterminés permettant l'identification du variant génétique du gène de résistance.

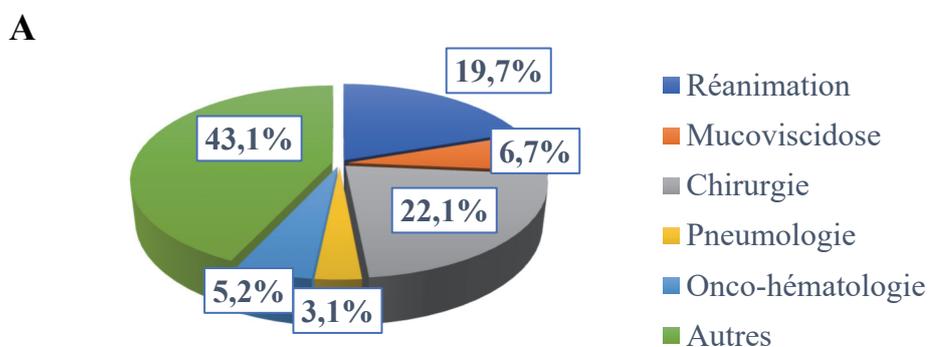
### Analyse statistique

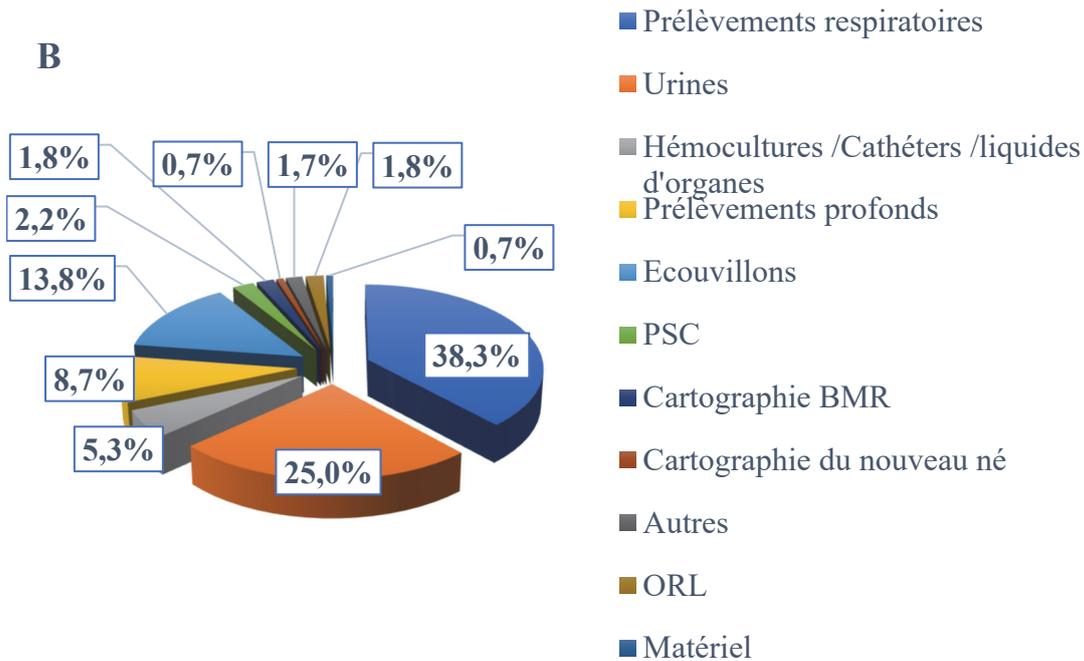
Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test du Chi2 avec un  $p < 0,05$  à l'aide du logiciel en ligne Openepi.

## 1.2. Résultats

### Données démographiques

Entre 2017 et 2021, 9 420 souches de *P. aeruginosa* correspondant à 5 169 patients ont été isolées au laboratoire. Une grande partie des isolats provenaient de patients hospitalisés en chirurgie (N=1 142 ; 22,1%), en réanimation (N= 1 019 ; 19,7%), et des services prenant en charge les patients atteints de mucoviscidose (N=347 ; 6,7%). La majorité des prélèvements provenaient de prélèvements respiratoires (N=3 604 ; 38,3%), urinaires (N=2 356 ; 25%), des écouvillons (N=1 298 ; 13,8%) de prélèvements profonds (N=823 ; 8,7%), et d'hémocultures (N=503 ; 5,3%) (Figure 13 A, B).

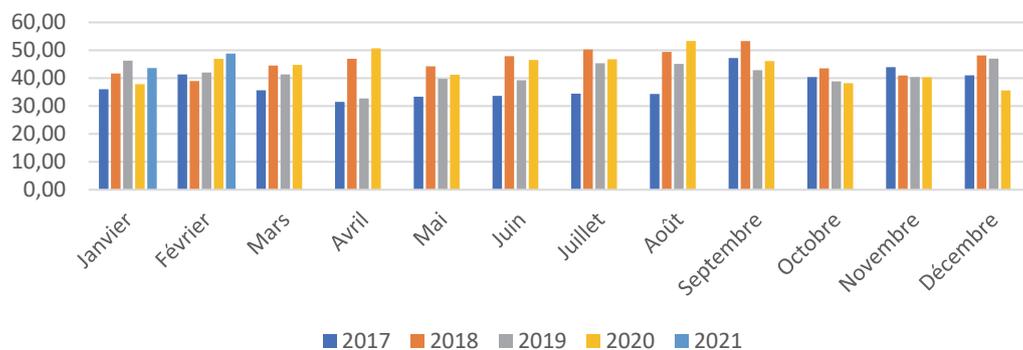




**Figure 13 :** A) Répartition des isolats de *P. aeruginosa* entre 2017 et 2021 selon les services B) selon l'origine des prélèvements.

### Souches résistantes aux $\beta$ -lactamines

Parmi les 9 420 souches analysées entre 2017 et 2021, 3 830 souches (40,7%) présentaient un phénotype sauvage, tandis que 1 374 souches (14,6%) étaient résistantes à la ceftazidime et 2 293 à l'imipénème (24,4%) dont 763 (33,3%) étaient co-résistantes à la ceftazidime. Nous avons environ 1,8 souches par patient. Sur la période 2017-2020, la proportion de souches sauvages a significativement augmenté (37,7% vs 43,6% ;  $p < 0,01$ ). Cette augmentation s'observait dès 2018 avec 45,7% des souches sauvages ( $p < 0,01$ ) (Figure 14).



**Figure 14 :** Répartition des souches sauvages sur la période 2017-2021.

De manière générale, nous avons observé une diminution significative de la résistance à la ticarcilline (46% vs 39,3% ;  $p < 0,01$ ), à la ticarcilline-acide clavulanique (50,5% vs 38,1% ;  $p < 0,01$ ), à la ceftazidime (16,9% vs 14,4% ;  $p = 0,024$ ) et à l'imipénème (27,5% vs 22,53% ;  $p < 0,01$ ) entre 2017 et 2020. Cette diminution a été observée dès 2018 pour la ticarcilline (46% vs 39,6% ;  $p < 0,01$ ), pour la ticarcilline-acide clavulanique (50,5% vs 36,6% ;  $p < 0,01$ ), pour la ceftazidime (14,4% vs 16,9% ;  $p = 0,019$ ), pour l'imipénème (27,5% vs 24,5% ;  $p < 0,01$ ) et est restée stable depuis (Figure 15).

En revanche, nous avons noté une augmentation significative de la résistance au céfépime (11,9% vs 15,1% ;  $p < 0,01$ ) entre 2017 et 2020. L'année 2018 marque une augmentation majeure de cette résistance (18,6% vs 11,9% ;  $p < 0,01$ ). La résistance à la pipéracilline-tazobactam n'était significativement pas différente entre 2017 et 2020 (18,2% vs 19% ;  $p = 0,05$ ). L'aztréonam et le méropénème sont testés systématiquement depuis courant 2018, leur résistance ne peut être évaluée que sur les années 2019 et 2020. Une tendance à la diminution était constatée (18,32% vs 18,1% ;  $p = 0,027$ ) pour le méropénème et pour l'aztréonam (41,1% vs 37,7% ;  $p = 0,015$ ).

L'année 2018 marque une fracture dans la résistance observée au laboratoire avec une augmentation des profils sauvages en parallèle d'une diminution quasi-globale de la résistance aux  $\beta$ -lactamines.

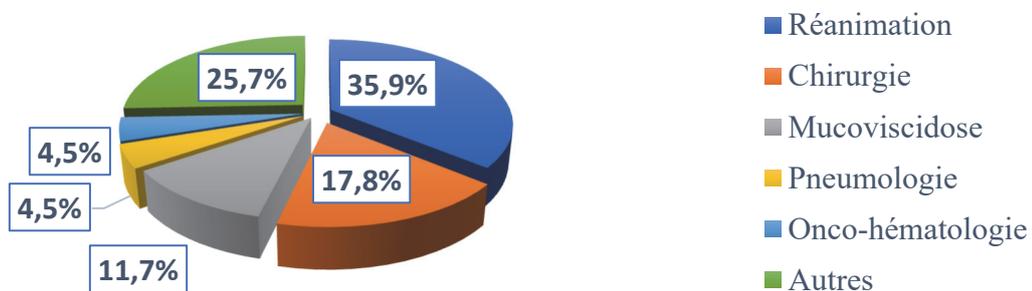


**Figure 15 :** Évolution du profil de résistance aux bêta-lactamines de *P. aeruginosa* 2017-2021.

\* =  $p$ -value  $< 0,05$  sur une comparaison basée sur l'année précédente.

## Souches résistantes à la ceftazidime

Les 1 374 souches de *P. aeruginosa* résistantes à la ceftazidime correspondaient à 651 patients. Ces 651 patients étaient hospitalisés en réanimation (35,9% ; 234/651) ; en chirurgie (17,8% ; 116/651) ; pour une mucoviscidose (11,7% ; 76/651) ; en pneumologie (4,5% ; 29/651), en onco-hématologie (4,5% ; 29/651), et en services de médecines conventionnels définis comme « autres » (25,7% ; 167/651) (Figure 16). Nous avons environ 2,1 souches différentes par patient, le nombre de souches par patient étant supérieur chez les patients hospitalisés en réanimation, en pneumologie et chez les patients atteints de mucoviscidose (Tableau 3).



**Figure 16** : Répartition des souches de *P. aeruginosa* résistantes à la ceftazidime.

Nous avons analysé la prévalence des souches de *P. aeruginosa* résistantes à la ceftazidime sur la période 2017-2021 au sein des populations à risques (ex : n patients résistants à la ceftazidime en réanimation/ n patients total en réanimation) en les comparant aux services de médecines conventionnelles (correspondant à la classe « autres »). La proportion de patients possédant des souches de *P. aeruginosa* résistants à la ceftazidime était significativement plus élevée au sein de la réanimation (23% vs 7,5%,  $p < 0,01$ ), en pneumologie (17,9% ;  $p < 0,01$ ), chez les patients atteints de mucoviscidose (21,9% ;  $p < 0,01$ ) et en chirurgie (10,15% ;  $p < 0,01$ ). Cependant, il n'y avait pas de différence significative pour l'onco-hématologie (10,8% ;  $p = 0,06$ ).

Parmi les souches isolées en réanimation, la résistance globale à la ceftazidime sur la période 2017-2021 est évaluée à 22,4%. Une diminution significative de la résistance est constatée entre 2017 et 2018 (27,8% vs 21,2% ;  $p = 0,047$ ). La résistance ne variait pas significativement les années suivantes ( $p > 0,05$ ). Parmi les souches de *P. aeruginosa* issues de patients atteints de mucoviscidose, hospitalisés en chirurgie, en pneumologie, et en onco-hématologie, la prévalence de la résistance à la ceftazidime ne variait pas significativement au fil des années ( $p > 0,05$ ) (Tableau 3).

**Tableau 3** : Prévalence de la résistance à la ceftazidime chez *P. aeruginosa* au sein des services.

	2017	2018	2019	2020	2021	2017-2021	n souches /patients
<b>Réanimation</b>	183/659 27,8%	102/482 21,2%*	99/516 19,2%	134/617 21,7%	8/70 11,4%	526/2344 22,4%	2,3
<b>Mucoviscidose</b>	54/257 21,0%	60/269 22,3%	60/365 16,4%	40/252 15,9%	6/36 16,7%	220/1179 18,7%	3,4
<b>Chirurgie</b>	58/423 13,7%	46/421 10,9%	47/480 9,8%	41/365 11,2%	3/41 7,3%	195/1730 11,3%	1,5
<b>Pneumologie</b>	17/101 16,8%	27/106 25,5%	36/146 24,7%	24/115 20,9%	2/26 7,7%	106/494 21,5%	3
<b>Onco- hématologie</b>	9/104 8,6%	9/81 11,1%	10/119 8,4%	16/112 14,3%	0/10 0%	44/426 10,3%	1,6
<b>Autres</b>	89/852 10,4%	67/792 8,5%	64/761 9,2%	58/690 9,2%	13/95 13,7%	291/3190 9,1%	1,4

n prélèvements résistants à la ceftazidime dans un service X/n prélèvements testés à la ceftazidime dans un service X ; % de résistance à la ceftazidime dans un service X.

\* = p-value <0,05 sur une comparaison basée sur l'année précédente.

Les antibiotiques restants sensibles sur les souches de *P. aeruginosa* résistants à la ceftazidime étaient la colistine, la fosfomycine, le ceftazidime-avibactam, l'amikacine, le ceftolozane-tazobactam, la ciprofloxacine et la gentamicine. Les carbapénèmes présentaient une efficacité intermédiaire. A contrario, la ticarcilline, la ticarcilline-acide clavulanique, l'aztréonam, la pipéracilline-tazobactam, et la céfépime présentaient une faible efficacité (Tableau 4).

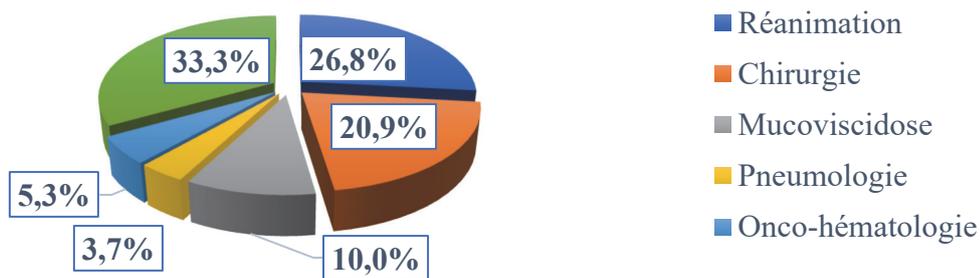
**Tableau 4 :** Antibiotiques restant actifs chez les *P. aeruginosa* résistants à la ceftazidime.

Antibiotiques testés	n souches sensibles/n souches testées ; %.
Colistine	398/440 ; 90,4%
Fosfomycine	929/1337 ; 69,5%
Ceftazidime-avibactam	421/615 ; 68,5%
Amikacine	930/1374 ; 67,7%
Ceftolozane-tazobactam	400/597 ; 67%
Ciprofloxacine	874/1374 ; 63,61%
Gentamicine	438/732 ; 59,8%
Méropénème	431/952 ; 45,3%
Imipénème	602/1365 ; 44,1%
Céfépime	372/1373 ; 27,1%
Pipéracilline-tazobactam	202/1371 ; 14,7%
Aztréonam	102/961 ; 10,6%
Ticarcilline	31/1370 ; 2,26%
Ticarcilline-acide clavulanique	30/1375 ; 2,18%

#### Souches résistantes à l'imipénème

Les 2 293 souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème correspondaient à 1 023 patients. Ces 1 023 patients étaient hospitalisés en réanimation (26,8% ; 274/1 023), en chirurgie (20,9% ; 214/1 023), pour une mucoviscidose (10% ; 102/1023), en pneumologie (3,7% ; 38/1023), en onco-hématologie (5,3% ; 54/1023) et en service de médecines conventionnels (33,3% ; 341/1023) (Figure 17). Nous avons environ 2,2 souches par patient, le nombre de souches par patient étant supérieur chez les patients hospitalisés en réanimation, en pneumologie et chez les patients atteints de mucoviscidose (Tableau 5).

Nous avons analysé la prévalence de *P. aeruginosa* résistant à l'imipénème sur la période 2017-2021 au sein des populations à risques (ex : nb patients R à la ceftazidime d'un service X/ nb patients total d'un service X) en les comparant aux services de médecines conventionnels (catégorisées « autres »). La proportion de patients possédant des souches de *P. aeruginosa* résistants à l'imipénème était significativement plus élevée dans les services de réanimation (26,9% vs 15,3% ;  $p < 0,01$ ), chez les patients atteints de mucoviscidose (29,4% ;  $p < 0,01$ ), en chirurgie (18,7% ;  $p = 0,01$ ), en pneumologie (23,5% ;  $p < 0,01$ ). Cette variation n'était pas significative chez les patients d'onco-hématologie (20% ;  $p = 0,05$ ).



**Figure 17** : Répartition des souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème.

La prévalence de la résistance à l'imipénème a été étudiée au sein de chaque service (% = nb de souches *P. aeruginosa* imipénème R d'un service X/nb de souches *P. aeruginosa* testés d'un service X). Nous avons observé une diminution globale de cette résistance sur les souches isolées en réanimation (38,7% vs 27,6% ;  $p < 0,01$ ) et également en chirurgie (24% vs 18% ;  $p = 0,029$ ) entre 2017 et 2020. En réanimation, cette diminution a été observée dès 2018 (38,7% vs 32,5% ;  $p = 0,033$ ), bien que, l'année 2020 marque une ré-augmentation (27,6% vs 22,2% ;  $p = 0,035$ ) (Tableau 5). Au sein des souches de *P. aeruginosa* isolées chez les patients atteints de mucoviscidose, en pneumologie et en onco-hématologie, la prévalence de la résistance à l'imipénème ne variait pas significativement au fil des années ( $p > 0,05$ ) (Tableau 5). En pneumologie, le taux de résistance en 2020 était supérieur à 2017 ( $p = 0,048$ ) sans autre variation significative ( $p > 0,05$ ).

**Tableau 5** : Prévalence de la résistance à l'imipénème chez *P. aeruginosa* au sein des services.

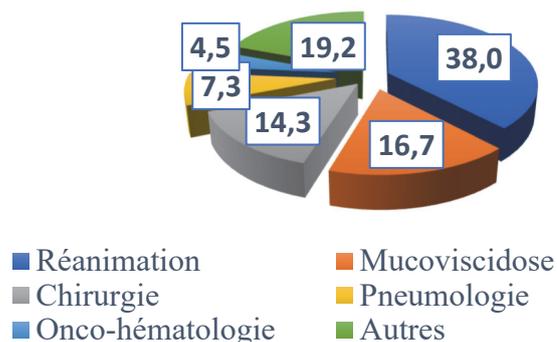
	2017	2018	2019	2020	2021	2017-2021	n souches /patients
<b>Réanimation</b>	251/649 38,7%	156/480 32,5%*	114/514 22,2%*	170/615 27,6%*	21/69 30,4%	712/2327 30,6%	2,3
<b>Mucoviscidose</b>	80/330 32%	84/268 31,3%	106/368 28,8%	86/251 34,3%	12/36 33,3%	368/1173 31,4%	3,4
<b>Chirurgie</b>	113/470 24%	117/446 26,2%	117/465 25,2%	72/400 18%*	4/42 9,5%	423/1823 23,2%	1,5
<b>Pneumologie</b>	24/109 22%	32/102 31,4%	55/142 38,7%	38/112 33,9%	8/27 29,6%	157/492 31,9%	3
<b>Onco- hématologie</b>	28/93 30,1%	15/91 16,5%*	27/117 23,1%	19/97 19,6%	1/9 11,1%	90/407 22,1%	1,6
<b>Autres</b>	158/810 19,5%	122/760 16,1%	134/784 17,1%	110/721 15,3%	19/91 20,9%	543/3166 17,2%	1,4

n prélèvements résistant à l'imipénème dans un service X/n prélèvements testés à l'imipénème dans un service X ; % de résistance à l'imipénème dans un service X.

\* = p-value <0,05 sur une comparaison basée sur l'année précédente.

#### Souches résistantes à toutes les bêta-lactamines

Au total, 510 souches de *P. aeruginosa* associées à une résistance à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines ont été isolées chez 244 patients. Les patients provenaient des services de réanimation (38% ; n=93), de patients atteint de mucoviscidose (16,7% ; n=285), de chirurgie (14,3% ; n=35), de pneumologie (7,3% ; n=18) et d'onco-hématologie (4,5% ; n=11) et des services de médecines conventionnels (19,2% ; n=47) (Figure 18).



**Figure 18 :** Répartition des patients possédant des souches de *P. aeruginosa* résistantes à toutes les bêta-lactamines.

Les antibiotiques restants sensibles sur ces souches résistantes pan- $\beta$ -lactamines utilisés en 1<sup>ère</sup> intention étaient la colistine, le ceftazidime-avibactam, la fosfomycine et le ceftolozane-tazobactam (Tableau 6).

**Tableau 6 :** Antibiotiques restant actifs chez les *P. aeruginosa* résistant à toutes les  $\beta$ -lactamines.

Antibiotiques testés	n souches sensibles/n souches testées ; %.
Colistine	251/281 ; 89,3%
Fosfomycine	290/497 ; 58,4%
Ceftazidime-avibactam	201/347 ; 57,9%
Amikacine	236/508 ; 46,5%
Ceftolozane-tazobactam	175/331 ; 52,9%
Ciprofloxacine	251/509 ; 49,3%
Gentamicine	101/285 ; 35,3%

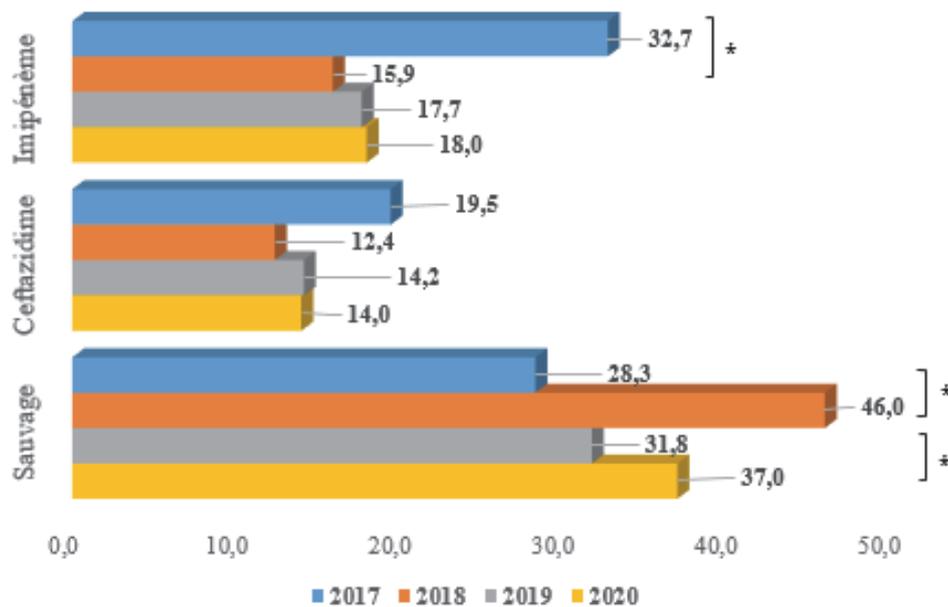
Parmi ces 510 souches, 19 (3,7%) étaient résistantes à tous les antibiotiques (pan-résistantes) dont les antibiotiques testés en deuxième intention (ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam). Les souches correspondaient à 19 patients provenant de réanimation (36,8% ; n=7), de chirurgie (21,1% ; n=4), de patients atteints de mucoviscidose (15,8% ; n=3), de service d'onco-hématologie (10,5% ; n=2), de pneumologie (10,5% ; n=2) et d'un établissement extérieur (5,3% ; n=1).

### ***P. aeruginosa* et infections invasives**

Parmi les souches de *P. aeruginosa* analysées dans cette étude, 441 ont été isolées d'hémocultures, correspondant à 391 patients. Le nombre de souches moyen par patient était de 1,1. Sur la période 2017-2020, la proportion de souches sauvages retrouvée dans les hémocultures variait entre 28,3% en 2017 et 37% en 2020. Cette augmentation était constatée dès 2018 (28,3% vs 46% ;  $p < 0,01$ ) suivie d'une diminution à 31,8% en 2019 ( $p = 0,03$ ), sans variation significative en 2020 ( $p = 0,126$ ) (Figure 19).

La résistance à l'imipénème était maximale en 2017 avec une diminution observée dès 2018 (32,7% vs 15,9% ;  $p < 0,01$ ) sans variation significative les années suivantes. Sur cette même période, la résistance à la ceftazidime ne variait pas significativement ( $p > 0,05$ ) (Figure 19).

La prévalence globale de la résistance à la ceftazidime (15,4%) et à l'imipénème (21,8%) sur la période 2017-2021 n'est pas différente entre les hémocultures et les autres types de prélèvements toutes origines confondues ( $p > 0,05$ ).



**Figure 19 :** Évolution entre 2017 et 2020 des souches résistantes à la ceftazidime et à l'imipénème et des souches sauvages sur les bactériémies à *P. aeruginosa*.

\* =  $p$ -value  $< 0,05$  sur une comparaison basée sur l'année précédente.

## Investigation phénotypique et génotypique des souches isolées au laboratoire

Sur une période de 5 mois (01/03/2020 au 10/07/2020), nous avons isolé 700 souches de *P. aeruginosa* issues de 463 patients. Parmi ces isolats, 106 étaient résistantes à la ceftazidime, 120 à l'imipénème dont 35 étaient co-résistants à la ceftazidime. Pour l'analyse phénotypique et moléculaire, nous avons sélectionné 43 souches résistantes à la ceftazidime, 10 souches présentant une résistance isolée à l'imipénème et 20 souches avec une co-résistance imipénème-ceftazidime.

### *Surexpression de la céphalosporinase AmpC*

La recherche de céphalosporinase hyperproduite AmpC a été retrouvée chez 42/43 (97,7%) souches suspectes d'être des BLSE, et sur 12/17 (70,6% ; 3 souches n'ont pas poussé) des souches suspectes d'être des carbapénémases (Annexe). Au total, 90% des souches présentaient une surexpression de la céphalosporinase AmpC. Au sein de ce phénotype de résistance, les résistances les plus fréquemment associées portaient sur les antibiotiques suivants : ticarcilline, ticarcilline-acide clavulanique, pipéracilline-tazobactam et aztréonam ; ce qui concorde avec ce phénotype majoritaire (Tableau 7).

**Tableau 7** : Résistance aux antibiotiques sur les souches de *P. aeruginosa* surproduisant la céphalosporinase AmpC.

	TIC	TCC	TZP	ATM	FEP	CAZ	IPM	MER	CAV	CTA
<b>Surexpression</b>	54/54	54/54	44/54	52/54	39/54	54/54	11/54	10/54	9/20	3/20
<b>AmpC (n=54)</b>	100%	100%	81,5%	96,3%	72,2%	100%	20,4%	18,5%	45%	15%

TIC : Ticarcilline ; TCC : Ticarcilline-Acide clavulanique ; TZP : Pipéracilline-tazobactam ; ATM : Aztréonam ; FEP : Céfépime CAZ : Ceftazidime ; IPM : Imipénème ; MER : Méropénème ; CAV : Ceftazidime-avibactam ; CTA : Ceftolozane-tazobactam.

### *E-Tests MBL pour la recherche de carbapénémases*

Les 20 souches avec suspicion d'une production de carbapénémases (co-résistance ceftazidime-carbapénèmes) ont été testées pour la recherche de métallo- $\beta$ -lactamases par des E-tests MBL. Les E-tests MBL étaient en majorité « non-interprétables » (16/20) et quatre E-tests MBL étaient négatifs (Annexe).

### *Tests de synergie pour la détection des BLSE*

Les tests de synergie antibiotiques (ticarcilline-acide clavulanique et ceftazidime) à la recherche de BLSE sont revenus négatifs pour les 43 souches testées (Annexe).

### *Recherche de gènes de résistance aux bêta-lactamines*

Les PCR temps réel et standard ont été réalisées sur l'ensemble des souches incluses dans notre étude (N=73). Les PCR à la recherche des gènes de résistance de type BLSE sont toutes revenues négatives. En revanche, la recherche de carbapénémases a permis d'identifier deux souches productrices d'IMP-15, confirmé par séquençage (99,5% identité, Genbank NG\_049178.1). Ces deux souches ont été isolées chez deux patients hospitalisés dans des services et à des moments différents. Il s'agissait dans les deux cas d'infections nosocomiales. La souche 3717 a été isolée à partir d'un patient âgé de 27 ans ayant acquis une pneumopathie acquise sous ventilation mécanique à *P. aeruginosa* au cours de son séjour en réanimation. Cette souche était résistante à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines, aux aminosides, aux fluoroquinolones et à la colistine. Le test MBL pour la recherche de métallo bêta-lactamase était ininterprétable. Les PCR *mcr* sont revenues négatives pour cette souche. La souche 1312 a été isolée à partir d'un prélèvement de greffe osseuse chez un patient de 64 ans hospitalisé en chirurgie, ayant fait un passage par la réanimation – unité de soin continu. Le service a conclu à une infection de site opératoire. Cette souche était résistante à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines excepté à l'aztréonam. Parmi les autres familles d'antibiotiques, seule la colistine restait active sur la souche (Tableau 8). L'E-test MBL était également ininterprétable, en revanche, cette souche présentait également un phénotype de « surexpression de la céphalosporinase AmpC ». Les PCR standards ciblant la porine OprD impliquée dans la résistance aux carbapénèmes n'ont pas montré d'insertion de séquences.

**Tableau 8 :** Tests de sensibilité aux antibiotiques des 2 souches d'IMP-15 identifiées par PCR. R=Résistant ; S=Sensible.

	3717 (mg/L)	1312 (mg/L)
Ticarcilline	R (>16)	R (>16)
Ticarcilline	R (>16)	R (>16)
Acide clavulanique		
Pipéracilline-tazobactam	R (>16)	R (>16)
Aztréonam	R (4)	S (<1)
Céfépime	R (>8)	R (>8)
Imipénème	R (>8)	R (>32)
Méropénème	R (>16)	R (>32)
Ceftazidime-avibactam	R (64)	R (256)
Ceftolozane-tazobactam	R	R (256)
Gentamicine	R (>4)	R (>4)
Amikacine	R (>128)	R (>256)
Ciprofloxacine	R (>16)	R (>32)
Colistine	R (8)	S (1)

*Recherche de gènes de résistance mobile à la colistine (mcr)*

Aucune résistance à la colistine n'a été documenté dans ce travail.

### 1.3. Discussion

Dans ce travail, nous avons effectué une étude épidémiologique de la résistance aux bêta-lactamines chez *P. aeruginosa* au sein de l'AP-HM entre 2017 et 2021 et réalisé une étude du mécanisme moléculaire de la résistance à ces  $\beta$ -lactamines sur un échantillon de 73 souches. Globalement, nous avons montré une augmentation de la proportion des souches sauvages associé à une diminution globale de la résistance aux bêta-lactamines à l'exception du céfépime. Le même constat était rapporté sur la période 2001-2016 au sein de l'APHM (71). Cette étude rapportait une prévalence de la résistance à la ceftazidime (2014-2016) estimée à 14,9% ; cependant nous rapportons une hausse en 2017 (16,9%) pour diminuer en 2018 (14,4%). Depuis, cette résistance est restée stable. La résistance à l'imipénème était rapportée comme fluctuante avec une estimation à 22,1% en 2016. Ce taux reste stable sur la période 2017-2020, à l'exception de l'année 2017 pour lequel nous avons observé une augmentation transitoire de la résistance (27,5%). Le nombre de souches Pan Drug Resistant (PDR) reste faible dans notre étude (0,09% ; 9/9420), ce qui est similaire à la précédente étude estimée à 0,05% (4/8543) (71). La pan-résistance était retrouvé exclusivement chez les personnes à risques. En 2019, la résistance aux carbapénèmes sur les souches invasives en Europe restait similaire à la nôtre avec un taux à 16,5% (17,7% à l'AP-HM) ; de même que pour la ceftazidime à 14,3% (14,2% à l'AP-HM) (70). Comme rapporté dans la littérature, la prévalence de la résistance aux  $\beta$ -lactamines était supérieure chez les patients hospitalisés en réanimation et chez les patients s'ayant vu administrés de multiples antibiotiques : céphalosporines à large spectre, carbapénèmes, aminosides dont les patients atteints de mucoviscidose (41). Il faut cependant noter que le nombre moyen d'isolats présentant des phénotypes de résistances différents était supérieur chez les populations à risques incluant la réanimation, les patients atteints de mucoviscidose et la pneumologie. Ces populations étaient colonisées par différentes souches, ce qui est expliqué par une durée d'hospitalisation plus longue, de multiples antibiothérapies entraînant l'acquisition de résistances secondaires, et le terrain chronique de la maladie pulmonaire dont la mucoviscidose propice à la colonisation par *P. aeruginosa*.

L'investigation de 73 souches de *P. aeruginosa* nous a permis de caractériser les mécanismes moléculaires les plus fréquemment associés à une résistance aux bêta-lactamines au sein de nos hôpitaux. La résistance à la ceftazidime associée à une sensibilité à l'imipénème est majoritairement expliquée par une surexpression de la céphalosporinase AmpC. Le phénotype de surexpression d'AmpC est décrit comme le mécanisme majoritaire de la résistance aux bêta-lactamines chez *P. aeruginosa* en France. En effet, sur la période 2019-2020, la résistance aux

béta-lactamines était dans 65,1% des cas due à des mécanismes de résistance intrinsèque dont 48,4% de mutants surproduisaient cette céphalosporinase. Ce phénotype n'est pas responsable d'épidémie puisque le gène est chromosomique et n'a pas été décrit sur un plasmide (57,72). Concernant la résistance aux carbapénèmes,-nous n'avons pas mis en évidence d'inactivation de la porine OprD par insertion de séquence. Ce mécanisme de résistance est rarement retrouvé en France mais est majoritaire dans d'autres régions du monde comme en Russie (73,74). Dans notre étude, nous n'avons pas séquencé les séquences OprD pour mettre en évidence les mutations inactivatrices mais nous supposons que ce mécanisme est responsable de la résistance aux carbapénèmes, d'une part car les autres mécanismes n'ont pas été retrouvés et d'autre part car il s'agit du mécanisme majoritaire en France. Ainsi, Castanheira et al ont rapporté que la résistance aux carbapénèmes étaient imputable à une altération de l'OprD chez 94,9% des *P. aeruginosa* étudiés (75). Les co-résistances à la ceftazidime et l'imipénème sont dues en grande partie à la surexpression de la céphalosporinase AmpC associée par argument de fréquence à une altération de l'OprD. Cependant, cette dernière peut être la conséquence d'une carbapénémase seule ou associée à une surexpression d'AmpC mais ce phénotype reste rare.

Les mécanismes de résistance acquises dans notre étude sont faiblement représentés. En effet, les BLSE les plus fréquemment isolées en France n'ont pas été retrouvées. Cependant, le CNR de la résistance aux antibiotiques rapporte en 2019, 11,9% de BLSE sur les souches multi-résistantes (58). Exclure totalement la présence de BLSE n'est pas plausible devant l'absence de recherche des phénotypes moins fréquents (VEB-, BOE-, SHV-, OXA-, TEM- ...) et un nombre de souches incluses faible. Actuellement, la disposition des disques antibiotiques (ticarcilline + acide clavulanique ; ceftazidime) dans la réalisation de nos antibiogrammes ne nous permet pas de rechercher un phénotype pouvant faire suspecter une BLSE, qui de plus, pourrait être masqué par la surexpression de la céphalosporinase AmpC. La pertinence à les placer à côté reste très limitée. De plus, la BLSE SHV2a qui est fréquemment isolée en France n'est pas inhibée par l'acide clavulanique : ainsi une modification de la disposition de nos antibiotiques ne nous paraît pas pertinente.

La recherche de carbapénémases sur les isolats de *P. aeruginosa* au laboratoire n'est actuellement pas réalisée en routine. Or, l'étude des souches suspectes d'être productrices de carbapénémases a permis la caractérisation de deux IMP-15. Ainsi, nous pouvons affirmer la présence de carbapénémases chez *P. aeruginosa* au sein de nos hôpitaux. La première description d'IMP-15 a eu lieu en 2005 à Bangkok, Thaïlande (GenBank accession no.

AY553333), et est associée à l'intégron de classe I. Dans tous les cas décrits, la production d'IMP-15 était liée à des profils multi-résistants. Trois foyers hospitaliers ont été identifiés à Mexico entre 2003 et 2005. Un cas d'importation américain d'IMP-15 lors d'une hospitalisation au décours d'un voyage au Mexique a également été documenté. En Europe, 1 cas d'IMP-15 a été rapporté en Allemagne, 4 IMP-15 ont été rapportés sur 2 souches de *P. aeruginosa* et 2 souches de *P. putida* en Espagne. Quatre autres cas ont été recensés au Liban (73,76–80). En France, le CNR de la résistance aux antibiotiques rapporte pour la première fois en 2020, 8 cas d'IMP-15 dont 2 dans les bouches du Rhône et 6 dans le Var ; la même année où nous rapportons nos deux cas chez des patients qui habitent à Marseille. Les souches ayant été analysées à posteriori, nous ne nous pouvions pas savoir si les patients avaient voyagé dans les pays où les cas étaient rapportés ou s'ils avaient un lien avec les cas régionaux rapportés. De plus, la présence simultanée d'une carbapénémase associée à une altération de l'OprD dans la résistance aux carbapénèmes n'est pas rare. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure une perte de l'OprD chez nos souches productrices de carbapénémases (61,81). La performance des E-tests MBL (Biomérieux) pour la détection de ces métallo- $\beta$ -lactamases ne s'est pas montrée concluante et ne nous a pas permis d'identifier nos deux IMP-15. Sur un cas d'IMP-15 isolé en Suisse, Goldenberger et al rapporte que sa détection par E-test MBL IP/IPI (Biomérieux) est revenue négative, tout comme le Xpert Carba-R (Cepheid) recherchant les gènes de résistance KPC, NDM, VIM, OXA-48 et IMP. En parallèle, le RAPIDEC® CARBA NP (Biomérieux) était positive. Le séquençage du génome entier a permis de caractériser IMP-15 (80). Une seule technique phénotypique ne paraît donc pas suffisante pour conclure à l'absence de carbapénémases. Excepté ces deux cas, les E-tests MBL sont décrits comme efficaces pour la détection des métallo- $\beta$ -lactamases. Cependant, la majorité des publications se basent sur un screening des métallo- $\beta$ -lactamases par des tests phénotypiques pour ensuite le confirmer ou infirmer par PCR ; si le screening phénotypique est négatif, les PCR ne sont pas faites (82,83).

Nous n'excluons pas la présence potentielle d'une surexpression de transporteurs d'efflux qui n'a pas été étudié ici. Le phénotype de surexpression du transporteur d'efflux MexXY/OprM peut tout de même être déduit. En effet, ce transporteur d'efflux est impliqué dans la résistance au céfépime, aux fluoroquinolones et aux aminosides. Ainsi, devant une résistance au céfépime avec une sensibilité conservée à la ceftazidime, le mécanisme le plus fréquent est la surexpression du système d'efflux actif MexXY/OprM. Une analyse moléculaire des transporteurs d'efflux est difficilement envisageable dans une activité de routine. Une

résistance commune aux substrats de la pompe MexXY/OprM doit faire suspecter ce phénotype (3,26,67,68,84).

Notre étude présente plusieurs limites. Le nombre de souches inclus est faible, ce qui ne nous permet pas de conclure à l'absence de certains phénotypes, dont les BLSE. De plus, les tests phénotypiques à la recherche d'une synergie pouvant faire évoquer une BLSE auraient dû être effectué sur l'ensemble des souches sur un milieu MH additionnée de cloxacilline pour un meilleur screening. La caractérisation des mutations génétiques supposées sur les phénotypes « altération de l'OprD » par séquençage nous aurait permis de confirmer l'origine de cette résistance. Bien que non négligeable dans la caractérisation de la résistance aux bêta-lactamines, l'absence d'exploration de la surexpression des pompes d'efflux reste un facteur limitant dans notre interprétation des différents phénotypes. Enfin, un caractère prospectif dans la caractérisation de nos carbapénèmases aurait permis la mise en place de procédures spécifiques dans la prise en charge des patients.

### **Proposition d'algorithme décisionnel pour l'interprétation des phénotypes de résistance**

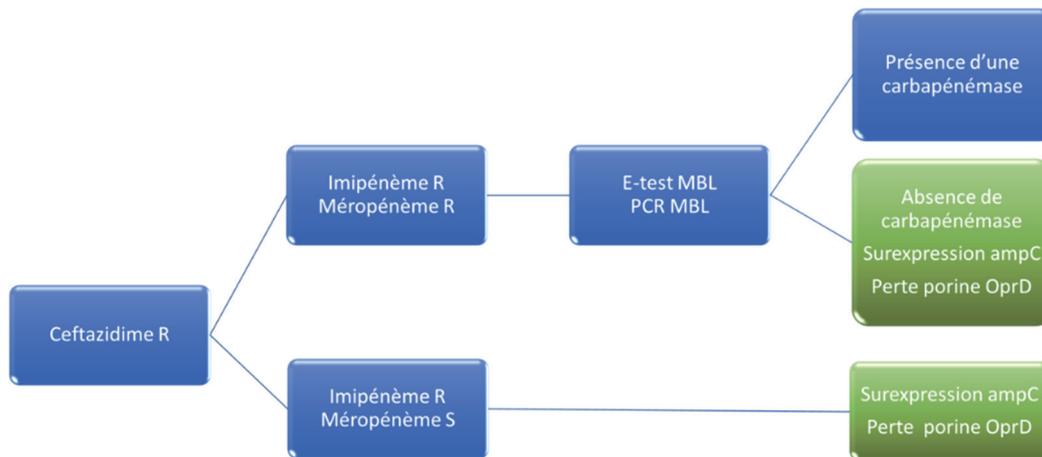
L'un des objectifs de cette étude était d'établir les démarches à suivre pour pouvoir conclure aux phénotypes de résistances aux bêta-lactamines.

Comme nous l'avons vu précédemment, la surexpression d'AmpC est associée à une augmentation des CMI de la pipéracilline, la ticarcilline, la ceftazidime et l'aztréonam (3). La surexpression de la céphalosporinase AmpC est décrite comme le mécanisme majoritaire impliqué dans la résistance à la ceftazidime (84%) et à la pipéracilline tazobactam (96%) (48). Une co-résistance ceftazidime-tazocilline est retrouvé dans 81,5% (44/54) de nos souches impliquées dans ce phénotype (Tableau 7). Pour la résistance à l'imipénème, l'altération de la porine OprD représente le mécanisme majoritaire.

Devant un *P. aeruginosa* résistant à la ceftazidime associé à une résistance aux carbapénèmes, il faut suspecter en premier lieu une perte de la porine OprD associée à une surexpression de la céphalosporinase AmpC puisque cette dernière, seule, n'induit pas de résistance aux carbapénèmes. En parallèle, il est nécessaire d'exclure la présence d'une MBL (16,2% des souches multi-résistantes) (48,58). Pour cela, il serait judicieux d'organiser un circuit en biologie moléculaire à la recherche des carbapénèmases les plus fréquentes dont IMP et VIM (85). Néanmoins, la caractérisation de ces résistances reste complexe. Les phénotypes possédant cette co-résistance peuvent également être dus à des BLSE associée à une perte de l'OprD, sur lesquels peuvent s'ajouter une surexpression d'AmpC. La présence d'oxacillinase associée à une BLSE, une surexpression d'AmpC et une perte de l'OprD peuvent aussi

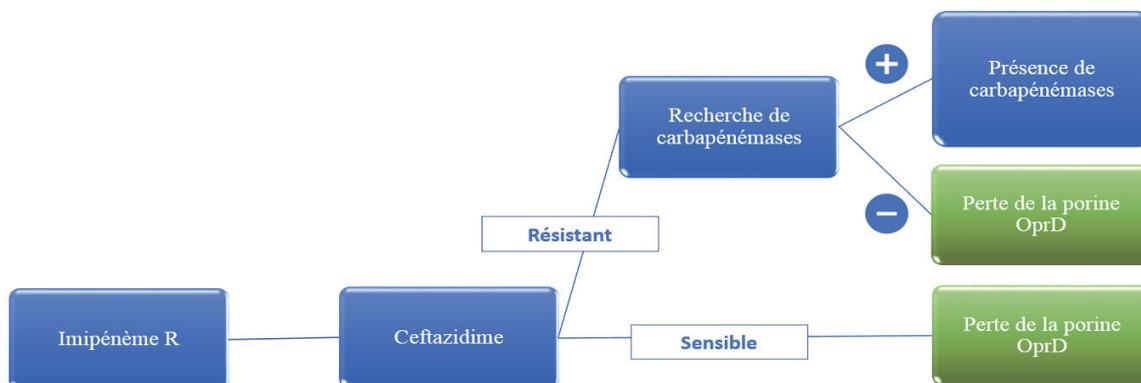
également être retrouvé. Tous les mécanismes de résistance peuvent s'additionner, il est important de pouvoir détecter les souches aux mécanismes de résistance diffusible.

Devant un *P. aeruginosa* résistant à la ceftazidime avec une sensibilité conservée aux carbapénèmes, la surexpression de la céphalosporinase AmpC est le mécanisme le plus probable. Plus rarement, des gènes de BLSE ou d'oxacillinasés peuvent être retrouvés. Les BLSE n'ayant pas été retrouvés dans notre étude, nous n'établirons pas de démarche diagnostic en ce sens pour le moment (Figure 20).



**Figure 20 :** Algorithme décisionnel pour la recherche des phénotypes de résistance à la ceftazidime. (En vert : phénotype les plus fréquemment retrouvés).

Les mécanismes de résistance à l'imipénème sont peu nombreux et concernent le plus fréquemment : la perte de porine OprD et l'acquisition d'une carbapénémase (majoritairement une métallo- $\beta$ -lactamase). La perte de la porine OprD peut également induire des résistances croisées à l'ensemble des carbapénèmes. Dès lors, la CMI du méropénème devrait toujours être inférieur à celle de l'imipénème. Si la résistance est associée à la ceftazidime, la recherche de métallo- $\beta$ -lactamases doit être envisagée (Figure 21).



**Figure 21 :** Algorithme décisionnel pour la recherche des phénotypes de résistance à l'imipénème. (En vert : phénotype les plus fréquemment retrouvés).

## Conclusion

L'objectif de notre thèse était de faire un état des lieux de la résistance aux bêta-lactamines chez *P. aeruginosa* et de mettre en place des mesures qui permettrait d'organiser une surveillance épidémiologique de ces résistances. Depuis 2018, cette résistance est devenue stable. La résistance à l'imipénème et à la ceftazidime reste cependant plus élevée en réanimation, chez les patients atteints de mucoviscidose, en chirurgie, et en pneumologie. Les patients sont généralement colonisés par une ou plusieurs souches présentant des phénotypes de résistance différents. Les souches invasives n'avaient pas de résistances supérieures aux souches non invasives. A ce jour, la résistance aux bêta-lactamines au sein de nos hôpitaux est expliquée majoritairement par des mécanismes de résistances chromosomiques avec la surexpression de la céphalosporinase AmpC seule ou associée à une altération de l'OprD. Nous ne pouvons exclure la présence des transporteurs d'efflux dans cette résistance puisque celle-ci n'a pas été étudiée.

Les mécanismes de résistance acquis et diffusibles restent rares mais présents. Les mesures d'isolements et d'hygiène relatives à la détection des carbapénémases identifiés nous confortent dans l'idée d'introduire une routine de dépistage en biologie moléculaire. Il serait cependant intéressant dans un premier temps de rechercher les carbapénémases sur un plus grand nombre de souches afin d'évaluer le besoin de rechercher ces gènes de manière systématique. En effet, la connaissance de notre épidémiologie locale joue un rôle majeur dans les directives de prescription d'antibiotique et dans la prise en charge des patients.

## Bibliographie

1. Barbier F, Wolff M. Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*: Vers l'impasse thérapeutique ? Med Sci (Paris). nov 2010;26(11):960-8.
2. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017. :270.
3. Mérens A, Janvier F, Vu-Thien H, Cavallo J-D, Jeannot K. Phénotypes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*. Revue Francophone des Laboratoires. sept 2012;2012(445):59-74.
4. Haynes WC. *Pseudomonas aeruginosa*---its Characterization and Identification. Journal of General Microbiology. 1 déc 1951;5(5):939-50.
5. Yabuuchi E, Ohyama A. Characterization of "Pyomelanin"-Producing Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. INT J SYST BACTERIOL. :12.
6. Tsuji A, Kaneko Y, Takahashi K, Ogawa M, Goto S. The Effects of Temperature and pH on the Growth of Eight Enteric and Nine Glucose Non-Fermenting Species of Gram-Negative Rods. Microbiology and Immunology. janv 1982;26(1):15-24.
7. Vasil ML. *Pseudomonas aeruginosa*: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology. The Journal of Pediatrics. mai 1986;108(5):800-5.
8. Pachori P, Gothwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. Genes & Diseases. juin 2019;6(2):109-19.
9. López-Pintor JM, Navarro-San Francisco C, Sánchez-López J, García-Caballero A, Loza Fernández de Bobadilla E, Morosini MI, et al. Direct antimicrobial susceptibility testing from the blood culture pellet obtained for MALDI-TOF identification of Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. juin 2019;38(6):1095-104.
10. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. PAO1, an opportunistic pathogen. 2000;406:6.
11. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. IJMS. 17 nov 2020;21(22):8671.
12. Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. Annales de biologie clinique. juill 2011;69(4):393-403.
13. Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. Drug Discovery Today. janv 2019;24(1):350-9.
14. Remold SK, Brown CK, Farris JE, Hundley TC, Perpich JA, Purdy ME. Differential Habitat Use and Niche Partitioning by *Pseudomonas* Species in Human Homes. Microb Ecol. oct 2011;62(3):505-17.
15. Tate D, Mawer S, Newton A. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* folliculitis associated with a swimming pool inflatable. Epidemiol Infect. avr 2003;130(2):187-92.
16. Weidner T, Tittelbach J, Illing T, Elsner P. Gram-negative bacterial toe web infection - a systematic review. J Eur Acad Dermatol Venereol. janv 2018;32(1):39-47.

17. Nseir S, Di Pompeo C, Pronnier P, Beague S, Onimus T, Saulnier F, et al. Nosocomial tracheobronchitis in mechanically ventilated patients: incidence, aetiology and outcome. *Eur Respir J.* déc 2002;20(6):1483-9.
18. Weber DJ, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE, Samsa GP, Brown V, Niederman MS. Microbiology of Ventilator-Associated Pneumonia Compared With That of Hospital-Acquired Pneumonia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* juill 2007;28(7):825-31.
19. Smulders C. Conjunctival and corneal colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients A prospective study. *The Netherlands Journal of Medicine.* sept 1999;55(3):106-9.
20. Cruciani M, Malena M, Amalfitano G, Monti P, Bonom L. Molecular Epidemiology in a Cluster of Cases of Postoperative *Pseudomonas aeruginosa* Endophthalmitis. *CLIN INFECT DIS.* févr 1998;26(2):330-3.
21. Sorbets E, Evrevin M, Jumas-Bilak E, Masnou A, Lotthé A, Thuret R, et al. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections following outpatient flexible cystoscopy. *American Journal of Infection Control.* déc 2019;47(12):1510-2.
22. Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. *Journal of Infection and Public Health.* 2009;2(3):101-11.
23. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. :9.
24. Al-Hasan MN, Wilson JW, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: A Population-Based Study. *The American Journal of Medicine.* août 2008;121(8):702-8.
25. Schaefer P, Baugh RF. Acute Otitis Externa: An Update. 2012;86(11):7.
26. Mérens A, Jault P, Bargues L, Cavallo J-D. Infections à *Pseudomonas aeruginosa*. *EMC - Maladies infectieuses.* févr 2013;10(1):1-18.
27. Osmon S, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. Hospital Mortality for Patients With Bacteremia Due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest.* févr 2004;125(2):607-16.
28. Elborn JS. Cystic fibrosis. *The Lancet.* nov 2016;388(10059):2519-31.
29. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 oct 2003;168(8):918-51.
30. Healthcare-associated infections in intensive care units - Annual Epidemiological Report for 2017 [Internet]. Disponible sur: [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER\\_for\\_2017-HAI.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2017-HAI.pdf)
31. Sousa D, Cenicerós A, Galeiras R, Pérttega-Díaz S, Gutiérrez-Urbón J-M, Rodríguez-Mayo M, et al. Microbiology in burns patients with blood stream infections: trends over time and during the course of hospitalization. *Infectious Diseases.* 3 avr 2018;50(4):289-96.
32. Weber DJ, van Duin D, DiBiase LM, Hultman CS, Jones SW, Lachiewicz AM, et al. Healthcare-Associated Infections among Patients in a Large Burn Intensive Care Unit: Incidence and Pathogens, 2008–2012. *Infect Control Hosp Epidemiol.* oct

- 2014;35(10):1304-6.
33. Pledel G. Caractéristiques des infections acquises chez le patient grand brûlé au chu de Toulouse : étude rétrospective sur 5 ans [Internet]. Disponible sur: [http://thesesante.ups-tlse.fr/3041/1/2020TOU31\\_527.pdf](http://thesesante.ups-tlse.fr/3041/1/2020TOU31_527.pdf)
  34. Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. AAC. juin 2004;48(6):2043-8.
  35. Chler HH, Santanam P, Kayser FH. Sequence and Characterization of a Novel Chromosomal Aminoglycoside Phosphotransférase Gene, aph(3J)-IIb, in *Pseudomonas aeruginosa*. :3.
  36. SURVEILLANCE REPORT. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. :110.
  37. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. mars 2012;18(3):268-81.
  38. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*. déc 2009;73(4):338-44.
  39. Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*. 1 août 2008;57(8):966-73.
  40. SPIADI 2020 - Résultat de l'enquête Réa-Sink [Internet]. Disponible sur: <https://www.spiadi.fr/results>
  41. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. AAC. janv 2006;50(1):43-8.
  42. Zavascki AP. The influence of metallo-β-lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 30 mai 2006;58(2):387-92.
  43. Persoon MC, Voor in't holt AF, Wielders CCH, Gommers D, Vos MC, Severin JA. Mortality associated with carbapenem-susceptible and Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase-positive *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Resist Infect Control*. déc 2020;9(1):25.
  44. Salmanov A, Litus V, Vdovychenko S, Litus O, Davtian L, Ubogov S, et al. HEALTHCARE-ASSOCIATED INFECTIONS IN INTENSIVE CARE UNITS. *Wiad Lek*. mai 2019;72(5):963-9.
  45. Surveillance des pneumopathies en réanimation [Internet]. Disponible sur: <https://www.spiadi.fr/results>
  46. Karampatakis T, Antachopoulos C, Tsakris A, Roilides E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an endemic area: comparison with global data. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. juill 2018;37(7):1211-20.
  47. Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, et al. Clinical and Bacteriological Characteristics of IMP-Type Metallo-β-Lactamase-Producing. :7.
  48. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodríguez C, Moya B, et al.

- Overexpression of AmpC and Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bloodstream Infections: Prevalence and Impact on Resistance in a Spanish Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2011;55(5):1906-11.
49. Rodríguez-Martínez J-M, Poirel L, Nordmann P. Extended-Spectrum Cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *AAC.* mai 2009;53(5):1766-71.
  50. Berrazeg M, Jeannot K, Ntsogo Enguéné VY, Broutin I, Loeffert S, Fournier D, et al. Mutations in  $\beta$ -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2015;59(10):6248-55.
  51. Photothèque *Pseudomonas aeruginosa* - CNR de la Résistance aux Antibiotiques [Internet]. Disponible sur: [www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/phototheque.html](http://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/phototheque.html)
  52. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin T-J, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances.* janv 2019;37(1):177-92.
  53. Diene SM, Rolain J-M. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection.* sept 2014;20(9):831-8.
  54. Schäfer E, Malecki M, Tellez-Castillo CJ, Pfennigwerth N, Marlinghaus L, Higgins PG, et al. Molecular surveillance of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* at three medical centres in Cologne, Germany. *Antimicrob Resist Infect Control.* déc 2019;8(1):208.
  55. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates.* mai 2019;44:100640.
  56. Rapport d'activité CNR Résistance aux antibiotiques 2012-2015 [Internet]. Disponible sur: [https://maquette.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Bilan\\_CNR\\_2012\\_2015.pdf](https://maquette.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Bilan_CNR_2012_2015.pdf)
  57. Jeannot K, Plésiat P. Épidémiologie de la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal des Anti-infectieux.* juin 2016;18(2):52-63.
  58. Rapport 2019 CNR des Résistances aux antibiotiques [Internet]. Disponible sur: <https://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/bilans-dactivite.html>
  59. on behalf of the CARB-LR group, Pantel A, Boutet-Dubois A, Jean-Pierre H, Marchandin H, Sotto A, et al. French regional surveillance program of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli: results from a 2-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* déc 2014;33(12):2285-92.
  60. Bonnin RA, Bogaerts P, Girlich D, Huang T-D, Dortet L, Glupczynski Y, et al. Molecular Characterization of OXA-198 Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. juin 2018 [cité 13 juin 2021];62(6). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02496-17>
  61. Fournier D, Richardot C, Müller E, Robert-Nicoud M, Llanes C, Plésiat P, et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* août 2013;68(8):1772-80.

62. Riera E, Cabot G, Mulet X, Garcia-Castillo M, del Campo R, Juan C, et al. Pseudomonas aeruginosa carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 sept 2011;66(9):2022-7.
63. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations 2021 [Internet]. Disponible sur: <https://www.sfm-microbiologie.org/2021/04/23/casfm-avril-2021-v1-0/>
64. Laudy AE, Róg P, Smolińska-Król K, Ćmiel M, Słoczyńska A, Patzer J, et al. Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods. Gonzalez-Bello C, éditeur. *PLoS ONE*. 28 juin 2017;12(6):e0180121.
65. Poole K. *Pseudomonas Aeruginosa: Resistance to the Max*. *Front Microbio* [Internet]. 2011 [cité 13 juin 2021];2. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00065/abstract>
66. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance Mechanisms of Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Germany and Correlation with Hypermutation. *AAC*. nov 2007;51(11):4062-70.
67. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. déc 2000;44(12):3322-7.
68. Muderris T, Durmaz R, Ozdem B, Dal T, Unaldı O, Aydogan S, et al. Role of efflux pump and OprD porin expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Infect Dev Ctries*. 31 janv 2018;12(01):001-8.
69. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 mars 2001;47(3):247-50.
70. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2019 [Internet]. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf>
71. Le Page S, Dubourg G, Baron SA, Rolain J-M, Raoult D. No global increase in resistance to antibiotics: a snapshot of resistance from 2001 to 2016 in Marseille, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. févr 2019;38(2):395-407.
72. CNR de la résistance aux antibiotiques - Rapport d'activité 2019-2020 [Internet]. Disponible sur: [https://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Rapport\\_CNR\\_RA\\_2019\\_2020v2.pdf](https://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Rapport_CNR_RA_2019_2020v2.pdf)
73. Al Bayssari C, Diene SM, Loucif L, Gupta SK, Dabboussi F, Mallat H, et al. Emergence of VIM-2 and IMP-15 Carbapenemases and Inactivation of *oprD* Gene in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Lebanon. *Antimicrob Agents Chemother*. août 2014;58(8):4966-70.
74. Bocharova Y, Savinova T, Lazareva A, Polikarpova S, Gordinskaya N, Mayanskiy N, et al. Genotypes, carbapenemase carriage, integron diversity and *oprD* alterations among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Russia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. avr 2020;55(4):105899.

75. Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 juill 2014;69(7):1804-14.
76. Martin CA, Morita K, Ribes JA, Deshpande LM, Sader HS, Castanheira M. IMP-15-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strain Isolated in a U.S. Medical Center: a Recent Arrival from Mexico. *AAC*. juin 2008;52(6):2289-90.
77. Gilarranz R, Juan C, Castillo-Vera J, Chamizo FJ, Artiles F, Álamo I, et al. First detection in Europe of the metallo- $\beta$ -lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*. sept 2013;19(9):E424-7.
78. Quinones-Falconi F, Galicia-Velasco M, Marchiaro P, Mussi MA, Ballerini V, Vila AJ, et al. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo- $\beta$ -lactamases of the IMP-15 and VIM-2 types in Mexico. *Clinical Microbiology and Infection*. févr 2010;16(2):126-31.
79. Garza-Ramos U, Morfin-Otero R, Sader HS, Jones RN, Hernández E, Rodríguez-Noriega E, et al. Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene blaIMP-15 in a Class 1 Integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Hospital in Mexico. *AAC*. août 2008;52(8):2943-6.
80. Goldenberger D. First case of IMP-15-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Switzerland: Challenging laboratory diagnosis using whole genome sequencing (WGS). 2020;3.
81. Sefraoui I, Berrazeg M, Drissi M, Rolain J-M. Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Isolated from Western Algeria Between 2009 and 2012. *Microbial Drug Resistance*. avr 2014;20(2):156-61.
82. Sachdeva R, Sharma B, Sharma R. Evaluation of different phenotypic tests for detection of metallo- $\beta$ -lactamases in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Lab Physicians*. oct 2017;9(04):249-53.
83. Qu T -t., Zhang J -l., Wang J, Tao J, Yu Y -s., Chen Y -g., et al. Evaluation of Phenotypic Tests for Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strains in China. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 avr 2009;47(4):1136-42.
84. Hocquet D, Plésiat P, Dehecq B, Mariotte P, Talon D, Bertrand X. Nationwide Investigation of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases, Metallo- $\beta$ -Lactamases, and Extended-Spectrum Oxacillinases Produced by Ceftazidime-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains in France. *AAC*. août 2010;54(8):3512-5.
85. Bisiklis A, Papageorgiou F, Frantidou F, Alexiou-Daniel S. Specific detection of blaVIM and blaIMP metallo- $\beta$ -lactamase genes in a single real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection*. déc 2007;13(12):1201-3.

## Annexes

**Tableau 1:** Antibiotiques utilisés pour définir les MDR, XDR et PDR chez *P. aeruginosa* (37) :

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)
Aminoglycosides	Gentamicin	
	Tobramycin	
	Amikacin	
	Netilmicin	
Antipseudomonal carbapenems	Imipenem	
	Meropenem	
	Doripenem	
Antipseudomonal cephalosporins	Ceftazidime	
	Cefepime	
Antipseudomonal fluoroquinolones	Ciprofloxacin	
	Levofloxacin	
Antipseudomonal penicillins + $\beta$ -lactamase inhibitors	Ticarcillin-clavulanic acid	
	Piperacillin-tazobactam	
Monobactams	Aztreonam	
Phosphonic acids	Fosfomycin	
Polymyxins	Colistin	
	Polymyxin B	
<p>Criteria for defining MDR, XDR and PDR in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>            MDR: non-susceptible to <math>\geq 1</math> agent in <math>\geq 3</math> antimicrobial categories.            XDR: non-susceptible to <math>\geq 1</math> agent in all but <math>\leq 2</math> categories.            PDR: non-susceptible to all antimicrobial agents listed.  <a href="http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHA/Pages/public_consultation_clinical_microbiology_infection_article.aspx">http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHA/Pages/public_consultation_clinical_microbiology_infection_article.aspx</a>.</p>		

**Tableau 2** : Résultats de l’investigation phénotypique et moléculaire de nos 73 souches de *P. aeruginosa*:

	Test de sensibilité aux antibiotiques (mg/L)													Investigation phénotypique et moléculaire				
	TIC	TCC	TZP	ATM	FEP	CAZ	IPM	MER	CAV	CTA	Test Synergie BLSE	Surexpression AmpC	E-test MBL	PCR BLSE	PCR Carbapénémases	PCR oprD		
5195	R	R	R	R	S	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+		
1556	R	R	R	R	R	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+		
0320	R	R	R	R	R	R	S	S	N	NR	-	+	NR	-	-	+		
8887	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+		
7976	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+		
8162	R	R	S	R	R	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+		
8726	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+		
0635	R	R	S	R	S	R	S	S	BR	NR	-	+	NR	-	-	+		
0987	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+		
1734	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+		
3383	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+		
8060	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+		
6954	R	R	R	R	R	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+		
2969	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+		
0996	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+		
1766	R	R	S	R	R	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+		
8833	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+		
3426	R	R	S	R	S	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+		
0323	R	R	R	R	S	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+		
8816	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+		

	TIC	TCC	TZP	ATM	FEP	CAZ	IPM	MER	CAV	CTA	Test Synergie BLSE	Surexpression AmpC	E-test MBL	PCR BLSE	PCR Carbapénèmes	PCR oprD
3426	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+
6559	R	R	R	S	S	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+
9921	R	R	S	R	S	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+
0588	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	-	+	NR	-	-	+
9208	R	R	R	R	R	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+
5096	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+
1478	R	R	R	R	S	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+
3271	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+
1017	R	R	R	R	R	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+
0893	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	-	+	NR	-	-	+
2330	R	R	R	R	S	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+
4367	R	R	R	R	R	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+
5588	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	-	+	NR	-	-	+
3818	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	-	+	NR	-	-	+
3285	R	R	R	R	S	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+
7681	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	-	+	NR	-	-	+
5586	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+
5585	R	R	R	R	S	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+
7782	R	R	R	R	R	S	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+
6559	R	R	R	R	S	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+
0074	R	R	R	R	S	R	S	S	NR	NR	-	+	NR	-	-	+

	TIC	TCC	TZP	ATM	FEP	CAZ	IPM	MER	CAV	CTA	Test Synergie BLSE	Surexpression AmpC	E-test MBL	PCR BLSE	PCR Carbapénémases	PCR OprD
0842	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	-	+	NR	-	-	+
1312	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	NR	+	NI	-	+ IMP-15	+
3717	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	-	NI	-	+ IMP-15	+
8061	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	NR	+	NI	-	-	+
7583	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	NR	+	NI	-	-	+
6400	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	NR	+	NI	-	-	+
4614	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	NR	+	NI	-	-	+
5865	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	NR	+	NI	-	-	+
7645	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	NR	+	NI	-	-	+
6104	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	NR	+	NI	-	-	+
7644	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	+	NI	-	-	+
6119	R	R	R	R	R	R	R	S	NR	NR	NR	+	-	-	-	+
5363	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	NR	+	-	-	-	+
6459	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	+	NI	-	-	+
8109	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	NR	-	NI	-	-	+
1310	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NR	-	NI	-	-	+
7879	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	NR	-	NI	-	-	+
8392	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	NR	-	NI	-	-	+
7386*	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	NR	∅	-	-	-	+
7034*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	NR	∅	NI	-	-	+
4969*	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	NR	∅	-	-	-	+



**Tableau 3 :** Amorces, primers et probes des PCR utilisées dans l’investigation moléculaire de notre étude.

PCR temps réel	CTX- a	CTX-MgrA F	CGGGCRATGGCGCARAC
		CTX-MgrA R	TGCRCCGGTSGTATTGCC
		CTX-MgrA P	CCARCGGGCGAGYTGGTGAC
	CTX- b	CTX-MgrB F	ACCGAGCCSACGCTCAA
		CTX-MgrB R	CCGCTGCCGGTTTTATC
		CTX-MgrB P	CCC GCGYGATACCACCAGC
	SHV	SHV F	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA
		SHV R	TCCTGCTGGCGATAGTGGAT
		SHV P	TGCCGGTGACGAACAGCTGGAG
	TEM	ALLTEM F	TTCTGCTATGTGGTGCGGTA
		ALLTEM R	GTCCTCCGATCGTTGTCAGA
		ALLTEM P	AACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGA
	NDM- 1	NDM-1 F	GCGCAACACAGAGCCTGACTTT
		NDM-1 R	CAGCCACCAAAGCGATGTC
		NDM-1 P	6-FAM-CAACCGCGCCCAACTTTGGC-TAMRA
	KPC	KPC F	GATACCACGTTCCGTCTGGA
		KPC R	GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC
		KPC_P	6-FAM-CGCGCGCCGTGACGGAAAGC-TAMRA
	OXA- 48	OXA48_F	TCTTAAACGGGCGAACCAAG
		OXA48_R	GCGTCTGTCCATCCCCTTA
		OXA48_RProbe	6-FAM-AGCTTGATCGCCCTCGATTTGG-TAMRA
	OXA- 58	oxa-58 F	CGCAGAGGGGAGAATCGTCT
		oxa-58 R	TTGCCATCTGCCTTTTCAA
		oxa-58 P	6-FAM-GGGGAATGGCTGTAGACCCGC-TAMRA
OXA- 23	oxa-23 F	TGCTCTAAGCCGCGCAAATA	
	oxa-23 R	TGACCTTTTCTCGCCCTTCC	
	oxa-23 P	6-FAM-GCCCTGATCGGATTGGAGAACCA-TAMRA	
OXA- 24	oxa-24 F	CAAATGAGATTTTCAAATGGGATGG	
	oxa-24 R	TCCGTCTTGCAAGCTCTTGAT	
	oxa-24 P	6-FAM-GGTGAGGCAATGGCATTGTCAGCA-TAMRA	
VIM	VIM F	CACAGYGGCMCTTCTCGCGGAGA	
	VIM R	GCGTACGTYGCCACYCCAGCC	

	VIM P	6FAMAGTCTCCACGCACTTTCATGACGACCGCGTCGGCG-TAMRA	
Mcr1	mcr-1 F	GCAGCATACTTCTGTGTGGTAC	
	mcr-1 R	ACAAAGCCGAGATTGTCCGCG	
	mcr-1 P	6-FAM –GACCGCGACCGCCAATCTTACC-TAMRA	
Mcr2	mcr-2 F	CTGTGCCGTGTATGTTTCAGC	
	mcr-2 R	TTATCCATCACGCCTTTTGAG	
	mcr-2 P	VIC-TGACCGCTTGGGTGTGGGTA-TAMRA	
Mcr3	mcr-3 F	TGAATCACTGGGAGCATTAGGC	
	mcr-3 R	TGCTGCAAACACGCCATATCAC	
	mcr-3 P	TGCACCGGATGATCAGACCCGT	
Mcr4	mcr-4 F	GCCAACCAATGCTCATAACCCAAA	
	mcr-4 R	CCGCCCCATTTCGTGAAAACATAC	
	mcr-4 P	GCCACGGCGGTGTCTCTACCC	
Mcr5	mcr-5 F	TATCCCGCAAGCTACCGACGC	
	mcr-5 R	ACGGGCAAGCACATGATCGGT	
	mcr-5 P	TGCGACACCACCGATCTGGCCA	
Mcr8	mcr-8 F	TCCGGGATGCGTGACGTTGC	
	mcr-8 R	TGCTGCGCGAATGAAGACGA	
	mcr-8 P	5 FAM – TCATGGAGAATCGCTGGGGGAAAGC	
PCR Standard	IMP	IMP U	CATGGTTTGGTGGTTCTTGT
		IMP L	ATAATTTGGCGGACTTTGGC
	PER	PER-F	GTAGTATCAGCCCAATCCCC
		PER-R	CCAATAAAGGCCGTCCATCA
	GES	GES-F	GAAAAAGCAGCTCAGATCG
GES-R		CAACAACCCAATCTTTAGGA	

## SERMENT DE GALIEN

*Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

*Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.*



## Résumé

**Introduction :** *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable d'infections sévères chez les patients immunodéprimés, atteints de mucoviscidose et de pathologies chroniques. Les infections à des isolats multi-résistants sont associées à une augmentation de la mortalité, de la durée d'hospitalisation et à un surcoût sur le système de soins. L'identification des mécanismes de résistance diffusibles est essentielle pour garantir une prise en charge médicale efficace et prévenir la dissémination de ces résistances. L'objectif de cette thèse était de réaliser un état des lieux de la résistance aux  $\beta$ -lactamines au sein de notre hôpital et d'identifier les mécanismes responsables de la résistance à ces antibiotiques clés.

**Matériels et méthodes :** Nous avons réalisé une étude épidémiologique rétrospective de janvier 2017 à février 2021 de la résistance aux  $\beta$ -lactamines sur des souches de *P. aeruginosa* isolées de patients hospitalisés à l'Assistance publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM). En parallèle, une investigation moléculaire et phénotypique a été réalisée sur une collection de 73 souches pour l'exploration des mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines dont la surexpression d'AmpC, l'altération de la pompe OprD, les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) et les carbapénémases.

**Résultats :** L'analyse épidémiologique retrouvait une proportion de souches sauvages en augmentation dès 2018 (45,7% vs 37,7%) et est restée stable depuis. La résistance à la ceftazidime et l'imipénème était élevée dans les populations à risques avec respectivement : en réanimation (22,4% vs 30,6%), en pneumologie (21,5% vs 31,9%), chez les patients atteints de mucoviscidose (18,7% vs 31,4%) et en chirurgie (11,3% vs 23,2%) en comparaison aux services conventionnels (9,1% vs 17,2%). La caractérisation des résistances aux  $\beta$ -lactamines retrouvait une surexpression de la céphalosporinase AmpC dans 90% des cas. Aucune souche ne produisait de BLSE, mais deux souches étaient productrices de carbapénémases (IMP-15), ce qui démontre que certaines carbapénémases circulent dans notre hôpital.

**Conclusion :** Au sein de nos hôpitaux, la résistance aux  $\beta$ -lactamines est majoritairement expliquée par des mécanismes de résistances d'origine chromosomique, ce qui limite la dissémination de cette résistance et explique les données de prévalence qui restent stables ou diminuent. Cependant, la mise en évidence de carbapénémases de type IMP sur des souches provenant de services différents et à des périodes différentes suppose la diffusion de ce mécanisme au sein de l'hôpital et impose une surveillance accrue. Nous proposons qu'une recherche plus systématique des carbapénémases les plus fréquentes (IMP et VIM) soit mise en place afin de mettre en place des mesures de dépistages efficaces rapidement pour lutter contre la diffusion de ces résistances.