



HAL
open science

Étude d'une épidémie d'entérobactérales productrices de carbapénèmases dans un service de chirurgie vasculaire français

Mathilde Loustalé

► **To cite this version:**

Mathilde Loustalé. Étude d'une épidémie d'entérobactérales productrices de carbapénèmases dans un service de chirurgie vasculaire français. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. dumas-04193707

HAL Id: dumas-04193707

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04193707>

Submitted on 1 Sep 2023

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

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

U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2022

Thèse n°79

THESE POUR L'OBTENTION du
DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par LOUSTALÉ Mathilde
Née le 19 octobre 1997 à Oloron-Sainte-Marie
Le 08 juillet 2022

**ÉTUDE D'UNE ÉPIDÉMIE D'ENTÉROBACTÉRALES
PRODUCTRICES DE CARBAPÉNÈMASES DANS UN
SERVICE DE CHIRURGIE VASCULAIRE FRANÇAIS.**

Sous la direction du Pr Véronique DUBOIS

Membres du jury :

Pr ARPIN Corinne, PU

Pr DUBOIS Véronique, PU-PH

Pr ROGUES Anne-Marie, PU-PH

Président

Rapporteur

Examineur

Remerciements

Je vous remercie, professeur Véronique Dubois de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir accompagnée dans l'avancement de ce projet qui m'a beaucoup plu et grâce auquel je peux soutenir ma thèse d'exercice en pharmacie. Merci pour votre bienveillance, patience et pédagogie.

Je vous remercie, professeur Corinne Arpin et professeur Anne-Marie Rogues. Je suis reconnaissante de votre présence au jury de ma thèse d'exercice. Je suis heureuse de pouvoir compter dans mon jury des enseignants des deux filières médecine et pharmacie.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de bactériologie pour son partage d'expérience et ses explications qui m'ont été très utiles tout au long de mes manipulations.

J'ai une pensée particulière pour vous : maman, papa et Thomas. Notre amour indéfectible me porte dans l'accomplissement de ma vie personnelle et professionnelle. Merci pour l'espace et la liberté que vous m'avez toujours donné.

Maryse, merci pour ton soutien sans faille : ton énergie matinale et ton réconfort quotidien ont été de précieux atouts pendant cette année chronométrée.

Mes chers amis, pas un jour ne passe sans m'inspirer de vous. Merci pour la ressource inépuisable que vous me donnez, en courant, en cuisinant, en dansant, en travaillant, en voyageant, en riant... Alexandra, Andrea, Anouk, Camille, Clémence, Douriya, Insiyah, Julie H. et Julie K., Léa, Lucie B. et Lucie S., Marie, Marion, Pierre, Sara, Sarah. Merci infiniment.

Étude d'une épidémie d'entérobactéries à carbapénèmases dans un service de chirurgie vasculaire français

Résumé

Aujourd'hui, la lutte contre l'antibiorésistance s'impose comme nouvel enjeu de santé publique. L'étude de la transmission des gènes de résistance aux antibiotiques est indispensable afin d'établir les liens épidémiologiques entre les souches bactériennes ayant acquis ces résistances aux antibiotiques et pouvant être à la source d'une dissémination de résistance aux antibiotiques. Dans un contexte d'émergence de bactéries hautement résistantes, nous nous intéressons dans cette étude aux modes d'acquisition horizontaux de deux carbapénèmases NDM-5 et OXA-48 identifiées chez quatre espèces d'entérobactéries : *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* dans un service de chirurgie vasculaire bordelais. Depuis 2017, 16 échantillons cliniques ont été analysés par le laboratoire de bactériologie du CHU de Bordeaux. En 2020, 7 échantillons environnementaux ont été collectés par l'équipe d'Hygiène hospitalière depuis les locaux du même service. Les équipes de bactériologie et d'hygiène hospitalière ont voulu étudier d'abord l'environnement génétique de *bla*_{NDM-5} et *bla*_{OXA-48} préalablement identifiés par technique de séquençage. Dans un deuxième temps, les plasmides ont été reconnus comme les supports génétiques privilégiés de transmission des deux gènes de résistances aux antibiotiques. Chaque carbapénémase étudiée a été identifiée chez des *C. freundii* provenant d'un échantillon clinique et d'un échantillon environnemental suggérant qu'une maîtrise de l'environnement de soin puisse permettre une diminution de la propagation des gènes responsables de l'antibiorésistance.

Mots clés : Antibiorésistance, carbapénèmases, entérobactéries, épidémie, plasmides.

Study of a carbapenemases producer enterobacteria epidemic in a French vascular surgical department

Abstract

Today, the struggle against antibiotic resistance comes to be a priority health concern. The ways of transmission of genes of antibiotic resistance must be understood. In this study we are interested in NDM-5 and OXA-48 and in their ways of horizontally transmission between bacterial strains. These two carbapenemases have been identified in four species of enterobacteria: *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* in a French vascular surgery department. Since 2017, 16 clinical samples have been analyzed by the bacteriology laboratory of the Bordeaux's University Hospital. In 2020, 7 environmental samples have been collected by the hygiene department from toilet water and swabs in the same department. *bla*_{NDM-5} and *bla*_{OXA-48} have been identified by sequencing. Then microbiology and hygiene teams studied their genetical environment and plasmids have been recognized as the main genetical support of transmission of these two carbapenemases. Each carbapenemase studied was identified chronologically in one *C. freundii* clinical and environmental strain suggesting that controlling this environment could decrease the diffusion of these antibiotic resistance genes.

Keywords: Antibioresistance, carbapenemases, enterobacteria, epidemic, plasmids.

Table des matières

I. β - lactamines	10
A. Mécanisme d'action général	10
B. Pharmacocinétique générale	11
C. Chimie thérapeutique générale.....	11
D. Les pénicillines	12
a) Les pénicillines V et G	12
b) Les pénicillines du groupe A	13
c) Les pénicillines du groupe M	14
E. Les uréidopénicillines et les carboxypénicillines	15
F. Les céphalosporines	16
G. Les carbapénèmes	18
H. Le monobactam	19
II. Résistance	19
A. Résistances naturelles.....	20
B. Résistances génétiques acquises	20
a) Résistance acquise par mutation ponctuelle.....	21
b) Résistances acquises par transfert de matériel génétique.....	21
C. Résistances biochimiques acquises	25
a) Résistances acquises par modification de cible de l'antibiotique	25
b) Résistance par imperméabilité de la bactérie à l'antibiotique	25
c) Système d'efflux (18).....	27
d) Résistance acquise par détoxification enzymatique	27
III. Les β lactamases	28
A. Définition	28
B. Classification selon Ambler	28
IV. Epidémiologie	29
A. Carbapénèmases en France	29
B. Carbapénèmases de classe B	32
a) bla_{NDM-1}	32
b) Autres variants bla_{NDM}	33
C. Carbapénèmases de classe D : oxacillinases	33
D. Description biochimique et génétique des carbapénèmases NDM et OXA	34
a) Activité biochimique des carbapénèmases	34
b) Description de l'environnement génétique des gènes bla_{NDM}	34
c) Description de l'environnement génétique de bla_{OXA}	35
V. Conduite à tenir selon le contexte épidémiologique	38
A. Diagnostic biologique.....	38
B. Évaluation du risque épidémique	40
a) Évaluation du risque en fonction de la bactérie	40
b) Évaluation du risque en fonction de la β lactamase	41

c)	Évaluation du risque en fonction de l'état de santé du patient	42
d)	Évaluation du risque en fonction du parcours du soin du patient.....	43
C.	Quatre situations épidémiques à distinguer.....	43
D.	Dépistage des patients concernés.....	44
E.	Clinique associée.....	45
F.	Alternatives thérapeutiques(1).....	46
VI.	Étude d'une épidémie d'entérobactériales productrices de carbapénèmases dans un service de chirurgie français.....	47
A.	Contexte de l'étude.....	47
B.	Matériels et méthodes.....	48
a)	Antibiogrammes.....	48
b)	PCR.....	48
c)	Séquençage de l'ADN.....	49
d)	Conjugaisons.....	50
e)	Extraction de plasmide.....	50
f)	Transformation bactérienne.....	51
C.	Résultats et discussion.....	51
a)	Résultats préalables.....	51
b)	Étude de l'environnement génétique de <i>bla_{NDM-5}</i>	53
c)	Étude du mode de transmission de <i>bla_{NDM-5}</i>	55

Annexe 1 : Profil des PFGE des *Citrobacter freundii* producteurs d'OXA-48 ou NDM-5 provenant d'échantillons cliniques et environnementaux.

Table des figures

Figure 1 :	Représentation schématique des dernières étapes de synthèse du peptidoglycane(2)	11
Figure 2 :	Structure générale des β lactamines	12
Figure 3 :	Structure de la pénicilline V - Source PubChem.....	12
Figure 4 :	Structure de l'amoxicilline - Source PubChem.....	13
Figure 5 :	Structure de l'acide clavulanique – Source PubChem	14
Figure 6 :	Structure de la cloxacilline – Source : PubChem.....	15
Figure 7 :	Structure de la piperacilline - Source PubChem	15
Figure 8 :	Structure de la ticarcilline.....	16
Figure 9 :	Structure générale des céphalosporines	16
Figure 10 :	Structure générale des carbapénèmes.....	18
Figure 11 :	Structure de l'aztreonam - Source PubChem.....	19
Figure 12 :	Schéma de la structure génétique du plasmide pEC463_NDM5 – Li and al(7).....	22
Figure 13 :	Schéma de la structure d'un intégron - Source Ploy et al(12).....	24
Figure 14 :	Arbre phylogénétique des variants OXA d'après l'étude de Pitout et al.(29).....	36
Figure 15 :	Schéma des environnements génétiques de <i>bla_{OXA-48}</i> chez <i>Shewanella ximenensis</i> et sur un plasmide pOXA-48a porté par les souches possédant OXA-48 - Source : Pitout & al(29).....	37
Figure 16 :	Algorithme phénotypique de criblage des souches d'Enterobacterales productrices de carbapénèmases selon CA-SFM/EUCAST	39
Figure 17:	Schéma de la conjugaison de <i>bla_{OXA-48}</i> depuis l'isolat 6621 vers E.coli K12.....	50
Figure 18 :	Chronologie de la collecte des échantillons d'EPC	51
Figure 19 :	PFGE des <i>C. freundii bla_{NDM-5} +</i>	52
Figure 20 :	PFGE des <i>C. freundii bla_{OXA-48} +</i>	53
Figure 21 :	Environnement génétique du gène <i>bla_{NDM-5}</i> et placement des amorces	53
Figure 22 :	PCR de <i>bla_{NDM-5}</i> de 6611	54
Figure 23 :	PCR de souches cliniques et environnementales productrices de NDM-5.....	55
Figure 24 :	PCR pour les plasmides du groupe d'incompatibilité IncA/C	56

Figure 25 : PCR pour les plasmides du groupe d'incompatibilité IncFIIb et IncN.....	57
Figure 26 : Extraction de plasmides IncA/C des souches possédant bla _{NDM-5}	58
Figure 27 : PCR de l'environnement de bla _{OXA-48}	59
Figure 28 : Environnement génétique de bla _{OXA-48} (30).....	59
Figure 29 : PCR de l'environnement de bla _{OXA-48}	60
Figure 30 : Environnement génétique de bla _{OXA-48}	60
Figure 31 : PCR pour les plasmides du groupe d'incompatibilité IncL/M sur les souches possédant bla _{OXA-48}	61
Figure 32 : PCR de l'environnement de bla _{OXA-48} sur E.coli 6621 et sur les TC 6621	62
Figure 33 : Test rapide d'identification d'OXA-48 chez E.coli TOP10 transformées.	62
Figure 34 : Antibiogrammes des transformants E.coli TOP10 obtenus avec l'extrait plasmidique de l'isolat d' E.coli 6621	63
Figure 35 : Digramme des fréquences d'expression de carbapénèmase en fonction de l'espèce d'entérobactériale dans cette étude.	65
Tableau 1: Classification des β- lactamases selon Ambler.....	29
Tableau 2: Amorces utilisées pour les PCR des gènes bla _{OXA-48} et bla _{NDM-5}	49

Abréviations

A : Adénine
ADN : Acide désoxyribonucléique
Am : Amoxicilline
Amp : Ampicilline
AmC : Amoxicilline et Acide Clavulanique
AZIDE : Acide de sodium
BHRe : Bactérie hautement résistante
BLSE : β lactamase de spectre élargi
BRP : Bleomycine resistant protein
C : Cytosine
CASFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
CAZ : Ceftazidime
C3G : Céphalosporine de 3 ^{ème} génération
C4G : Céphalosporine de 4 ^{ème} génération
CIP : Ciprofloxacine
CMI : Concentration minimale inhibitrice
DI : Diamètre d'inhibition
EHEC : Escherichia coli entérohémorragique
EIEC : Escherichia coli entéro-invasif
EPEC : Escherichia coli entéro-pathogène
ETEC : Escherichia coli entéro-toxinogènes
EDTA : Acide ethylenediaminetetracétique
EPC : Entérobactériales productrices de carbapénémases
ERC : Entérobactériales résistantes aux carbapénèmes
ETP : Ertapénème
EUCAST : European Union Comitee Antiobiorésistance
G : Guanine
HCSP : Haut conseil de santé publique
IM intramusculaire
IMP : Imipénèmase
IRL : Inverted repeated left sequence
IRR : Inverted repeated right sequence
IV : intraveineuse
IS : Séquence d'insertion
Kb : kilobases
LCS : Liquide cérébro-spinal
LEU : Leucine

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation / Time Of Flight
MET : Méthionine
mg : milligrammes
MH : Muller Hinton
mL : millilitres
Nal^R : Résistant à l'acide nalidixique
ng : nano grammes
NCBI : National Center of Biotechnological Information
NDM : New Delhi Metallo-enzyme
OXA-48 : Oxacillinase 48
Pb : paires de bases
PCIH : Phénol Chloroforme Alcool Isoamylique, Hydroxyquinoléine
PCR : Réaction en chaîne à polymérase
PFGE : électrophorèse sur gel en champ pulsé
PO : Per os, voie orale
PSDP : Pneumocoque de sensibilité réduite aux pénicillines
Rif^R : Résistance à la rifampicine
Rpm : rotation par minutes
SARM : Staphylocoque résistant à la méticilline
SAMS : Staphylocoque sensible à la méticilline
SDS : Sodium dodecyl sulfate
STR^R : Résistance à la streptomycine
T : Thymine
TGE : Tris Glucose EDTA
VAL : Valine
VIM : Verona integrin encoded β lactamase

Introduction générale

Isolée depuis *Penicillium notatum* en 1928 par Alexander Fleming et finalement purifiée en 1940 par Ernst Chain et Howard Florey, la pénicilline a été le premier antibiotique produit industriellement, permettant le début de la prise en charge des maladies infectieuses à grande échelle. Depuis, les β -lactamines restent les antibiotiques les plus prescrits (1) : ils sont utilisés en curatif sur les bactéries qui leur sont sensibles, ainsi qu'après certaines interventions chirurgicales.

Le principal effet indésirable de la classe des β lactamines est l'hypersensibilité. Une fois le statut allergique du patient connu, la toxicité des β -lactamines est moindre qu'avec d'autres classes d'antibiotiques comme les fluoroquinolones ou aminosides. Il existe un important recul sur cette classe d'antibiotique ce qui explique que le choix du prescripteur se porte souvent sur une β -lactamine en première intention.

Depuis le début de l'utilisation de la première famille des β -lactamines : les pénicillines, la sélection des souches résistantes aux β -lactamines s'est faite d'abord silencieusement, avant que de multiples cas d'infections non rémissibles fassent étudier la sensibilité aux antibiotiques des bactéries infectantes. L'étude microbiologique du spectre de résistance aux antibiotiques des bactéries passe par la réalisation d'antibiogrammes. Si le développement de nouvelles thérapeutiques a permis de traiter avec succès les infections causées par les bactéries résistantes, les nouvelles familles de β -lactamines comme les céphalosporines, carbapénèmes ou les inhibiteurs de β -lactamases ne permettent plus de traiter les infections à bactéries hautement résistantes émergentes (BHRe) compte tenu de l'étendue de leur spectre de résistance. Les alternatives thérapeutiques antibiotiques actuelles s'amenuisent tandis que le spectre des résistances aux antibiotiques ne cesse de s'élargir. Les nouvelles recommandations d'utilisation des antibiotiques visent un contrôle de leur consommation et leur prescription, documentée. Afin d'éviter un contexte épidémique, une gestion des flux humains et matériaux biologiques plus rigoureuse pourrait être organisée dans les établissements de soins.

La biologie moléculaire décrit une transmission massive, performante et rapide des gènes de résistances aux antibiotiques entre les bactéries. Elles peuvent combiner des facteurs de résistances génétiques et biochimiques. Ces résistances peuvent être acquises par des souches bactériennes endogènes commensales : les patients deviennent alors porteurs silencieux de Bactéries Multi Résistantes (BMR) voire de BHRe. Le portage asymptomatique constitue une voie privilégiée de la transmission des gènes de résistances antibiotiques. Si la transmission des gènes de résistance se fait à des bactéries pathogènes, les infections deviennent compliquées à traiter selon les alternatives thérapeutiques disponibles et l'étendue de l'infection. Au-delà du traitement d'un syndrome infectieux provoqué par une BHRe, les équipes médicales doivent prévenir la contamination d'autres patients. Dans un contexte de pandémie virale, nous sommes mis devant le fait accompli et nous prenons conscience que la prévention que nous croyions jusqu'à présent une mesure presque non prioritaire dans une prise en charge pathologique, se révèle de première nécessité face à l'urgence du contrôle de la contagion.

La lutte contre l'antibiorésistance est un enjeu de santé publique et ce travail, je l'espère, permettra de le confirmer une nouvelle fois.

Dans une première partie, nous nous intéresserons à la classification des β -lactamines, à leur intérêt pharmacodynamique et pharmacocinétique. Nous redéfinirons les différentes résistances aux β -lactamines : naturelles ou acquises, biochimiques ou génétiques. D'un point de vue épidémiologique, nous nous attacherons à décrire les prévalences des résistances aux β -lactamines en France et dans le monde. Nous verrons quels sont leurs modes de transmission privilégiés. Nous terminerons par l'étude des recommandations de gestion d'une situation épidémique en établissement de soin.

Dans une seconde partie, nous proposerons une analyse microbiologique et génétique de la transmission des gènes de résistance aux antibiotiques lors de l'étude d'une épidémie d'entérobactériales productrices de carbapénèmases (EPC) dans un service de chirurgie vasculaire bordelais.

Après avoir rappelé le contexte de l'étude nous décrirons les matériels et les méthodes utilisés, nous rendrons compte des résultats que nous avons obtenu et enfin nous formulerons une conclusion sur la portée de cette étude.

I. β - lactamines

A. Mécanisme d'action général

Le mécanisme d'action des β -lactamines, décrit par Tiper et Strominger en 1965, consiste en l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane, constituant essentiel de la paroi bactérienne. Cette classe d'antibiotiques a pour cible les enzymes responsables de la synthèse du peptidoglycane.

Dans la littérature, ces enzymes de synthèse du peptidoglycane sont appelées les *protéines liant les pénicillines* (PLP). Les β -lactamines rentrent en compétition avec le substrat naturel des PLP : ces enzymes reconnaissent le cycle β lactame plus vite que leur substrat naturel : D-Ala-D-Ala du pont peptidique du peptidoglycane (figure 1). Cette compétition empêche la progression de sa synthèse, c'est l'effet bactériostatique de la β -lactamine. L'effet bactéricide des β -lactamines est plutôt indirect. Les autolysines (amidase, transpeptidase, transglycosylase) sont des enzymes responsables de la coupure des liaisons glycosidiques du peptidoglycane : entre N acétylglucosamine et l'acide muramique, entre l'acide muramique et le premier acide aminé du pentapeptide ou encore sur la liaison inter peptidique (figure 1)(2). Ces enzymes continuent de fonctionner tandis que le peptidoglycane ne peut plus être synthétisé sous l'action des β -lactamines. Le peptidoglycane est lysé, la bactérie perd alors son intégrité et meurt.

Compte tenu du mode d'action des β -lactamines, nous serions tentés de dire que la seule condition pour qu'une bactérie puisse être sensible aux β -lactamines soit qu'elle possède une paroi.

Dans la partie qui suit, nous aborderons la classification des β -lactamines et nous verrons quels sont les éléments de chimie thérapeutique qui expliquent le spectre d'activité de ces molécules antibiotiques. Nous verrons aussi quelles sont leurs spécificités pharmacocinétiques et enfin quelles sont les indications de chaque famille de β -lactamines.

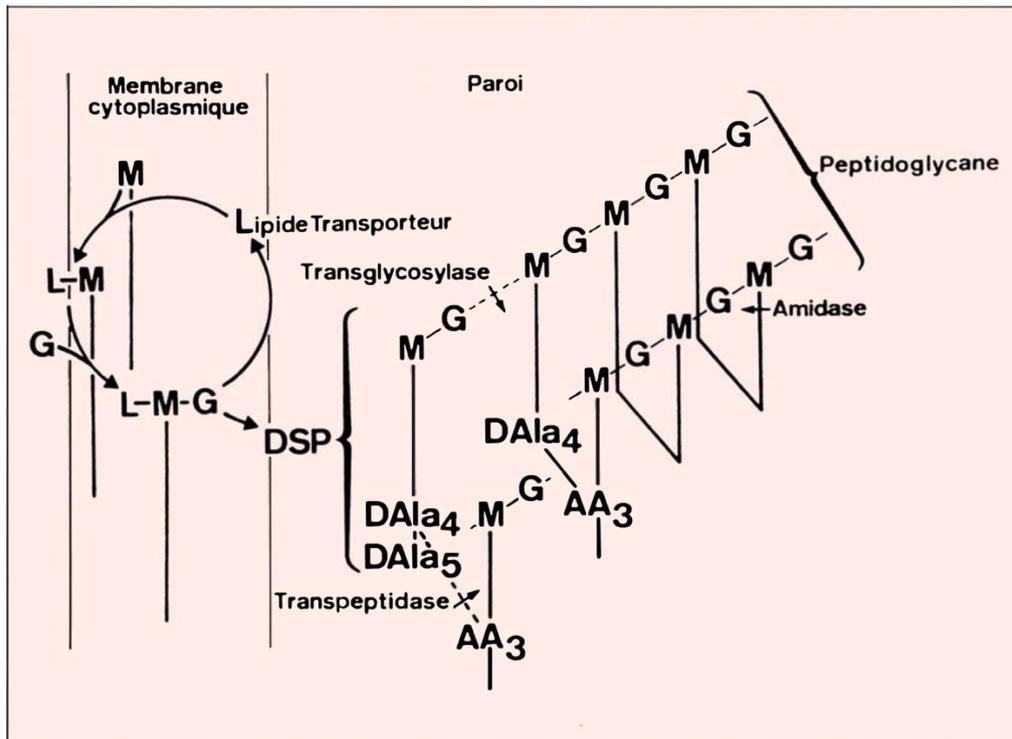


Figure 1 : Représentation schématique des dernières étapes de synthèse du peptidoglycane(2)

L : lipide transporteur **M** : acide muramique **G** : N acétyl glucosamine **DSP** : Disaccaride pentapeptide
D – Ala : D Alanine **AA₃** : 3^{ème} acide aminé du pentapeptide

B. Pharmacocinétique générale

Le temps de mise à disposition des β -lactamines pour leur cible dépend du type de bactérie sur laquelle elles agissent. Sur les bactéries Gram positif, la diffusion de l'antibiotique se réalise plus rapidement que chez les bactéries Gram négatif qui possèdent une membrane externe. Chez ces dernières, le transport de l'antibiotique doit être facilité par les porines, protéines membranaires formant des canaux dans cette membrane externe.

L'activité bactéricide des β -lactamines est temps-dépendante et comme leur demi-vie d'élimination est courte, il est nécessaire de réitérer les administrations 2 à 6 fois en 24 heures ou réaliser une perfusion continue suivant les propriétés physico-chimiques de la β -lactamine administrée. La posologie de l'antibiotique devra permettre d'atteindre une concentration plasmatique répondant aux objectifs thérapeutiques.

Les β -lactamines sont éliminées en grande majorité par voie urinaires. Les posologies doivent être adaptées à la clairance de la créatinine chez le patient insuffisant rénal.

C. Chimie thérapeutique générale

Les 3 groupes fonctionnels qui sont indispensables à l'activité bactéricide des β lactamines sont :

- Le cycle β -lactame, encadré en pointillés orange sur la figure 2.
- La fonction acide carboxylique, entourée en bleu sur la figure 2, permet d'obtenir des sels d'antibiotiques ayant une meilleure solubilité et biodisponibilité. À pH physiologique, la fonction

acide carboxylique est ionisée. En formulant des sels de potassium ou de sodium, la solubilité de la β -lactamine est améliorée.

- La fonction amine, entourée en vert sur la figure 2, sur laquelle peuvent être greffés des groupements supplémentaires d'atomes permettant une meilleure stabilité des molécules antibiotiques.

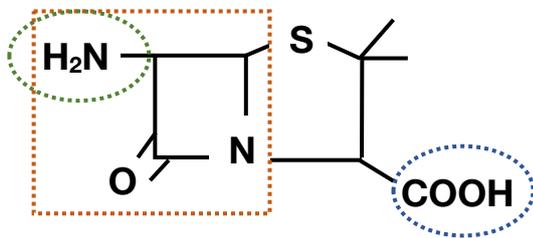


Figure 2 : Structure générale des β lactamines

D. Les pénicillines

a) Les pénicillines V et G

La pénicilline G est administrable en voie intraveineuse (IV) tandis que la pénicilline V, plus stable en milieu acide, peut être administrée par voie orale (PO). Un cycle phénoxy entouré en pointillés sur la figure 3 permet une délocalisation des électrons du cycle β -lactame donnant une meilleure stabilité en milieu acide à la pénicilline V. Ces deux pénicillines ont une demi-vie courte, ainsi une forme retard de la pénicilline G : la benzathine pénicilline G a été formulée en sel d'amine. Elle est administrable par voie intramusculaire (IM), réduisant drastiquement sa fréquence d'administration. Les pénicillines G et V se distribuent médiocrement dans l'œil, dans la prostate, dans le liquide cébro-spinal (LCS), et dans l'os.

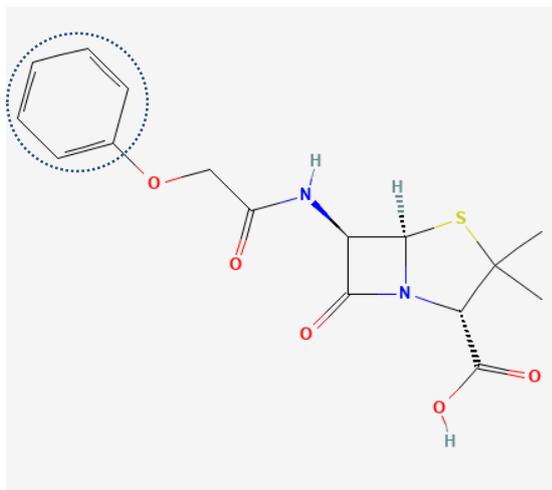


Figure 3 : Structure de la pénicilline V - Source PubChem

Le spectre d'activité des pénicillines V et G s'étend sur les streptocoques, *Treponema* spp., *Fusobacterium* spp. et *Corynebacterium diphtheriae*. Les résistances naturelles concernent les bacilles Gram négatif. Les résistances peuvent concerner le pneumocoque. Les staphylocoques produisent à 90% une pénicillinase rendant inactive la pénicilline G.

La pénicilline V per os est indiquée en prophylaxie des infections à pneumocoques chez les splénectomisés. La pénicilline G injectable est indiquée dans le traitement de la neurosyphilis et la benzathine pénicilline est indiquée dans le traitement de la syphilis primaire, secondaire ou latente excepté neurosyphilis et en antibioprophylaxie des dermoépidermites bactériennes non nécrosantes.

b) Les pénicillines du groupe A

Dans le groupe des pénicillines A, la fonction amine est le siège d'ajout de groupement encombrant inhibant l'attaque de certaines enzymes d'inactivation des pénicillines. La fonction amine de l'amoxicilline a été modifiée en fonction amide sur laquelle a été ajouté un cycle aromatique (figure 4).

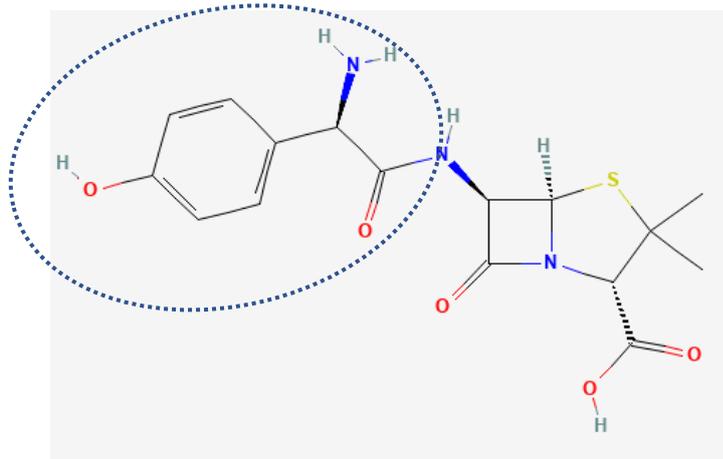


Figure 4 : Structure de l'amoxicilline - Source PubChem.

L'ajout d'une fonction hydroxyle et d'une fonction amine en para de ce cycle aromatique permet la prise de l'amoxicilline par voie orale où sa biodisponibilité atteint 80%. La diffusion dans le LCS est faible et si la voie IV doit être utilisée, il sera nécessaire d'injecter l'amoxicilline à des doses supérieures à celles utilisées en voie PO afin d'obtenir une biodisponibilité supérieure à 80%.

Le spectre d'activité des pénicillines A s'élargit par rapport à celui de la pénicilline G et V aux bactéries Gram négatif, aux entérobactérales du groupe 1, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Borrelia* spp.

Les résistances naturelles concernent le *Pseudomonas aeruginosa* et les entérobactérales du groupe 2 et 3. Les résistances à l'amoxicilline peuvent être acquises par les entérocoques, les staphylocoques, les pneumocoques, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catharralis*. L'amoxicilline est utilisée dans les angines streptococciques, sinusites maxillaires aiguës, otites moyennes aiguës, pneumonies à pneumocoque, exacerbations de bronchites obstructives chroniques, infections à *L. monocytogenes*, méningites à pneumocoque et méningocoque sensibles aux pénicillines, endocardites à streptocoques ou entérocoques sensibles aux pénicillines, prophylaxie de l'endocardite infectieuse. (CMIT, ECN.Pilly. 27ème ed., 2020)

Lorsqu'un inhibiteur de β -lactamase est associé à l'amoxicilline, le spectre d'activité s'élargit aux espèces qui produisent une pénicillinase : staphylocoques sensibles à la méticilline, *M. catharralis*, *Escherichia coli*, *H. influenzae* et entérobactérales (groupe 2). L'acide clavulanique, figure 5, joue le rôle de substrat suicide pour les enzymes de lyse des β -lactamines : l'inhibiteur de β -lactamase réalise une

liaison irréversible avec la β -lactamase qui ne peut plus exercer son activité de lyse sur l'antibiotique. L'acide clavulanique est reconnu par la β -lactamase par son analogie de structure avec les β -lactamines.

Les résistances naturelles à l'association d'une pénicilline et d'un inhibiteur de β -lactamase s'expriment chez les entérobactérales du groupe 3 et les *Pseudomonas spp.* Les résistances acquises peuvent concerner *H. influenzae*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), *N. gonorrhoeae*, et *N. meningitidis*.

L'association acide clavulanique et amoxicilline est utilisée en pratique dans les exacerbations de bronchopneumopathies obstructives sur arguments, infections stomatologiques, infections gynécologiques, pneumonies communautaires chez la personne âgée ou possédant des comorbidités, dermoépidermites bactériennes non nécrosantes sur plaie traumatique ou morsure. (CMIT, ECN.Pilly, 2020)

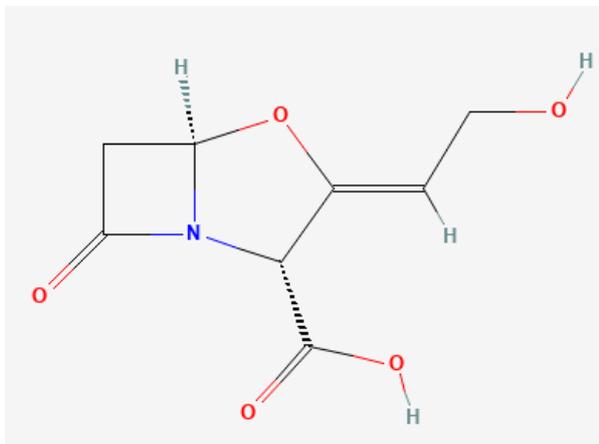


Figure 5 : Structure de l'acide clavulanique – Source PubChem

L'ampicilline, la deuxième pénicilline du groupe A est utilisée dans les mêmes indications que l'amoxicilline. L'ampicilline peut être administrée par voie orale, intramusculaire ou intra veineuse, la biodisponibilité étant meilleure en IV. Elle peut être associée avec le céfotaxime (C3G), la gentamicine (famille des aminosides) ou le métronidazole (famille des nitro 5 imidazolés).

L'ampicilline peut être associée à un inhibiteur de β -lactamase, le sulbactam (spécialité UNACIM injectable). Concernant le spectre d'activité de cette association, les espèces bactériennes qui y sont sensibles et résistantes sont les mêmes que pour l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique sauf pour l'espèce *Acinetobacter baumannii* sensible à l'association d'ampicilline - sulbactam mais résistant à l'association d'amoxicilline - acide clavulanique. L'utilisation de cette association est rare bien qu'elle puisse être utile lors d'un traitement d'infections digestives, gynécologiques, otorhino laryngée (ORL) ou encore urinaires.

c) Les pénicillines du groupe M

Dans le groupe des pénicillines M, le groupement isoxazoxyle ajouté sur la fonction amine en position 6 du cycle β -lactame de la cloxacilline et de l'oxacilline est un groupement encombrant, diminuant les possibilités d'attaques enzymatiques de l'antibiotique par les β -lactamases. Le groupe

isoxasoxyle est attracteur d'électrons (entouré sur la figure 6), expliquant la faible biodisponibilité PO des deux antibiotiques de ce groupe : 40% pour l'oxacilline et 70% pour la cloxacilline.

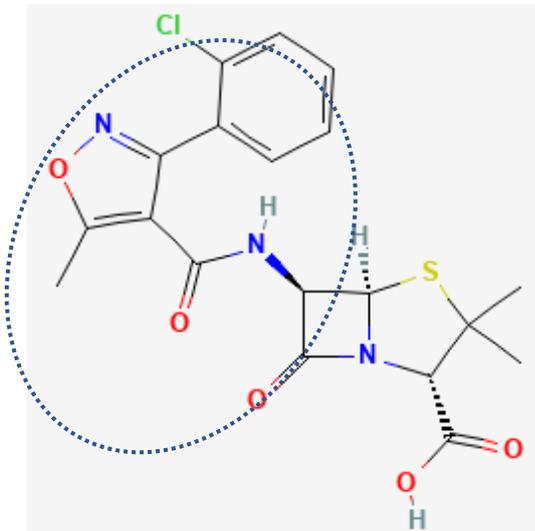


Figure 6 : Structure de la cloxacilline – Source : PubChem.

Ce sont des antibiotiques qui ont une action préférentielle sur les staphylocoques sensibles à la méticilline dont le *S. aureus* sensible à la méticilline (SAMS). Les pénicillines M injectables en IV sont utilisées dans les infections systémiques : bactériémies, ostéoarthrites, endocardites provoquées par le staphylocoque sensible aux pénicillines M. L'utilisation des pénicillines M par voie orale doit être évitée compte tenu de leurs faibles biodisponibilités.

E. Les uréidopénicillines et les carboxypénicillines

Les molécules du groupe des carboxypénicillines sont la ticarcilline et la témocilline. Dans le groupe des uréidopénicillines nous retrouvons la pipéracilline. Ces antibiotiques sont administrables uniquement en IV en raison de leur instabilité en milieu acide.

La fonction amine de l'ampicilline est remplacée par une fonction acyl urée dans la structure de la pipéracilline, figure 7.

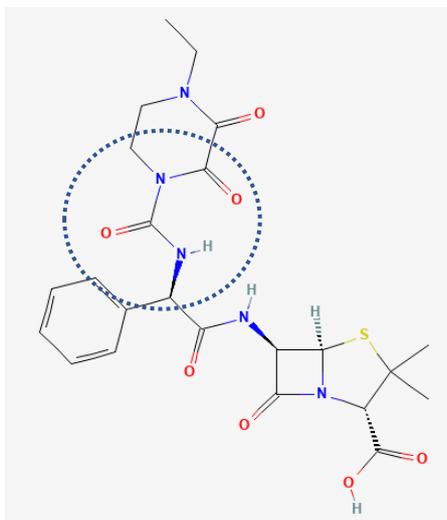


Figure 7 : Structure de la pipéracilline - Source PubChem

La fonction amine de l'ampicilline a été remplacée par un radical COOH et le noyau benzène a été remplacé par un noyau thiofène dans la structure de la ticarcilline, figure 8.

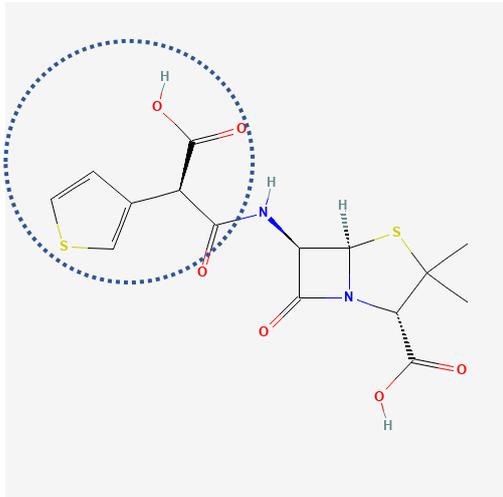


Figure 8 : Structure de la ticarcilline

Leur spectre d'activité comprend celui de l'amoxicilline :

Streptocoques, *Fusibacterium* spp., *Treponema* spp., *C. diphtherae*, *N. meningitidis*, *L. monocytogenes*, staphylocoques méticillino-sensibles, *Borrelia* spp., entérocoques sauf pour la ticarcilline et s'élargit aux entérobactérales Gram négatif notamment au *P. aeruginosa*.

Des résistances s'expriment chez les bactéries Gram négatif, chez le SARM et chez les bactéries productrices de β -lactamases de spectre élargi (BLSE).

L'utilisation concomitante à un inhibiteur de β -lactamase permet d'élargir le spectre aux bactéries Gram négatif productrices de pénicillinases.

Les indications de l'utilisation de tels antibiotiques sont les infections nosocomiales : pneumonies acquises sous ventilation, infections urinaires nosocomiales, infections post opératoires mais pas les méningites : les uréidopénicillines et les carboxypénicillines diffusent médiocrement dans le LCS.

F. Les céphalosporines

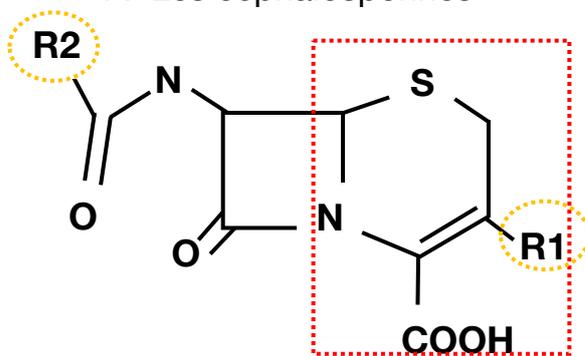


Figure 9 : Structure générale des céphalosporines

La famille des céphalosporines comprend de nombreuses molécules réparties en générations suivant leur spectre d'activité. Nous nous intéresserons d'abord à leur relation structure/activité avant de décrire leurs indications.

La structure générale des céphalosporines se compose du cycle β -lactamine accolé à un cycle hexa atomique insaturé, figure 9, encadré en rouge. Les groupes atomiques R1 et R2 sont évolutifs en fonction des générations des céphalosporines. Les modifications de chimie thérapeutiques portent sur les groupes R1 et R2 en jaune sur la figure 9. Le radical R1 permet souvent de modifier la pharmacocinétique de la molécule tandis que le groupe atomique R2 définit le spectre d'activité de la céphalosporine.

Si le groupe R1 est un groupe volumineux permettant la délocalisation des électrons, il permet alors d'intensifier la liaison entre l'antibiotique et sa cible par des liaisons de pi-stacking (interaction attractive non covalente entre deux noyaux aromatiques).

Le radical R2 est chez les céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération (C1G et C2G), peu encombrant et facilite le passage des antibiotiques par la voie orale. Il est plus volumineux chez les céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération (C3G et C4G) et permet de réaliser un encombrement stérique ce qui empêche la lyse des C3G et C4G par les β -lactamases. Concernant la céphalosporine ceftobiprole qui a une activité anti SARM, R2 consiste en un ester faisant de cette molécule une prodrogue.

Les céphalosporines administrables par voie orale sont stables en milieu acide cependant leur absorption est un phénomène saturable expliquant leur biodisponibilité médiocre pour les céphalosporines de 3^{ème} génération administrables PO.

Le cefazoline et le céfuroxime sont respectivement les C1G et C2G les plus utilisées. Les C1G et C2G ont une diffusion satisfaisante dans les tissus excepté le LCS. Leur spectre d'activité s'étend aux cocci Gram positif : aux streptocoques, au staphylocoques sensibles à la méticilline et aux entérobactériales du groupe 1. L'utilisation du cefazoline se fait majoritairement dans les cas d'infections aux staphylocoques méticillino-sensibles et principalement en IV. Le céfuroxime est aussi utilisé en voie injectable dans la prophylaxie des chirurgies ou pour les infections ORL en cas d'allergies aux pénicillines.

Le cefpodoxime et le céfixime sont les deux C3G administrables par voie orale. Comme dit plus haut elles ont une biodisponibilité inférieure à 50%. Elles sont actives sur les entérobactériales du groupe 1 et 2, certaines du groupe 3 et les cocci Gram positif.

Le céfixime est administrable PO en relais d'une antibiothérapie IV dans les pyélonéphrites aiguës.

Le cefpodoxime est utilisé dans les sinusites bactériennes aiguës de l'adulte, angines streptococciques de l'adulte, otites moyennes aiguës de l'enfant en 2^{ème} intention.

Ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime sont les C3G administrables en IV. Elles ont une bonne biodisponibilité dans les tissus excepté dans le LCS. Lorsqu'il est nécessaire de traiter une méningite, la dose administrée est plus forte, permettant de compenser leur faible biodisponibilité. Dans le LCS, la distribution des β -lactamines s'améliore lorsque l'état inflammatoire du patient est important. L'inflammation permet un passage favorisé des β -lactamines à travers la barrière hémato-méningée. Seules les C3G injectables peuvent avoir des concentrations efficaces dans le LCS, ce sont les seules

β -lactamines intéressantes dans le traitement des méningites infectieuses.(3) Les C3G en IV sont réservées aux infections localisées ou systémiques graves à bactéries Gram négatif, les méningites purulentes en traitement probabiliste, les infections extra pulmonaires aux pneumocoques dont la sensibilité à la pénicilline G est diminuée, pyélonéphrites et infections urinaires masculines, fièvre chez les neutropéniques, suspicion clinique de purpura fulminans, maladie de Lyme au stade secondaire et tertiaire, fièvre typhoïde.

Les espèces bactériennes résistantes aux céphalosporines sont *L. monocytogenes*, entérocoques, le SARM et bactéries intracellulaires. *P. aeruginosa* est sensible uniquement au ceftazidime et céfépime. Céfépime et ceftiprome sont considérés comme des céphalosporines de 4^{ème} génération (C4G). Les antibiotiques de ce groupe sont utilisés en voie intraveineuse pour traiter des infections systémiques bactériennes, la fièvre chez le neutropénique, les infections urinaires compliquées. Leur spectre d'activité s'étend aux bactéries à Gram positif : Les streptocoques, SAMS, ainsi qu'aux bactéries Gram négatif *A. baumannii*, *C. freundii*, *Citrobacter koseri*, *E. coli*, *H. influenzae*, *Klebsiella spp.*, *Morganella morganii*, *Neisseria spp.*, *P. mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*. Les entérobactérales qui produisent des BLSE sont résistantes aux C4G tout comme le SARM ou *P. aeruginosa*.

G. Les carbapénèmes

L'intérêt thérapeutique des carbapénèmes provient des modifications de la structure chimique native du noyau pénème des pénicillines : l'ajout d'une insaturation sur le cycle pénème pour donner le noyau pénème, figure 10. Cette modification permet d'augmenter l'affinité du carbapénème pour sa cible : la PLP.

Les trois molécules disponibles à l'hôpital sont l'ertapénème, l'imipénème, le méropénème.

Elles sont administrables uniquement par voie injectable. Elles ont un spectre d'activité extrêmement large : entérobactérales, *P. aeruginosa* sauf pour l'ertapénème, les entérocoques sauf pour l'ertapénème, les staphylocoques méticillino-sensibles et les bactéries anaérobies. Les résistances naturelles concernent les bactéries intracellulaires pour tous les carbapénèmes. Les résistances acquises concernent toutes les bactéries qui sécrètent des carbapénémases. L'étude des modes d'acquisition de ces carbapénémases par les bactéries fera l'objet d'une partie suivante.

L'utilisation des carbapénèmes est restreinte au traitement des infections liées aux soins à bactéries multirésistantes.

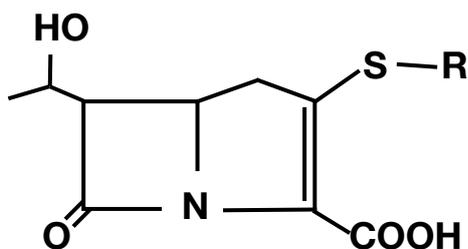


Figure 10 : Structure générale des carbapénèmes

H. Le monobactam

L'aztreonam est le seul représentant de la famille du monobactam dont la structure est représentée en figure 11. Il est actif par son simple cycle β -lactame. L'optimisation de sa chimie thérapeutique a permis de lui additionner une fonction oxime et un cycle aminothiazole lui donnant plus d'affinité pour sa cible. Lors de l'ajout d'un groupe méthyle sur le cycle β -lactame, la résistance aux β -lactamases est acquise.

L'aztreonam est très actif sur les entérobactériales. Il est utilisé principalement chez les patients souffrant d'infections associées aux soins pouvant être pris en charge en ambulatoire en relais d'un traitement déjà instauré à l'hôpital. C'est le principal antibiotique proposé chez les patients atteints de mucoviscidose souffrant d'infection à germes multi résistants. Il est utilisé pour les infections urinaires masculines. Enfin il peut être utilisé dans toutes les infections à bactéries Gram négatif multirésistants qui lui sont sensibles : infections gynéco-obstétricales, infections broncho pulmonaires, septicémies, infections de la peau et intra abdominales. Il existe une recherche active de nouvelles molécules dans la famille du monobactam du fait de sa persistance d'activité sur certaines BHRé.(4)

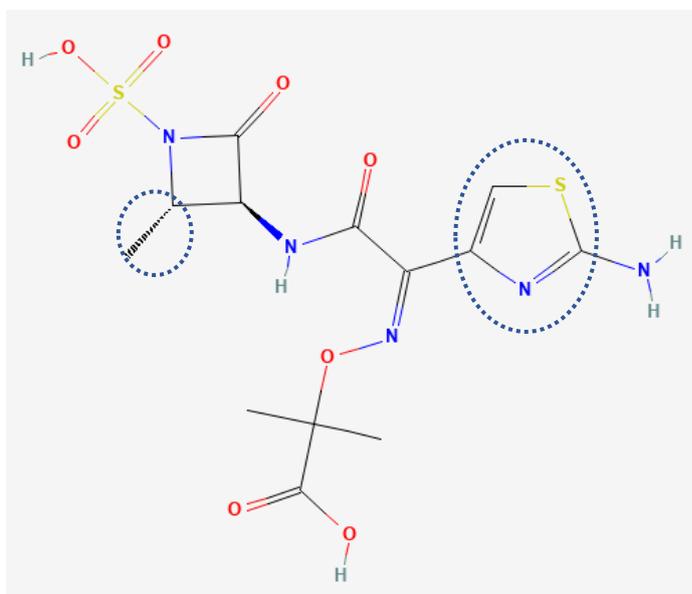


Figure 11 : Structure de l'aztreonam - Source PubChem

II. Résistance

Dans la partie précédente, nous avons vu que la classe d'antibiotiques des β -lactamines regroupe les pénicillines, les céphalosporines, le monobactam et les carbapénèmes. Leur utilité d'abord révolutionnaire, puis leur utilisation abusive a conduit à l'émergence de résistances bactériennes. Nous savons qu'il existe des résistances naturelles aux β -lactamines lorsque par exemple, les bactéries ne possèdent pas de paroi bactérienne ou qu'il existe des variations naturelles concernant la densité de protéines de transport des antibiotiques exprimées à la membrane externe bactérienne, ou la présence de systèmes d'efflux jouant un rôle important dans l'inactivité thérapeutique d'un antibiotique. L'intérêt thérapeutique se porte alors sur un antibiotique d'une autre classe.

Les résistances acquises sont diverses. Une résistance aux β -lactamines peut s'observer notamment lorsqu'une bactérie acquiert un gène qui code pour une β -lactamase, enzyme de lyse de cette famille d'antibiotique. Les substrats de ces enzymes peuvent différer au sein de la famille des β -lactamines, ainsi les spectres de résistance aux antibiotiques de la bactérie sont multiples selon la β -lactamase acquise(5).

Si les β -lactamines constituent le traitement de première intention de bien des infections, au cours du temps, l'utilisation massive de ces antibiotiques a conduit à une sélection de souches bactériennes multirésistantes et parfois totorésistantes, par exemple les bactéries possédant une β -lactamase de type carbapénèmase.

Bien que l'adaptation génétique des êtres vivants soient un phénomène naturel, aujourd'hui la pression de sélection exercée par l'utilisation massive et parfois non appropriée des antibiotiques, accélère la vitesse de sélection des souches bactériennes résistantes.

Dans cette partie, après avoir fait un bref rappel sur les résistances naturelles aux β -lactamines, nous nous intéresserons aux résistances acquises génétiquement et aux modifications biochimiques qui sont responsables de l'expression des résistances.

A. Résistances naturelles

Une résistance naturelle à un antibiotique s'exprime chez toutes les souches d'une même espèce bactérienne lorsque leur multiplication est possible dans un milieu enrichi en cet antibiotique. Ces bactéries sont insensibles au mécanisme d'action de l'antibiotique auquel leur croissance résiste. Les résistances naturelles aux β -lactamines s'expriment chez les bactéries intracellulaires strictes comme *Chlamydia*, chez les bactéries intracellulaires facultatives comme *Legionella* qui peuvent sécréter des β -lactamases ou chez les bactéries qui n'ont pas de paroi, les Mycoplasmes.

Les résistances naturelles biochimiques peuvent provenir d'une variation du nombre de porines exprimées sur la membrane externe des bactéries Gram négatif. Les porines sont les protéines membranaires responsables du transport des molécules hydrophiles et volumineuses dont font partie les antibiotiques de la classe des β -lactamines. Si leur nombre diminue, l'antibiotique n'atteint plus sa cible en concentrations thérapeutique suffisante.

Des systèmes de pompes à efflux sont responsables de l'expulsion non sélective des antibiotiques de la cellule, ils sont refoulés à l'extérieur de la bactérie, ils n'ont plus aucun intérêt thérapeutique.

Pour terminer, il existe des résistances naturelles aux pénicillines ou aux céphalosporines de spectre étroit lorsque les bactéries possèdent un gène chromosomique codant pour une β -lactamases.

B. Résistances génétiques acquises

Une résistance acquise se traduit par l'insensibilité à un antibiotique de certaines souches appartenant à la même espèce bactérienne, normalement sensible à cet antibiotique.

Les éléments transposables génétiques et intégrons sont les supports de matériel génétique qui permettent les transferts génétiques horizontaux, mode préférentiel d'acquisition des gènes de résistance chez les bactéries. Nous expliquerons comment ces transferts génétiques ont lieu.

Une mutation génétique sur le chromosome bactérien peut aussi être à la source de l'expression de résistance aux antibiotiques.

a) Résistance acquise par mutation ponctuelle

Lorsqu'il existe une erreur génétique ponctuelle non réparée sur le chromosome bactérien, l'expression de la mutation peut se traduire par une résistance à une famille ou une classe d'antibiotique. Par la suite, si les souches bactériennes sont soumises, dans leur environnement, à l'antibiotique pour lequel elles ont acquis une résistance, alors elles sont sélectionnées contrairement aux souches bactériennes qui sont restées sensibles à l'antibiotique. L'acquisition de cette mutation génétique devient un facteur de sélection naturelle des bactéries.

b) Résistances acquises par transfert de matériel génétique

1. Les plasmides

Un plasmide est une molécule d'ADN bi caténaire circulaire au pouvoir réplcatif autonome. Le nombre de copies de plasmides par cellule est régulé par le système réplcatif du plasmide. En fonction du type de plasmide, existe un spectre d'hôte bactérien privilégié. Suivant leurs origines de réplcation, les plasmides sont classés en groupes d'incompatibilités.

Deux plasmides appartenant à un même groupe d'incompatibilité ne peuvent pas être contenus dans une même cellule hôte.

Les plasmides sont hébergés par les procaryotes en majorité, et les bactéries qui contiennent les plasmides sont retrouvées chez les êtres humains, chez les animaux et enfin chez les végétaux rendant compte de leur aisance de transmissibilité. Un article publié dans le Lancet en 2016 (6) décrit la co-expression des gènes de résistance NDM-9 aux carbapénèmes et MCR-1 à la colistine sur des plasmides de groupes d'incompatibilité différents chez un clone d'*E. coli* retrouvé dans la viande de marché de Guangzhou. L'expression des plasmides offrent aux organismes qui les possèdent un critère de sélection naturelle comme un facteur de virulence ou une résistance aux antibiotiques.

Les plasmides sont porteurs de gènes qui leur permettent d'assurer leurs fonctions de réplcation, recombinaison et réparation génétique ou encore qui leur donnent une stabilité génétique. Sur la figure 12, nous pouvons repérer en vert kaki, certains éléments génétiques mobiles : les séquences d'insertions (IS) dont IS-5 ou ISaba125 qui semble faciliter la transposition de *bla_{NDM-5}* sur les plasmides, nous en reparlerons dans la partie expérimentale de ce travail.

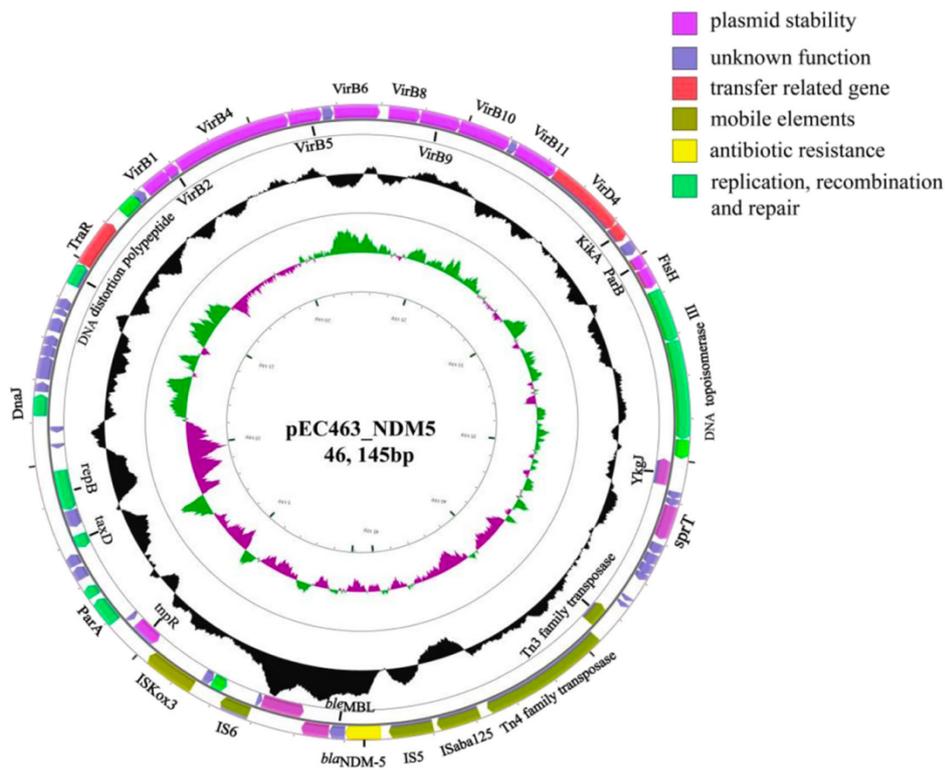


Figure 12 : Schéma de la structure génétique du plasmide pEC463_NDM5 – Li and al(7)

Lors d'un contexte d'épidémie de BHRé, les plasmides sont recherchés par techniques de biologie moléculaire : amplification et séquençage des origines de réplication des groupes d'incompatibilité de plasmides potentiellement en cause. Le séquençage du gène que le plasmide est susceptible d'avoir intégré doit aussi être fait. Pour conclure l'étude épidémiologique, il est nécessaire de tester le pouvoir transmissible du ou des plasmides en cause par des conjugaisons ou des transformations de bactéries compétentes.

La transmission horizontale des gènes de résistances se fait majoritairement par les plasmides. Si le gène de résistance se transmet via un seul groupe d'incompatibilité de plasmide nous pouvons parler d'épidémie de plasmides, ce qui est souvent le cas par exemple de *bla*_{OXA-48} qui se transmet majoritairement par les plasmides du groupe IncL/M.

Certains plasmides peuvent se transmettre à plusieurs espèces bactériennes, comme IncN ou IncA/C, alors que d'autres groupes d'incompatibilité ont un spectre d'hôte étroit.

Par ailleurs, il a déjà été observé chez un même patient, plusieurs plasmides de plusieurs groupes d'incompatibilité ayant intégré le même gène de résistance aux carbapénèmes.(8)

La transmission des gènes de résistances aux carbapénèmes dépendra de plusieurs facteurs comme le spectre d'hôte des plasmides, l'incompatibilité entre les plasmides présents chez une même bactérie.

2. Les séquences d'insertion

Les séquences d'insertion (IS) sont les plus petits éléments transposables, généralement de 700 à 2500 paires de bases (pb), capables de s'exciser d'un brin d'ADN et de se transposer plus loin sur la séquence d'ADN d'origine ou sur un autre brin d'ADN. Elles possèdent un cadre de lecture ouvert qui

code pour une transposase (*Tnp*). C'est l'enzyme qui permet la mobilité de l'IS et son intégration dans le brin d'ADN cible. La transposition d'un gène ne requiert pas d'homologie de séquence entre la séquence source et la séquence cible. La transposase, pour exercer son action, reconnaît la séquence d'insertion par une séquence inversée gauche en 5' (IRL) et une séquence inversée droite en 3' (IRR) de la séquence d'insertion. L'intégration d'une IS dans le gène cible aboutit souvent à l'inactivation de l'expression de cette séquence, et donc à une perte de fonction pour la cellule qui exprimait le gène. Il se peut aussi que cette IS code pour un promoteur d'expression du gène qui se trouve en aval de la séquence d'insertion. Enfin, la séquence d'insertion peut donner un caractère phénotypique supplémentaire à la cellule qui l'a acquise comme la résistance à un antibiotique.

3. Les transposons

Les transposons sont des éléments transposables plus complexes que les IS. Contrairement à ces dernières, ils peuvent contenir des gènes autres que ceux codant pour le matériel nécessaire à la transposition. Ils ont une taille souvent comprise entre 2500 et 7000 pb.

Il existe plusieurs types de transposition :

- Conservatrice : le transposon est coupé et collé dans une séquence génétique différente entre un site donneur et un site accepteur de transposition.
- Réplicative : l'élément transposable est copié et collé entre un site donneur et accepteur de transposition. La séquence transposée est une copie supplémentaire de la séquence transposable originale. Dans la transposition réplicative il est souvent nécessaire qu'une resolvase s'exprime afin de séparer les deux copies de l'élément transposable générées par la transposase.
- « One ended » : il s'agit d'une transposition réplicative se réalisant avec une seule séquence inversée précédant la séquence à transposer. Le site receveur de la transposition est reconnu par la transposase, l'élément transposable est répliqué complètement puis les deux copies de l'élément transposable sont séparés grâce à une resolvase. Le transposon Tn21 suit ce mode de transposition (9)
- En cercle roulant : elle a lieu lorsqu'il n'existe pas de séquences inversées répétées gauche et droite. La transposition se fait grâce à l'existence d'une séquence de lecture ouverte codant pour une transposase. La transposition se fait par reconnaissance de l'origine de réplication de l'élément transposable (*OriS*) jusqu'à la séquence de terminaison de réplication de l'élément transposable (*TerIS*)(10).

Les transposons composites sont des séquences nucléotidiques qui sont encadrées par deux copies identiques d'IS qui contiennent le matériel génétique nécessaire à sa transposition. La transposase exprimée reconnaît alors une séquence inversée répétée droite et gauche afin de transposer la séquence qui se trouve entre ces deux séquences répétées inversées.

Chez les transposons non composites, comme les transposons de la famille Tn3, reconnus comme le support de dissémination privilégié de *bla_{KPC}* au niveau mondial(11), il n'existe pas de séquences d'insertions identiques en 5' et 3' de la séquence à transposer. Leur transposition est possible par la

persistance de séquences inversées répétées droite et gauche. L'expression d'une transférase et d'une resolvase sera nécessaire à la transposition du gène.

Les transposons conjugatifs sont de plus grande taille que les transposons non conjugatifs. Ils nécessitent des séquences répétées inversées droite et gauche pour s'exciser et s'intégrer au génome de la cellule hôte. Le système emprunté est celui de la conjugaison, c'est-à-dire l'échange de matériel génétique entre deux bactéries vivantes en contact direct.

4. Les intégrons

Un intégron est une organisation génétique capable de capturer un gène cassette et de l'exprimer. Pour bien fonctionner, un intégron nécessite un gène codant une intégrase (IntI) et un site de recombinaison (attI) pour une intégration correcte du gène cassette. L'expression des gènes cassettes est rendu possible grâce à la présence d'un promoteur de transcription en 5'.

Les intégrons sont répartis en 6 classes selon la séquence qui code l'intégrase. Les 3 premières classes sont associées à des éléments mobiles génétiques comme les plasmides ou les transposons, qui permettent la mobilisation de l'intégron. D'autres classes d'intégrons sont associées à des séquences génétiques classiques, ce sont les intégrons chromosomiques.

La majorité des gènes cassettes qui codent pour des gènes de résistance aux antibiotiques sont issus des 3 premières classes d'intégrons. Les gènes de résistance aux antibiotiques comme *bla_{GES}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, sont connus pour être contenus dans des intégrons.

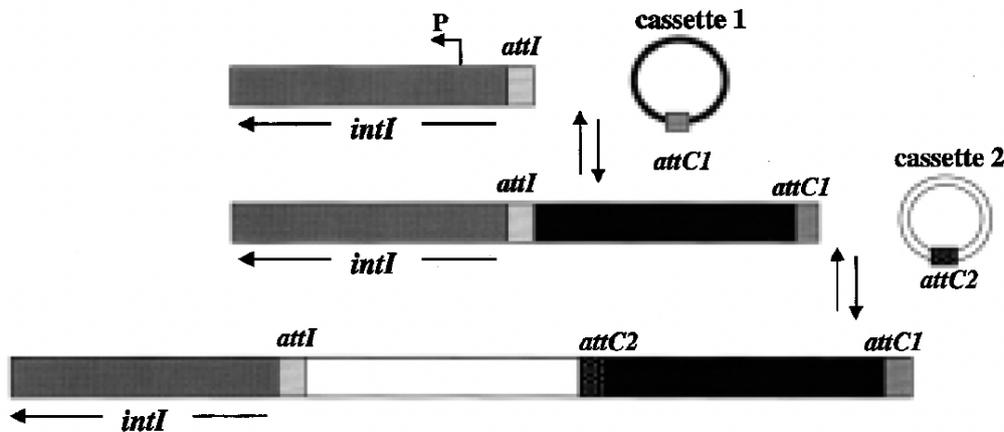


Figure 13 : Schéma de la structure d'un intégron - Source Ploy et al(12)

5. Transformation

Le principe de la transformation bactérienne est à l'origine de la transmission horizontale des gènes de résistance aux antibiotiques. Le matériel génétique d'une bactérie donatrice est intégré par une bactérie compétente. Le phénotype de la bactérie receveuse se trouve enrichi du caractère transmis par la bactérie donneuse.

C. Résistances biochimiques acquises

Ces résistances biochimiques sont acquises par différents mécanismes : premièrement par une modification de l'affinité de la β -lactamine pour leur cible : la PLP.

Deuxièmement, la résistance biochimique aux antibiotiques de la classe des β -lactamines s'observe chez les bactéries qui expriment une imperméabilité pour l'antibiotique. Cette imperméabilité résulte de la variation d'intensité d'expression des porines à la paroi bactérienne ou de l'expression d'un système d'efflux des xénobiotiques.

Finalement, la résistance biochimique aux antibiotiques par l'expression d'enzymes de résistance : les β -lactamases.

a) Résistances acquises par modification de cible de l'antibiotique

Dans cette partie nous aborderons uniquement les résistances acquises par modification de cible chez le pneumocoque bien que ce mode d'acquisition de résistance se rencontre chez le SARM. L'acquisition d'une résistance aux β -lactamines par le pneumocoque se réalise par échange de matériel génétique homologue avec d'autres pneumocoques ou bien par échange de matériel génétique hétérologue avec des streptocoques oraux. La résistance aux β -lactamines est exprimée lorsque le matériel génétique échangé avec les pneumocoques ou les streptocoques oraux consiste en un gène codant pour une PLP d'affinité modifiée pour les β -lactamines. Parmi les PLP d'affinité diminuée pour les β -lactamines, les PLP2x, PLP1a et PLP2b doivent être coexprimées pour qu'une résistance aux pénicillines soit observée(13). Si les PLP d'affinité diminuée PLP2x et 1a s'expriment, il existera une résistance aux céphalosporines(13). L'expression conjointe de plusieurs PLP désigne une mosaïque de PLP. Depuis les années 80, les chercheurs ont pu caractériser les différentes PLP mosaïque après avoir prouvé qu'elles avaient une affinité diminuée pour les β -lactamines en faisant des études de liaisons compétitives entre les pénicillines et leur cible(14).

L'acquisition de résistances aux β -lactamines par modification de cible peut aussi se faire par une accumulation de mutations ponctuelles dans un gène codant pour une PLP, dont l'effet produit sur sa séquence nucléotidique se traduira par une diminution de l'affinité des PLP pour les β -lactamines.

b) Résistance par imperméabilité de la bactérie à l'antibiotique

Certaines bactéries perdent leur perméabilité aux antibiotiques : la quantité de porines de surface diminue ce qui peut entraîner une perte de sensibilité de ces bactéries aux carbapénèmes et cela reste vrai lorsque d'autres mécanismes de résistance aux antibiotiques s'expriment. Certaines bactéries sont donc résistantes aux carbapénèmes sans pour autant sécréter de carbapénèmases.

Les porines sont des protéines de membrane permettant la diffusion non sélective de molécules hydrophiles dont le passage doit être facilité de part et d'autre de la paroi bactérienne : bicouche de phospholipides. Il existe différents types de porines dont les plus fréquentes sont OmpF et OmpC chez *E. coli* et OmpK35 et OmpK36 chez *K. pneumoniae*. OmpF est plus large qu'OmpC, et donc s'adapte mieux au passage de grosses molécules comme les antibiotiques. Suivant les conditions dans lesquelles se développent les bactéries, la force osmotique et la température élevée sont des facteurs

qui répriment l'expression d'OmpF et entretiennent l'expression d'OmpC, diminuant le transport efficace de l'antibiotique vers sa cible.

Dans la revue de L. Martínez- Martínez(15), lorsque les bactéries expriment la carbapénèmase KPC, il est observé que le nombre de copies du gène *bla_{KPC}* est augmenté et que l'expression des porines OmpK35 et OmpK36 est diminuée. Les bactéries qui perdent l'expression des porines sont significativement moins sensibles aux antibiotiques hydrophiles : lorsque l'expression d'OmpK35 et OmpK36 est perdue simultanément, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) chez *K. pneumoniae* sont augmentées pour le cefoxitine, le cefotaxime, l'imipénème, et le méropénème.

La résistance aux antibiotiques peut se déclarer lorsqu'il existe une multiplication du nombre de copies du gène codant la β -lactamase, ce qui augmente la force de son expression. La résistance aux carbapénèmes peut se déclarer lorsque l'expression d'une porine qui facilite normalement son transport, est diminuée. Chez certaines entérobactériales productrices de BLSE peut être observé une modification d'expression des porines OmpK35 et OmpK36. Soit une des deux porines ne s'exprime plus soit les deux porines perdent leur expression, aboutissant à la diminution de perméabilité aux antibiotiques précédemment décrit.

Dans certains cas particuliers, en plus de la perte de sensibilité aux carbapénèmes, il est observé une répression de l'expression de la porine responsable du transport de phosphate *phoE*. La sensibilité aux carbapénèmes est rétablie lorsqu'un promoteur d'expression du gène *phoE* est réintroduit par un plasmide LacZ exogène confirmant que l'expression du gène codant pour *phoE* est réprimée très probablement par l'insertion de la séquence codante d'un gène de résistance aux β -lactamines de spectre élargi, au sein du gène codant pour la protéines *phoE*.(16)

Il s'agit alors d'une mutation non-sens pour le gène codant la porine.

L'expression du gène codant pour la porine peut aussi subir une erreur ponctuelle dans sa séquence ce qui aboutira à une mutation faux sens ou encore à une modification phénotypique : un plus petit diamètre qui ne permet plus à la porine de faciliter le passage de la β -lactamine. Aussi, lorsque le nombre de porines exprimées à la surface des bactéries est modifié, tous les échanges de la bactérie avec son milieu qui dépendent des porines sont compromis, ce qui peut jouer en défaveur à la survie des bactéries. Ceci explique qu'il n'existe que peu de bactéries sélectionnées naturellement avec un nombre ou un diamètre de porines de surface diminué.

Il est intéressant de remarquer que les modes de répression de l'expression des porines ne sont pas les mêmes suivant l'espèce bactérienne, et qu'il est toujours nécessaire de réaliser un antibiogramme pour déterminer la susceptibilité de la bactérie à toutes les β -lactamines. Leur spectre de résistance est difficilement prévisible au vu des nombreux modes d'acquisition des résistances bactériennes.

Puisque nous sommes dans la partie qui traite des résistances aux antibiotiques acquises par diminution de perméabilité aux antibiotiques, nous pouvons dire qu'il existe d'autres protéines de membranes que les porines et qui sont responsables uniquement de l'efflux des xénobiotiques à l'extérieur de la bactérie.(17)

c) Système d'efflux (18)

Nous avons vu plus haut que la résistance aux β -lactamines peut être acquise par l'imperméabilité de la bactérie à ces antibiotiques. S'il existe une diminution de la pénétration des β -lactamines lorsque les porines de membrane sont moins nombreuses ou de structure modifiée, il existe également un système d'efflux actif pouvant être responsable de l'acquisition de multiples résistances aux médicaments aussi appelées *MDR*, *multidrug resistance* (19). Les gènes codant pour ces pompes MDR sont souvent retrouvés sur le chromosome.

Parmi les systèmes MDR, chez les bactéries Gram négatif et plus particulièrement chez les entérobactériales, les pompes de la famille RND pour *Resistance-Nodulation cell Division family* sont souvent décrites pour donner à ces bactéries des résistances naturelles ou acquises pour de multiples antibiotiques. La résistance acquise aux antibiotiques est souvent le produit de la synergie de l'activité des pompes RND avec l'expression d'une imperméabilité de membrane de la bactérie pour les antibiotiques (20).

Les RND forment un complexe protéique tripartite pour pouvoir fonctionner. Ce complexe est composé d'une protéine périplasmique MFP et d'une porine de membrane OMF (Outer Membrane Factor). Les pompes RND font partie des pompes d'efflux qui utilisent un gradient de protons comme source d'énergie. (21)

Il existe aussi certaines protéines d'efflux spécifiques d'une famille d'antibiotiques. Les gènes qui codent ces protéines d'efflux permettant le transport d'une seule famille d'antibiotiques sont souvent retrouvés sur des éléments génétiques mobiles(19). Chez les entérobactériales, des transporteurs spécifiques des macrolides, lincosamides et streptogramines : les MLS ainsi que des pompes d'efflux donnant une résistance aux tétracyclines *TetA*, *TetB*, *TetC*, *TetD* et *TetE* sont largement répandues chez les entérobactériales.

Si nous voulons parler de la régulation de l'expression de ces systèmes d'efflux, les gènes codant pour les protéines d'efflux de la famille RND font partie du même opéron (21), leur expression dépend souvent d'un régulateur d'expression local commun.

La régulation de l'expression de certains gènes chez les bactéries Gram négatif comme *TetA* à *E* dépendent de *TetR*, un répresseur local.

Dans d'autres cas, comme chez *E. coli*, le système d'efflux est plus complexe : il implique des pompes d'efflux *acrAB* (famille RND) et une porine *toIC*. Il existe des inducteurs de l'expression concomitante de *toIC* et *acrAB* et des répresseurs respectifs de ces deux protéines(21).

d) Résistance acquise par détoxification enzymatique

Il s'agit de la résistance acquise par l'expression d'enzyme de résistance : les β -lactamases. Nous aborderons la description et classification de ces enzymes dans la suite de ce travail.

III. Les β lactamases

A. Définition

Une β -lactamase est une enzyme d'inactivation des antibiotiques de la classe des β -lactamines. Les β -lactamases sont sécrétées dans l'espace péri plasmique, l'endroit d'interaction des β -lactamines avec leurs cibles les PLP.

Il existe deux classifications des β -lactamases :

Une classification fonctionnelle des β -lactamases : la classification de Bush et Jakoby en fonction des substrats et des inhibiteurs de chaque β -lactamase(22). Cette classification permet de déterminer quel est l'impact clinique de la β -lactamase et ainsi d'adapter la prise en charge thérapeutique.

Une classification en fonction de la séquence d'acides aminés de l'enzyme de lyse des β -lactamines, la classification d'Amblar qui nous servira dans la suite de ce travail.

Les classes A, C, et D de la classification selon Amblar ont une activité sérine kinase tandis que la classe B des enzymes de résistance a une activité qui dépend de métaux : les métalloenzymes.

Toutes ces enzymes ont en commun leur activité hydrolytique : le groupe fonctionnel β -lactame est hydrolysé, ouvert, empêchant l'antibiotique d'agir sur sa cible. Les β -lactamases sont douées d'une activité catalytique plus rapide que les PLP sur les β -lactamines expliquant l'efficacité de leur activité d'hydrolyse. La mesure de l'activité enzymatique d'une carbapénèmase est estimée à $\frac{K_{cat}}{V_{max}} > 1 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (23).

B. Classification selon Amblar

Cette classification s'appuie sur l'étude des séquences génétiques de chaque gène de résistance (Tableau 1). La classe A des β -lactamases inhibe les pénicillines mais les inhibiteurs de β -lactamases restent actifs la plupart du temps. Dans cette famille nous retrouvons les pénicillinases, les carbapénèmases de classe A et les BLSE.

La classe C des β -lactamases comprend des enzymes qui inhibent certaines pénicillines et les C1G. En cas d'hyperproduction de ces enzymes, peuvent être observées des résistances aux uréidopénicillines : la pipéracilline, des résistances aux carboxypénicillines : ticarcilline, témocilline et des résistances aux C3G : nous parlons alors de céphalosporinases dé réprimées ou hyperproduites.

La classe D des β -lactamases est très hétérogène dans son spectre de résistance. Nous distinguons les oxacillinases de spectre étroit et les oxacillinases de spectre large lorsqu'il existe une inhibition des céphalosporines des 2, 3 et 4^{ème} génération.

La classe B des β -lactamases sont toutes des carbapénèmases, elles ont une activité qui dépend des ions divalents zinc. Elles ont un spectre d'hydrolyse large sur toute la grande classe des β -lactamines. Leur activité est inhibée par les chélateurs d'ions divalents comme l'EDTA.

Tableau 1: Classification des β - lactamases selon Ambler

Classe	Classe A KPC	Classe B VIM, IMP, NDM	Classe C	Classe D OXA 48
Activité de l'enzyme	Serine β -lactamases Penicillinase	Métallo β -lactamases	Serine β -lactamases Céphalosporinase	Serine β -lactamases Oxacillinase
Spectre de résistance	Inhibent la plupart des β -lactamines Activité variable des inhibiteurs de β -lactamases	Inhibent toutes les β -lactamines sauf l'aztreonam	Inhibition des carboxypenicillines, ureidopenicillines, C3G et l'aztreonam	Résistance faible aux carbapénèmes, sensibilité maintenue aux C3G.
Support génétique de transmission	Chromosomique et plasmides et transposons	Plasmides et transposons	Chromosomique et plasmides	Plasmides et transposons

Dans les parties suivantes, nous nous intéresserons principalement aux carbapénèmases produites par les entérobactérales. Elles sont réparties dans les classes A, B et D d'Ambler. Dans la classe A nous retrouvons la famille des *K. pneumoniae* carbapénémase (KPC). Dans la classe B des métallo enzymes nous retrouvons les New Delhi β -lactamase (NDM), les imipénèmases (IMP), et les Verona integron encoded metallo β -lactamase (VIM). Dans la classe D d'Ambler, nous retrouvons les oxacillinases (OXA) dont la plus fréquente reste la famille OXA-48.

IV. Epidémiologie

Une épidémie d'entérobactérales productrices de carbapénèmases (EPC) se définit lorsque deux cas ou plus de souches productrices d'enzymes de résistance aux carbapénèmes sont isolés. Dans certains contextes épidémiologiques, les cas sont définis indépendamment de l'espèce bactérienne résistante puisqu'une grande majorité de gènes de carbapénèmases se transmet par des plasmides. La dissémination de souches résistantes aux carbapénèmes facilite l'acquisition et la transmission des gènes de résistance aux carbapénèmes. Les transports humains sont responsables de la prévalence parfois endémique des carbapénèmases, l'homme étant un vecteur important d'exposition et de transmission de colonies résistantes.(24) Dans cette partie nous analyserons la situation épidémiologique des deux carbapénèmases NDM et OXA-48 like après avoir décrit la situation épidémiologique globale des carbapénèmases en France.

A. Carbapénèmases en France

Depuis la publication du rapport d'activité du centre national de référence (CNR) de résistance aux antibiotiques en 2018 (CNR de résistance aux antibiotiques, 2018) l'augmentation du nombre de toutes les classes de carbapénèmases est constante. Il existe une incidence plus forte des cas d'EPC recensés entre les mois de septembre et de décembre, période correspondant au retour des congés d'été depuis l'étranger.

En 2018, il était intéressant de noter qu'à 72%, les cas rapportés d'EPC sont découverts après dépistage par écouvillonnage rectal, dont 43% sont en lien avec un séjour à l'étranger, dans une zone de circulation des EPC, et pendant laquelle le patient a pu être hospitalisé.

Parmi les échantillons à visée diagnostique, 77% des échantillons positifs provenaient d'échantillons urinaires et 9% des échantillons diagnostiques étaient des hémocultures positives.

En 2018, les régions françaises ayant envoyé le plus grand nombre d'échantillons au CNR étaient les régions Ile-de-France, Nord-Pas-de-Calais, Provence-Alpes-Côte d'Azur, Rhône-Alpes : régions à forte densité de population, dans lesquelles ont été recensées des épidémies et qui pratiquent régulièrement les transferts inter-hospitaliers. De 2004 à décembre 2011, les hôpitaux de Paris (AP-HP) ont recensés 63 cas index de patients porteurs de carbapénèmes(24) avec ou sans cas secondaire. Sur ces 63 cas, 55 (87%) avaient un historique de voyage à l'étranger : 43 ont directement été transférés depuis un hôpital étranger, 4 avaient été hospitalisés à l'étranger dans les 12 mois précédents et 8 avaient séjourné à l'étranger pour une durée proche de 1an. Les 55 patients qui avaient un antécédent de séjour à l'étranger ou qui y avaient été hospitalisés, les pays de provenance étaient en majorité les pays de l'Amérique du Nord (22,40%) et la Grèce (19,35%). Ces chiffres permettent d'associer le risque d'antécédent de retour de zone d'endémie d'EPC à un facteur de risque d'être porteur d'EPC. Les régions de France où sont réalisés le plus grand nombre de transferts hospitaliers depuis l'étranger peuvent ainsi devenir de nouveaux réservoirs pour les EPC.

Nous observons que les épidémies d'EPC étaient un phénomène majoritairement lié aux soins : 71,7% des échantillons reçus par le CNR de l'antibiorésistance provenaient des hôpitaux publics. Le reste des échantillons (28,3%) provenaient des laboratoires d'analyses de ville qui peuvent traiter des échantillons d'origine hospitalière. La proportion bien plus importante des échantillons provenant des hôpitaux était certainement due à la pratique de dépistage par écouvillonnage rectal qui y reste plus fréquente.

Par espèces d'entérobactériales, la proportion d'EPC représentait en 2020, sur le nombre d'échantillons reçus au CNR (CNR des résistances aux antibiotiques, 2019-2020) :

- 28,2% des *K.pneumoniae* avec 622 souches
- 25,5% des *E. coli* avec 563 souches
- 18,9% de *C.freundii* avec 418 souches
- 17,2% des *E. cloacea* avec 380 souches

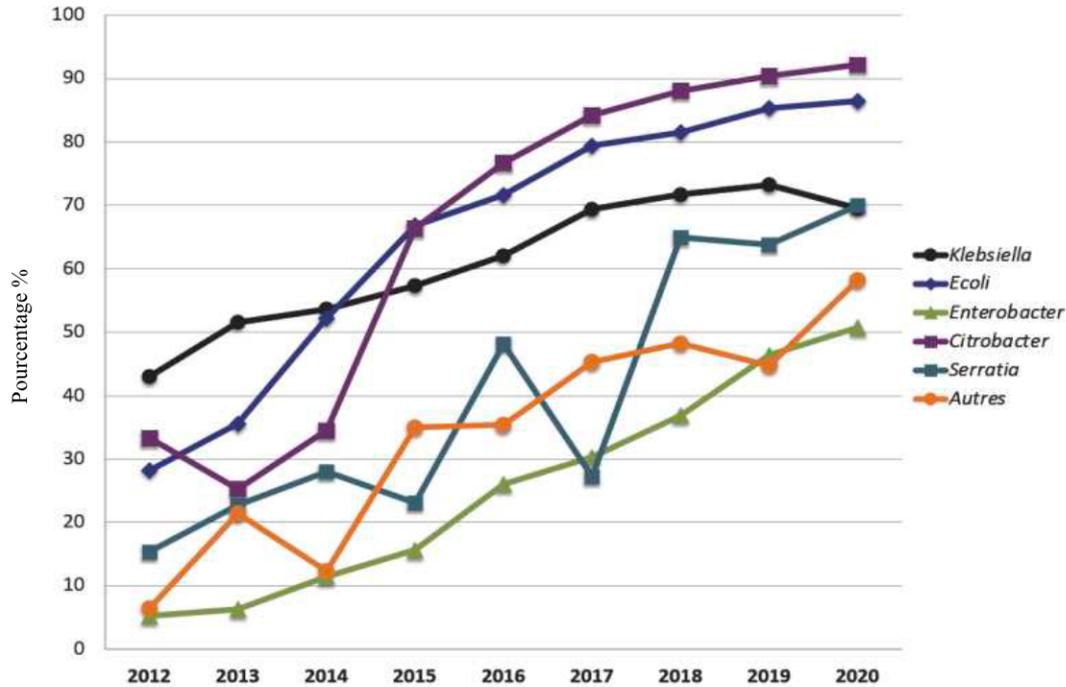


Figure 14 : Évolution de la proportion d'expression de carbapénèmases par espèce bactérienne (2012-2020) – Source : Rapport d'activité du Centre National de Référence de Résistance aux Antibiotiques 2019-2020

Toujours en 2020, par espèce bactérienne résistante aux carbapénèmes, la proportion des souches qui produisaient des carbapénèmases étaient pour *C. freundii* 92,2%, *E. coli* 86,5%, *Klebsiella sp.* 69,5%. Elle était plus faible chez les *Enterobacter cloacae* avec 50,8% des souches productrices de carbapénèmases. La figure 14 est le graphique qui représente le pourcentage d'échantillons producteurs de carbapénèmases par espèce bactérienne depuis l'année 2012. La proportion des souches productrices de carbapénèmases a progressé chez toutes les espèces bactériennes.

Depuis 2014, le nombre de *C. freundii* producteurs de carbapénèmases en France a été multiplié par 4,4 (25). Depuis 2017, le nombre de *C. freundii* producteurs de carbapénèmases parmi les *C. freundii* résistants aux carbapénèmes semble se stabiliser autour des 90%. Ces chiffres permettent de constater que c'est cette espèce d'entérobactériale qui semble être l'hôte favori des gènes de résistance aux carbapénèmes et peut être le moyen privilégié de transmission de ces gènes de résistances.

Maintenant, regardons les statistiques de chaque carbapénèmase : les souches OXA-48 like sont en proportion les plus représentées : en 2018, 67,1% des souches reçues étaient des OXA-48 like suivi par les NDM représentant 20,1% des souches reçues. Les carbapénèmases VIM et KPC de classe 2 étaient présentes en proportion moindre.

Les carbapénèmases de classe B comme NDM et de classe D comme les OXA-48 like semblaient réparties équitablement chez toutes les espèces d'entérobactériales responsables de pathologies humaines.

Bien que les carbapénèmases OXA-48 like soient les plus prévalentes, leur proportion a diminué pour laisser une plus grande part aux metallo β carbapénèmases de type NDM : les souches OXA-48 like sont passées de 70,5 % en 2019 à 63,3% en 2020 tandis que les metallo- β -lactamases du type

NDM sont passées de 16,6% en 2018 à 20,1% en 2020 (CNR des résistances aux antibiotiques, 2019-2020).

Le bulletin hebdomadaire épidémiologique de santé publique France de novembre 2021(26) décrivait au sein du groupe des OXA-48 like un variant dont la fréquence semblait augmenter : OXA-244. Ce variant semblait difficile à détecter du fait de sa plus faible activité d'hydrolyse des carbapénèmes qu'OXA-48 et OXA-181.

Au sein de la classe B des β -lactamases, une augmentation de la proportion du variant NDM-5 par rapport au variant NDM-1 était à noter. Par ailleurs, sa dissémination communautaire était observée en Inde et sa prévalence semblait se stabiliser à 35%.

B. Carbapénèmases de classe B

Ces carbapénèmases ont d'abord été détectées chez des souches environnementales et des bactéries opportunistes comme *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp et *Stenotrophomonas maltophilia* avant d'être identifiées chez les *Pseudomonas* et les entérobactérales.

VIM a d'abord été identifiée en Italie puis en France avant d'être décrite mondialement. Il en existe 69 variants cliniques. Elle est endémique en Europe du Sud : Italie, Espagne et Grèce et en Asie du Sud-Est : à Taiwan et en Corée du Sud.

IMP a été décrite au Japon, puis à Taïwan et en Chine de l'Est et plus récemment en Grèce. Il existe 85 variants circulants.

La carbapénèmase NDM a été identifiée en Inde puis au Pakistan et au Bangladesh et a rapidement diffusé sur l'ensemble du globe. La littérature décrivait 29 variants cliniques en mai 2020 (27). Entre les variants de NDM, il existe toujours une différence d'activité enzymatique suivant l'expression de leur séquence nucléotidique. NDM-5 a été identifiée plus tardivement que NDM-1 et semble avoir un pouvoir hydrolytique plus important.(28)

a) *bla*_{NDM-1}

Depuis 2010 en Inde, au Pakistan et au Royaume-Uni, les entérobactérales productrices de NDM-1 sont endémiques (29). Sur le continent Indien, la carbapénèmase NDM-1 a été identifiée dans les eaux usées des égouts indiens et chez les bactéries pathogènes *Vibrio cholerae* et *Shigella* spp. Elles ont été responsables de syndromes gastroentériques à carbapénèmases ce qui atteste d'une transmission horizontale efficace de *bla*_{NDM-1}. La transmission peut se faire d'une souche résistante environnementale jusqu'à l'homme ou bien depuis l'homme dans l'environnement notamment via les réseaux d'eau usées. Le péril fécal semble jouer un rôle dans la persistance des souches résistantes aux antibiotiques dans l'environnement.

*bla*_{NDM-1} a été identifié en Europe pour la première fois en Suède chez *K. pneumoniae* chez un patient revenant de zone d'endémie, l'Inde. Les Balkans ont aussi été identifiés comme réservoir secondaire des souches productrices de carbapénèmases en Europe. Ils comptent 16,8% des cas totaux de souches productrices de carbapénèmases NDM-1 alors que 58,1% du total des souches productrices de NDM-1 se trouvent en Inde et en Chine. Le continent Africain regroupe 10% des souches qui portent

NDM-1 au niveau mondial. Le réservoir principal des souches possédant *bla_{NDM-1}* en Afrique est l'Algérie. Enfin l'Amérique héberge 10,8% des souches mondiales productrices de NDM, et le pays réservoir est le Brésil.

b) Autres variants *bla_{NDM}*

NDM-5 et NDM-7 sont présents au Danemark et France tandis que le variant NDM-4 est présent en Italie.

C. Carbapénèmases de classe D : oxacillinases

Dans les études SMART (2008 à 2014) et INFORM (2012 à 2014) qui sont deux programmes de surveillance épidémiologique mondiaux, il a été estimé que parmi les entérobactérales (n=1615) qui produisent des carbapénèmases, 27% produisent une OXA-48 like contre 55% produisent KPC et 26% produisent NDM (30).

En Afrique de l'Est et du Nord, en Belgique et Espagne, les carbapénèmases OXA-48 like sont les carbapénèmases les plus prévalentes chez les entérobactérales. *K. pneumoniae* sont les entérobactérales produisant le plus souvent les carbapénèmases OXA-48 like.

OXA-48 a été décrite en Turquie en milieu hospitalier en 2004 (31). Les souches concernées étaient des *K. pneumoniae* avant qu'OXA-48 s'étende à tout le territoire turc, chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, responsables d'épidémies dans des hôpitaux dans lesquels des transferts de malades ont eu lieu.

En 2010 en Belgique, Égypte, France, Liban, Maroc, Tunisie et Turquie, différentes entérobactérales ont été identifiées comme porteuses du gène *bla_{OXA-48}* sur des plasmides de 70kpb appartenant tous au même groupe d'incompatibilité IncL/M.

En 2011, des cas d'oxacillinases OXA-48 ont été rapportés en Irlande, en Israël, aux Pays-Bas, au Sénégal, et en Slovénie.

Les cas rapportés en France, Espagne, Israël et Slovénie provenaient de patients ayant subi une hospitalisation en Turquie ou au Maroc.

Les oxacillinases OXA-48 like sont endémiques en Turquie et certains pays du Moyen Orient, Arabie Saoudite, Iran, Jordanie, Liban, et Oman, ainsi qu'en Afrique du Nord, en Algérie, Égypte, Maroc et Tunisie. Des cas d'oxacillinases OXA-48 ont été rapportés tout autour du monde, avec pour seul pays épargné l'Antarctique. Les espèces chez lesquelles ont été rapportés des cas d'oxacillinases OXA-48 sont : *K. pneumoniae* responsable d'infections associées aux soins, *C. freundii*, *E. cloacae* ou encore *E. coli* responsables d'infections communautaires.

Depuis 2018, le CNR de l'antibiorésistance a enregistré une diversification des variants OXA-48 like notamment avec l'émergence du variant OXA-244.

Nous remarquons donc que, si certaines carbapénèmases gagnent du terrain en proportion comme les NDM, les variants des carbapénèmases OXA-48 like sont toujours plus nombreux nécessitant une mise à jour fréquente des techniques d'identification des gènes de résistance.

Si certains variants peuvent être identifiés avec certitude comme OXA-48 ou OXA-181, les variants émergents demandent un séquençage génétique précis et plus long puisqu'il s'agit d'une analyse comparative de ce nouveau variant par rapport aux variants déjà répertoriés.

D. Description biochimique et génétique des carbapénèmases NDM et OXA

a) Activité biochimique des carbapénèmases

Dans cette partie nous nous intéresserons préférentiellement aux classe B et D de la classification d'Ambler qui contiennent respectivement les NDM et les OXA.

Concernant la classe B des β -lactamases, les NDM contiennent dans leur site actif deux ions zinc leur donnant leur pouvoir hydrolytique (32). La liaison du substrat à l'enzyme se fait par le biais d'un premier ion zinc, le deuxième ion zinc permet d'initier la réaction d'hydrolyse du cycle β lactame en réagissant avec une molécule d'eau, et en libérant un réactif hydroxyde qui attaque le cycle β -lactame sur le carbone de la liaison C=O. Cette mécanistique d'hydrolyse dépendante des ions zinc et propre aux β -lactamases de la classe B d'Ambler permet à ces β -lactamases de développer un spectre de résistance s'étendant sur toute la classe des β -lactamines : les pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes. Les inhibiteurs de β -lactamases : tazobactam, avibactam, sulbactam, acide clavulanique ne sont pas efficaces sur les carbapénèmases de type métallo-enzymes. Les bactéries NDM positives restent sensibles à l'aztreonam (32), à la fosfomycine et à la tigecycline associée à la colistine (33). Il est assez commun de retrouver chez les bactéries exprimant NDM, l'expression d'autres résistances aux antibiotiques acquises par des éléments génétiques transposables. Parmi les gènes de résistance aux β -lactamines acquis nous pouvons citer les plus courants : *bla_{TEM}* codant pour une pénicillinase ou *bla_{OXA-1}* ou *bla_{CTXM}*(34) codant pour une BLSE. Plus modérément nous pouvons retrouver des cas de co-expression d'une β -lactamase avec *bla_{OXA-48}* ou *bla_{AmpC}*. Les résistances d'une souche peuvent s'étendre aux aminosides ou aux fluoroquinolones lorsque la bactérie produit plusieurs enzymes de lyse d'antibiotiques.

Concernant les carbapénèmases du groupe D de la classification d'Ambler, toutes les oxacillinases possèdent un résidu sérine en position 70 dont l'activité catalytique dépend d'une lysine carbamylée en position 73 de la chaîne peptidique. Certains motifs peptidiques sont conservés chez les β -lactamases de classe D comme Lys-Thr-Gly des positions 144 à 146 et Tyr-Gly-Asn des positions 216 à 218. Lorsque Phe-Gly-Asn remplace Tyr-Gly-Asn, les oxacillinases étendent leur spectre de résistance aux céphalosporines et carbapénèmes.(17)

b) Description de l'environnement génétique des gènes *bla_{NDM}*

Les variants du gène *bla_{NDM}* sont souvent associés au gène *ble_{MBL}* donnant à la bactérie qui possède ces gènes à la fois la résistance aux carbapénèmes, à la bléomycine et zocine. La bléomycine est une molécule anticancéreuse qui a déjà été retrouvée dans les eaux potables et eaux usées au Royaume-Uni et Allemagne rendant compte de sa persistance dans l'environnement même après décontamination des eaux usées. Les bactéries de l'environnement aquatique ont pu acquérir le gène de résistance à la bléomycine puis le gène de résistance aux carbapénèmes *bla_{NDM}* via des supports de matériel génétique comme les plasmides, les transposons ou les séquences d'insertion. Une protéine résultant de l'expression du gène *ble_{MBL}* : *Bleomycin resistant protein* (BRP), protège le gène

bla_{NDM} des répressions d'expression(35). Ainsi, lorsque les bactéries possèdent les deux gènes de résistance aux carbapénèmes et à la bléomycine, elles sont sélectionnées. Ces souches résistantes peuvent être acquises par l'homme par la consommation de l'eau contenant les bactéries hautement résistantes : en Inde, bla_{NDM-1} a été identifié chez *Vibrio cholera* (36). Toujours en Inde, le gène bla_{NDM-1} a aussi été identifié chez des souches de *K. pneumoniae* responsables d'infections urinaires communautaires (29).

Il semblerait que le gène bla_{NDM} ne s'exprime pas que sur un groupe d'incompatibilité de plasmide ou dans une souche bactérienne préférentielle mais plutôt grâce à la séquence d'insertion promotrice ISAb₁₂₅. (37)

En réalisant l'étude moléculaire de l'environnement génétique du gène bla_{NDM-1} chez *A. baumannii*, il a été observé que bla_{NDM-1} était toujours encadré par deux copies identiques d'ISAb₁₂₅, le tout formant un transposon composite Tn125 (38). Chez les entérobactérales il semblerait que le transposon composite soit toujours tronqué par une ou plusieurs séquences d'insertions selon le variant du gène bla_{NDM} . Cette variabilité génétique semble être favorisée par l'acquisition de séquences d'insertions par les plasmides qui transmettent les gènes de résistance aux carbapénèmes.

Chronologiquement, le transposon Tn125 semble avoir permis l'acquisition de bla_{NDM1} par *A. baumannii*. Le transposon Tn125 a pu être acquis par divers groupes d'incompatibilité de plasmides. Ces plasmides ont pu être transmis aux entérobactérales (17). Le gène bla_{NDM-1} est contenu sur plusieurs groupes d'incompatibilité de plasmides chez les entérobactérales objectivant sa grande capacité de transposition sur ses hôtes plasmidiques(39).

c) Description de l'environnement génétique de bla_{OXA}

La classe D de la classification d'Ambler contient les oxacillinases, parmi lesquelles on retrouve des carbapénémases qui peuvent être reclassées en deux catégories : celles qui sont exprimées majoritairement chez *A. baumannii* : OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58 et celles qui sont exprimées plutôt chez les entérobactérales (30) : les OXA-48 like : OXA-48, OXA-181, OXA-232, OXA-204, OXA-162, OXA-244 dans leur ordre de prévalence. Sept cent cinquante variants d'oxacillinases ont été recensés avec chacun un spectre de résistance qui lui est propre.

Les oxacillinases OXA-48 like ont un spectre d'hydrolyse qui s'étend sur les aminopénicillines, les carboxypénicillines, uréidopénicillines et les céphalosporines de spectre étroit. Les inhibiteurs de β -lactamases sont souvent inactifs sur les oxacillinases. Le spectre d'inhibition des carbapénèmes par les oxacillinases est variable.

Tous les variants du groupe OXA-48 like semblent provenir d'un même hôte : *Shewanella xiamenensis* une bactérie aquatique, compte tenu de la proximité génétique de leurs séquences nucléotidiques (30). Les variations génétiques portent le plus souvent sur la boucle $\beta 5$ et $\beta 6$ de la séquence peptidique des gènes $bla_{OXA-48like}$, ce qui se traduit par une modification de l'affinité de l'enzyme pour sa cible.

Finalement, l'étude des similitudes entre les gènes d'oxacillinases et l'étude de leur environnement génétique permet de dresser un arbre phylogénétique de l'apparition et filiation des souches.

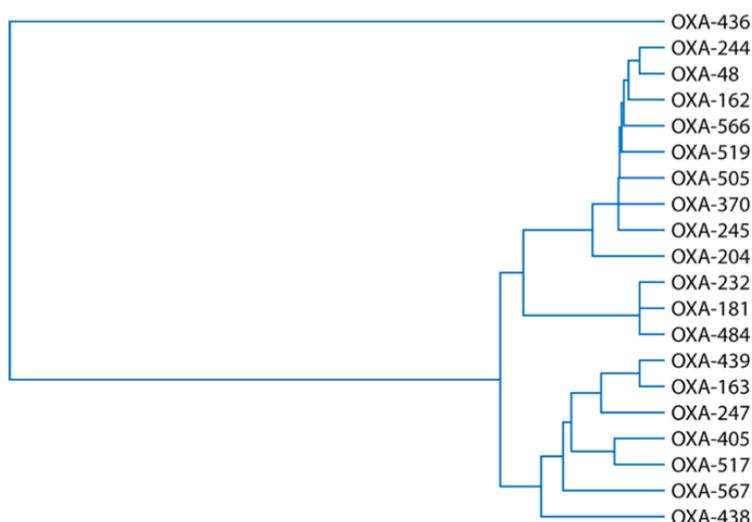


Figure 14 : Arbre phylogénétique des variants OXA d'après l'étude de Pitout et al.(30)

OXA-232 dérive d'OXA-181 et leurs séquences peptidiques diffèrent par la substitution d'un seul acide aminé. Cette substitution donne un pouvoir d'hydrolyse moindre à OXA-232 comparé à celui d'OXA-48 et OXA-181(40). OXA-232 et OXA-181 sont souvent identifiés chez des individus ayant comme antécédent un séjour en Inde. Ces deux variants sont retrouvés préférentiellement sur les plasmides IncN, IncT, IncX3 et Col2.

Nous retrouvons dans la littérature des cas de co-expression de bla_{NDM-1} et $bla_{OXA-181}$. (41)

OXA-204 et OXA-181 diffèrent par 6 substitutions d'acides aminés. Les plasmides du groupe d'incompatibilité IncA/C semblent accueillir plus facilement le gène $bla_{OXA-204}$ tandis que la transmission de $bla_{OXA-181}$ semble se faire par l'intermédiaire des ISEcp1.

Sur les plasmides ayant acquis $bla_{OXA-204}$, le gène de résistance semble pouvoir réaliser sa transposition grâce au transposon Tn2016 retrouvé sur plusieurs types de plasmides de différentes tailles allant de 90 à 160 kb, ce qui confirme la transmission de $bla_{OXA-204}$ par Tn2016.

OXA-48 et OXA-181 ne se transmettent pas par les mêmes supports génétiques : OXA-48 fait partie du transposon Tn1999 défini par la présence de 2 séquences d'insertion IS1999 alors qu'OXA-181 fait partie d'un ISEcp1 suggérant que ces 2 gènes de résistance sont apparus lors de 2 événements différents (42). $Bla_{OXA-181}$ n'est pas contenu sur les plasmides du groupe d'incompatibilité IncL/M, contrairement à ce qui est observé pour bla_{OXA-48} , mais est retrouvé sur les plasmides non conjugatifs du groupe d'incompatibilité ColE2. En amont de la séquence codante pour $bla_{OXA-181}$ c'est l'ISEcp1 qui permet la transposition du gène sur les plasmides ColE2.

Le gène $bla_{OXA-181}$ a un réservoir bactérien environnemental : *Shewanella xiamenensis*. Bla_{OXA-48} a été identifié chez *Shewanella oneidensis*, ainsi il semblerait que ces gènes de résistance aux antibiotiques se soient transmis via ces deux espèces bactériennes du genre *Shewanella* partageant le même milieu aquatique (43).

$Bla_{OXA-244}$ et $bla_{OXA-162}$ diffèrent de bla_{OXA-48} par une seule substitution et l'environnement de ces 3 carbapénémases semble très similaires les unes des autres. Les plasmides du groupe d'incompatibilité IncL/M portent les gènes bla_{OXA-48} , $bla_{OXA-244}$ et $bla_{OXA-162}$.

$bla_{OXA-163}$ diffère de bla_{OXA-48} par un seul acide aminé. Elle a été identifiée chez *K. pneumoniae* et *E. cloacea* en Argentine puis en Égypte chez des patients qui n'avaient pas d'antécédent de voyage en Argentine.

Les plasmides du groupe d'incompatibilité IncL/M ont été identifiés comme étant les supports génétiques de transmission des gènes des BLSE bla_{CTX-M3} , ou encore des carbapénèmases bla_{NDM-1} (44). Le gène bla_{OXA-48} est en majorité contenu par les plasmides IncL/M ceci pouvant être expliqué par l'efficacité de la conjugaison des plasmides du groupe IncM/L ayant intégré bla_{OXA-48} . La conjugaison de ces plasmides est quarante fois plus efficace pour les plasmides IncL/M qui ont intégré bla_{OXA-48} que pour les plasmides IncL/M ayant intégré le gène bla_{NDM-1} (44).

L'insertion de bla_{OXA-48} dans les plasmides du groupe d'incompatibilité IncL/M se fait par interruption de la séquence nucléotidique du gène *tir* qui code pour une protéine de répression de conjugaison des plasmides. L'expression de *tir* étant réprimée par l'insertion de bla_{OXA-48} , la conjugaison des plasmides du groupe d'incompatibilité IncL/M est dé-réprimée, permettant une meilleure transmission de bla_{OXA-48} . L'intégration du gène de résistance aux antibiotiques bla_{OXA-48} au sein des plasmides semble être favorisée par le transposon composite *Tn1999* composé de deux copies d'IS1999, une en amont et une en aval du gène de résistance aux antibiotiques, figure 16. La séquence qui suit bla_{OXA-48} , *lysR*, sur le transposon *Tn1999* a une homologie de séquence de 98% avec la séquence codante de *lysR* chez *Shewanella xiamensis* (45). Ainsi d'après la structure du transposon composite dans lequel est contenu le gène bla_{OXA-48} et *LysR*, il semblerait que son intégration aux plasmides du groupe d'incompatibilité IncL/M soit passée par un hôte bactérien qui pourrait faire partie de la famille des *Shewanella* spp.

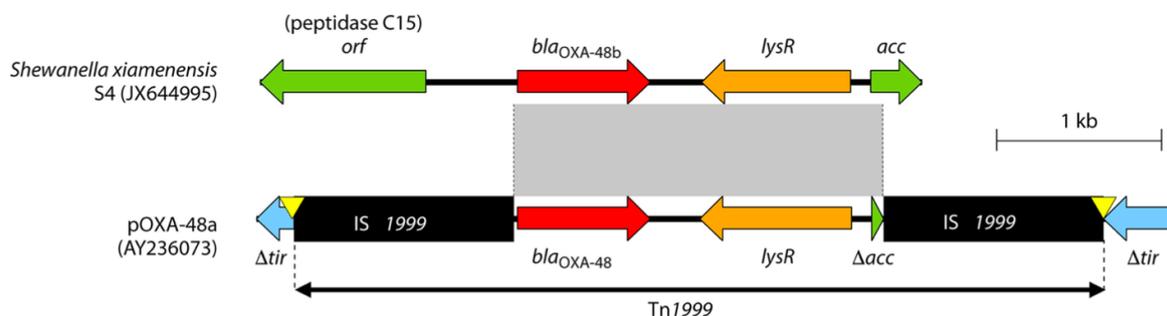


Figure 15 : Schéma des environnements génétiques de bla_{OXA-48} chez *Shewanella xiamensis* et sur un plasmide *pOXA-48a* porté par les souches possédant *OXA-48* - Source : Pitout & al(30)

Les travaux de Poirel et al.(45) décrivent un spectre d'hôte étroit pour les plasmides du groupe d'incompatibilité IncL/M. Les résultats de conjugaisons et transformations ont été obtenus uniquement chez le groupe des entérobactérales, ce qui fait de ces bactéries les hôtes préférés du groupe d'incompatibilité IncL/M de plasmides porteurs du gène bla_{OXA-48} .

Le gène bla_{OXA-48} est retrouvé sur des plasmides appartenant à d'autres groupes d'incompatibilité : IncA/C, IncF.

Il existe encore d'autres promoteurs d'expression du gène bla_{OXA-48} : les souches ST530 de *K. pneumoniae* de Turquie et ST963 d'*E. coli* en France, ont acquis bla_{OXA-48} sur un chromosome grâce à la séquence d'insertion IS1.

V. Conduite à tenir selon le contexte épidémiologique

La lutte contre l'antibiorésistance fait partie des nouveaux enjeux de santé publique. Comme tout médicament, l'utilisation des antibiotiques doit répondre favorablement à la balance bénéfique du traitement par rapport au risque encouru lors de sa prise. Le versant négatif de la balance bénéfice-risque consiste ici en la sélection des souches bactériennes résistantes à l'antibiotique à chacune des nouvelles utilisations des antibiotiques. L'émergence des nouvelles résistances aux antibiotiques sont un enjeu de santé publique majeur puisque, nous l'avons vu plus haut, leur transmission horizontale est rapide et extrêmement efficace. Le risque pris n'est pas limité à l'individu qui se traite mais s'étend à son entourage si les bactéries résistantes sont transmises par contact indirect ou par manu portage en cas de péril fécal. Les diarrhées, l'incontinence ou les expectorations productives sont autant de symptômes qui facilitent la transmission des EPC.

En connaissant les supports génétiques des gènes de résistance aux antibiotiques et leur grande facilité à se transmettre horizontalement, nous comprenons que la consommation des antibiotiques doit être un acte réfléchi afin d'éviter la transmission à grande échelle des souches bactériennes résistantes ou la création d'épidémies de BHRé. Ainsi pour une meilleure prévention, la trajectoire de soin des patients identifiés comme à risque de portage de bactéries hautement résistantes émergentes doivent être suivis.

Nous avons vu précédemment que les bactéries hôtes de ces résistances aux antibiotiques sont pour la majorité commensales de la flore digestive. Cependant lorsque ces bactéries acquièrent une carbapénèmase, le risque de transmission à une espèce bactérienne potentiellement pathogène pour l'humain est possible, compromettant fortement la guérison du patient atteint, surtout lorsque son état de santé est déjà dégradé (immunodépression).

Avec leur multitude de mode d'acquisition, avec la variabilité de leurs spectres de résistance, nous verrons que la prévention, notamment secondaire, de la transmission des EPC constitue un défi d'envergure.

A. Diagnostic biologique

Le dépistage de patients porteurs de carbapénèmases se réalise chez les patients ayant un risque d'antécédent d'exposition aux EPC comme un historique de retour de zone d'endémie, un ou plusieurs critères cliniques favorables à un portage d'EPC.

Le dépistage se fait par un écouvillonnage rectal ou analyse des selles. Dans l'ordre, une mise en culture en vue de l'obtention d'un antibiogramme est toujours nécessaire et suivie par une identification du gène de résistance en cause par biologie moléculaire.

Le CDC (US Center of Disease Control and Prevention) conseille une mise en culture des écouvillonnages rectaux dans 5mL de trypticase soja et incubation avec un disque de 10µM d'ertapénème ou mérépénème durant vingt-quatre heures puis culture sur milieu McConkey pour sélectionner les souches qui fermentent le lactose. L'inconvénient serait de ne pas sélectionner les souches productrices de carbapénèmases et qui ne fermentent pas le lactose. Une recherche de BLSE

est souvent réalisée en préalable à l'antibiogramme sur un milieu enrichi en C3G et acide clavulanique afin d'identifier les souches qui exprimeraient conjointement une BLSE et une carbapénémase (46)

Les recommandations CA-SFM/EUCAST de criblage des souches d'EPC ont été actualisées en mai 2022 ((CA-SFM/EUCAST, 2022). Le nouvel algorithme en figure 16 semble mieux adapté à la détection des souches productrices d'entérobactérales qui avaient jusqu'à présent un profil d'expression compatible avec un profil de bactéries sensibles aux carbapénèmes. Les faux négatifs représentaient environ 10% des souches OXA-48 like et les VIM.

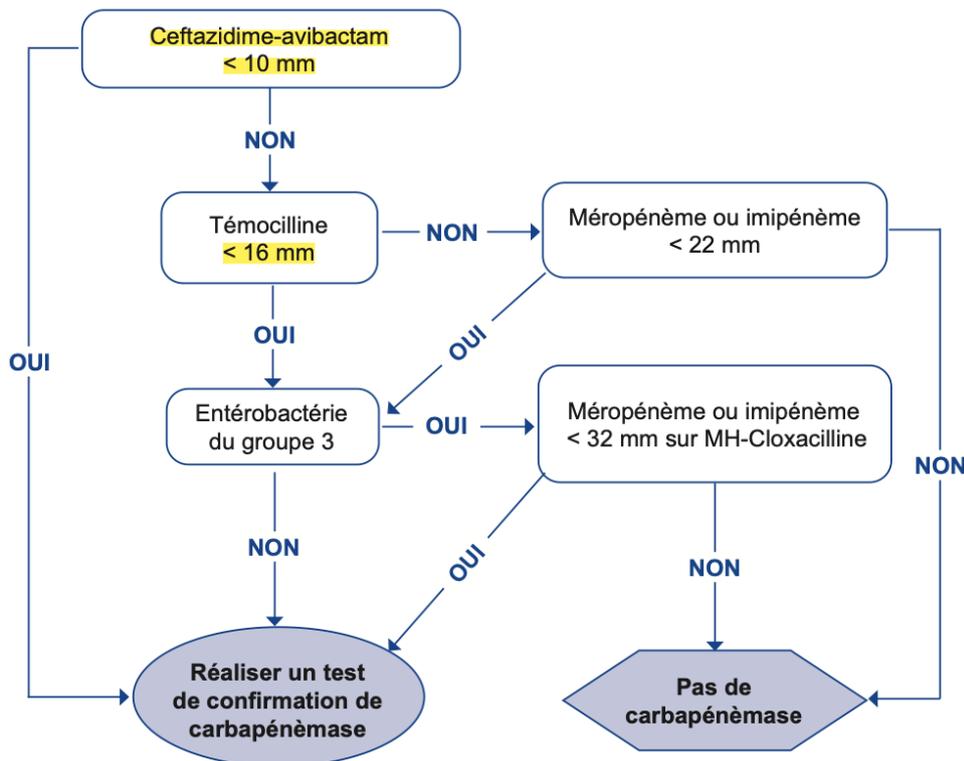


Figure 16 : Algorithme phénotypique de criblage des souches d'entérobactérales productrices de carbapénémases selon CA-SFM/EUCAST

Bien que la marche à suivre du diagnostic biologique soit définie, il existait un nombre de cas non négligeables pour lesquels les diamètres d'inhibition des colonies isolées n'avaient pas une valeur supérieure à la valeur seuil de résistance aux carbapénèmes. Les anciennes recommandations de l'EUCAST visaient un DI < 25 mm pour l'ertapénème mais 25% des souches résistantes isolées en Europe ne répondaient pas à ce critère.

L'évaluation de la résistance au méropénème semblerait être un facteur de bonne spécificité et sensibilité alors que la recherche de carbapénémases par évaluation de la sensibilité à l'ertapénème est de très bonne sensibilité mais manque de spécificité.

Concernant l'identification des entérobactérales potentiellement résistantes aux carbapénèmes, il existe un test colorimétrique, le *Carba NP Test*. Lorsque l'imipénème est hydrolysé par une carbapénémase, il en résulte une acidification du milieu. Cette acidification du milieu est objectivée par un passage de l'indicateur du pH de la couleur rouge à jaune.

Il existe encore des tests immunochromatographiques d'identification spécifique d'une carbapénèmase. Ils sont souvent utilisés car peu coûteux et rapides.

Le dépistage du portage doit associer, à la culture et antibiogramme, une méthode de séquençage contemporaine pour gagner en sensibilité et spécificité de détection (47). La biologie moléculaire permet d'augmenter la sensibilité de détection en identifiant les souches productrices de carbapénémases si elles sont non identifiables par l'antibiogramme.

B. Évaluation du risque épidémique

Les recommandations de conduite à tenir sont rédigées par les autorités sanitaires régionales et les instances chargées de la lutte contre les infections associées aux soins (CPIAS).

L'activité d'investigation microbiologique est indispensable à l'analyse du risque biologique : la biologie moléculaire permet de connaître la consistance génétique des gènes de résistance aux antibiotiques et les modalités de leur transmission. Il est nécessaire de pouvoir faire une identification sensible, spécifique et rapide du gène de résistance aux antibiotiques, ce qui permettra de mettre en place une prévention secondaire efficace. L'architecture des infrastructures hospitalières prévoyant une gestion des flux et la formation des soignants à l'application des gestes de prévention sont deux facteurs très importants dans la gestion du risque épidémique afin d'éviter la contamination d'autres patients.

À l'accueil d'un patient porteur d'une carbapénèmase, le personnel de l'établissement de santé évalue le risque d'évolution épidémique qui dépend de la bactérie résistante, du gène de résistance acquis par la bactérie en cause, et de l'état de santé du patient principalement.

a) Évaluation du risque en fonction de la bactérie

Les EPC inquiètent les équipes de soignants et microbiologistes parce qu'elles font parties des bactéries hautement résistantes émergentes et peuvent être à l'origine d'infections incurables. Parmi les entérobactérales nous pouvons retrouver différentes espèces comme *C. freundii*, *E. cloacea*, *E. coli* et *K. pneumoniae*, qui semblent toutes accueillir les gènes de résistance aux carbapénèmes.

Certaines entérobactérales sont commensales du tube digestif comme *E. coli* ou d'autres sont potentiellement pathogènes pour l'homme comme *K. pneumoniae*. Ce sont toutes des bacilles Gram négatif, aéro-anaérobies facultatives, fermentent le glucose et réduisent les nitrates en nitrites. Elles sont cultivables en milieu ordinaire.

La promiscuité de la sphère digestive et urologique permet de comprendre qu'il existe un fort risque de transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques depuis la sphère urologique vers la sphère digestive et inversement.

Lorsqu'il s'agit d'entérobactérales pathogènes, elles peuvent être responsables de syndrome infectieux multiples comme les infections intra abdominales, les infections urinaires ou les pneumonies. Le plus sérieux d'entre eux étant la bactériémie pouvant évoluer vers un choc septique. Les entérobactérales se transmettent par manuportage et particulièrement en établissement de soin où elles sont responsables de surinfections. Elles peuvent être aussi responsables d'un portage asymptomatique.

Dans cette partie nous décrivons les 4 espèces d'entérobactérales résistantes aux carbapénèmes dans notre étude.

C. freundii est un bacille Gram négatif opportuniste de l'environnement et du tube digestif. Il est capable de donner des infections urinaires, infections méningées, pulmonaires ou des infections nosocomiales comme des abcès ou des septicémies. Les antibiotiques administrés sont les C3G associées à un aminoside, les carbapénèmes, fluoroquinolones.

E. cloacea est une entérobactérale saprophyte du tube digestif et des cavités naturelles. Elle est responsable d'infections nosocomiales comme les sepsis, les infections urinaires ou les pneumonies. Ces entérobactérales produisent une céphalosporinase chromosomique inductible qui donne une résistance aux céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème} génération et aux aminopénicillines. Les antibiotiques de choix peuvent être un carbapénème associé à un aminoside ou une céphalosporine de 3^{ème} génération.

E. coli est une entérobactérale commensale du tube digestif. Il existe certains sérogroupes pathogènes pour l'homme : *E. coli* entéro-hémorragique (EHEC) responsable de syndrome urémique et hémolytique, *E. coli* entéro-invasif (EIEC) responsable de syndrome dysentérique, *E. coli* entéro-pathogène (EPEC) responsable de syndrome gastro entéritique infantile, *E. coli* entéro-toxinogène (ETEC) responsable de syndrome cholériforme. En plus des infections du tube digestif, *E. coli* est responsable d'infections urinaires, de toxi-infections alimentaires collectives, de septicémies, de méningites chez le nouveau-né. A l'état sauvage, *E. coli* est sensible aux β -lactamines. Les résistances apparaissent lorsqu'il y a une production d'une enzyme de lyse : une pénicillinase, une céphalosporinase hyperproduite ou augmentée ou une BLSE. Elle est résistante aux macrolides naturellement. La résistance aux quinolones est chromosomique, elle s'exprime lorsqu'il existe une mutation du chromosome codant pour l'ADN gyrase. Une prescription d'antibiotique doit être réalisée après documentation : amoxicilline + acide clavulanique, cotrimoxazole en cas d'infection colique et céphalosporine de 3^{ème} génération associé à un aminoside si septicémie.

K. pneumoniae existe dans le tube digestif ou les voies respiratoires. Cette bactérie est responsable d'infections nosocomiales et communautaires comme les infections broncho pulmonaires et urinaires.

K. pneumoniae est résistante naturellement à l'amoxicilline et ticarcilline et de sensibilité diminuée à la pipéracilline. *K. pneumoniae* peut avoir acquis une pénicillinase : elle reste sensible à l'imipénème, aztreonam, et céphalosporine de 3^{ème} génération. Il existe un phénotype résistant aux β -lactamines de spectre élargi ou encore un phénotype résistant aux carbapénèmes.

En thérapeutique, les céphalosporines de 3^{ème} génération sont utilisées en association avec un aminoside.

b) Évaluation du risque en fonction de la β lactamase

Les gènes de résistance aux β -lactamines se transmettent horizontalement via les plasmides et sont souvent entourées de séquences promotrices qui facilitent la transposition de leur séquence codante ou leur expression. Nous avons vu précédemment que lorsque les souches bactériennes expriment une β -lactamase de classe A, elles restent sensibles aux inhibiteurs de β -lactamases alors que les souches exprimant une métallo β -lactamases de classe B sont insensibles à tout l'arsenal antibiotique existant sauf la fosfomycine, les polymixines et tigecycline. Dans tous les cas, il sera

nécessaire de réaliser une identification de la carbapénémase et surtout explorer la sensibilité de la souche résistante avant de débiter l'antibiothérapie. La méthode de prise en charge la plus rigoureuse aujourd'hui reste l'identification de la carbapénémase rendant possible l'évaluation de la sensibilité de la bactérie par mesure des diamètres d'inhibition et interprétation des CMI.

c) Évaluation du risque en fonction de l'état de santé du patient

La symptomatologie du patient dépendra de l'espèce bactérienne acquise ainsi que de la porte d'entrée de l'infection. Enfin l'intensité du syndrome infectieux du patient, son risque de surmortalité dépendra de son état de santé préalable à sa contamination. L'étude de *Satlin and al* étudie le risque de surmortalité dans les trente jours qui suivent le diagnostic d'une bactériémie chez des patients infectés par *K. pneumoniae* porteuse de KPC dans la région de New-York et du New Jersey(48). Il en ressort que 50% des patients qui ont déclaré une bactériémie étaient traités pour cause de cancer ou recevaient un traitement de prévention de rejet de greffe. Dans une autre étude toujours menée par *Satlin and al* qui s'intéresse cette fois ci au développement des bactériémies chez les immunodéprimés recevant une greffe d'organe ou traités contre le cancer, l'incidence des infections à *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases chez les néo-greffés est estimée de 3 à 10% (49). Dans cette étude, le site d'infection correspond toujours à l'organe greffé : infection broncho pulmonaire après une greffe de poumon, bactériémie ou infection gastro-intestinale après une greffe de foie ou pancréas et l'incidence d'infections à entérobactériales résistantes aux carbapénèmes est comparable quel que soit l'organe greffé. Les patients qui reçoivent une greffe ont une surmortalité estimée à 37% et les bactériémies affectant les patients nouvellement greffés sont plus mortelles que les bactériémies touchant la population générale, très probablement à cause de l'immunodéficience des receveurs de greffe. L'épidémiologie des infections à *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases post transplantation hépatique a été étudiée et il est estimé que 5% des greffes hépatiques dans les régions endémiques des *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases se compliqueront d'une bactériémie. Le risque de mortalité chez les patients qui développent une bactériémie à *K. pneumoniae* productrices de carbapénémase est 5 fois plus important que chez les patients qui déclarent une bactériémie à bactérie sensibles aux antibiotiques(50).

Lorsque l'étude porte sur les patients recevant des greffes de moelle osseuse, il a été rapporté que même si une antibioprofylaxie a été faite, elle n'était pas adaptée au spectre de sensibilité de la bactérie résistante aux carbapénèmes chez les patients ayant déclaré une bactériémie. Sur les 18 patients qui ont déclaré une bactériémie, 3 sont morts avant d'avoir pu recevoir une antibiothérapie efficace, le temps d'identification biologique de la souche en cause étant estimé à 55 heures. Chez les 15 patients chez qui il a pu être administré une antibiothérapie documentée, 13 étaient neutropéniques et 9 sont décédés dans les 4 jours qui ont suivi la déclaration de la bactériémie. La mortalité provoquée par les infections à entérobactériales résistantes aux carbapénèmes chez les grands immunodéprimés estimée ici à 69% (49).

Yuanyuan and al (51) a étudié statistiquement les facteurs de risques associés à la déclaration d'une bactériémie à *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes ainsi que les facteurs de risques de mortalité associés à une bactériémie à EPC.

Une durée d'hospitalisation plus longue était associée à un risque plus important de mortalité due à une bactériémie à EPC : une médiane de 31 jours d'hospitalisation a été estimée pour les patients ayant déclaré une bactériémie à EPC au lieu de 19 jours pour les patients n'ayant pas déclaré de bactériémie à EPC. L'admission en soins intensifs est aussi un risque de mortalité accru en cas de bactériémie à EPC.

Nous pouvons dire qu'un état de santé dégradé pourrait donner un risque accru de développer une bactériémie à EPC potentiellement parce que les patients nécessitent une prise en charge en établissement de soin ou parce qu'ils peuvent nécessiter une prise en charge plus lourde comme le recours aux antibiotiques de large spectre (carbapénèmes), une ponction de moelle osseuse dans le cadre d'une allogreffe, sous entendant dans ce cas particulier une immunodépression.(51)

Nous le verrons dans la partie suivante, l'utilisation de dispositifs médicaux invasifs peut augmenter le risque de portage d'EPC.

d) Évaluation du risque en fonction du parcours du soin du patient

Les bactériémies à EPC sont souvent acquises en milieu hospitalier : Dans l'étude de *Satlin and al*, parmi les patients qui ont déclaré une bactériémie à EPC, 28 patients avaient subi un examen endoscopique invasif dont la majorité (71 %) étaient une cholangio-pancréatographie rétrograde. Vingt-quatre des 28 patients ayant réalisé une endoscopie n'avaient pas de culture positive avant de réaliser l'examen. Les EPC sur les appareils d'endoscopie ne sont donc pas détectables par les contrôles réalisés après désinfection des dispositifs médicaux.

Lors d'une étude prospective de 121 échantillons cliniques (48), 23% des patients qui ont passé une fibroscopie ont déclaré une bactériémie dans les 7 jours qui ont suivi. Parmi les patients qui ont déclaré une bactériémie à EPC, 86% d'entre eux n'étaient pas porteurs d'entérobactériales résistantes aux carbapénèmes avant de faire l'examen, ce qui peut attester d'une transmission des EPC via le matériel de fibroscopie.

Nous remarquons qu'il existe un risque de transmission d'EPC en utilisant les dispositifs médicaux à destination du tube digestif. Ici encore, même si les conditions de désinfection sont réunies, il existe toujours un risque de transmission des EPC et de déclaration d'infections systémiques sévères.

C. Quatre situations épidémiques à distinguer

Il existe quatre situations possibles de maîtrise de l'environnement de soin lors de l'identification d'un ou plusieurs porteurs d'EPC :

- Lorsqu'il existe deux ou plus de deux porteurs d'EPC dans un service, il s'agit d'une épidémie. Il est normalement nécessaire de répartir le personnel et les patients en trois secteurs : cas indemnes, cas contact et porteurs en plus de l'application des précautions contact complémentaires.

- Si un seul porteur d'EPC est identifié, que l'application des précautions complémentaires contact est suivie et qu'une équipe dédiée aux soins du porteur d'EPC sont déployés, il s'agit du plus haut niveau de maîtrise du risque épidémique.
- Lorsque l'application des précautions standard complémentaires est faite mais qu'il n'existe pas de personnel soignant dédié au patient porteur de carbapénèmases, nous nous retrouvons dans un niveau plus bas de gestion de la situation épidémique que décrit ci-dessus.
- La découverte du patient porteur d'une carbapénèmase peut encore être fortuite, lorsque le dépistage à l'admission n'est pas réalisé. L'application des précautions contact complémentaires n'est donc pas faite et il n'existe pas non plus d'équipe de soin dédiée. Le risque d'évolution de la situation vers une épidémie est fort.

Lorsqu'un cas de porteur d'EPC est identifié, le rapport du Haut Conseil de Santé Publique (HCSP) de 2018 (HCSP, 2018) décrit une prise en charge avec les précautions contact complémentaires (PCC) et en suivant une organisation de soin du type marche en avant comme le préconise les recommandations dans seulement 10% des cas. Les précautions contact complémentaires sont appliquées dans 41% des cas tandis que les précautions standards seules sont appliquées dans 43% des cas.

Dans le cas où il existe un contexte épidémique, pour les cas secondaires, la prise en charge initiale est faite uniquement par précautions standard dans 61% des cas contre uniquement 22% de cas incidents pris en charge par PCC.

D. Dépistage des patients concernés

Le dépistage du portage d'EPC concerne les patients qui ont été hospitalisés 24h ou plus à l'étranger. Les patients qui ont des antécédents de portage de BHRé doivent être également sujets au dépistage. Dans le cas d'une épidémie dans un service, les cas contacts doivent être soumis au dépistage. Tous les profils des patients énoncés ci-dessus sont considérés à risque de portage d'une EPC.

Le dépistage consiste en un écouvillonnage rectal. Si le patient est déclaré positif, les précautions contacts complémentaires s'appliquent. Si un cas contact est négatif à son admission, il faudra continuer d'effectuer un test de dépistage hebdomadaire aussi longtemps que durera son hébergement en établissement de soin. Un cas contact n'est plus considéré comme tel lorsque 3 tests de dépistages hebdomadaires sont négatifs.

Si le patient à risque de portage de bactéries résistantes aux carbapénèmes est négatif à son admission, il sera nécessaire de réitérer le dépistage à 24 ou 48 heures d'intervalle du premier écouvillonnage.

Plusieurs hypothèses sont à formuler si un patient à risque se positive pendant un séjour hospitalier :

- Il a pu être contaminé par un cas positif pendant son hospitalisation.
- Il a été détecté faux négatif au test de dépistage des EPC à son admission si la carbapénèmase exprimée par les entérobactérales avait un niveau d'expression plus bas que le seuil de sensibilité du test. Les EPC pouvaient peut-être coloniser un endroit du tube digestif non atteignable par les écouvillons au moment du dépistage négatif. Enfin, le recours à une antibiothérapie pendant le séjour hospitalier a pu augmenter le niveau

d'expression des carbapénèmases par les entérobactérales qui ont été sectionnées car résistantes aux antibiotiques utilisés.

Il est donc encore difficile aujourd'hui de prédire les profils de patients qui seront à risque de se positiver avant une admission.

Lorsqu'un cas positif est identifié dans un service, tous ses cas contacts doivent être dépistés une fois par semaine tant que le risque épidémique n'est pas contrôlé. Tous les cas contacts ou les cas positifs sont inclus dans un système de « contact tracing » informatisé qui permet de suivre leurs parcours de soin.

Le patient : qu'il soit sécréteur ou pas, doit être isolé en chambre simple munie de toilettes individuels. Les précautions contacts complémentaires et l'isolement s'appliquent pour chaque patient à risque. Le lavage des mains par friction à la solution hydroalcoolique avant de rentrer et avant de sortir de la chambre du patient doit être systématique pour le patient, les visiteurs et les soignants.

Le matériel de soin doit être stocké dans la chambre du patient en quantité limitée. Les gants à usage unique doivent être utilisés par les soignants lors de soins à risque d'exposition au sang ou tout autre liquide biologique. Le tablier à usage unique est utilisé lors de tout soin, doit être jeté après la réalisation du soin et suivi d'une friction des mains au gel hydroalcoolique. S'il existe un portage de bactéries multi résistantes au niveau pulmonaire, il sera nécessaire de rajouter les précautions gouttelettes par le port du masque chirurgical par le personnel soignant, les visiteurs et le patient.

Un personnel du service doit lui être dédié et le tracing des cas contacts doit être organisé : 3 écouvillonnages rectaux négatifs hebdomadaires sont nécessaires pour prétendre reprendre les transferts hospitaliers des cas contacts. Pour que les patients soient retirés de la liste cas contact, il est nécessaire d'obtenir un écouvillonnage rectal négatif en dehors de la période d'exposition au cas positif.

E. Clinique associée

Dans une majorité des cas, les bactéries qui acquièrent les carbapénèmases sont endogènes de la flore intestinale donc les patients porteurs de carbapénèmases peuvent être parfaitement asymptomatiques.

Dans le cas où la bactérie résistante aux carbapénèmes est pathogène, la symptomatologie dépend des facteurs de virulence de celle-ci. Les syndromes infectieux peuvent être des cystites, méningites, péritonites, pneumonies, pyélonéphrite, ou encore septicémies.

Le traitement des symptômes d'une infection à BHRe est compliqué par le manque d'alternative thérapeutique et la mortalité d'une bactériémie à BHRe est estimée à plus de 50%. Comme son acquisition reste en majorité nosocomiale, les facteurs aggravants liés à l'état pathologique du patient sont à prendre en considération dans la probabilité de guérison du patient.(52)

Une immunodépression pathologique ou provoquée par un traitement immunosuppresseur, une infection de l'arbre respiratoire sont des facteurs de risque de surmortalité provoqué par le portage d'EPC sur 30 jours d'hospitalisation.(52)

L'admission d'un patient en soins intensifs, la réalisation d'examens invasifs, l'utilisation des β -lactamines et fluoroquinolones récente ou l'existence d'infections sous-jacentes sont autant de facteurs de risque de déclarer une bactériémie à EPC. (52)

Concernant le risque de mortalité, il est significativement plus élevé chez les porteurs d'EPC par acquisition d'un gène de résistance plutôt que chez les porteurs de bactéries résistantes aux carbapénèmes à cause de la production d'une BLSE combinée à la diminution d'expression des porines.

Lorsqu'une bactérie a intégré un gène de résistance du type BLSE associé à la diminution de l'expression des porines, le risque de mortalité n'augmente pas dans les 30 jours après la déclaration de la bactériémie cela étant dû à la faible valeur sélective des bactéries qui possèdent cette combinaison de résistances.

Lorsqu'il existe une surmortalité due au portage de bactéries résistantes aux carbapénèmes mais non productrices de carbapénèmases, ceci peut être expliqué par l'administration d'une antibiothérapie non adaptée à la sensibilité de la bactérie.

F. Alternatives thérapeutiques(1)

Les alternatives thérapeutiques se discutent au cas par cas après documentation de l'antibiogramme puisqu'il existe autant de spectre de résistance aux carbapénèmes que de souches bactériennes ayant acquis la résistance.

Ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam, méropénème-vaborbactam, imipénème-cilastatine-relebactam, evaracycline, fosfomycine en IV sont les nouvelles alternatives thérapeutiques qui semblent garder une activité sur les carbapénèmases.

Le sulbactam a permis de combattre quelques infections causées par des souches d'*A.baumannii* productrices de carbapénèmases.

Les polymixines : polymixine B et colistine sont néphrotoxiques et neurotoxiques. Leurs propriétés pharmacocinétique et pharmacodynamique ont été récemment élucidées et la concentration thérapeutique optimale n'est pas encore complètement établie. L'étude de la sensibilité des souches aux polymixines est souvent compliquée parce que les méthodes comme l'E-test ou la mesure des diamètres d'inhibition ne fonctionnent pas. La colistine et la polymixine ne sont utilisées qu'avec prudence du fait de leur toxicité néphrologique et neurologique. De plus, les patients qui reçoivent une monothérapie à la colistine ont souvent des concentrations résiduelles infra-thérapeutiques favorisant l'émergence de nouvelles résistances. Les recommandations actuelles préconisent l'usage de la colistine ou polymixine en association à un antibiotique d'une autre classe.

Les aminoglycosides ont une faible pénétration dans l'arbre bronchique et leur toxicité rénale les font souvent utiliser à des doses infra-thérapeutiques. La gentamicine reste utilisée chez les patients atteints d'infections à bactéries Gram positif. L'amikacine est utilisée chez les patients atteints d'infections systémiques à bactéries Gram négatif (53). Les bactéries productrices de NDM sont souvent résistantes aux aminoglycosides. Après étude du spectre de résistance de la bactérie par l'antibiogramme, les aminoglycosides peuvent conserver une place dans l'arsenal thérapeutique,

toujours en association et sur une durée courte pour éviter leurs effets indésirables rénaux et cochléovestibulaires irréversibles.

La tigecycline a été développée pour traiter les infections à bactéries résistantes aux autres tétracyclines par mécanismes d'acquisition de plasmide ou de pompes à efflux. Bactériostatique, son usage n'est pas recommandé pour traiter les bactériémies. Son administration nécessite une mesure des concentrations plasmatiques très régulièrement. Pour éviter les doses infra thérapeutiques, les cliniciens optent souvent pour l'administration d'une double dose de tigecycline, mais tous les patients ne supportent pas les effets indésirables digestifs de l'antibiotique. La tigecycline n'atteint l'arbre bronchique et la circulation sanguine qu'avec une faible concentration. Elle n'est pas active sur le *P. aeruginosa*.

L'association ceftazidime-avibactam est une association qui fonctionne bien sur les bactéries productrices de β -lactamase de classe A comme KPC, sur la classe C ou enfin sur la classe D comme sur OXA-48 mais n'a aucune activité sur les β -lactamases de classe B comme NDM. Cette association est utilisable dans les infections sévères intra-abdominales, dans les infections urinaires compliquées, et dans les infections nosocomiales pulmonaires associées à la ventilation assistée.

Ceftolozane-tazobactam est une association d'une céphalosporine active sur *P. aeruginosa* et sur les entérobactériales productrices de BLSE mais pas sur toutes les carbapénèmases.

Meropenem - Vaborbactam est une association d'un carbapénème et de l'acide boronique qui est un inhibiteur compétitif réversible des β -lactamases. Il est actif sur les β -lactamases de classe A comme KPC mais pas sur les β -lactamases de classe B comme KPC ou VIM ou encore sur les classes D.

Le cefiderocol est une céphalosporine qui peut passer la membrane plasmique des bactéries Gram négatif jusqu'à l'espace périplasmique via un transporteur de fer bactérien. Cette molécule semblerait résister à l'hydrolyse d'un spectre large de β -lactamases : classe A : KPC, classe B : NDM, VIM, IMP, classe C : AmpC et classe D : OXA-48, OXA-23 et OXA-24.

Nous avons vu que l'adaptation de la thérapeutique au spectre de sensibilité des EPC peut être compliqué ou les alternatives thérapeutiques très restreintes. Ceci fait comprendre tout l'enjeu de la maîtrise de la propagation des BHRé dans l'environnement et aux hommes.

VI. Étude d'une épidémie d'entérobactériales productrices de carbapénèmases dans un service de chirurgie français

A. Contexte de l'étude

Depuis 2017, des patients porteurs d'EPC, NDM et OXA, ont été identifiés dans un service de chirurgie vasculaire du CHU de Bordeaux. En 2020, dans ce même service, la récolte d'échantillons environnementaux a été entreprise après l'identification de 11 cas d'EPC. Au total, dix-huit échantillons cliniques ou environnementaux ont été collectés au laboratoire de bactériologie et par l'équipe d'hygiène du CHU de Bordeaux. Pendant que notre équipe de microbiologie a étudié les modes d'acquisition et de transmission génétique de ces carbapénèmases par les quatre EPC en

cause dans l'épidémie : *C. freundii*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, l'équipe d'hygiène a souhaité savoir s'il s'agissait d'une épidémie de cas ou si la prévalence des cas d'EPC s'alignait avec les statistiques du territoire Français. Il s'agissait également de déterminer si la persistance des souches d'EPC dans l'environnement hospitalier constituait un facteur de risque de transmission d'EPC au patient.

Sachant que les carbapénèmases s'acquièrent via des éléments génétiques mobiles comme les plasmides et les transposons(8), le but de notre étude a été d'identifier précisément les carbapénèmases en cause dans l'épidémie, d'étudier leur environnement génétique et enfin de savoir par quel support génétique préférentiel se transmettaient les gènes *bla_{OXA}* et *bla_{NDM}*.

B. Matériels et méthodes

a) Antibiogrammes

Des antibiogrammes complets ont été réalisés sur la totalité des souches cliniques et environnementales. Ils ont permis d'étudier le spectre de résistance aux antibiotiques des souches collectées. Tous les antibiogrammes ont confirmé une résistance aux carbapénèmes. Sur milieu gélosé Muller Hinton (MH) ensemencés de cultures bactériennes fraîches de concentration correspondant à un MacFarland 0,5, des disques d'antibiotiques ont été déposés. La culture a été laissée 24h à l'étuve à 37°C. La lecture des diamètres d'inhibition a été réalisée selon les recommandations du CASFM 2021. (https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CASFM2020_Avril2020_V1.1.pdf) Les CMI ont été déterminées avec des bandelettes Etest (bioMérieux).

b) PCR

La PCR est une réaction de polymérisation en chaîne in vitro d'un fragment d'ADN. Pour se faire, le fragment d'ADN à amplifier est entouré de deux amorces spécifiques. L'enzyme nécessaire à l'amplification de l'ADN cible est une Taq polymérase : ici nous avons utilisé la GoTaq DNA Polymérase, Promega.

Toutes les préparations pour PCR ont été réalisées dans un volume réactionnel de 50µL :

- ADN cible 10µL
- Tampon réactionnel contenant la TaqPolymérase 25µL
- Amorce sens et anti-sens 2x1,25 µL
- Eau MilliQ : 12,5 µL

L'appareil *Biorad T100 Thermal Cycler* a été programmé pour réaliser 35 cycles d'amplification : Dénaturation à 95°C pendant 40 secondes, hybridation à 60°C pendant 40 secondes et élongation à 72°C pendant 1 minute. Une étape de prolongation de 10 minutes à 72°C a été ajoutée en fin de PCR. Les ADN cibles ont été obtenus à partir de cultures bactériennes de 24h desquelles nous avons extrait l'ADN par ébullition selon le protocole suivant : une suspension bactérienne a été réalisée dans 200µL d'eau MilliQ afin d'obtenir un trouble suffisant. Celle-ci a ensuite été vortexée puis portée à ébullition à 100°C pendant 10min. Après avoir refroidi la suspension dans de la glace, elle a été centrifugée 5min

à 10 000 rotations par minutes (rpm). Le surnageant correspondant au bouilli d'ADN a alors été récupéré.

Les amorces nécessaires à l'amplification de *bla_{NDM-5}* et *bla_{OXA-48}* ont été choisies suivant leur placement en amont, en aval ou à l'intérieur des gènes de manière à ce que nous puissions connaître la séquence chromosomique des gènes *bla_{OXA-48}* et *bla_{NDM-5}* ainsi que leur environnement génétique (**Tableau 2**).

Tableau 2: Amorces utilisées pour les PCR des gènes *bla_{OXA-48}* et *bla_{NDM-5}*

Nom de l'amorce	Gène amplifié	Commentaire	Séquence nucléotidique (5' → 3')
ISAb125 ext	<i>bla_{NDM-5}</i>	Sens	ACACCATTAGAGAAATTTGC
NDM -			GAAGCTGAGCACCGCATTAG
NDM +		Antisens	GGCCGTATGAGTGATTGC
bleR			GGGATGACAGCATCATCCG
OXA-48 A	<i>bla_{OXA-48}</i>	Antisens	TTGGTGGGCATCGATTATCGG
OXA-48 B		Sens	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC
OXA-48 F		Antisens	ATGCGTGTATTAGCCTTATCG
OXA-48 R		Sens	CTAGGGAATAATTTTTTCC
LysR-OXA-48		Sens	AAGAAAGCCTACAATCCTTG
Tnp1999		Sens	GCTGTTTAATCGTTTTAGG
TirOXA-48		Sens	GTTGTAGGATATTGGCTTCG
Fibfw	IncFib	Sens	GGAGTTCTGACACACGATTTTCGT
Fibrv		Antisens	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT
Nfw	IncN	Sens	GTCTAACGAGCTTACCGAAG
Nrv		Antisens	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC

Les produits de PCR ont été révélés par électrophorèse, technique permettant de séparer les fragments d'ADN selon leur rapport masse/taille. La migration sur gel s'est faite pendant 25 minutes sous impulsion d'un champ électrique de 3Volt/min. Composition du gel : Agarose 1%, Tampon 1X TBE : *TrisHCl*, *Acide borique*, *EDTA* et 4 à 6 µL de *SYBR Safe DNA Gel Strain* qui permet la lecture du gel sous UVs. 6µL du marqueur de taille d'ADN *SMARTladder* ont été ajoutés pour déterminer les tailles des amplicons obtenus.

c) Séquençage de l'ADN

Une découpe sous UV du gel d'électrophorèse puis une d'extraction de l'ADN a été faite avec le kit : Quiaquick Gel Extraction Kit (Quiagen). Nos échantillons avec une concentration en ADN proportionnelle au nombre de paires de bases à séquencer, ont été envoyés au séquençage au laboratoire Eurofins en Belgique. Une mesure préalable de la concentration en ADN des extraits a été réalisée au NanoDrop en ng/µL. La préparation de l'échantillon de séquençage a été faite en ajoutant un volume de produit de PCR et un volume d'amorce sens ou anti sens le tout ne dépassant pas 15µL. Le séquençage de nos PCR a été réalisé par la méthode de Sanger (terminaison de chaîne par didésoxyribonucléotide couplé à un fluorochrome). Les séquences obtenues sous 48 heures ont été

traitées par le logiciel de bio-informatique *Bioedit*. Les alignements ont été réalisés grâce à des séquences de référence disponibles sur la base de données Genbank. La séquence consensus a ensuite été analysée sur la plateforme BLAST du site NCBI pour connaître la nature exacte de l'ADN séquencé.

d) Conjugaisons

1. Conjugaison de l'isolat *E. coli* 6621 vers *E. coli* K12

Nous avons réalisé une conjugaison sur filtre 0,45µm (Millipore type HA) ainsi qu'une conjugaison en milieu liquide à partir de l'isolat d'*E. coli* 6621 possédant le gène *bla_{OXA-48}* vers une *E. coli* K12 Rif^R NAL^R. Après conjugaison, les colonies transconjugantes ont été mises en culture sur des géloses MH sélectives enrichies en Ampicilline 100 mg/L et en Rifampicine 300 mg/L

Après 24h à 37°C l'obtention de transconjugants a été recherchée.

La souche donatrice *E. coli* 6621 était résistante à l'Ampicilline et la souche réceptrice *E. coli* K12 était résistante à la Rifampicine et à l'acide nalidixique. Le milieu sélectif a donc été choisi en connaissant le spectre de résistance de la souche donatrice et de la souche réceptrice. La concentration des antibiotiques à ajouter au milieu gélosé MH a été calculé en fonction des CMI connues des souches bactériennes donatrice et réceptrice, figure 17.

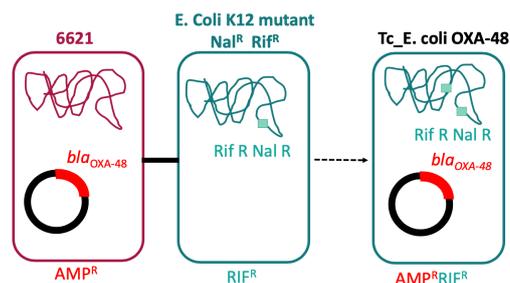


Figure 17: Schéma de la conjugaison de *bla_{OXA-48}* depuis l'isolat 6621 vers *E.coli* K12

2. Conjugaison d'*E. coli* 6611 vers *E. coli* C600

Les protocoles décrits en VI.B.d.(1) ont été suivis pour réaliser les conjugaisons de l'isolat *E. coli* 6611 contenant *bla_{NDM-5}* vers *E. coli* C600 résistant à l'azide de sodium. Seul le milieu de sélection des transconjugants a changé : les géloses MH ont été coulées avec de la ceftazidime à 2 mg/L et de l'azide de sodium à 300 mg/L.

e) Extraction de plasmide

Les extractions plasmidiques ont été réalisées selon la méthode *Miniscreen*. Cette méthode consiste en des étapes successives de lyse alcaline cellulaire (TGE, solution de lyse) rendant l'extraction des plasmides possible. Le PCIH permet de séparer les matières organiques bactériennes des matières polaires bactérienne dont fait partie l'ADN plasmidique et d'obtenir une interface contenant les protéines amphiphiles. Les dernières étapes étaient des étapes de précipitation de l'ADN puis de lavage à l'éthanol.

f) Transformation bactérienne

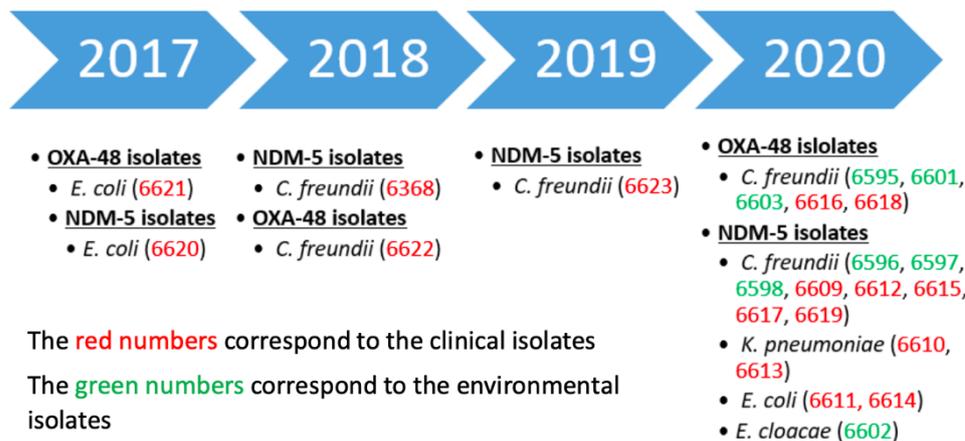
La transformation bactérienne a permis, via une décharge électrique, de transférer un plasmide dans une cellule compétente. Le but était de faire exprimer le gène contenu dans le plasmide par la bactérie compétente afin de prouver une acquisition du gène de résistance aux carbapénèmes via ce plasmide. Ici nous avons fait plusieurs transformations, les extraits plasmidiques des bactéries contenant les gènes *bla*_{OXA-48} et *bla*_{NDM-5} ont été transférés vers des *E. coli* TOP10. En préalable à la phase d'électroporation nous avons réalisé une phase de dialyse sur filtre 0,025 µm permettant de dialyser les extraits de plasmides en sels. L'électroporation a été faite directement dans une cuve contenant l'extrait plasmidique et la souche bactérienne compétente. L'appareil d'électroporation a été réglé sur 2.5V. Après la décharge, le contenu de la cuve d'électroporation a été remis en bouillon de culture et incubé à 37°C pendant une heure. Une étape de centrifugation a permis de concentrer les bactéries transformées qui ont étéensemencées sur des géloses sélectives MH contenant de la streptomycine 50 mg/L et de l'ampicilline 100 mg/L.

C. Résultats et discussion

a) Résultats préalables

Pour chaque isolat collecté, clinique ou environnemental, l'identification de la carbapénémase produite a été faite par immunochromatographie et/ou PCR. Une seule carbapénémase a été identifiée dans chaque isolat et seules les carbapénémases OXA-48 et NDM-5 ont été impliquées dans l'épidémie, figure 18(54).

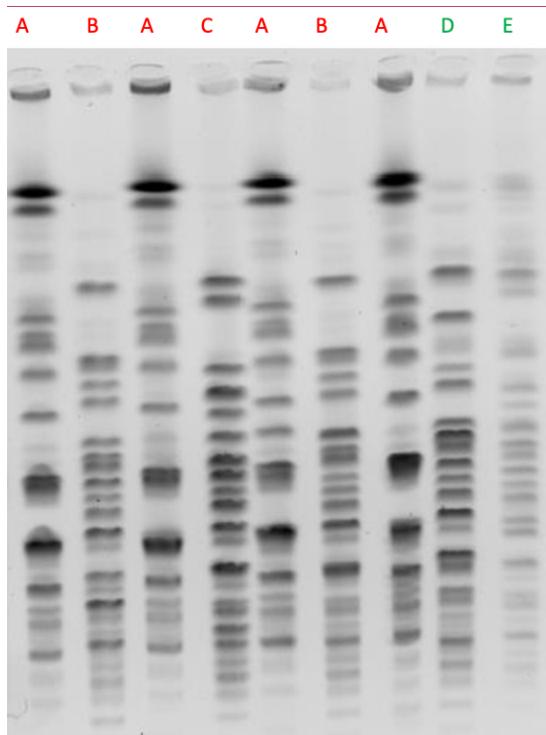
Figure 18 : Chronologie de la collecte des échantillons d'EPC



Une électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) a été réalisée sur toutes les espèces d'entérobactériales afin de déterminer les liens épidémiologiques existants entre les différents isolats collectés au cours du temps.

Concernant *bla*_{NDM-5}, les profils de migration des 9 échantillons de *C. freundii* nous ont permis d'identifier plusieurs pulsotypes A, B, C, D et E (figure 19) et de suspecter une transmission clonale inter-patient pour les 4 isolats de *C. freundii* possédant le pulsotype A. En interprétant les profils de PFGE en annexe 1, nous voyons que les deux échantillons environnementaux de *C. freundii* 6664 et 6598 récoltés en

2020 ont des profils électrophorétiques similaires aux échantillons cliniques de pulsotype A. Il en est de même pour l'échantillon clinique 6623 récolté en 2019 suggérant qu'il s'agit d'un clone de *C. freundii* qui aurait persisté depuis 2019 dans l'environnement avant d'être à nouveau transmis aux patients en 2020.

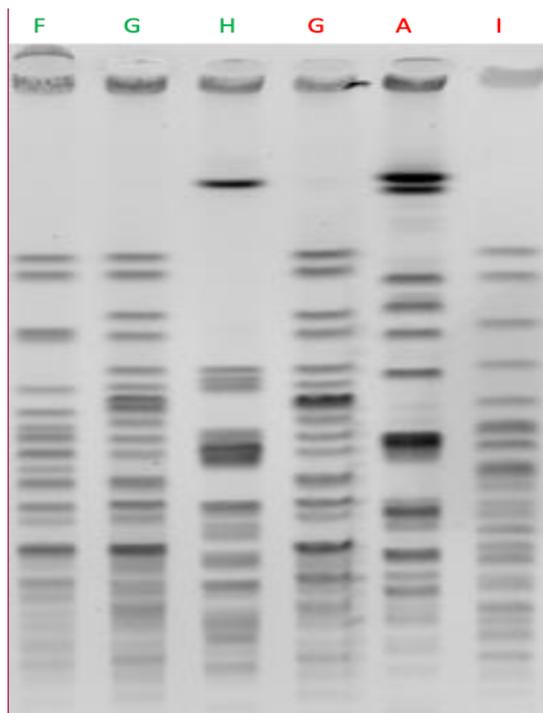


A : 6612, **B** : 6368, **A** : 6615, **C** : 6609, **A** : 6619, **A** : 6623, **D** : 6596, **E** : 6597

Figure 19 : PFGE des *C. freundii* $bla_{NDM-5}+$

Concernant les isolats contenant le gène bla_{OXA-48} , un pulsotype par souche a été identifié : A, I, G, F, H (Figure 20). Seul le pulsotype G isolé en 2018 chez un patient a de nouveau été identifié dans l'environnement en 2020.

Les liens épidémiologiques établis par l'étude des profils d'expression génétique des *C. freundii* ont suggéré la persistance des EPC dans l'environnement hospitalier, permettant peut-être d'une part la transmission du *C. freundii* porteur de bla_{OXA-48} pulsotype G et d'autre part la transmission des *C. freundii* porteurs de bla_{NDM-5} et de pulsotypes similaires.



F : 6601, G : 6603, H : 6595, G : 6622, A : 6616,
I : 6618.

Figure 20 : PFGE des *C. freundii* blaOXA-48 +

b) Étude de l'environnement génétique de *bla_{NDM-5}*

L'amplification du gène *bla_{NDM}* de la souche 6611 avec des amorces externes et internes a permis d'identifier le gène *bla_{NDM-5}*. La comparaison de la séquence obtenue à une séquence de référence *bla_{NDM-1}* (N° d'accès sur Gene Bank : FN_396876) a permis d'identifier deux mutations en position 262 (G→T) et 460 (A→C) responsables des 2 substitutions d'acides aminés chez NDM-5 : position 88 (VAL→LEU) et 154 (MET→LEU)(28). Ces deux substitutions seraient responsables d'un accroissement de l'activité hydrolytique de NDM-5 par rapport à NDM-1. (28)

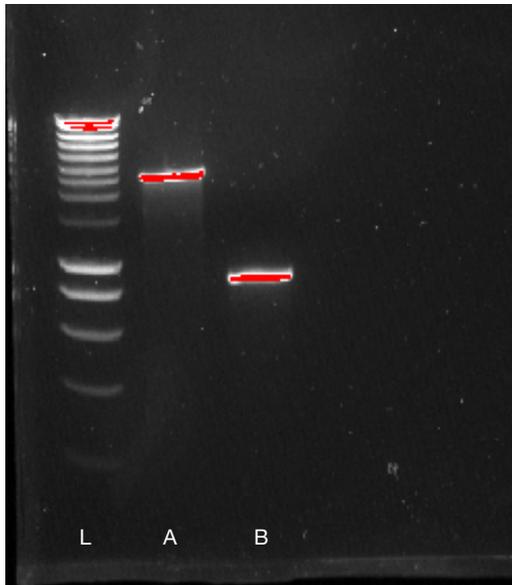
Les amorces externes au gène *bla_{NDM-5}* ont permis de séquencer l'environnement génétique en amont de *bla_{NDM-5}*. En effet, l'organisation partielle du gène *bla_{NDM-1}* est connue et il est précédé de la séquence d'insertion ISAb125 qui joue le rôle de son promoteur d'expression(55), figure 21.



Figure 21 : Environnement génétique du gène *bla_{NDM-5}* et placement des amorces

Lors de la migration des fragments de PCR obtenus avec les amorces *ISAb125ext* et *NDM+* (figure 22), nous avons observé un fragment de taille comprise entre 2000 et 2500 pb. Compte tenu de la taille de la séquence de *bla_{NDM-5}* (758 pb), nous avons cherché à déterminer la séquence qui précédait *bla_{NDM-}*

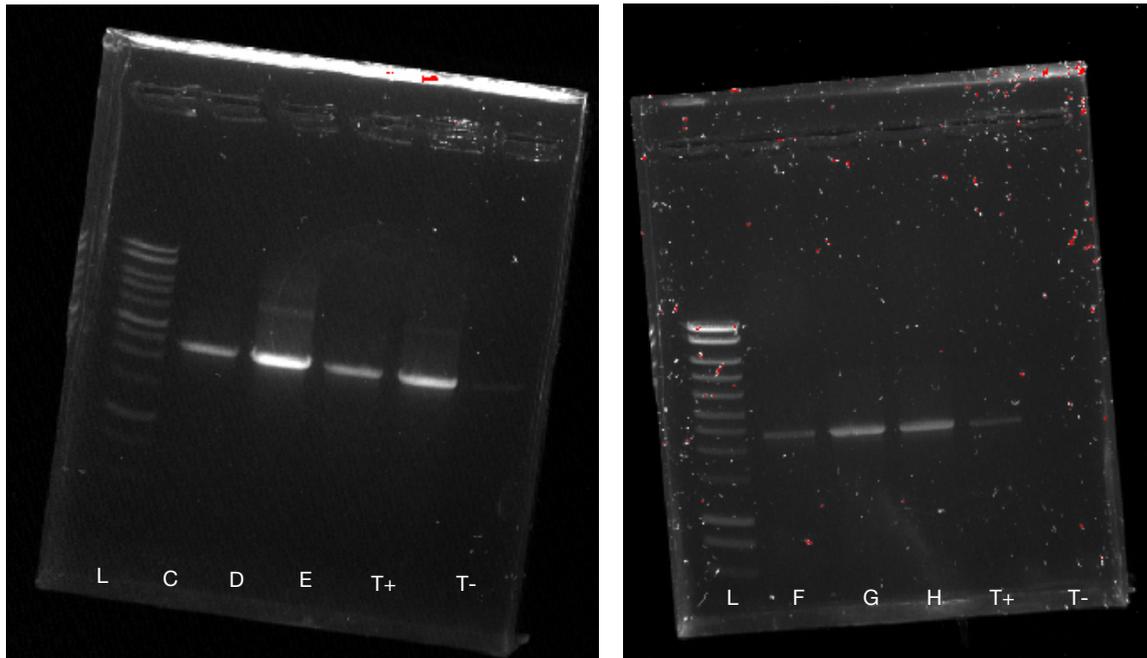
5.



L Marqueur de taille
A : 6611 (Amorces utilisées : *ISAb125ext* et *NDM (+) reverse*)
B : 6611 (Amorces utilisées : *BleR* et *NDM (-)*)

Figure 22 : PCR de *bla_{NDM-5}* de 6611

Après comparaison de la séquence consensus de *bla_{NDM-5}* obtenu avec l'ADN de l'isolat 6611 et la séquence de référence de *bla_{NDM-5}* (N° d'accès sur NCBI KF_220657)(37), nous avons constaté que le gène *bla_{NDM-5}* en cause dans notre épidémie était précédé par un IS-5 *like* avec 99% d'homologie de séquence avec la séquence de référence de l'IS5. Les PCR ont été pratiquées sur chaque espèce bactérienne et au moins sur 1 échantillon clinique et environnemental de chaque pulsotype différent. L'analyse des produits de PCR a montré des profils de migration similaires, quel que soit le pulsotype et la provenance des échantillons, suggérant que l'environnement génétique de *bla_{NDM-5}* était systématiquement le même dans tous les échantillons de notre étude et confirmant le lien et la transmission de la résistance d'un isolat à l'autre (figure 23).



Amorces utilisées : ISAb125ext et NDM (+)

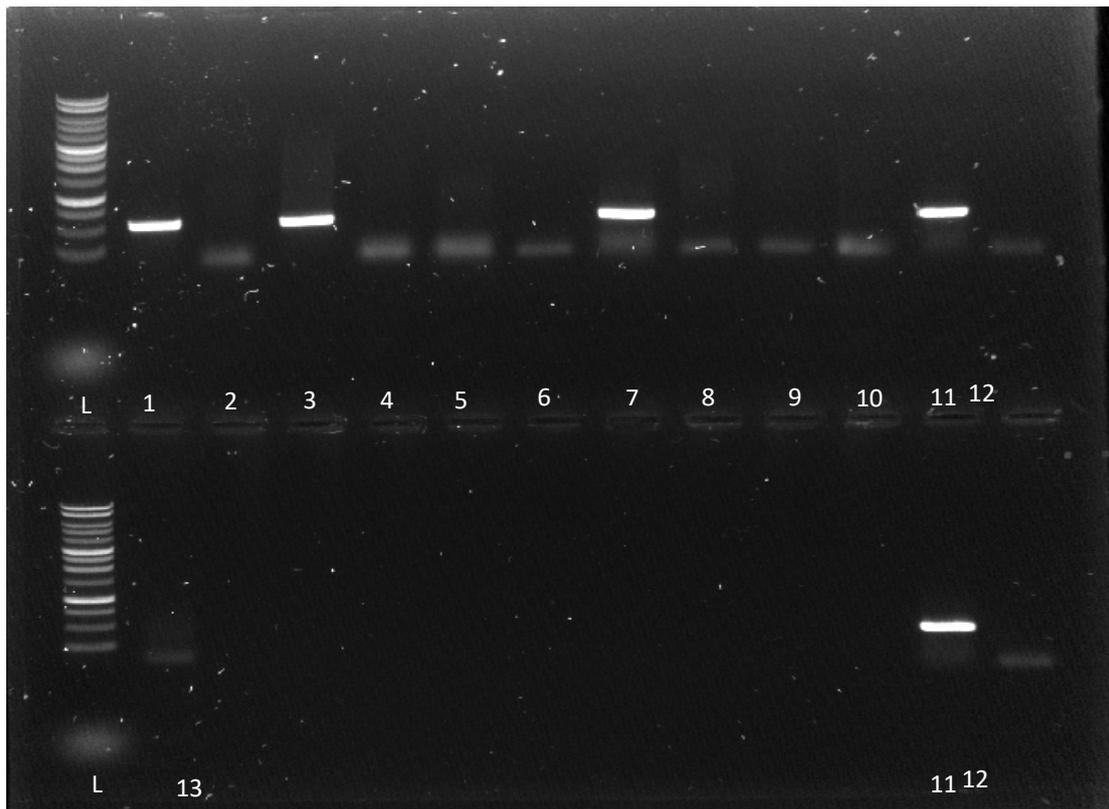
L : marqueur de taille C : 6596 D : 6597 E : 6598 F : 6609 G : 6612 H : 6617 T+ : 6611(Témoin +) T- : Témoin -

Figure 23 : PCR de souches cliniques et environnementales productrices de NDM-5

c) Étude du mode de transmission de *bla*_{NDM-5}

Afin de préciser que le support génétique permettant la transmission de *bla*_{NDM-5} était de nature plasmidique, nous avons réalisé des PCR sur ADN bouilli des souches chez lesquelles *bla*_{NDM-5} a été identifié. Sur des bases bibliographiques, nous avons sélectionné des groupes d'incompatibilité de plasmides déjà identifiés comme supports génétiques de *bla*_{NDM-1}(56) ou *bla*_{NDM-5}(57) ainsi que les amorces spécifiques de leurs groupes d'incompatibilité(58). Un plasmide du groupe d'incompatibilité IncA/C a d'abord été identifié chez les isolats de *C. freundii* 6596, 6598, et 6612, figure 24.

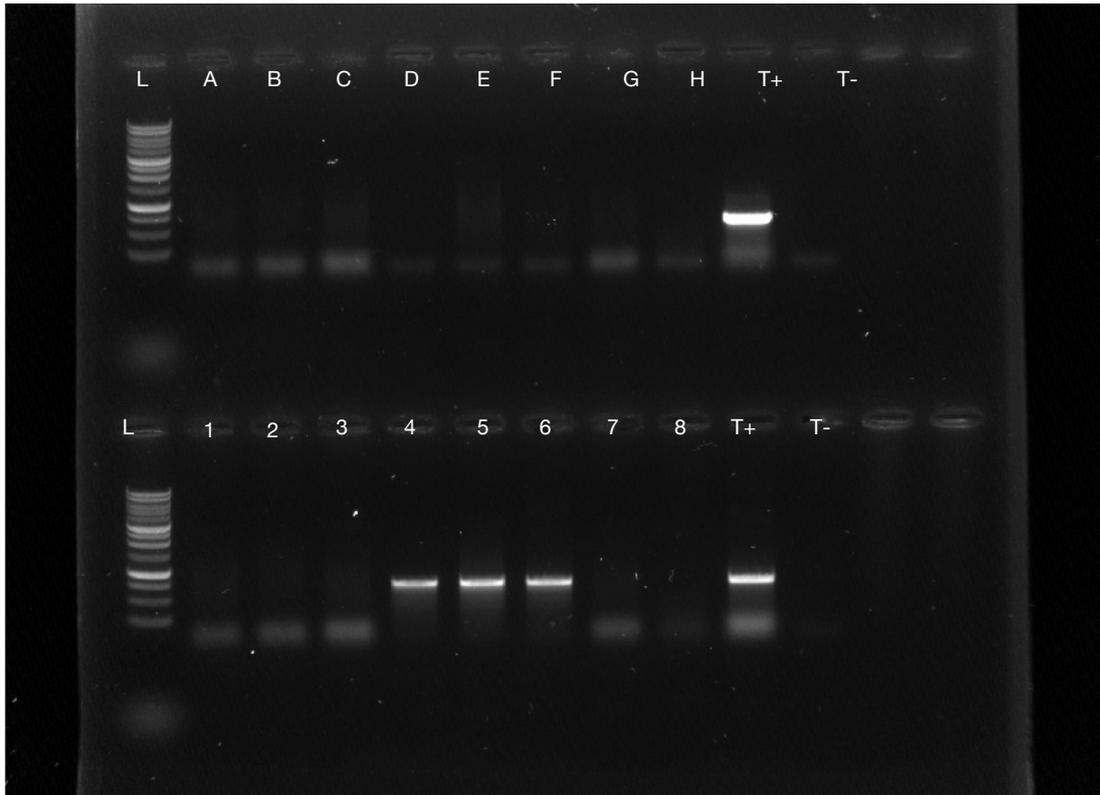
Cependant, les résultats des PCR d'ADN plasmidiques sont à prendre avec précautions puisque ce n'est pas parce que le plasmide est contenu dans la bactérie qu'il a forcément intégré le gène de résistance aux carbapénèmes.



L : marqueur de taille **1** : 6596 **2** : 6597 **3** : 6598 **4** : 6609 **5** : 6610 **6** : 6611 **7** : 6612 **8** : 6613 **9** : 6614 **10** : 6617 **11** : Témoin + 159 **12** : Témoin - **13** : 6620

Figure 24 : PCR pour les plasmides du groupe d'incompatibilité IncA/C

Il est intéressant de noter que pour un seul patient qui possédait les souches cliniques productrices de *bla_{NDM-5}*, 6609 (*C. freundii*), 6610 (*K. pneumoniae*) et 6611 (*E. coli*), seul l'isolat 6611 a été identifié comme possédant un plasmide IncN, figure 25.



A 6597 **B** 6609 **C** 6610 **D** 6611 **E** 6613 **F** 6614 **G** 6617 **H** 6620 **T+** 4189 témoin positif **T-** témoin négatif

1 6597 **2** 6609 **3** 6610 **4** 6611 **5** 6613 **6** 6614 **7** 6617 **8** 6620 **T+** Témoin positif 4194 **T-** Témoin négatif **L** marqueur de taille

Figure 25 : PCR pour les plasmides du groupe d'incompatibilité *IncFlb* et *IncN*

Ces observations ont suggéré que l'épidémie de souches possédant *bla_{NDM-5}* n'était peut-être pas lié à la diffusion d'un seul groupe d'incompatibilité de plasmides puisque plusieurs groupes d'incompatibilité de plasmides ont été retrouvés dans nos isolats. Il se pourrait aussi que *bla_{NDM-5}* soit contenu sur un plasmide de groupe d'incompatibilité dont nous n'avons pas encore réalisé les PCR.

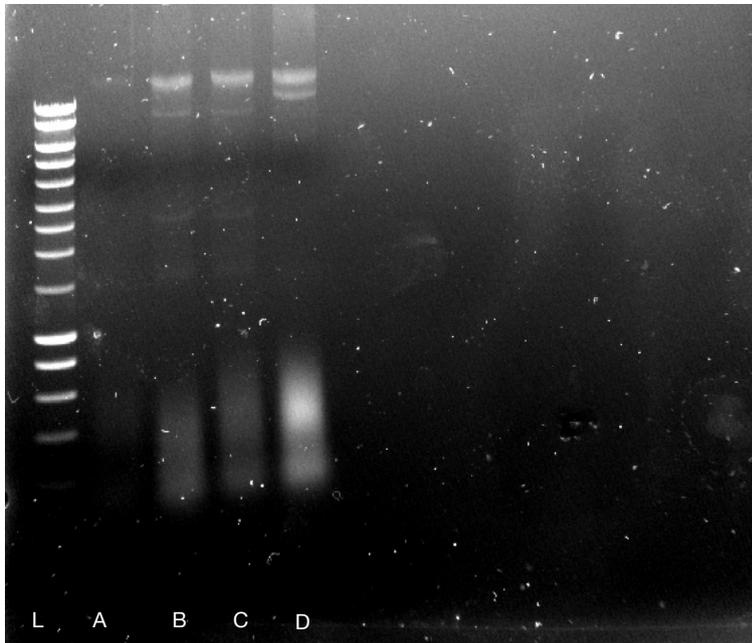
d) Conjugaison bactérienne, extraction de plasmides et transformation bactérienne

Des conjugaisons de plasmides depuis la souche *E. coli* 6611 productrice de NDM-5 vers les *E. coli* K12 résistantes à la rifampicine, et de la souche de *C. freundii* 6609 productrice de NDM-5 vers *E. coli* C600 résistantes à l'azide de sodium ont été réalisées. La sélection des transconjugants a été réalisée respectivement sur milieu MH contenant de la ceftazidime 2 mg/L / Azide de sodium 300 mg/L sans pouvoir observer de transconjugants.

Une première transformation d'extrait plasmidique depuis l'isolat de *C. freundii* 6609 vers la souche d'*E. coli* TOP10 n'a pas permis l'observation de transformants. Le support génétique responsable de la transmission de *bla_{NDM-5}* de la souche 6609 n'étant pas encore identifié, nous avons décidé de refaire

des transformations depuis la souche *C. freundii* 6612 qui contient un plasmide du groupe d'incompatibilité IncA/C vers les cellules *E. coli* TOP10.

Les extractions plasmidiques réalisées à partir des souches identifiées IncA/C⁺ par PCR ont permis de visualiser des plasmides de tailles variées, figure 26.



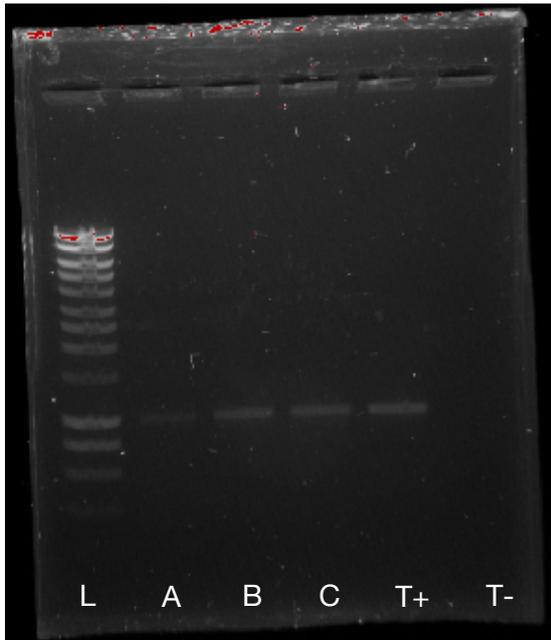
L : Marqueur de taille A : 6596 B : 6598 C : 6612 D : 50192 témoin positif

Figure 26 : Extraction de plasmides IncA/C des souches possédant *bla*_{NDM-5}

e) Étude de l'environnement génétique de *bla*_{OXA-48}

Pour étudier l'environnement du gène *bla*_{OXA-48}, nous avons réalisé des PCR (figures 27) grâce aux amorces sens Tnp1999 et OXA-48 F antisens externes au gène *bla*_{OXA-48} préalablement placées sur la séquence de référence (N° d'accès NC_019154.1).

D'après les profils électrophorétiques des PCR réalisées sur toutes les souches qui possédaient *bla*_{OXA-48}, qu'elles soient environnementales ou cliniques, nous avons montré la même organisation de l'environnement du gène *bla*_{OXA-48} (figure 28) sauf pour la souche environnementale de *C.freundii* 6601 (figure 29). Trois organisations de l'environnement génétique de *bla*_{OXA-48} ont été décrites dans la littérature (31) : la présence d'une IS1 en amont du gène *bla*_{OXA-48} pourrait expliquer la taille plus grande du fragment d'ADN obtenu par PCR avec la souche 6601, figure 30. Nous avons décidé d'envoyer au séquençage les amplicons d'ADN de 6601 (1796 pb) et de 6621 (981pb) pour comparaison. En effet, l'étude de la séquence de la souche 6601 sur *Bioedit* a permis d'identifier une IS1 en amont de *bla*_{OXA-48} similaire à la séquence de référence de *bla*_{OXA-48} précédé de l'IS1 : JN714122.1. L'acquisition de l'IS1 par la souche 6601 isolée en 2020 était unique dans notre étude, ce qui n'a pas permis de faire de lien épidémiologique direct avec les autres isolats possédant le même environnement génétique de *bla*_{OXA-48}.



L : marqueur de taille
 A : 6602 B : 6603 C : 6622 T+ : Témoin positif 6621
 T- : Témoin négatif

Figure 27 : PCR de l'environnement de *bla_{OXA-48}*

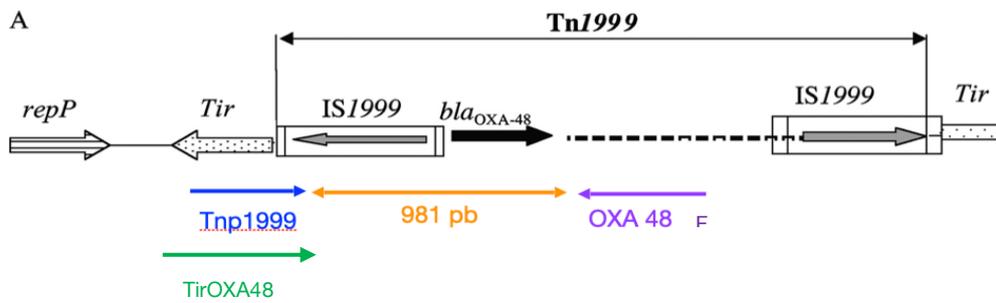
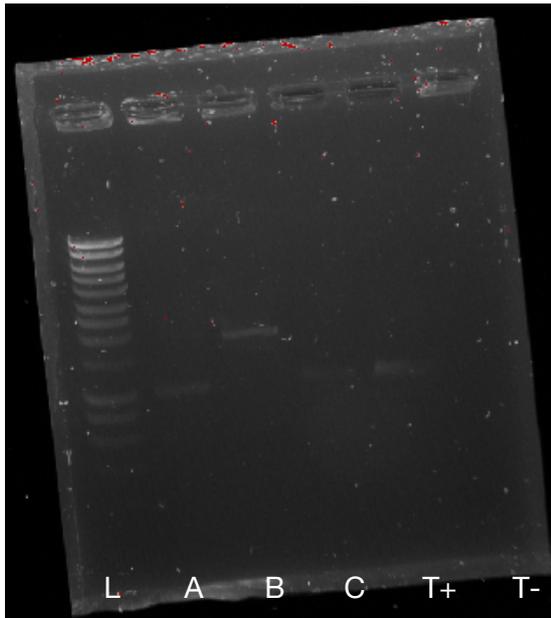


Figure 28 : Environnement génétique de *bla_{OXA-48}*(30)



L : marqueur de taille A : 6595 B : 6601 C : 6602
T+ : 6621 T- : Témoin -

Figure 29 : PCR de l'environnement de *bla_{OXA-48}*

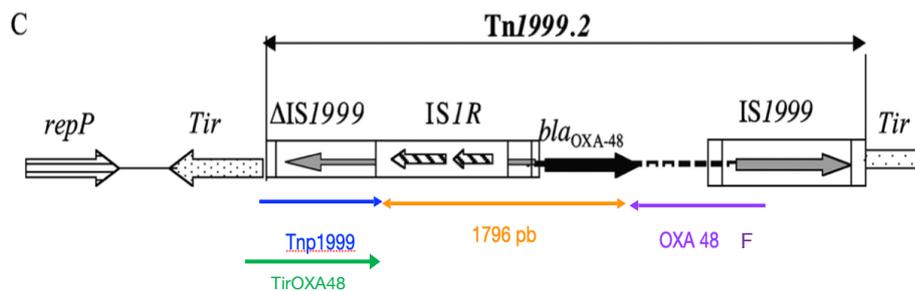
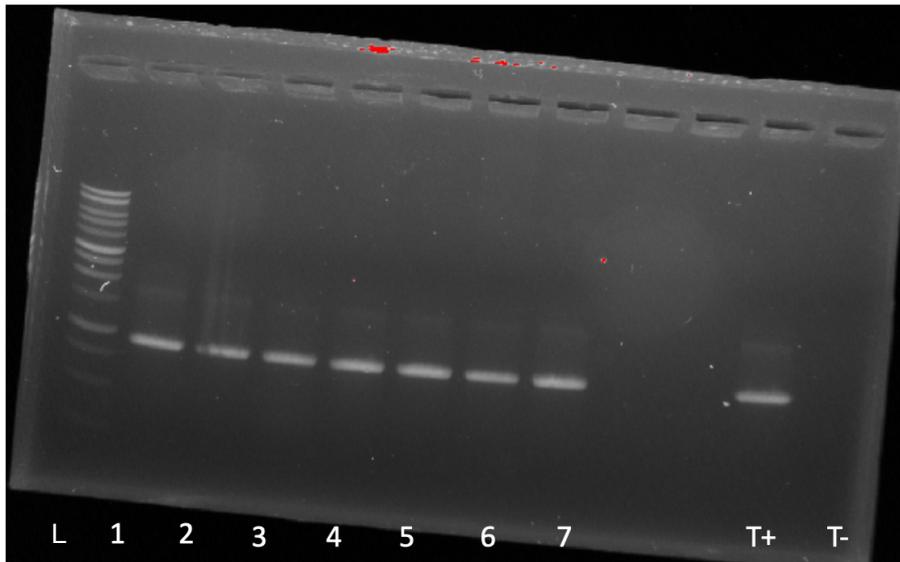


Figure 30 : Environnement génétique de *bla_{OXA-48}*

f) Étude du mode de transmission de *bla_{OXA-48}*

Nous avons entrepris de réaliser des PCR avec les amorces RepA/A et RepA/B qui ont révélé la présence de plasmides du groupe d'incompatibilité IncL/M dans toutes les souches cliniques et environnementales possédant le gène *bla_{OXA-48}* (profil de migration électrophorétique identique quelle que soit la souche), figure 31.



L : marqueur de taille 1 : 6595 2 : 6601 3 : 6602 4 : 6603 5 : 6616 6 : 6620 7 : 6622
 T+ : Témoin positif 6621 T- : Témoin négatif

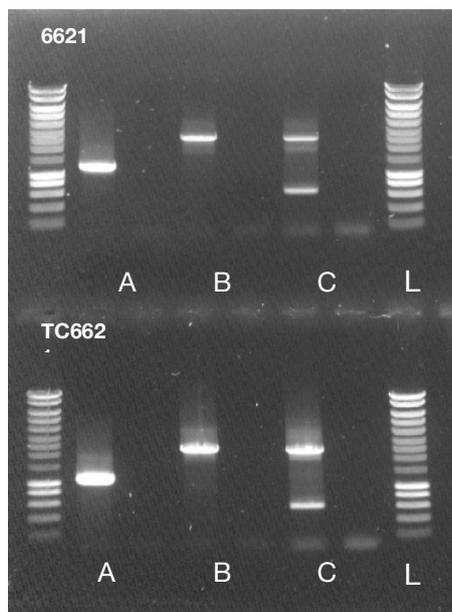
Figure 31 : PCR pour les plasmides du groupe d'incompatibilité IncL/M sur les souches possédant *bla_{OXA-48}*

g) Conjugaison bactérienne, extraction de plasmide, et transformation bactérienne

Des conjugaisons entre l'isolat clinique d'*E. coli* 6621 et *E. coli* K12 ont permis d'observer des transconjugants (TC6621) sur milieu MH sélectif enrichi en Ampicilline 100 mg/L et Rifampicine 300 mg/L. Le gène *bla_{OXA48}* a donc été transmis via un plasmide vraisemblablement du groupe d'incompatibilité IncL/M chez toutes les souches cliniques et environnementales recueillies pendant notre étude. Les produits de PCR obtenus à partir de 6621 et TC 6621 (figure 32) étaient identiques, nous permettant de conclure que la conjugaison est bien obtenue. Les produits de PCR obtenus avec les amorces TirOXA48 et OXA48F montrent deux fragments d'amplifications, nous n'avons pas encore trouvé d'interprétation à cette observation. Les amorces TirOXA48 et OXA48F sont placées sur les schémas figures 28 et 30.

La transformation d'*E. coli* TOP10 par l'extrait plasmidique obtenu à partir de la souche d'*E. coli* 6621 a permis d'obtenir des transformants produisant l'OXA-48. Les colonies bactériennes transformées ont été appréciées sur les antibiogrammes, figure 34 : la résistance à l'Ampicilline et surtout la diminution du diamètre d'inhibition significative pour l'ertapénème prédictive de l'acquisition d'une carbapénémase ont été deux arguments en faveur de la transformation des *E. coli* TOP10. Par la suite nous avons confirmé la présence d'OXA-48 chez les *E. coli* TOP10 par un test rapide d'identification immunochromatographique spécifique de l'OXA-48, figure 33.

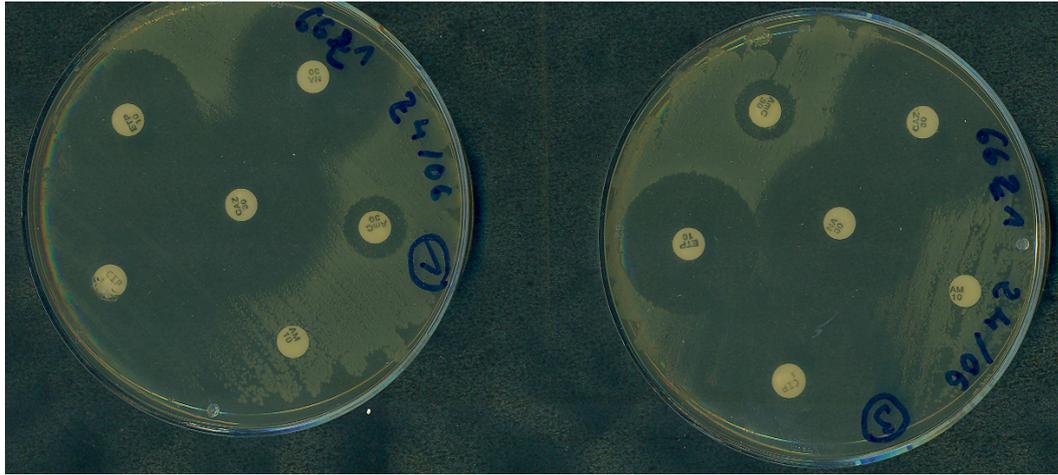
Figure 32 : PCR de l'environnement de bla_{OXA-48} sur *E.coli* 6621 et sur les TC 6621



L : marqueur de taille
A : LysROXA48 et OXA48F
B : Tnp1999 OXA48 et OXA48F
C : TirOXA48 et OXA48F



Figure 33 : Test rapide d'identification d'OXA-48 chez *E.coli* TOP10 transformées.



(ETP: ertapénème, CAZ : ceftazidime, AmC : amoxicilline/acide clavulanique, NA : acide nalidixique, AM : Ampicilline, CIP : ciprofloxacine).

Figure 34 : Antibiogrammes des transformants *E. coli* TOP10 obtenus avec l'extrait plasmidique de l'isolat d'*E. coli* 6621

D. Perspectives

Concernant l'épidémie à carbapénémase NDM-5, les PCR des ADN plasmidiques des groupes d'incompatibilités IncX et IncII n'ont pas encore été réalisées. En effet, un plus grand nombre de PCR, permettrait d'identifier le groupe d'incompatibilité des plasmides responsables de l'acquisition de *bla*_{NDM-5} par les isolats de *C. freundii* 6597, 6368, 6609, 6610, 6615, 6617, 6619, 6620 et 6623. Nous orienterons nos recherches vers l'identification de ce groupe d'incompatibilité selon les nouvelles données bibliographiques qui décrivent une association d'IS5 et de NDM-5 contenu par un plasmide du groupe d'incompatibilité IncX3 disséminé dans l'environnement de cultures maraichères chinoises et responsable du portage intestinal d'EPC par les agriculteurs(59).

Nous essaierons une transformation du gène *bla*_{NDM-5} de la souche de *C. freundii* 6612 vers des *E. coli* TOP10 afin de confirmer que la transmission génétique de *bla*_{NDM-5} passe par un support génétique de type plasmide.

Concernant les patients chez lesquels plusieurs espèces bactériennes productrices de NDM-5 ont été identifiées mais chez lesquelles il n'a pas été retrouvé le plasmide porteur du gène *bla*_{NDM-5}, il est possible que les bactéries aient acquis *bla*_{NDM-5} en dehors de l'organisme du patient comme via l'environnement par exemple.

Bien qu'aucun groupe d'incompatibilité de plasmides n'ait été retrouvé chez une majorité d'entérobactériales productrices de NDM-5, nous avons pu noter l'existence qu'au moins 2 souches cliniques de *C. freundii* (de pulsotype A et B) ayant une transmission inter-patients. Les *C. freundii* ayant un pulsotype A semblent correspondre à l'épidémie de souche persistante depuis 2019.

Concernant l'épidémie à carbapénémase OXA-48, nous avons confirmé une épidémie de plasmides. L'acquisition de *bla*_{OXA-48} par les souches environnementales et cliniques se fait par un plasmide appartenant au groupe d'incompatibilité IncL/M. Une PCR du groupe d'incompatibilité IncL/M sur les transconjugants TC6621 pourrait être réalisée afin d'avoir la certitude de l'origine plasmidique de

l'épidémie à carbapénèmase OXA-48. L'existence de 2 clones de *C. freundii* de pulsotype G retrouvés respectivement dans l'environnement et en clinique nous a permis de supposer qu'il a sûrement existé une persistance du *C. freundii* isolé chez un patient en 2018 dans l'environnement puisque nous avons retrouvé son clone en 2020 dans un échantillon environnemental.

Finalement, notre étude décrit des modes variés d'acquisition des gènes de résistance aux carbapénèmes selon la classe de carbapénèmase. Le gène *bla_{OXA-48}* semble être acquis selon une épidémie de plasmide. L'étude des modes d'acquisition génétique des carbapénèmases montre d'une part que les carbapénèmases ont des supports génétiques permettant leur transmission rapide et performante. D'autre part que les bactéries résistantes ont une certaine capacité à persister dans l'environnement. La maîtrise de cet environnement pourra devenir une priorité dans la lutte contre l'expansion des carbapénèmases et des résistances aux antibiotiques. La biologie moléculaire des gènes de résistances aux carbapénèmes traduit de multiples combinaisons de promoteurs d'expression permettant encore aux gènes de résistance d'accroître leur robustesse de transmission ou encore d'élargir leur spectre de résistance.

Il serait intéressant de savoir quel était l'état clinique des patients au moment de leur admission et pendant leur hospitalisation afin de voir si les facteurs de risques de développer une infection aux EPC déjà identifiés (immunodépression, antibiothérapie récente, âge, par exemple) étaient aussi présents chez les patients desquels provenaient les échantillons cliniques de l'étude.

Conclusion générale

Dans ce travail, nous avons revu la constitution de la famille des β -lactamines et les résistances qui pouvaient être exprimées par les entérobactérales. Nous avons vu que ces résistances pouvaient être naturelles mais que ce sont les résistances acquises qui constituent une réelle menace de santé publique. Nous pouvons rappeler que l'utilisation des antibiotiques n'a pas cessé d'augmenter entraînant par la même occasion la sélection des souches bactériennes qui leur sont résistantes. Aujourd'hui, si les alternatives thérapeutiques sont peu nombreuses lorsqu'il s'agit de traiter des infections sévères à BMR ou BHRé, il semblerait que la solution pérenne puisse se trouver dans l'utilisation modérée et d'avantage documentée des antibiotiques.

Les BHRé sont plutôt transmissibles en établissement de santé surtout chez les patients immunodéprimés ou âgés ou accidentés. Dans certaines régions du globe, elles sont déjà endémiques et responsables d'épidémies communautaires, comme les EPC NDM en Inde. Elles se transmettent depuis l'environnement à l'homme notamment par les bactéries résistantes qui se trouvent dans les eaux usées ou qui contaminent les dispositifs médicaux comme les endoscopes. La transmission interhumaine se fait par manuportage principalement. L'homme est dans la majorité des cas porteur asymptomatique : les entérobactérales étant commensales du tube digestif en grande majorité. Pour prévenir la contamination interhumaine à bas bruit, il serait nécessaire d'harmoniser les recommandations de dépistage de patients à risque à leur entrée en établissement de soin.

Des cas d'épidémies à EPC ont été recensées dans le monde entier. La transmission interhumaine des souches résistantes et de l'homme vers l'environnement est rendue possible grâce à des supports

généétiques transposables comme les plasmides ou les séquences d'insertion. L'étude précise de leur composition permet d'établir le mécanisme de transmission favori d'une carbapénèmase : s'agit-il d'une épidémie de plasmides ou d'une épidémie de souche ?

Dans l'étude que nous avons réalisée, nous rappelons que nous avons 23 échantillons cliniques ou environnementaux récoltés sur la période de 2017 à 2020 dans un service de chirurgie vasculaire à Bordeaux. Chacun exprimait une seule carbapénèmase : soit OXA-48 soit NDM-5. Chez un patient ont été collectés 3 espèces d'entérobactérales contenant une même carbapénèmase attestant de la transmission du gène de résistance entre les bactéries. Encore plus intéressant, une même souche bactérienne a été retrouvée chez un patient puis dans un échantillon environnemental et ceci pour chaque carbapénèmase. Cette observation confirme la persistance des entérobactérales dans l'environnement et leur pouvoir de transmission efficace.

Concernant les chiffres de cette étude, nous pouvons compter 7 isolats OXA-48 (30%) et 16 isolats NDM-5 (70%), ce qui, en proportion par carbapénèmase, peut traduire que la carbapénèmase NDM-5 gagne du terrain en proportion par rapport à la carbapénèmase OXA-48 pourtant majoritaire en prévalence selon les chiffres statistiques français. Maintenant, par espèce d'entérobactérales, nous pouvons constater que c'est l'espèce *C. freundii* qui est porteuse en majorité de carbapénèmase, soit OXA-48 soit NDM-5.

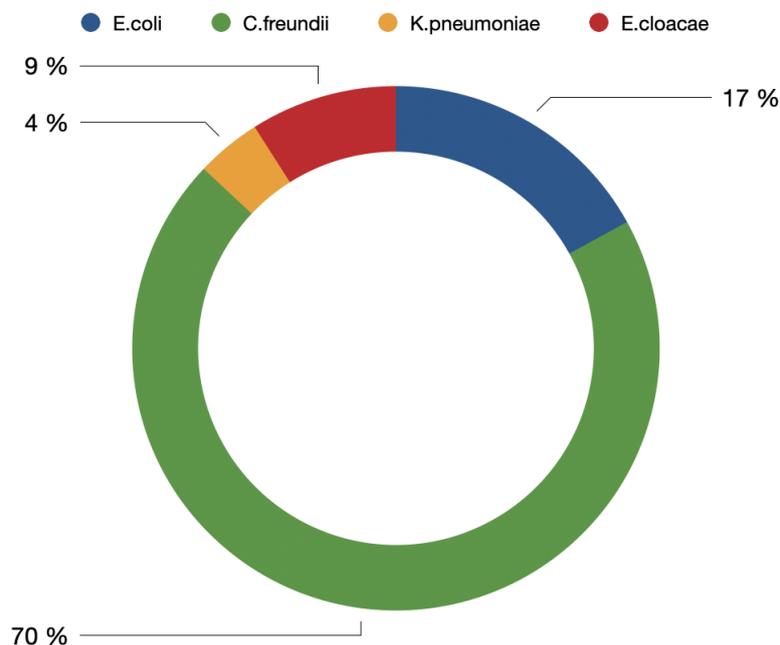


Figure 35 : Diagramme des fréquences d'expression de carbapénèmase en fonction de l'espèce d'entérobactérale dans cette étude.

Il serait bien sûr nécessaire de réaliser des statistiques plus rigoureuses pour pouvoir l'affirmer, notamment savoir si l'échantillon d'isolats à notre disposition dans l'étude est assez grand pour pouvoir interpréter les résultats des statistiques.

Concernant l'épidémie d'EPC NDM-5, il s'agirait en partie d'une épidémie de souche dont nous n'avons pas encore trouvé le support de transmission génétique responsable de la diffusion de *bla_{NDM}*.

5. Concernant l'épidémie de plasmides OXA-48, il a été obtenu des conjugaisons et transformations qui permettent d'affirmer que les souches OXA-48 se sont transmises par un plasmide de groupe d'incompatibilité IncL/M, décrit dans la littérature comme porteur des gènes *bla*_{OXA-48 like}.

Cette étude d'épidémie d'EPC a montré que les modes de transmission des résistances pouvaient être multiples et complexes : 2 environnements génétiques de *bla*_{OXA-48} ont été décrits, attestant du remaniement constant des gènes de résistance provoqué par les mécanismes d'échange de matériel génétique horizontaux multiples. Ces échanges, nous le rappelons, sont permis par les plasmides, les séquences d'insertions, les transposons ou encore les intégrons.

Cette étude permet de confirmer les chiffres statistiques concernant les espèces bactériennes résistantes aux carbapénèmes. Notre travail permet surtout constater que la transmission des gènes de résistance aux carbapénèmes semble être privilégiée en milieu hospitalier.

La persistance des souches résistantes dans les sanitaires des chambres du service pose toujours l'interrogation de savoir s'il s'agit des patients qui ont contaminé les sanitaires quand ils étaient porteurs ou est ce qu'ils ont été contaminés pendant leur séjour hospitalier ?

Quoi qu'il en soit, si la chronologie de l'épidémie est difficilement interprétable à posteriori, l'étude des gènes de résistance aux carbapénèmes permet d'établir les liens épidémiologiques qui relient les souches bactériennes résistantes.

Travaux cités

CA-SFM/EUCAST. (2022, mai). Récupéré sur [sfm-microbiologie.org](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2022/05/CASFM2022_V1.0.pdf): [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2022/05/CASFM2022_V1.0.pdf?](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2022/05/CASFM2022_V1.0.pdf)

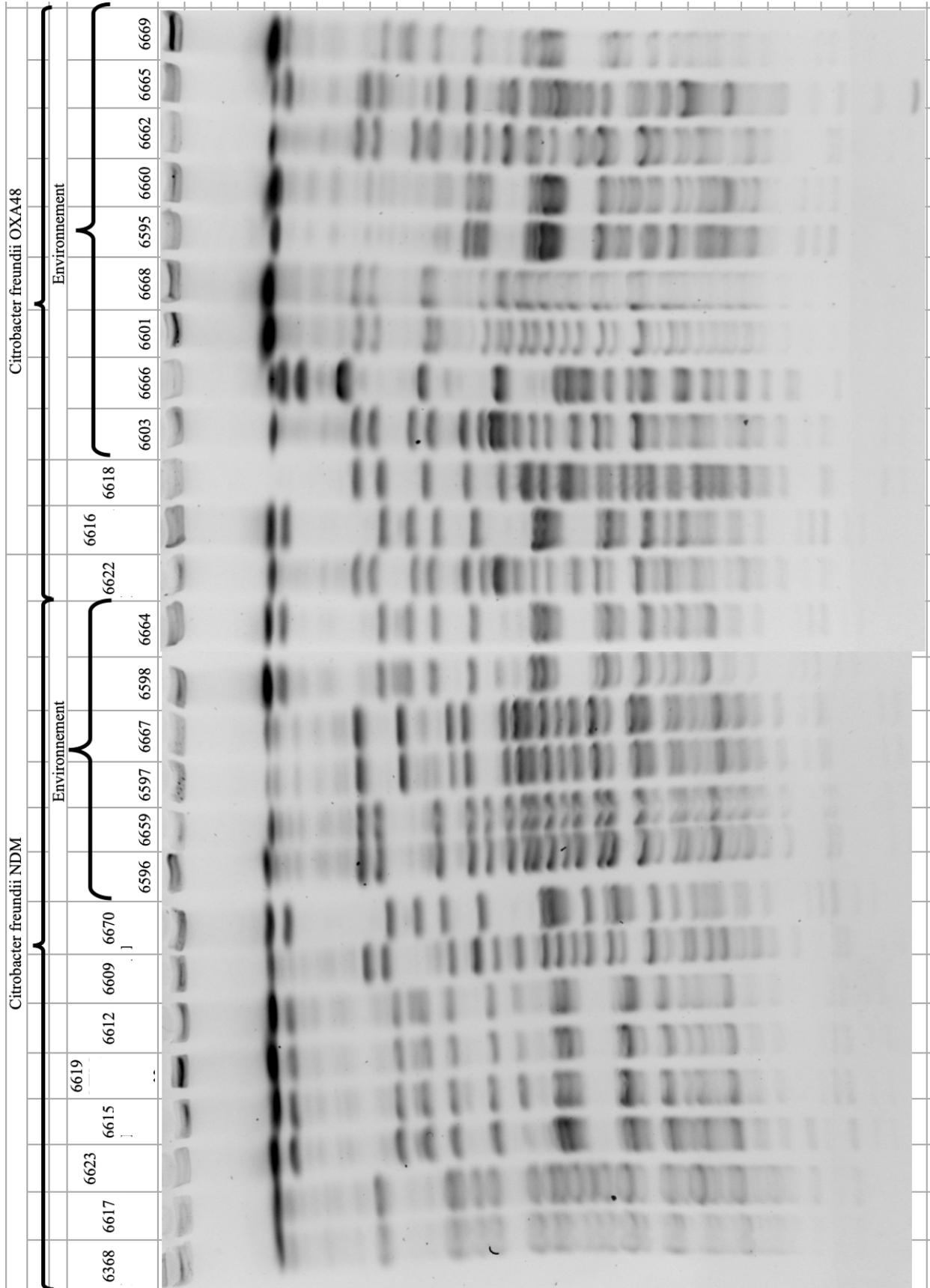
CMIT. (2020). *ECN.Pilly. 27ème ed.* Alinéa plus.

CNR de résistance aux antibiotiques. (2018). Récupéré sur [cnr-resistance-antibiotiques.fr](https://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Rapport_CNR_2018v1.pdf): https://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Rapport_CNR_2018v1.pdf

CNR des résistances aux antibiotiques. (2019-2020). *cnr-resistance-antibiotiques.fr*. Récupéré sur https://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Rapport_CNR_RA_2019_2020v2.pdf

HCSP. (2018). *hcsp.fr*. Récupéré sur <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/dra2018.pdf>

Annexe 1 : Profil des PFGE des *Citrobacter freundii* producteurs d'OXA-48 ou NDM-5 provenant d'échantillons cliniques et environnementaux.



Bibliographie

1. Aminov R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology*. juin 2017;133:4-19.
2. Gutmann L, Williamson R. Paroi bactérienne et bêta-lactamines. *Med Sci (Paris)*. 1987;3(2):75.
3. Modai J. Pénétration des antibiotiques dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) chez l'homme. :12.
4. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. août 2016;6(8):a025247.
5. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1 nov 2010;36:S8-14.
6. Yao X, Doi Y, Zeng L, Lv L, Liu JH. Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1. *The Lancet Infectious Diseases*. mars 2016;16(3):288-9.
7. Li X, Fu Y, Shen M, Huang D, Du X, Hu Q, et al. Dissemination of bla_{NDM-5} gene via an IncX3-type plasmid among non-clonal *Escherichia coli* in China. *Antimicrob Resist Infect Control*. déc 2018;7(1):59.
8. Conlan S, Thomas PJ, Deming C, Park M, Lau AF, Dekker JP, et al. Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Science Translational Medicine*. 17 sept 2014;6(254):254ra126-254ra126.
9. Grinstead J, De La Cruz F, Schmitt R. The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. *Plasmid*. nov 1990;24(3):163-89.
10. Tavakoli N, Comanducci A, Dodd HM, Lett MC, Albiger B, Bennett P. IS1294, a DNA Element That Transposes by RC Transposition. *Plasmid*. juill 2000;44(1):66-84.
11. Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional Characterization of Tn 4401, a Tn 3 -Based Transposon Involved in bla_{KPC} Gene Mobilization. *Antimicrob Agents Chemother*. nov 2011;55(11):5370-3.
12. Ploy MC, Lambert T, Couty JP, Denis F. Integrins: an Antibiotic Resistance Gene Capture and Expression System. *cclm*. 11 juin 2000;38(6):483-7.
13. Nagai K, Davies TA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Effects of Amino Acid Alterations in Penicillin-Binding Proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP Affinities of Penicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Cefditoren, Cefuroxime, Cefprozil, and Cefaclor in 18 Clinical Isolates of Penicillin-Susceptible, -Intermediate, and -Resistant Pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother*. mai 2002;46(5):1273-80.
14. Hakenbeck R, Tarpay M, Tomasz A. Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. mars 1980;17(3):364-71.
15. Martínez-Martínez L. Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. *Clinical Microbiology and Infection*. janv 2008;14:82-9.
16. Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD. High-Level Carbapenem Resistance in a *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate Is Due to the Combination of bla_{ACT-1} β -Lactamase Production, Porin OmpK35/36 Insertional Inactivation, and Down-Regulation of the Phosphate Transport Porin PhoE. *Antimicrob Agents Chemother*. oct 2006;50(10):3396-406.
17. Bonomo RA. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*. janv 2017;7(1):a025239.
18. Cattoir V. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*. déc 2004;52(10):607-16.
19. Poole K. Efflux-mediated multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. janv 2004;10(1):12-26.
20. Li XZ, Nikaido H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. 2009;69.
21. Grkovic S, Brown MH, Skurray RA. Regulation of Bacterial Drug Export Systems. *Microbiol Mol Biol Rev*. déc 2002;66(4):671-701.
22. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. mars 2010;54(3):969-76.
23. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, et al. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 18 oct 2008;63(1):1-4.
24. Fournier S, Lepointeur M, Kassis-Chikhani N, Huang M, Brun-Buisson C, Jarlier V, et al. Link Between Carbapenemase-Producing *Enterobacteria* Carriage and Cross-Border Exchanges: Eight-

- Year Surveillance in a Large French Multihospitals Institution. *J Travel Med.* 1 sept 2012;19(5):320-3.
25. Biez L, Bonnin RA, Naas T, Dortet L. Characterization of VIM-1-, NDM-1- and OXA-48-producing *Citrobacter freundii* in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 31 mars 2022;77(4):1199-201.
 26. Antibiorésistance en France en 2021 : une menace sous surveillance / Antimicrobial resistance in France in 2021: A threat under close observation. 2021;49.
 27. Cheng Z, Bethel CR, Thomas PW, Shurina BA, Alao JP, Thomas CA, et al. Carbapenem Use Is Driving the Evolution of Imipenemase 1 Variants. *Antimicrob Agents Chemother.* 18 mars 2021;65(4):e01714-20.
 28. Hornsey M, Phee L, Wareham DW. A Novel Variant, NDM-5, of the New Delhi Metallo- β -Lactamase in a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* ST648 Isolate Recovered from a Patient in the United Kingdom ∇ . *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2011;55(12):5952-4.
 29. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. 2010;10:6.
 30. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 18 déc 2019 [cité 19 janv 2022];33(1). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00102-19>
 31. Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond [Internet]. 2021 [cité 22 août 2021]. Disponible sur: <https://journals-asm-org.docelec.u-bordeaux.fr/doi/epub/10.1128/AAC.01312-09>
 32. Kim Y, Cunningham MA, Mire J, Tesar C, Sacchettini J, Joachimiak A. NDM-1, the ultimate promiscuous enzyme: substrate recognition and catalytic mechanism. *FASEB j.* mai 2013;27(5):1917-27.
 33. Doi Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases.* 13 nov 2019;69(Supplement_7):S565-75.
 34. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection.* janv 2008;14:144-53.
 35. Dortet L, Nordmann P, Poirel L. Association of the Emerging Carbapenemase NDM-1 with a Bleomycin Resistance Protein in Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2012;56(4):1693-7.
 36. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Diseases.* mai 2011;11(5):355-62.
 37. Krishnaraju M, Kamatchi C, Jha A, Devasena N, Vennila R, Sumathi G, et al. Complete sequencing of an IncX3 plasmid carrying bla_{NDM-5} allele reveals an early stage in the dissemination of the bla_{NDM} gene. *Indian Journal of Medical Microbiology.* janv 2015;33(1):30-8.
 38. Poirel L, Bonnin RA, Boulanger A, Schrenzel J, Kaase M, Nordmann P. Tn 125 -Related Acquisition of bla_{NDM} -Like Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2012;56(2):1087-9.
 39. Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Gawryszewska I, Bojarska K, Herda M, et al. NDM-producing Enterobacteriaceae in Poland, 2012–14: inter-regional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases. *J Antimicrob Chemother.* janv 2016;71(1):85-91.
 40. Potron A, Rondinaud E, Poirel L, Belmonte O, Boyer S, Camiade S, et al. Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents.* avr 2013;41(4):325-9.
 41. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early Dissemination of NDM-1- and OXA-181-Producing *Enterobacteriaceae* in Indian Hospitals: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2011;55(3):1274-8.
 42. Poirel L, Heritier C, Nordmann P. Chromosome-Encoded Ambler Class D β -Lactamase of *Shewanella oneidensis* as a Progenitor of Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase. 2004;48:4.
 43. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine.* mai 2012;18(5):263-72.
 44. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Derepressed Transfer Properties Leading to the Efficient Spread of the Plasmid Encoding Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2014;58(1):467-71.

45. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2012;56(1):559-62.
46. Hoyos-Mallecot Y, Naas T, Bonnin RA, Patino R, Glaser P, Fortineau N, et al. OXA-244-Producing *Escherichia coli* Isolates, a Challenge for Clinical Microbiology Laboratories. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. sept 2017 [cité 18 janv 2022];61(9). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00818-17>
47. Viau R, Frank KM, Jacobs MR, Wilson B, Kaye K, Donskey CJ, et al. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. *Clin Microbiol Rev.* janv 2016;29(1):1-27.
48. Satlin MJ, Chen L, Patel G, Gomez-Simmonds A, Weston G, Kim AC, et al. Multicenter Clinical and Molecular Epidemiological Analysis of Bacteremia Due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) in the CRE Epicenter of the United States. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. avr 2017 [cité 9 févr 2022];61(4). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02349-16>
49. Satlin MJ, Jenkins SG, Walsh TJ. The Global Challenge of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in Transplant Recipients and Patients With Hematologic Malignancies. *Clinical Infectious Diseases.* 1 mai 2014;58(9):1274-83.
50. Kalpoe JS, Sonnenberg E, Factor SH, del Rio Martin J, Schiano T, Patel G, et al. Mortality associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in liver transplant recipients: Mortality and CRKP Infections after LT. *Liver Transpl.* avr 2012;18(4):468-74.
51. Li Y, Li J, Hu T, Hu J, Song N, Zhang Y, et al. Five-year change of prevalence and risk factors for infection and mortality of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in a tertiary hospital in North China. *Antimicrob Resist Infect Control.* déc 2020;9(1):79.
52. Zhao S, Kennedy S, Perry MR, Wilson J, Chase-Topping M, Anderson E, et al. Epidemiology of and risk factors for mortality due to carbapenemase-producing organisms (CPO) in healthcare facilities. *Journal of Hospital Infection.* avr 2021;110:184-93.
53. Marsot A, Guilhaumou R, Riff C, Blin O. Amikacin in Critically Ill Patients: A Review of Population Pharmacokinetic Studies. *Clin Pharmacokinet.* févr 2017;56(2):127-38.
54. Coppry M, Lasheras A, Loustale M, Boulestreau H, Aillerie S, Coulange L, et al. Complex transmission of carbapenem resistance for various Enterobacterales species in a vascular surgical department of a French hospital. :1.
55. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Analysis of the Resistome of a Multidrug-Resistant NDM-1-Producing *Escherichia coli* Strain by High-Throughput Genome Sequencing ν . *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2011;55(9):4224-9.
56. Weber RE, Pietsch M, Frühauf A, Pfeifer Y, Martin M, Luft D, et al. IS26-Mediated Transfer of bla_{NDM-1} as the Main Route of Resistance Transmission During a Polyclonal, Multispecies Outbreak in a German Hospital. *Frontiers in Microbiology.* 2019;10:2817.
57. Sun P, Xia W, Liu G, Huang X, Tang C, Liu C, et al. Characterization Of bla_{NDM-5}-Positive *Escherichia coli* Prevalent In A University Hospital In Eastern China. *IDR.* sept 2019;Volume 12:3029-38.
58. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods.* 1 déc 2005;63(3):219-28.
59. Zhao Q, Berglund B, Zou H, Zhou Z, Xia H, Zhao L, et al. Dissemination of bla_{NDM-5} via IncX3 plasmids in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among humans and in the environment in an intensive vegetable cultivation area in eastern China. *Environmental Pollution.* mars 2021;273:116370.

Résumé en français

Aujourd'hui, la lutte contre l'antibiorésistance s'impose comme nouvel enjeu de santé publique. L'étude de la transmission des gènes de résistance aux antibiotiques est indispensable afin d'établir les liens épidémiologiques entre les souches bactériennes ayant acquis ces résistances aux antibiotiques et pouvant être à la source d'une dissémination de résistance aux antibiotiques. Dans un contexte d'émergence de bactéries hautement résistantes, nous nous intéressons dans cette étude aux modes d'acquisition horizontaux de deux carbapénèmases NDM-5 et OXA-48 identifiées chez quatre espèces d'entérobactérales : *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* dans un service de chirurgie vasculaire bordelais. Depuis 2017, 16 échantillons cliniques ont été analysés par le laboratoire de bactériologie du CHU de Bordeaux. En 2020, 7 échantillons environnementaux ont été collectés par l'équipe d'hygiène hospitalière depuis les locaux du même service. Les équipes de bactériologie et d'hygiène hospitalière ont voulu étudier d'abord l'environnement génétique de *bla*_{NDM-5} et *bla*_{OXA-48} préalablement identifiés par technique de séquençage. Dans un deuxième temps, les plasmides ont été reconnus comme les supports génétiques privilégiés de transmission des deux gènes de résistances aux antibiotiques. Chaque carbapénémase étudiée a été identifiée chez des *C. freundii* provenant d'un échantillon clinique et d'un échantillon environnemental suggérant qu'une maîtrise de l'environnement de soin puisse permettre une diminution de la propagation des gènes responsable de l'antibiorésistance.

Mots clés : Antibiorésistance, carbapénèmases, entérobactérales, épidémie, plasmides.

Study of a carbapenemases producer enterobacteria epidemic in a French vascular surgical department

Today, the struggle against antibioresistance comes to be a priority health concern. The ways of transmission of genes of antibiotic resistance must be understood. In this study we are interested in NDM-5 and OXA-48 and in their ways of horizontally transmission between bacterial strains. These two carbapenemases have been identified in four species of enterobacteria: *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* in a French vascular surgery department. Since 2017, 16 clinical samples have been analyzed by the bacteriology laboratory of the Bordeaux's University Hospital. In 2020, 7 environmental samples have been collected by the hygiene department from toilet water and swabs in the same department. *bla*_{NDM-5} and *bla*_{OXA-48} have been identified by sequencing. Then microbiology and hygiene teams studied their genetical environment and plasmids have been recognized as the main genetical support of transmission of these two carbapenemases. Each carbapenemase studied was identified chronologically in one *C. freundii* clinical and environmental strain suggesting that controlling this environment could decrease the diffusion of these antibioresistance genes.

Mots-clefs : Antibiorésistance, carbapénèmases, entérobactérales, épidémie, plasmides.

Discipline : Pharmacie.

Intitulé et du laboratoire : Mfp UMR 5234 - Laboratoire de microbiologie et pathogénicité fondamentale 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux Cedex.