

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

le 6 octobre 2010

par **PAQUIN Axelle**

Conformément aux dispositions du décret

du 23 janvier 2003 tient lieu de :

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Comparaison du typage moléculaire par M.L.V.A.
et M.L.S.T. d'une collection de 70 isolats
de *E. coli* au C.H.U. de Nantes.**

Président : M. Alain REYNAUD, Professeur de Bactériologie,
Faculté de Pharmacie - Nantes

Membres du jury : M. Gilles POTEL, Professeur de Thérapeutique,
Faculté de Médecine - Nantes
Mme Nathalie CAROFF, Maître de Conférences de
Bactériologie, Faculté de Pharmacie - Nantes
Mme Nathalie ASSERAY, Docteur en Médecine,
Praticien Hospitalier, Service de Maladies Infectieuses et
Tropicales - C.H.U. de Nantes
M. Stéphane CORVEC, Maître de Conférences de
Bactériologie, Faculté de Médecine - Nantes

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	4
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	7
INTRODUCTION	8
PARTIE I : GÉNÉRALITÉS	10
I-Les infections à <i>Escherichia coli</i>	11
I-1-Habitat	11
I-2-Caractères généraux.....	11
I-2-1-Morphologie et caractères biochimiques d'identification.....	11
I-2-2-Caractères cultureux	12
I-2-3-Caractères antigéniques	12
I-3-Pouvoir pathogène	13
I-3-1-Facteurs de virulence	14
I-3-1-1-Les toxines.....	14
I-3-1-2-Les facteurs d'adhérence	15
I-3-1-3-La capsule.....	15
I-3-1-4-Les sidérophores.....	15
I-3-2-Relations entre phylogénie et virulence.....	16
I-3-2-1-La phylogénie	17
I-3-2-2-Études phylogénétiques et facteurs de virulence	17
I-3-3-Principales pathologies causées par <i>E. coli</i>	19
I-3-3-1-Infections urinaires	19
I-3-3-2-Diarrhées	20
I-3-3-3-Infections digestives et hépatobiliaires	20
I-3-3-4-Septicémies et méningites	21
II-La résistance aux β-lactamines chez <i>E. coli</i>	22
II-1-Rappel du mécanisme d'action des β -lactamines	22
II-2-Mécanisme de résistance aux β -lactamines	23
II-2-1-Production de β -lactamases	24
II-2-1-1-Classification des β -lactamases	24
II-2-1-2-Résistance naturelle des entérobactéries	27
II-2-2-Résistance par imperméabilité membranaire.....	27
II-2-3-Résistance par expression de systèmes d'efflux actifs	28
II-3-Résistance des <i>E. coli</i> par production de β -lactamases	29
II-3-1-Résistance naturelle.....	29
II-3-1-1-Phénotype sauvage	29
II-3-1-2-Hyperexpression de la céphalosporinase naturelle	29
II-3-2-Résistance acquise des <i>E. coli</i> à l'égard des β -lactamines	30
II-3-2-1-Production de « pénicillinase de haut niveau »	30
II-3-2-2-Production de « pénicillinase résistante aux inhibiteurs ».....	30
II-3-2-3-Production de « β -lactamases à spectre étendu » (BLSE).....	31
II-3-2-3-Production de « céphalosporinase AmpC plasmidique »	34
II-3-2-4-Production de « carbapénémases ».....	35

III-Les principales techniques de typage bactérien	36
III-1-Généralités sur le typage bactérien	36
III-1-1-Intérêts du typage bactérien	36
III-1-2-Définitions utiles.....	37
III-1-3-Les différents types d'étude	37
III-1-4-Critères de performance des systèmes de typage épidémiologique	38
III-1-5-Les techniques d'agrégation des profils.....	38
III-2-Les marqueurs phénotypiques.....	39
III-2-1-L'antibiotype.....	39
III-2-2-Le biotype	39
III-2-3-Le sérotype.....	40
III-2-4-Le lysotype.....	40
III-3-Les marqueurs génotypiques.....	40
III-3-1-Le génome bactérien	40
III-3-2-Méthodes par restriction de l'ADN bactérien	41
III-3-2-1-L'électrophorèse en champs pulsés	41
III-3-2-2-La PCR - ribotypage	43
III-3-3-Méthodes par amplification des gènes bactériens	44
III-3-3-1-L'ERIC 2 PCR ou « Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR ».....	44
III-3-3-2-Le Multi-Locus Sequence Type.....	45
III-3-3-3-Le Multi-Locus Variable number tandem repeats Analysis.....	46
<i>PARTIE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</i>	49
I-Objectifs de notre étude.....	50
II-Souches bactériennes étudiées	50
III-Méthodes.....	51
III-1-Extraction de l'ADN bactérien	51
III-2-Le Multi-Locus Variable number tandem repeats Analysis.....	51
III-3-Le Multi-Locus Sequence Typing.....	54
III-4-Détermination du groupe phylogénétique par PCR triplex	56
III-5-Détermination du clone O25b-ST131	57
III-6-Caractérisation des BLSE	58
III-6-1-Caractérisation des CTX-M	58
III-6-2-Caractérisation des TEM-BLSE	58
III-6-3-Caractérisation des SHV-BLSE.....	58
<i>PARTIE III : RÉSULTATS.....</i>	60
I-M.L.V.A.	61
I-1-Validation de la technique	61
I-2-Analyse des profils obtenus	63
I-2-1-CVN014.....	63
I-2-2-CVN015.....	64
I-2-3-CVN004.....	64
I-3-Résultats du M.L.V.A.....	65
II-M.L.S.T. et groupes phylogénétiques.....	66
III-Caractérisation des BLSE	66
IV-Tableau récapitulatif des données.....	67

V-Interprétation des données.....	68
V-1-Polymorphisme allélique.....	68
V-2-Étude du M.L.V.A. type en fonction du phénotype de résistance	69
V-2-1-Souches exprimant un mécanisme de résistance chromosomique	69
V-2-2-Souches sauvages ou possédant un mécanisme de résistance plasmidique.....	70
V-3-Interprétation des arbres phylogénétiques	72
V-3-1-Étude globale	72
V-3-2-Comparaison M.L.V.A. – P.F.G.E. pour les souches ESAC	74
V-3-3-Étude avec les souches de la collection ECOR	75
V-3-4-Comparaison des coûts	76
<i>PARTIE IV : DISCUSSION.....</i>	77
<i>PARTIE V : CONCLUSION</i>	83
<i>BIBLIOGRAPHIE.....</i>	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adénine
ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
ARN	Acide Ribo-Nucléique
BLSE	Bêta-Lactamase à Spectre Étendu
C	Cytosine
C1G	Céphalosporine de première génération
C2G	Céphalosporine de deuxième génération
C3G	Céphalosporine de troisième génération
C4G	Céphalosporine de quatrième génération
CTX-M	Céfotaximase M
ECOR	<i>E. coli</i> Collection Reference
EDTA	Acide Éthylène-Diamine-Tétra-Acétique
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
ESAC	Céphalosporinase AmpC à spectre étendu
ExPEC	Extra intestinal Pathogenic <i>E. coli</i>
G	Guanine
M.L.E.E.	Multi-Locus Enzyme Electrophoresis
M.L.S.T.	Multi-Locus Sequence Type
M.L.V.A.	Multi-Locus Variable number tandem repeats Analysis
pb	paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
P.F.G.E.	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PLP	Protéines Liant les Pénicillines
REP	Repetitive Extragenic Palindromic
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT	Repeat Type
ST	Sequence Type
T	Thymine
V.N.T.R.	Variable Number Tandem Repeat

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Facteurs de virulence associés aux différentes étapes du processus physiopathologique : adhérence, invasion, multiplication (Jaureguy, 2009).	15
Figure 2 : Processus impliqué dans l'évolution du génome basé sur l'acquisition ou la perte d'informations génétiques codant pour des facteurs de virulence et d'adaptation à certaines conditions environnementales. Les éléments génétiques impliqués sont : les plasmides, les bactériophages, les îlots de pathogénicité (PAI) (Dobrindt <i>et al.</i> , 2010).....	16
Figure 3 : Distribution des facteurs de virulence étudiés en fonction des souches de la collection ECOR (Boyd <i>et al.</i> , 2004).....	18
Figure 4 : Relations entre les groupes phylogénétiques, la virulence, et la résistance aux antibiotiques de <i>E. coli</i> (Jaureguy, 2009).	19
Figure 5 : Schéma du mécanisme d'action des β -lactamines.....	23
Figure 6 : Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase (Ruppé, 2010).	24
Figure 7 : Structure d'un système d'efflux (Murakami <i>et al.</i> , 2002).	28
Figure 8 : Séquence du promoteur de <i>E. coli</i> K12, et principales mutations (en vert) à l'origine de l'hyperproduction de AmpC.....	30
Figure 9 : Dendrogramme de la famille des CTX-M (Bonnet, 2004).....	32
Figure 10 : Schéma explicatif de l'électrophorèse en champs pulsés (Swaminathan, Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications, 1993).	41
Figure 11 : Exemple de dendrogramme obtenu au laboratoire de Bactériologie du C.H.U. de Nantes avec différentes souches de <i>E. coli</i> par P.G.F.E. Les souches J et K sont identiques. Les souches A, B, J, et K semblent appartenir au même clone.	42
Figure 12 : Exemple de dendrogramme obtenu au laboratoire de Bactériologie du C.H.U. de Nantes avec différentes souches de <i>C. difficile</i> par PCR Ribotypage. Les souches A et B sont identiques. Les souches C, D, et E sont différentes.	43
Figure 13 : Exemple de dendrogramme par ERIC2 PCR. Les souches sont différentes.	44
Figure 14 : Le principe du séquençage (extrait livret Applied Biosystem®).	45
Figure 15 : Schéma explicatif du M.L.V.A.....	47
Figure 16 : Exemple de résultats obtenus avec MLVA-NET pour <i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhimurium (Guigon <i>et al.</i> , 2008).	48
Figure 17 : Répartition des isolats de notre étude.	50
Figure 18 : Copie d'écran du site de l'Environmental Research Institute de l'University College Cork (http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli/).	55
Figure 19 : Arbre décisionnel pour la détermination des groupes phylogénétiques (Clermont <i>et al.</i> , 2000).	56
Figure 20 : Exemples de profils de PCR triplex spécifiques des groupes phylogénétiques de <i>E. coli</i> . Ligne 1 et 2, groupe A ; ligne 3, groupe B1 ; ligne 4 et 5, groupe D ; lignes 6 et 7, groupe B2 ; ligne M, marqueurs de taille (Clermont <i>et al.</i> , 2000).....	56
Figure 21 : Profils du <i>E. coli</i> K12 MG1655 obtenus lors de la PCR multiplex A (allèles CVN002, CVN003, CVN014).....	62
Figure 22 : Profils du <i>E. coli</i> K12 MG1655 obtenus lors de la PCR multiplex B (allèles CVN001, CVN004, CVN007, CVN015).	62

Figure 23 : Séquences du CVN014 alignées grâce au logiciel Clustalw[®] des souches 4009889 (S13) et 5000484 (S14).	63
Figure 24 : Arbre phylogénétique d'après MLVA.EU en UPGMA des souches hyperproductrices de céphalosporinases AmpC.	69
Figure 25 : Arbre phylogénétique d'après MLVA.EU en UPGMA des souches de céphalosporinases à spectre étendu (ESAC).	70
Figure 26 : Arbre phylogénétique d'après MLVA.EU en UPGMA des souches sauvages.	70
Figure 27 : Arbre phylogénétique d'après MLVA.EU en UPGMA des souches de céphalosporinases plasmidiques (CMY-2).	71
Figure 28 : Arbre phylogénétique d'après MLVA.EU en UPGMA des souches productrices de différentes BLSE.	71
Figure 29 : Arbre phylogénétique en Ward des souches de notre étude à l'aide du logiciel BioNumerics[®] (Applied Maths[®], Sint Martens-Latem, Belgium).	73
Figure 30 : Comparaison de souches ESAC par P.G.F.E. par rapport au M.L.V.A.	74

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	I : Tableau récapitulatif des classifications des β -lactamases selon Bush et Ambler.....	26
Tableau	II : Les différents groupes d'Entérobactéries (Bonnet, 2006).	27
Tableau	III : Caractéristiques des amorces utilisées pour notre étude (*pb = paires de bases).....	51
Tableau	IV : Composition de la PCR multiplex A : amplification des CVN002, CVN003, et CVN014.....	52
Tableau	V : Composition de la PCR multiplex B : amplification des CVN001, CVN004, CVN007 et CVN015.....	52
Tableau	VI : Conditions d'amplification pour les PCR multiplex A et B.	53
Tableau	VII : Dilution des produits d'amplification pour les PCR multiplex A et B.	53
Tableau	VIII : Conversion de la taille des amplicons en numéro d'allèles, d'après Lindstedt <i>et al.</i> (Lindstedt <i>et al.</i> , 2007).	54
Tableau	IX : Conditions pour le séquençage.	55
Tableau	X : Composition du mélange réactionnel permettant l'amplification des gènes <i>pabB</i> et <i>trpA</i>	57
Tableau	XI : Conditions d'amplification pour la PCR multiplex <i>pabB</i> / <i>trpA</i> sur le thermocycleur Thermal Cyclor 2720.	57
Tableau	XII : Amorces utilisées pour la détermination des BLSE de type CTX-M, TEM et SHV (Brasme <i>et al.</i> , 2007).....	59
Tableau	XIII : Composition du mélange réactionnel permettant la détermination des BLSE de type CTX-M, TEM et SHV.	59
Tableau	XIV : Conditions d'amplification permettant la détermination des BLSE de type CTX-M, TEM et SHV sur le thermocycleur Thermal Cyclor 2720.	59
Tableau	XV : Résultats obtenus après séquençage permettant l'attribution de nouveaux allèles.....	64
Tableau	XVI : Données brutes issues du typage M.L.V.A. pour les 69 isolats de l'étude.....	65
Tableau	XVII : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour le typage des BLSE.	66
Tableau	XVIII : Tableau récapitulatif des données. G.P. : groupe phylogénétique, U : urines, LG : liquide gastrique, H : hémoculture, CP : collection profonde, LP : liquide péritonéal, P : poulet, Co : cochon, B : bétail.	67
Tableau	XIX : Fréquence de chaque allèle pour chaque CVN de notre étude	68
Tableau	XX : Fréquence de chaque allèle pour chaque CVN de l'étude de Lindstedt <i>et al.</i>	68
Tableau	XXI : Comparaison des techniques génotypiques utilisées au C.H.U. de Nantes pour le typage moléculaire de <i>E. coli</i> . Le coût est calculé pour 10 souches.	76

INTRODUCTION

Escherichia coli est une bactérie fréquemment isolée en Bactériologie médicale. Il s'agit d'une bactérie hôte du tube digestif, responsable de nombreuses infections, principalement digestives et urinaires. Cette espèce demeure habituellement sensible aux principaux antibiotiques utilisés en pathologie humaine. Les infections à *E. coli* sont, en général, faciles à traiter. Du fait de leurs importantes capacités d'adaptation génétique, les bactéries développent constamment de nouvelles résistances, en fonction de la pression de sélection à laquelle elles se trouvent exposées, en utilisant les possibilités que leur offre leur patrimoine génétique, mais aussi celui de leurs congénères. Cette dynamique du génome ou plasticité constitue une caractéristique propre de la cellule procaryote. Ainsi, les bactéries s'adaptent rapidement aux différents stress environnementaux, notamment les antibiotiques. Sous pression de sélection, les échanges horizontaux permettent l'acquisition de différents déterminants de résistance ou de marqueurs de virulence parfois appelés îlots de pathogénicité. Ces échanges génétiques participent à l'évolution de la population bactérienne et créent sa richesse et sa diversité.

Au quotidien, des études phénotypiques sont conduites par la réalisation d'un antibiogramme. Les différents marqueurs qui constituent cet antibiogramme, permettent un premier niveau d'alerte sur l'éventuelle similitude entre deux isolats. Néanmoins, des méthodes génotypiques s'avèrent indispensables pour infirmer ou confirmer une éventuelle relation génétique au sens épidémiologique du terme, entre plusieurs cas groupés au sein d'une même structure hospitalière, d'un même service ou au sein d'une même famille ou bien dans le cadre d'une chaîne de production dans l'industrie agro-alimentaire.

Différentes techniques analysant les profils de bandes après restriction de l'ADN chromosomique procaryote existent. L'avènement des techniques moléculaires associant amplification et séquençage des gènes ciblés a permis de compléter l'offre des méthodes de typage moléculaire afin de répondre à différentes interrogations : épidémies, cas sporadiques, circulation de clones hyper-virulents...

Les objectifs de notre étude étaient d'une part, de développer une nouvelle technique de typage bactérien, la technique M.L.V.A. (Multi-Locus Variable number tandem repeats Analysis) et, d'autre part, de comparer les résultats obtenus à ceux du M.L.S.T (Multi-Locus Sequence Type) à partir d'une cohorte de 70 isolats de *E. coli* présentant des profils de résistance différents vis-à-vis des β -lactamines.

Après un rappel des connaissances actuelles sur les infections à *E. coli* et son comportement à l'égard des antibiotiques, les principales techniques de typage bactérien ainsi que les matériels et méthodes utilisés lors de notre travail seront présentés et commentés. Les résultats obtenus seront alors analysés et discutés afin de dégager les perspectives de cette nouvelle technique de typage.

PARTIE I : GÉNÉRALITÉS

I-Les infections à *Escherichia coli*

Escherichia coli, isolé par Escherich en 1885, est l'espèce type du genre *Escherichia* qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette espèce est responsable avec *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* de plus de 80 % des infections humaines à entérobactéries (Baraduc *et al.*, 2000). A titre d'exemple, dans le service de Bactériologie du C. H. U. de Nantes, environ 450 souches de *E. coli* sont isolées chaque mois. Le genre *Escherichia* comprend d'autres espèces : *E. hermanni*, *E. vulneris*, *E. fergussonii* (Baraduc *et al.*, 2000). Ces espèces possèdent leurs propres caractères génotypiques et phénotypiques. Leur incidence en Bactériologie humaine ne représente pas plus de 1 %.

I-1-Habitat

E. coli fait partie de la flore commensale digestive de l'Homme et des animaux. Cette bactérie est prédominante dans la flore digestive de l'Homme, essentiellement au niveau de la partie distale du côlon, où elle constitue l'espèce majoritaire de la flore aéro-anaérobie facultative (environ 80 %), sous dominante par rapport à la flore anaérobie. Aussi appelée « colibacille », par contraction de « bacille du côlon », cette bactérie est retrouvée également au niveau du revêtement cutané-muqueux à proximité des orifices naturels. Par ailleurs, elle est très répandue dans l'environnement (eau, sols, aliments). Sa présence dans l'eau constitue un indice de contamination fécale (Baraduc *et al.*, 2000).

I-2-Caractères généraux

I-2-1-Morphologie et caractères biochimiques d'identification

E. coli appartient aux *Enterobacteriaceae*. Il présente les caractères communs des entérobactéries : bacille à Gram négatif, assez grand (1-1,5 x 2-6 μm), aéro-anaérobie facultatif, oxydase négative, généralement mobile par une ciliature péritriche, réduisant les nitrates en nitrites et fermentant le glucose.

Les principaux caractères distinctifs de *E. coli* vis-à-vis des autres entérobactéries sont : la fermentation du lactose, la production d'une β -galactosidase, la production d'indole à partir du tryptophane. Les autres caractères sont : l'absence d'utilisation du citrate (Simmons) comme source d'énergie et de carbone, une réaction de Voges-Proskauer (VP) négative, l'absence d'uréase, de tryptophane désaminase et de production d' H_2S .

Concernant les décarboxylases, *E. coli* possède une lysine décarboxylase et une ornithine décarboxylase mais il est dépourvu d'arginine dihydrolase (Baraduc *et al.*, 2000).

Au quotidien au laboratoire, l'identification se fait à l'aide de différentes galeries regroupant tous les caractères biochimiques et enzymatiques indispensables à l'identification des entérobactéries : galeries Api 20E[®], ID 32E[®], ou IDGN[®] développée pour le système automatisé Vitek2[®] (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

La généralisation dans les laboratoires des géloses chromogéniques contenant différents substrats chromogéniques permet en général une orientation rapide. En effet, la présence chez une souche d'une β -galactosidase, hydrolysant un substrat incolore contenu dans la gélose, génère lors de la croissance des bactéries (après 18-24 h d'incubation à 37°C), une coloration rose des colonies suspectant la présence de *E. coli*. La réalisation complémentaire d'un test Indole spot[®] rapide et sa positivité permettent d'identifier la bactérie impliquée à *E. coli*.

I-2-2-Caractères cultureux

E. coli est une bactérie non exigeante, de croissance rapide en 18-24 h, sur milieux gélosés ordinaires, non enrichis, type gélose Trypticase-Soja ou géloses lactosées (Bromo-Crésol-Pourpre, Cystine Lactose Electrolyte Deficient...).

Les colonies sont rondes, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre et non pigmentées. Sur milieux lactosés additionnés d'un indicateur coloré de pH, les colonies paraissent lactose positif. Sur gélose au sang, elles peuvent présenter une β -hémolyse.

I-2-3-Caractères antigéniques

La détermination des caractères antigéniques par sérotypage présente un intérêt épidémiologique.

Les trois principaux types d'antigènes présents chez les entérobactéries sont retrouvés chez *E. coli* :

- L'antigène « O » ou somatique :

Il s'agit d'un antigène ubiquitaire de paroi, de nature polysaccharidique, correspondant à l'endotoxine bactérienne, principal facteur de virulence des entérobactéries (Baraduc *et al.*, 2000 ; Stenutz *et al.*, 2006).

- L'antigène « H » ou flagellaire :

De nature protéique, il n'existe que chez les bactéries mobiles, pourvues de flagelles (Baraduc *et al.*, 2000).

- Les antigènes de surface :

- Antigène K ou capsulaire, de nature polysaccharidique, il en existe 70 types différents. Chez *E. coli*, le plus connu est l'antigène K1 fréquemment mis en évidence chez les souches impliquées lors de méningites néo-natales (Baraduc *et al.*, 2000).
- Antigène F, de nature protéique, est mis en évidence chez les souches présentant des propriétés d'adhérence (Baraduc *et al.*, 2000).

La sérotypie rassemble les spécificités des antigènes O, H et K, permettant la caractérisation de souches pathogènes et/ou épidémiques. Les *E. coli* entérohémorragiques de sérotype O157 : H7 sont liés à une pathologie typique : une diarrhée avec colite hémorragique associée à un syndrome hémolytique et urémique (Baraduc *et al.*, 2000).

Récemment, parmi des isolats producteurs de CTX-M (8 pays sur 3 continents), Nicolas Chanoine *et al.* ont mis en évidence que 88 % des souches présentaient des caractéristiques communes dont le sérotype O25 : H4. Ce clone de distribution mondiale exprime souvent la β -lactamase à spectre étendu de type CTX-M-15 (cf. page 38), la plus fréquente en France (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008).

I-3-Pouvoir pathogène

Chez l'Homme, la colonisation de *E. coli* est précoce, dès l'accouchement par contact avec la flore périnéale issue de la flore fécale. Le pouvoir pathogène de *E. coli* peut être extrêmement varié. La survenue de ces infections est fréquemment la conséquence de la conjonction d'un état de fragilité du patient (malformation, obstacle, immunodépression) et de facteurs de pathogénicité de la bactérie. D'un point de vue clinique, les souches pathogènes intestinales et les souches pathogènes extra-intestinales sont distinguées au sein de l'espèce. Les souches pathogènes extra-intestinales sont regroupées sous la dénomination Ex.P.E.C. (Extraintestinal Pathogenic *E. coli*). Elles sont incapables de produire des infections intestinales, mais peuvent coloniser le tractus intestinal. La physiopathologie des infections à Ex.P.E.C. débute par la colonisation d'une muqueuse, suivie par l'échappement des systèmes de défense de l'hôte.

Elle se poursuit par la multiplication dans un site et par la dissémination vers d'autres sites distants en produisant différents dommages chez l'hôte. Les infections extra-intestinales peuvent intéresser tous les âges et toucher tous les sites anatomiques. Elles comprennent principalement des infections du tractus urinaire, des méningites, des infections intra-abdominales (Jaureguy, 2009).

E. coli est fréquemment isolé lors d'infections urinaires communautaires. Toutefois, il ne faut pas oublier son implication dans les infections associées aux soins. Trois pathogènes représentent plus de la moitié (53,5 %) des micro-organismes isolés lors d'infections liées aux soins avec *E. coli* (24,7 %) en premier lieu, suivi de *Staphylococcus aureus* (18,9 %) et *Pseudomonas aeruginosa* (10 %) (Thiolet *et al.*, 2006).

I-3-1-Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence regroupent l'ensemble des moyens mis en œuvre par la bactérie pour s'adapter, se multiplier, disséminer, et survivre dans un environnement hostile.

Les effets délétères sur les cellules de l'hôte s'exercent à différents niveaux : perturbation de la division cellulaire, synthèse de protéines, perte de l'intégrité des membranes, adhérence, formation de biofilm et résistance à la phagocytose.

I-3-1-1-Les toxines

- Les toxines thermolabiles produites par les souches entérotoxigènes (E.T.E.C.), sont à l'origine de diarrhées aqueuses. Elles présentent une structure proche de la toxine cholérique.
- Les toxines thermostables, comme la toxine STa, sont produites par les E.T.E.C. et certaines souches entérotoxigènes (E.P.E.C.).
- Les vérotoxines ou shiga-like toxin sont produites par les souches entérohémorragiques (E.H.E.C.) responsables du syndrome hémolytique et urémique (S.H.U.).
- L'hémolysine, codée par le gène *hly*, entraîne la lyse des hématies, la formation de canaux sélectifs au niveau des surfaces membranaires contribuant à l'inflammation (Yamamoto, 2007).
- Le *cytotoxic necrotizing factor* est codé par le gène *cnf1* (Yamamoto, 2007).

I-3-1-2-Les facteurs d'adhérence

- Les fimbriae ou adhésines piliques ont un rôle majeur dans l'adhérence aux cellules eucaryotes. Les P-fimbriae sont codés par l'opéron *pap*, comprenant les gènes *papG*. Les fimbriae de type S sont codés par différents gènes, dont *sfa/foc*. Les fimbriae de type P et de type S sont des facteurs de virulence impliqués dans la pathogénèse des infections du tractus urinaire, retrouvés principalement chez les souches uropathogènes (Bingen-Bidois *et al.*, 2002 ; Yamamoto, 2007).
- L'intimine est responsable de l'adhérence des E.P.E.C. et E.H.E.C. aux cellules épithéliales.

I-3-1-3-La capsule

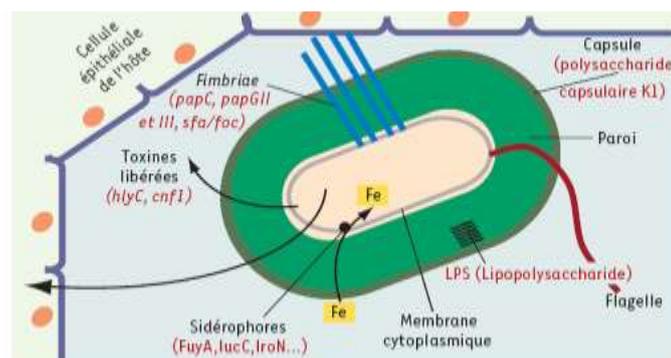
La capsule contribue à la virulence en protégeant les bactéries de la phagocytose, de la lyse par le sérum et en bloquant l'activation de la voie classique du complément. Les polysaccharides capsulaires de type K1 présentent une communauté antigénique avec les acides sialiques cérébraux humains et les polysaccharidiques capsulaires du méningocoque du sérotype B, pouvant expliquer qu'ils soient retrouvés dans 80 % des méningites à *E. coli* (Robbins *et al.*, 1974). Plusieurs régions du génome de *E. coli* (*kpsSCUDEF*, *neuDBACES*, et *kpsMT*) sont impliquées dans la synthèse de ces polysaccharides capsulaires (Andreishcheva and Vann, 2006).

I-3-1-4-Les sidérophores

L'aérobactine, codée par le gène *iucC*, permet une captation du fer indispensable au métabolisme bactérien, à partir de ses protéines de liaisons (Bingen-Bidois *et al.*, 2002).

Les principaux facteurs de virulence sont illustrés sur la Figure 1.

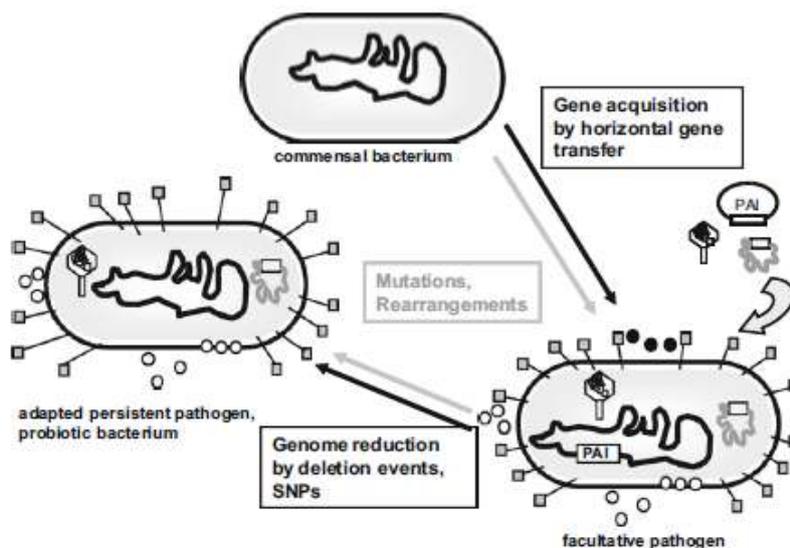
Figure 1 : Facteurs de virulence associés aux différentes étapes du processus physiopathologique : adhérence, invasion, multiplication (Jaureguy, 2009).



Le génome de *E. coli* est une mosaïque composée de régions conservées codant pour des fonctions essentielles au métabolisme et de régions variables donnant à chaque souche sa spécificité indispensable à son adaptation.

Les plasmides, les bactériophages et les îlots de pathogénicité codent pour des fonctions supplémentaires : les facteurs de virulence schématisés dans la Figure 2 (Dobrindt *et al.*, 2010). Les îlots de pathogénicité sont délimités par des séquences d'insertion. Ils codent pour plusieurs facteurs de virulence. Chez *E. coli*, la conjugaison et la recombinaison homologue jouent un rôle clé dans la plasticité du génome bactérien et le transfert des îlots de pathogénicité (Bingen-Bidois *et al.*, 2002 ; Johnson *et al.*, 2008 ; Schubert *et al.*, 2009).

Figure 2 : Processus impliqué dans l'évolution du génome basé sur l'acquisition ou la perte d'informations génétiques codant pour des facteurs de virulence et d'adaptation à certaines conditions environnementales. Les éléments génétiques impliqués sont : les plasmides, les bactériophages, les îlots de pathogénicité (PAI) (Dobrindt *et al.*, 2010).



I-3-2-Relations entre phylogénie et virulence

Les notions de « groupes phylogénétiques » et de « pouvoir pathogène » sont liées. Les souches de *E. coli* sont réparties en quatre groupes phylogénétiques principaux, présentant des caractéristiques différentes en termes de pathogénicité, de facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques.

I-3-2-1-La phylogénie

La phylogénie permet l'étude des relations de parenté entre des entités ayant un ancêtre commun. Elle est souvent représentée par un arbre phylogénétique. Une des méthodes conduisant au groupage phylogénétique est le Multi-Locus Enzyme Electrophoresis (M.L.E.E.) permettant l'étude du polymorphisme des enzymes par électrophorèse. Les variants d'une enzyme peuvent ainsi être corrélés aux différents allèles du gène structural correspondant. A partir d'une collection de souches de *E. coli* de référence (ECOR), l'étude de la variation allélique des gènes codant pour les enzymes du métabolisme a permis la subdivision en quatre groupes phylogénétiques : A, B1, B2 et D (Herzer *et al.*, 1990). Les relations phylogénétiques entre les différentes souches ont été déduites de l'analyse de la distance génétique par la méthode de Neighbour-Joining (Figure 3, page 18).

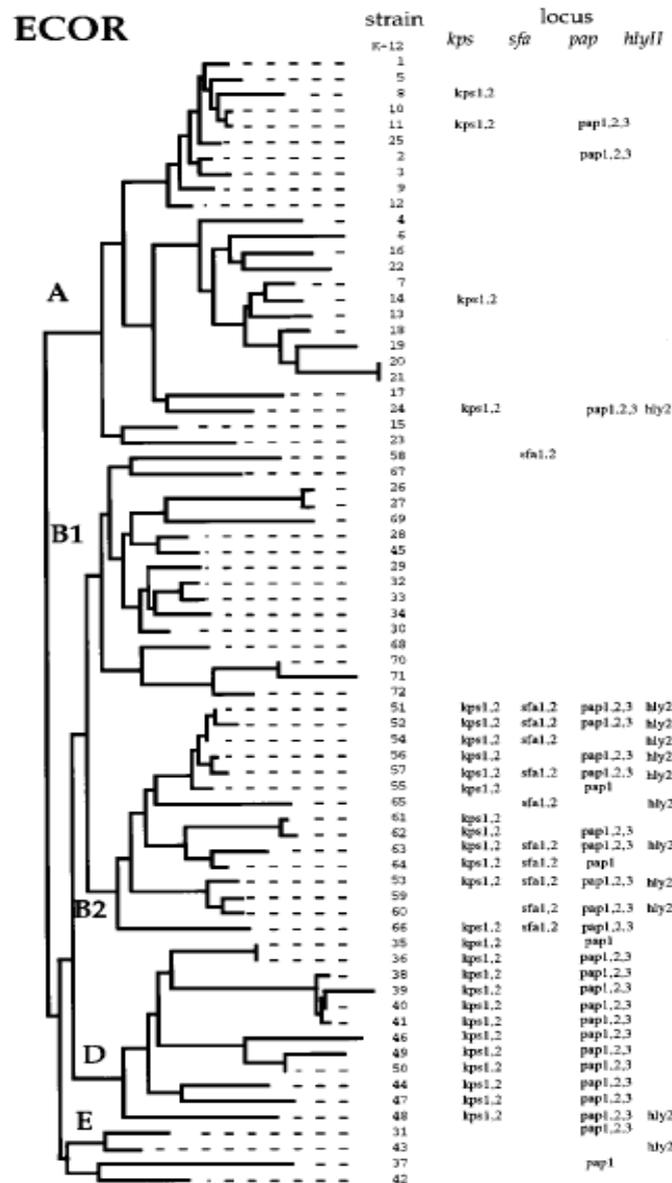
Plus récemment, une méthode rapide et simple a été développée pour la détermination du groupe phylogénétique. Elle est basée sur une PCR triplex, c'est-à-dire utilisant trois couples d'amorces ciblant le gène *chuA* (codant pour une protéine impliquée dans le transport de l'hème), le gène *yja A* (de fonction inconnue) et un fragment d'ADN appelé TspE4.C2.

La combinaison de la présence ou de l'absence de ces trois marqueurs conduit à une détection rapide du groupe phylogénétique (Clermont *et al.*, 2000).

I-3-2-2-Études phylogénétiques et facteurs de virulence

Une étude des régions chromosomiques codant pour les gènes de virulence (α -hémolysine (*hly*), capsule (*kps*), P fimbriae (*pap*), S fimbriae (*sfa*)) sur les isolats de la collection ECOR a été réalisée. Elle a mis en évidence une corrélation entre les groupes phylogénétiques et les facteurs de virulence. Les souches de groupe phylogénétique B2 possèdent les 4 types de facteurs de virulence alors que les souches de groupe D n'en possèdent que deux : *kps* et *pap*. A l'inverse, les souches de groupe A ou B1 possèdent aucun facteur de virulence (Boyd *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données est regroupé dans la Figure 3, page 18.

Figure 3 : Distribution des facteurs de virulence étudiés en fonction des souches de la collection ECOR (Boyd *et al.*, 2004).

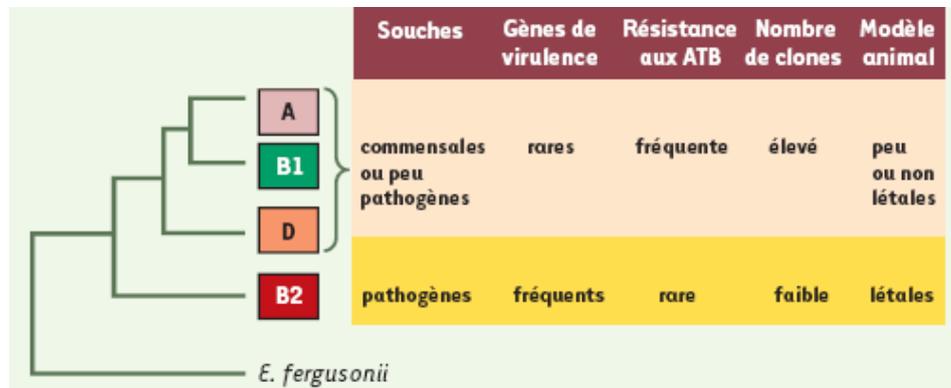


L'analyse d'une population de Ex.P.E.C. montre qu'elle appartient majoritairement au groupe phylogénétique B2 et, dans une moindre mesure au groupe phylogénétique D. Les souches moins virulentes dites commensales appartiennent généralement aux groupes phylogénétiques A et B1. Par ailleurs, une corrélation a été mise en évidence entre résistance aux antibiotiques, facteurs de virulence et groupes phylogénétiques des souches de *E. coli*. Les souches des groupes A et B1 sont fréquemment résistantes à de nombreux antibiotiques, notamment aux β -lactamines et aux fluoroquinolones, alors que la majorité des souches de groupe B2 demeurent relativement sensibles (Moreno *et al.*, 2006 ; Corvec *et al.*, 2007 ; Piatti *et al.*, 2008 ; Jaureguy, 2009).

Chez des patients immunocompétents, plus rarement traités par des antibiotiques, les bactéries résistantes ou non aux antibiotiques semblent posséder plus de facteurs de virulence pour surmonter les défenses de l'hôte. A l'inverse, chez les sujets immunodéprimés, beaucoup plus fréquemment exposés à des antibiotiques et dont les défenses sont amoindries, la résistance aux antibiotiques confère un avantage sélectif à la bactérie, la présence de facteurs de virulence n'étant pas forcément nécessaire (Jaureguy, 2009).

En conclusion, les souches de groupe B2 sont plus fréquemment associées à la présence des facteurs de virulence, à une sensibilité relative aux antibiotiques, à une origine communautaire de l'infection, à une porte d'entrée urinaire et au statut immunocompétent des patients. A l'inverse, les souches des groupes A, B1, et D sont plus fréquemment associées à une rareté des facteurs de virulence, à une résistance aux antibiotiques, à une origine nosocomiale de l'infection, à une porte d'entrée urinaire ou non et à un statut immunodéprimé (Jaureguy, 2009). La Figure 4 résume les relations entre les groupes phylogénétiques, la virulence et la résistance aux antibiotiques chez *E. coli*.

Figure 4 : Relations entre les groupes phylogénétiques, la virulence, et la résistance aux antibiotiques de *E. coli* (Jaureguy, 2009).



I-3-3-Principales pathologies causées par *E. coli*

I-3-3-1-Infections urinaires

E. coli est le principal pathogène (95 %) impliqué dans les infections urinaires. La présence d'un urètre court et la proximité anatomique du tube digestif majorent le risque d'infections urinaires chez la femme. Par ailleurs, l'existence d'anomalies morphologiques de l'arbre urinaire, les rapports sexuels ou une hygiène défectueuse sont aussi impliqués dans la survenue des infections urinaires.

I-3-3-2-Diarrhées

Bien que commensales du tube digestif, certaines souches de *E. coli* peuvent être à l'origine d'infections intestinales, soit en respectant, soit en détruisant les entérocytes (Pawlowski *et al.*, 2009).

Ces souches sont classées en quatre catégories principales :

- Souches de *E. coli* entéropathogènes ou « E.P.E.C. » :

Elles sont responsables de diarrhées infantiles sévères dans les pays en voie de développement. Dans les pays industrialisés, des cas infantiles sporadiques sont recensés ainsi que de rares formes épidémiques. La virulence de ces souches est liée d'une part, à une capacité d'adhérence précoce aux entérocytes de l'intestin grêle et, d'autre part, à une capacité à produire des lésions histologiques au niveau des microvillosités intestinales (Baraduc *et al.*, 2000).

- Souches de *E. coli* entérotoxigènes ou « E.T.E.C. » :

Elles constituent la principale cause de diarrhée infantile dans les pays en voie de développement, et sont également responsables de la diarrhée du voyageur ou turista. La colonisation des entérocytes de l'intestin grêle et la sécrétion d'entérotoxines entraînent une fuite importante d'eau et d'électrolytes (Baraduc *et al.*, 2000).

- Souches de *E. coli* entéroinvasifs ou « E.C.E.I. » :

Elles provoquent un syndrome dysentérique comparable à celui provoqué par les shigelles, en raison de leur capacité à envahir et à se multiplier dans les cellules épithéliales du côlon (Baraduc *et al.*, 2000).

- Souches de *E. coli* entérohémorragiques ou « E.H.E.C. » :

Elles sont responsables de colites hémorragiques, notamment le sérotype O157 : H7 dont la principale complication est le syndrome hémolytique et urémique (S.H.U.). Il est la conséquence de l'adhérence aux cellules de l'épithélium du fait de la synthèse d'exotoxines appelées « Shiga-Like Toxins » (SLT-I et STL-II) ou « vérotoxines » (VT-I ou VT-II) (Baraduc *et al.*, 2000). Les ruminants constituent le principal réservoir de souches de *E. coli* O157 : H7 (Callaway *et al.*, 2009).

I-3-3-3-Infections digestives et hépatobiliaires

E. coli est fréquemment isolé lors de péritonites, appendicites, suppurations abdominales, cholécystites aiguës ou chroniques, ictères infectieux ainsi que lors d'infections post-chirurgicales (Baraduc *et al.*, 2000).

I-3-3-4-Septicémies et méningites

Les septicémies communautaires ou nosocomiales sont le plus souvent à point de départ digestif ou urinaire. Les souches possédant l'antigène capsulaire K1 sont à l'origine de la majorité des méningites néo-natales à *E. coli*, survenant après une effraction de la barrière hémato-encéphalique. Cependant, de nombreux autres facteurs de virulence sont impliqués dans la survenue de méningites néonatales à *E. coli*. Ainsi, l'étude du clone O45 : K1 hyper-virulent de groupe phylogénétique B2 a permis la mise en évidence de nouveaux facteurs de virulence au sein d'îlots de pathogénicité (*sfa/foc*, *hly* et *cnf1*) (Leflon-Guibout *et al.*, 2004).

II-La résistance aux β -lactamines chez *E. coli*

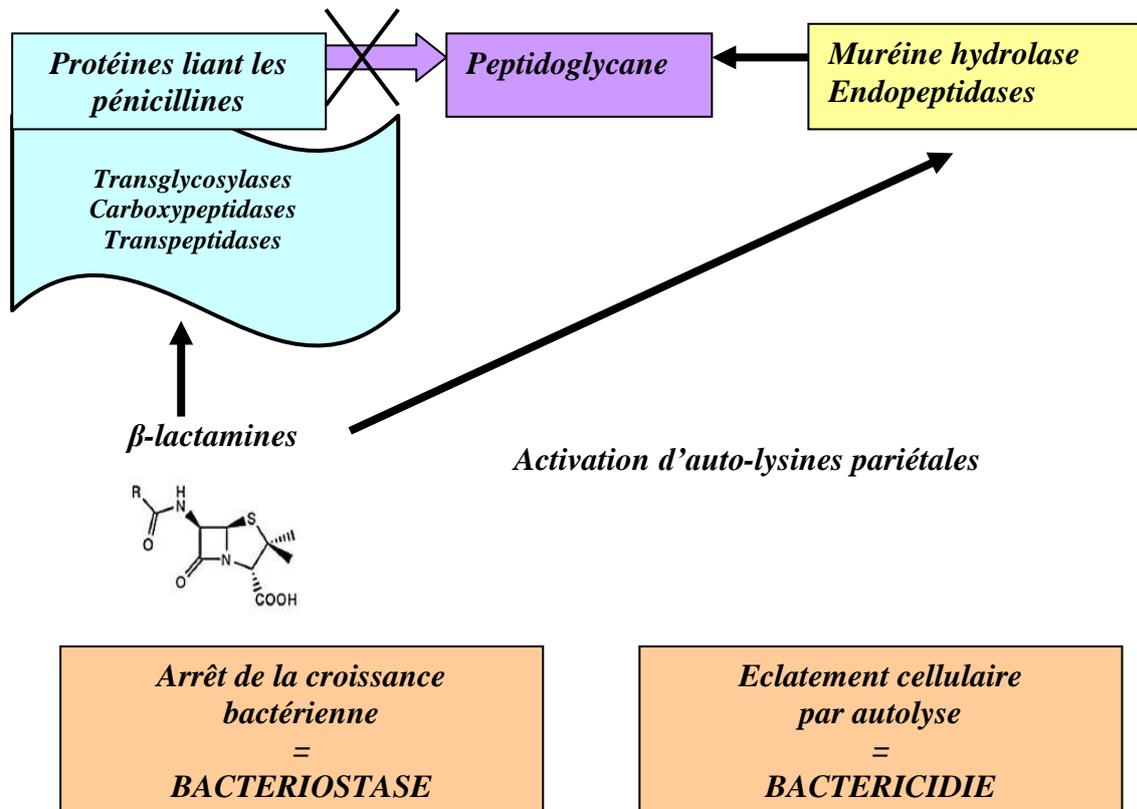
II-1-Rappel du mécanisme d'action des β -lactamines

Les β -lactamines agissent en bloquant la synthèse du peptidoglycane, constituant principal de la paroi bactérienne, indispensable au maintien de la morphologie bactérienne. Elles agissent sur les bactéries en phase exponentielle de croissance. Après franchissement de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, grâce à des canaux transmembranaires appelés porines, les β -lactamines peuvent agir sur leurs cibles à la face externe de la membrane cytoplasmique.

Les cibles des β -lactamines sont les PLP « protéines liant les pénicillines ». Le nombre des PLP est variable selon les espèces bactériennes. Chez *E. coli*, elles sont au nombre de 10 réparties en deux groupes : les PLP de poids moléculaire élevé (1A, 1B, 1C, 2 et 3) et les PLP de faible poids moléculaire (4, 5, 6, 6b, et 7) (Bonnet, 2006). Les PLP de poids moléculaire élevé dites « essentielles » possèdent des activités transglycosylases, transpeptidases et carboxypeptidases, assurant la formation des chaînes polysaccharidiques et les liaisons inter-peptidiques indispensables à la synthèse du peptidoglycane. Les autres PLP assurent les remaniements de ces chaînons (Bonnet, 2006).

Les β -lactamines présentent une analogie structurale avec le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala du peptidoglycane et se comportent comme un substrat suicide lors de leur fixation aux PLP induisant un arrêt de la synthèse du peptidoglycane. Une modification morphologique de la bactérie (formes ovoïdes ou filamenteuses) et l'arrêt de la croissance bactérienne sont alors observés (Figure 5, page 23). L'effet bactéricide des β -lactamines résulte de phénomènes secondaires mal compris déclenchés par l'inhibition des PLP. Il est initié par une altération du peptidoglycane qui induirait une activation dérégulée d'autolysines pariétales (muréine hydrolase et endopeptidase) conduisant à la lyse bactérienne (Bonnet, 2006).

Figure 5 : Schéma du mécanisme d'action des β -lactamines.



II-2-Mécanisme de résistance aux β -lactamines

La résistance peut être naturelle ou acquise. La résistance naturelle est une caractéristique propre appartenant à l'ensemble des souches d'une espèce. Elle est stable, liée au patrimoine génétique et transmise à la descendance. La résistance acquise résulte d'une modification du patrimoine génétique. Elle ne concerne qu'une proportion plus ou moins importante de la population bactérienne. Elle est instable, variable dans le temps et transmise aux cellules filles. Elle peut résulter soit d'une mutation chromosomique, soit d'une acquisition de gènes grâce à un élément génétique mobile (plasmide ou transposon).

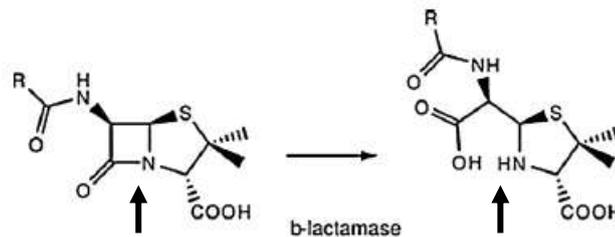
Chez les bacilles à Gram négatif, les principaux mécanismes de résistance naturelle ou acquis aux β -lactamines sont l'imperméabilité, l'efflux, et surtout la production d'enzymes inactivatrices : les β -lactamases.

II-2-1-Production de β -lactamases

II-2-1-1-Classification des β -lactamases

La production d'enzymes inactivatrices est le principal mécanisme de résistance des entérobactéries aux β -lactamines. L'inactivation des β -lactamines par les β -lactamases est due à l'ouverture du cycle β -lactame au niveau de la liaison amide, suite à une réaction d'hydrolyse (Figure 6).

Figure 6 : Mécanisme d'hydrolyse d'une β -lactamine par une β -lactamase (Ruppé, 2010).



Deux classifications des β -lactamases sont actuellement utilisées (Tableau I, page 26) :

- la classification structurale d'Amblar (Amblar, 1980) est basée sur la séquence primaire en acides aminés du site actif, définissant quatre classes d'enzymes de A à D. Les enzymes de classe A, C et D sont des enzymes à sérine active et les enzymes de classe B correspondent aux métallo-enzymes. Les sérines β -lactamases utilisent un site actif à sérine pour hydrolyser le noyau β -lactame. Les métallo- β -lactamases nécessitent la présence de cations divalents type ions Zinc Zn^{2+} pour être actives.
- la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995) repose sur l'activité hydrolytique de la β -lactamase vis-à-vis de différents substrats (β -lactamines) et sur la restauration éventuelle de l'activité par des inhibiteurs de β -lactamases, tels que l'acide clavulanique ou l'EDTA. Cette classification rend compte de la diversité fonctionnelle des β -lactamases au sein des quatre classes structurales.

La **classe A** est subdivisée en 6 groupes fonctionnels :

- le groupe fonctionnel **2a** comprend les pénicillinases à spectre étroit, limité aux seules pénicillines.
- le groupe fonctionnel **2b** regroupe les pénicillinases à spectre étroit (TEM-1, TEM-2 et SHV-1). Elles ont un spectre élargi parfois aux céphalosporines de première génération.
- le groupe fonctionnel **2be** correspond aux β -lactamases à spectre étendu (BLSE) de classe A. Elles hydrolysent majoritairement les β -lactamines à large spectre mais elles touchent également les pénicillines et les céphalosporines, à l'exception des céphamycines. La sensibilité aux inhibiteurs de β -lactamases permet la détection de ce phénotype, par la mise en évidence d'une image de synergie entre les inhibiteurs et les C3G et/ou les C4G et/ou l'aztréonam. En général, les carbapénèmes et les céphamycines ne sont pas hydrolysés par les BLSE.
- le groupe fonctionnel **2br** comprend les enzymes résistantes aux inhibiteurs, dérivées de TEM-1 et TEM-2 par mutations ponctuelles. Elles sont ainsi appelées TRI ou IRT pour « TEM Résistantes aux Inhibiteurs ».
- le groupe fonctionnel **2c** correspond aux carbénicillinases ou enzymes de type CARB (ou PSE) avec une activité plus importante sur les carboxypénicillines que sur la benzylpénicilline.
- le groupe fonctionnel **2e** correspond à des enzymes appelées céfuroximases, sensibles à l'acide clavulanique, actives uniquement sur les aminopénicillines, les céphalosporines de première génération et deuxième génération, à l'exception des céphamycines.
- le groupe fonctionnel **2f** comprend les carbapénémases de classe A, actives sur les pénicillines, les céphalosporines, l'aztréonam et les carbapénèmes.

Les enzymes de **classe B** ou groupe fonctionnel **3** comprennent les carbapénémases résistantes à l'acide clavulanique et sensibles à l'action de l'EDTA. L'activité des métallo-enzymes dépend de la présence d'un ion Zinc (Zn^{2+}) au sein du site actif. Elles sont inhibées *in vitro* par un chélateur type EDTA, pour Ethylène - Diamine - Tétra - Acétique. Leur spectre d'action comprend les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et, dans une moindre mesure, l'aztréonam (Lartigue *et al.*, 2004 ; Garau *et al.*, 2005 ; Walsh *et al.*, 2005).

Les enzymes de **classe C** regroupent toutes les céphalosporinases de type AmpC et forment le groupe fonctionnel **1**. Leur spectre recouvre les aminopénicillines, les céphalosporines de première génération et, selon la nature de l'enzyme, les céphalosporines de deuxième génération dont les céphamycines. Elles hydrolysent les céphalosporines 5 à 10 fois plus vite que la benzylpénicilline. Elles ne confèrent généralement pas de résistance aux carbapénèmes et aux céphalosporines de quatrième génération. Elles sont insensibles aux inhibiteurs tels que l'acide clavulanique mais sont inhibées par de faibles concentrations de cloxacilline (50 - 300 mg/L) (Bonnet, 2006).

Enfin, les enzymes de **classe D**, comprennent les oxacillinases (OXA pour Oxacillin-hydrolysing-abilities) et correspondent au groupe fonctionnel **2d** de la classification de Bush. Leur activité hydrolytique est plus importante sur l'oxacilline que sur la benzylpénicilline. Elles sont insensibles à l'acide clavulanique.

Tableau I : Tableau récapitulatif des classifications des β -lactamases selon Bush et Ambler.

Type	Bush	Ambler	Inhibiteur	Exemples
Céphalosporinase de type AmpC	1	C	Cloxacilline	Entérobactéries Groupe 3
Pénicillinase Gram positif	2a	A	Clavulanate	Pénicillinase <i>S. aureus</i>
Pénicillinase spectre étroit	2b	A	Clavulanate	TEM-1, SHV-1
BLSE	2be	A	Clavulanate	TEM-3, SHV-2, CTX-M, PER, VEB
Pénicillinases résistantes aux inhibiteurs	2br	A	-	TEM-30...
Carbécillinases	2c	A	Clavulanate	PSE-1
Oxacillinases	2d	D	-	OXA-1
Céfuroximase	2e	A	Clavulanate	Céphalosporinase <i>Proteus vulgaris</i>
Carbapénémase	2f	A	Clavulanate	KPC, GES...
Métallo-β-lactamase	3	B	EDTA	VIM, IMP...

II-2-1-2-Résistance naturelle des entérobactéries

Les entérobactéries produisent naturellement diverses β -lactamases. Cela conduit à une classification en sept groupes phénotypiques de résistance aux β -lactamines (Tableau II).

Tableau II : Les différents groupes d'Entérobactéries (Bonnet, 2006).

Gp.	Phénotype	Entérobactéries
Gp. 0	Absence de gène de β -lactamase	<i>Salmonella</i> spp., <i>P. mirabilis</i>
Gp. 1	CASE de type AmpC non inductible	<i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> spp.
Gp. 2	PASE de bas niveau	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>C. koseri</i>
Gp. 3	CASE de type AmpC inductible	<i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp., <i>C. freundii</i> , <i>H. alvei</i>
Gp. 4	PASE associée à une CASE	<i>Y. enterocolitica</i> , <i>S. fonticola</i>
Gp. 5	céfuroximase	<i>P. vulgaris</i> , <i>P. penneri</i>
Gp. 6	BLSE chromosomique	<i>Kluyvera</i> spp., <i>Rhanella</i> spp...

(Gp. = groupe, CASE = Céphalosporinase, PASE = Pénicillinase)

A noter que les *E. coli*, comme les *Shigella* spp., appartiennent au groupe 1. Ces espèces sont naturellement sensibles aux aminopénicillines, carboxypénicillines, uréidopénicillines, à l'aztréonam, aux céphalosporines et aux carbapénèmes. Cependant, elles produisent à bas niveau une céphalosporinase chromosomique non inductible de type AmpC (groupe fonctionnel 1, classe C), entraînant parfois une réduction de la sensibilité aux aminopénicillines, aux associations avec inhibiteurs ainsi qu'aux C1G.

II-2-2-Résistance par imperméabilité membranaire

La membrane externe est formée en partie de lipopolysaccharides, caractéristique des bactéries à Gram négatif. Cette organisation explique la résistance naturelle aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée : pénicillines G, V, et M, rifampicine, acide fucidique, macrolides et glycopeptides.

Chez *E. coli*, les β -lactamines hydrophiles peuvent emprunter les voies des porines OmpF/OmpC. Ces porines forment des canaux protéiques qui permettent des échanges par diffusion passive (Nikaido, 2003).

Au cours d'un stress environnemental, notamment en présence d'antibiotiques, la diminution du nombre de porines (OmpX et OmpF) et la perte de leur fonctionnalité altèrent ainsi la perméabilité membranaire (Dupont *et al.*, 2007 ; Viveiros *et al.*, 2007).

Ce mécanisme s'exprime en général à bas niveau, mais touche plusieurs familles d'antibiotiques. Il est souvent associé à d'autres mécanismes de résistance : efflux ou production de β -lactamases (James *et al.*, 2009). La combinaison de ces différents mécanismes conduit à une accumulation de résistance avec possibilité d'un haut niveau de résistance aux β -lactamines, notamment aux carbapénèmes (Ananthan and Subha, 2005 ; Martinez-Martinez, 2008).

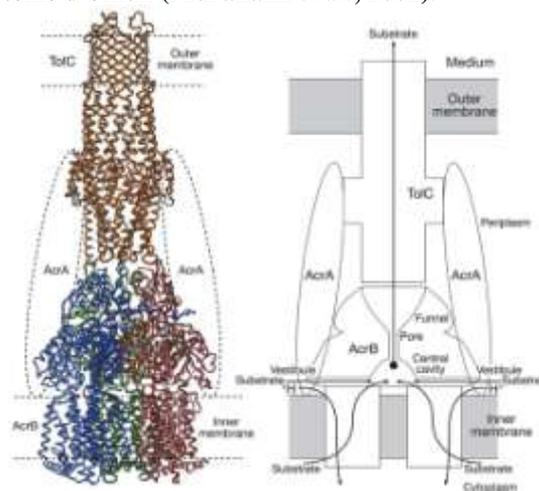
II-2-3-Résistance par expression de systèmes d'efflux actifs

Les systèmes d'efflux assurent l'expulsion active de produits du métabolisme, de métaux lourds ou de toxiques comme les antibiotiques, en utilisant la force proton motrice.

Chez *E. coli*, les protéines TolC, AcrA et AcrB constituent le système d'efflux majeur conférant le premier mécanisme de résistance aux antibiotiques lipophiles (Murakami *et al.*, 2002). Ce système d'efflux est constitué de trois protéines (Figure 7) :

- une protéine membranaire, assurant le passage à travers la membrane externe, insérée dans cette dernière : TolC ;
- une protéine périplasmique, lien entre la pompe (Acr B) et la protéine de membrane externe (TolC) : AcrA ;
- une protéine jouant le rôle de pompe, insérée dans la membrane cytoplasmique ou interne : AcrB.

Figure 7 : Structure d'un système d'efflux (Murakami *et al.*, 2002).



Ces systèmes tripartites non spécifiques confèrent une résistance de bas niveau aux tétracyclines, au chloramphénicol, aux fluoroquinolones ou aux β -lactamines. Une mutation dans la séquence de ces gènes ou dans le gène régulateur *acrR* peut avoir pour effet une hyperexpression de cette pompe et, par conséquent, une résistance accrue vis-à-vis des antibiotiques concernés (Murakami *et al.*, 2002 ; Bonnet, 2006).

II-3-Résistance des E. coli par production de β -lactamases

II-3-1-Résistance naturelle

II-3-1-1-Phénotype sauvage

Comme nous l'avons souligné, *E. coli* appartient au groupe 1 des entérobactéries et possède une céphalosporinase AmpC constitutive. Chez cette espèce, l'absence de gène régulateur *ampR* constitue une particularité (Honore *et al.*, 1986). Le promoteur du gène *ampC* est faible et associé à un atténuateur transcriptionnel, probablement responsable de la très faible expression du gène. Cette organisation génétique explique la très faible quantité d'enzyme produite et donc un niveau de résistance non détectable chez les souches sauvages, sensibles à l'ensemble des β -lactamines (Jaurin *et al.*, 1981).

II-3-1-2-Hyperexpression de la céphalosporinase naturelle

Le mécanisme prépondérant à l'origine de l'hyperproduction éventuelle de AmpC semble lié à une régulation transcriptionnelle en fonction de la force du promoteur. La vitesse de fixation de l'ARN polymérase, permettant la synthèse de transcript (ARNm) codant pour la céphalosporinase AmpC au promoteur est influencée par la séquence d'héxamères en position -35 et -10 en amont de AmpC. Ces héxamères sont des séquences consensus : la région -35 est TTGACA et la séquence -10 (appelée Pribnow box) est TATAAT (Figure 8, page 30). Les deux premières bases et la dernière base de la région -10 sont très conservées, les trois autres bases de l'hexanucléotide sont variables. Pour la région -35, les trois premières bases sont les plus conservées, les trois dernières présentant un plus grand degré de variabilité. La distance entre les séquences -35 et -10 varie de 15 à 21 paires de base, plus fréquemment de 16 à 18 pb, la distance optimale étant de 17 pb. Il existe une bonne corrélation entre la force du promoteur et le degré d'homologie avec la séquence consensus. La présence d'un atténuateur (présentant une structure en épingle à cheveux) est probablement responsable du très faible niveau d'expression du gène chez les souches sauvages. Les mutations en position -11, -32 et -42 (Figure 8, page 30), sont capables d'augmenter les interactions promoteur - ARN polymérase et donc le niveau de transcription du gène (Caroff *et al.*, 2000 ; Corvec *et al.*, 2002). A noter que ces souches appartiennent majoritairement au groupe phylogénétique A, présentant généralement peu de facteurs de virulence (Corvec *et al.*, 2007).

Figure 8 : Séquence du promoteur de *E. coli* K12, et principales mutations (en vert) à l'origine de l'hyperproduction de AmpC.

-42 -32 -11
-35 BOX -10 BOX -1

CTGCTATCCCTGACAGTTGTCACGCTGATTGGTGTCGTTACAATCTAACGCATCGC

Depuis 1995, des céphalosporinases AmpC à spectre étendu appelées ESAC pour « Extended Spectrum AmpC β -lactamases » ont été rapportées. Elles hydrolysent les céphalosporines à spectre étendu telles que le céfépime et le cefpirome. Elles dérivent de la céphalosporinase chromosomique par différents événements génétiques (insertion, délétion ou substitution) dans la partie C-terminale de l'enzyme (Mammeri *et al.*, 2006 ; Cremet *et al.*, 2010). Elles sont souvent décrites chez *E. coli*. Par ailleurs, l'association de la perte d'une porine OmpC ou OmpF chez les ESAC confère une résistance à l'ertapénème et une sensibilité diminuée à l'imipénème (Mammeri *et al.*, 2008).

II-3-2-Résistance acquise des *E. coli* à l'égard des β -lactamines

II-3-2-1-Production de « pénicillinase de haut niveau »

Le phénotype « pénicillinase de haut niveau » est d'expression variable. Selon la nature du promoteur des gènes de structure ou le nombre de copies de gènes, la sensibilité aux uréïdopénicillines et aux céphalosporines de première génération apparaît peu ou pas affectée. Les β -lactamases impliquées sont les pénicillinases plasmidiques de classe A (groupe fonctionnel 2b) : TEM-1, TEM-2 et SHV-1 (Williams, 1999). Selon les données de 2004 de l'Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques, 40 à 55 % des souches de *E. coli* présentent ce phénotype de résistance (ONERBA, 2004).

II-3-2-2-Production de « pénicillinase résistante aux inhibiteurs »

Ce phénotype a été initialement décrit en 1989 chez *E. coli* (Martinez *et al.*, 1989). Une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et, dans une moindre mesure, aux uréïdopénicillines avec ou sans inhibiteur est retrouvée.

Cependant, les céphalosporines et, notamment les céphalosporines de première génération, conservent leur activité permettant une distinction phénotypique avec les pénicillinases de haut niveau. Ces β -lactamases codées par des plasmides constituent des variants de TEM-1 ou SHV-1 par mutations ponctuelles dans le gène de structure.

Les oxacillinases sont des enzymes appartenant au groupe fonctionnel 2d (groupe D). Elles peuvent présenter un phénotype de résistance proche du phénotype TRI.

II-3-2-3-Production de « β -lactamases à spectre étendu » (BLSE)

Les BLSE sont codées par des plasmides facilitant leur diffusion. Dans les années 1980, les BLSE dérivées de TEM et SHV ont émergé dans les hôpitaux chez *Klebsiella pneumoniae*, suite à l'utilisation massive des C3G (Bradford, 2001). Récemment, l'épidémiologie des BLSE s'est modifiée avec la dissémination massive et rapide des CTX-M au niveau mondial, indifféremment isolées en milieu communautaire et hospitalier, principalement chez *E. coli* (Livermore *et al.*, 2007)

II-3-2-2-1-Les BLSE de type TEM et SHV

Les premières BLSE dérivées par mutation ponctuelle des pénicillinases TEM-1, TEM-2 et SHV-1 (Bradford, 2001). Selon la nature des mutations présentes, le spectre d'hydrolyse de l'enzyme déterminait son classement dans l'un des deux grands groupes suivants :

- les ceftazidimases conférant un plus haut niveau de résistance à la ceftazidime qu'au céfotaxime (TEM-5, TEM-24, SHV-4, SHV-5...).
- les cefotaximases conférant un niveau de résistance équivalent à ces deux molécules (TEM-3, SHV-2...).

II-3-2-2-2-Les BLSE de type CTX-M

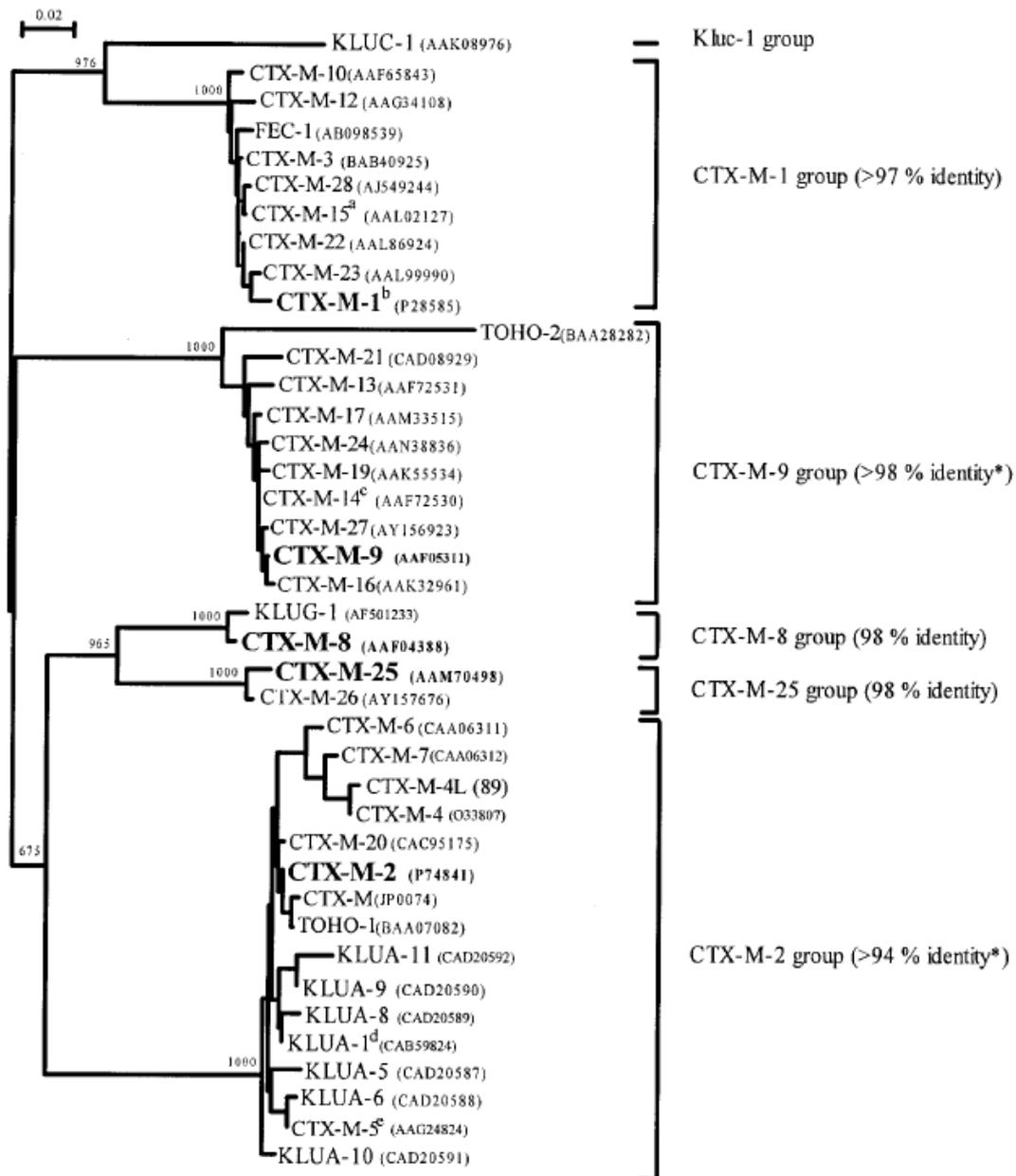
Dans les années 1980-1990, les BLSE étaient retrouvées préférentiellement dans les hôpitaux, en unités de soins intensifs, chez *Enterobacter* et *Klebsiella*. Depuis la fin des années 1990, de nouvelles BLSE non dérivées de TEM et SHV les ont supplantées. Ces nouvelles BLSE comprennent :

- des céfotaximases de type CTX-M ;
- des ceftazidimases de type PER, GES, ou VEB, rarement retrouvées en France.

Les BLSE ne sont plus désormais l'apanage exclusif des hôpitaux. Elles sont également acquises dans la communauté et fréquemment retrouvées chez *E. coli* (Livermore *et al.*, 2007). Quentin *et al.* ont ainsi rapporté une augmentation de la prévalence en milieu communautaire de 0,3 % en 1999 à 1,1 % en 2006, principalement en raison de la diffusion des CTX-M (Quentin *et al.*, 2004).

Les CTX-M sont codées par des gènes *bla*_{CTX-M} dont les séquences nucléotidiques présentent des homologies importantes avec des gènes codant pour des BLSE chromosomiques naturelles de bactéries de l'environnement : *K. ascorbata*, *K. gorgiana*, *K. cryocrescens* (Bonnet, 2004). Actuellement, près de 100 CTX-M sont répertoriées et classées en cinq groupes selon leur homologie de séquence en acides aminés (Figure 9 - <http://www.lahey.org/studies/other.asp>).

Figure 9 : Dendrogramme de la famille des CTX-M (Bonnet, 2004).



Les études des environnements génétiques de ces gènes ont permis de souligner l'implication de différents éléments dans l'acquisition et la dissémination des gènes *bla*_{CTX-M}. Par exemple, la séquence d'insertion *ISEcp1* constitue un élément indispensable à la mobilisation et à l'expression des gènes *bla*_{CTX-M} en apportant un promoteur fort (Poirel *et al.*, 2003).

Les clones prédominants dans le monde appartiennent au groupe 1, avec principalement CTX-M-3 et surtout CTX-M-15 (Boyd *et al.*, 2004). Une étude nationale réalisée en 2005 montre que les BLSE étaient principalement isolées chez *E. coli* (48,5 %). Il s'agissait de CTX-M dans 76 % des cas, dont 85 % appartenaient au groupe CTX-M-1 et 11 % au groupe CTX-M-9 (Galas *et al.*, 2008).

L'analyse des différentes caractéristiques (groupe phylogénétique, profil ERIC2 par PCR, sérotype) d'un panel de souches isolées dans 8 pays sur 3 continents différents a montré la dissémination d'un clone O25 : H4 pathogène appartenant au ST131 et de groupe phylogénétique B2 (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008). Devant cette diffusion inter-continentale, une technique rapide de détection par PCR duplex de ce clone a été récemment mise au point (Clermont *et al.*, 2009). Elle a mis en évidence que 45 % des *E. coli* O25 : H4 produisait une CTX-M-15. Néanmoins, ce clone pouvait aussi produire des CTX-M-3, CTX-M-14... Dans de rares cas, aucune BLSE était retrouvée (Clermont *et al.*, 2009).

L'augmentation des flux migratoires des populations humaines (tourisme, tourisme médical, déplacements professionnels) pourrait expliquer en partie la dissémination mondiale des CTX-M. Par ailleurs, des animaux sauvages, d'élevage ou de compagnie hébergeraient également des souches de *E. coli* productrices de CTX-M (Johnson *et al.*, 2008).

Enfin, la plupart des souches productrices de CTX-M sont également résistantes à de nombreuses familles d'antibiotiques : les fluoroquinolones, les aminosides, le cotrimoxazole, les tétracyclines ou le chloramphénicol. L'association de gènes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1}, *tet(A)*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-II*, *qnr* a été retrouvée sur le même plasmide (Boyd *et al.*, 2004).

II-3-2-3-Production de « céphalosporinase AmpC plasmidique »

Les β -lactamases AmpC plasmidiques découvertes dans les années 1990 confèrent un profil de résistance comparable à celui des entérobactéries exprimant leur β -lactamase AmpC chromosomique. Les gènes *ampC* ont été mobilisés du chromosome d'espèces naturellement productrices d'AmpC vers des plasmides qui ont diffusé au sein d'entérobactéries tels que *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* et *Salmonella* spp.

Les gènes codant pour ces enzymes dérivent de gènes chromosomiques d'espèces naturellement productrices d'AmpC et ont été classés en six groupes en fonction du pourcentage de similitude avec les gènes *ampC* d'origine : ACC (*Hafnia alvei*), FOX (*Aeromonas*), MOX (*Aeromonas*), DHA (*Morganella morganii*), CIT (*Citrobacter freundii*), EBC (*Enterobacter cloacae*) (Perez-Perez and Hanson, 2002). La distribution géographique de ces enzymes plasmidiques est mondiale. Malgré un nombre croissant de variants, CMY-2 reste la céphalosporinase plasmidique prépondérante dans le monde. La difficulté de leur détection semble sous-estimer leur prévalence. La majorité de ces enzymes plasmidiques sont synthétisées de manière constitutive, en raison de l'absence de gènes de régulation. Seules DHA et ACC restent liées au gène *ampR* et sont inductibles (Jacoby, 2009).

Les β -lactamases AmpC plasmidiques confèrent une résistance de niveau variable aux C3G. Les carbapénèmes sont rarement touchés. Les plasmides, vecteurs de ces déterminants, peuvent également être le support de plusieurs gènes de résistance aux aminosides, au chloramphénicol, aux quinolones, aux sulfonamides, aux tétracyclines et au triméthoprime (Jacoby, 2009).

Une étude menée récemment au C.H.U. de Nantes chez *E. coli*, a montré que seule CMY-2 était représentée. Les quatre groupes phylogénétiques et onze séquences types différents ont été détectés soulignant la diversité génétique de cette espèce (Corvec *et al.*, 2010). A l'inverse, sur la même période, une étude réalisée chez *K.pneumoniae* a rapporté la présence exclusive de DHA-1 (données nantaises non publiées).

II-3-2-4-Production de « carbapénémases »

Les carbapénémases de classe A de type KPC et GES (groupe fonctionnel 2f) sont codées par des plasmides qui ont permis leur diffusion chez de nombreuses espèces : *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Salmonella enterica* et *E. coli* (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2007). La première description en France de KPC-2 a été faite chez *K. pneumoniae* par Naas *et al.* en 2005 (Naas *et al.*, 2005). Chez *E. coli*, KPC-2 a été décrite en 2006 par Navon *et al.* (Navon-Venezia *et al.*, 2006). Les carbapénémases de classe A confèrent une résistance à l'ensemble des β -lactamines, y compris les céphamycines, les C3G, les C4G et les carbapénèmes. Une image de synergie peut être observée entre le disque d'acide clavulanique et le disque d'imipénème. Les KPC ont par ailleurs un très haut potentiel de dissémination inter-espèce (Petrella *et al.*, 2008).

Les carbapénémases plasmidiques de classe B (groupe fonctionnel 3) ont également été mises en évidence chez les entérobactéries. La première description en France a été faite en 2004 chez *K.pneumoniae* avec mise en évidence d'une enzyme de type VIM qui hydrolyse toutes les β -lactamines, à l'exception de l'aztréonam (Lartigue *et al.*, 2004). En France, ces enzymes restent pourtant rares. Cependant, nos voisins européens, italiens et grecs notamment, rapportent régulièrement des souches de *E. coli* productrices de métallo-enzymes (Miriagou *et al.*, 2003 ; Scoulica *et al.*, 2004). Les plasmides, support génétique de ces β -lactamases, portent généralement d'autres gènes de résistance aux antibiotiques. Cette co-résistance souligne les risques de co-diffusion et de co-sélection pouvant conduire à des impasses thérapeutiques.

III-Les principales techniques de typage bactérien

III-1-Généralités sur le typage bactérien

E. coli est un des pathogènes fréquemment impliqués dans les infections communautaires et hospitalières. Malgré des profils de virulence variés et des phénotypes de résistance divers, *E. coli* reste moins impliqué que *K. pneumoniae* dans les épidémies hospitalières. Toutefois, des épidémies à *E. coli* sont régulièrement rapportées, notamment ceux qui produisent des BLSE (Alsterlund *et al.*, 2009). Si la source n'est pas systématiquement retrouvée, la mise en œuvre de techniques de typage moléculaire demeure indispensable.

III-1-1-Intérêts du typage bactérien

Le typage bactérien permet d'une part, de mettre en évidence l'existence de différences entre des isolats non liés génétiquement et, d'autre part, d'évaluer le degré de similitude entre des isolats retrouvés soit chez un même patient, soit lors d'une épidémie chez des patients différents hospitalisés dans le même service. Par ailleurs, ces techniques peuvent être mises en œuvre pour rechercher une source commune lors de cas groupés dans le temps et dans une même unité de lieu. Elles permettent d'affirmer ou d'infirmer l'origine de la contamination (fibroscopie, plaque radiologique ou réseau d'eau) (Struelens, 2000).

Les marqueurs épidémiologiques utilisés pour le typage bactérien sont, soit des caractères phénotypiques qui prennent en compte l'expression de certains gènes, soit des caractères génotypiques qui étudient l'ensemble du génome ou un certain nombre de gènes dits « ménage ».

Le typage épidémiologique bactérien a différentes applications :

- sur le plan individuel, il permet de confirmer la présence d'une infection par des pathogènes opportunistes provenant d'un réservoir commensal. Il permet également d'établir le foyer initial d'une infection ou de distinguer une récurrence d'une réinfection ;
- sur le plan collectif ou épidémiologique, il permet de confirmer la transmission endémique ou épidémique d'un pathogène au sein d'une population humaine, de déceler l'origine de la contamination et le mode de transmission, de suivre l'évolution du réservoir pathogène au sein d'une population et de mesurer l'efficacité des stratégies de maîtrise des infections épidémiques.

Enfin, sur le plan phylogénétique, le typage permet de reconnaître au cours du temps, la transmission d'une lignée clonale à travers de nombreux cycles infectieux et déterminer la vitesse de l'horloge moléculaire (Struelens, 2000).

III-1-2-Définitions utiles

- Un **isolat** concerne une population bactérienne dérivée d'une seule colonie bactérienne.
- Une **souche** est un isolat ou un groupe d'isolats possédant les mêmes caractéristiques phénotypiques et génotypiques, différentes des autres isolats de la même espèce.
- Un **clone** peut être défini comme un ensemble d'isolats issus d'un ancêtre commun. Le degré de similitude entre les souches considéré comme significatif d'une lignée clonale dépend de l'espèce étudiée (plasticité et structure génétique de la population), des marqueurs utilisés (vitesse de l'horloge moléculaire) et du cadre spatio-temporel de l'étude (quelques jours à quelques décennies).

III-1-3-Les différents types d'étude

Le choix des marqueurs varie selon le type d'application des méthodes de typage.

L'étude épidémiologique locale est la principale application du typage. Elle permet de suivre la dynamique d'importation et de transmission secondaire des clones multi-résistants ou virulents. Elle compare un nombre limité d'isolats. Elle utilise des marqueurs facilement adaptables à la diversité des espèces, généralement de haut pouvoir discriminant. Le typage doit alors être reproductible au cours des mois voire des années. Les profils seront regroupés et analysés ensemble. Le typage est dit « comparatif ».

La surveillance internationale est utilisée pour suivre la prévalence et la diffusion géographique des grands clones épidémiques. Des marqueurs phénotypiques et génotypiques doivent être standardisés et générer des profils types définis selon une nomenclature internationale. Cette standardisation permet la comparaison et l'intégration des résultats obtenus dans différents laboratoires dans une banque de données mondiale *via* Internet. Le typage est dit « définitif ».

L'étude de la génétique des populations bactériennes utilise quant à elle, des marqueurs capables d'analyser de multiples séquences ou gènes, afin d'établir des hypothèses de structure phylogénétique et d'évolution des populations (Struelens, 2000).

III-1-4-Critères de performance des systèmes de typage épidémiologique

Un système de typage doit répondre à un certain nombre de critères.

- La **typabilité** est la proportion de souches au sein d'une espèce qui produit un résultat interprétable. C'est la sensibilité de la technique.
- La **reproductibilité** est la capacité d'une technique à classer dans le même type une même souche testée de façon répétée.
- La **stabilité** d'une méthode correspond à la conservation des marqueurs définissant le type durant la répllication, la conservation bactérienne *in vitro* et la persistance de la bactérie chez l'hôte ou dans l'environnement. La connaissance de la plasticité génomique et phénotypique ainsi que celle de la structure génétique de l'espèce à étudier sont indispensables.
- Le **pouvoir discriminant** correspond à la probabilité de classer en types distincts, des isolats indépendants du point de vue épidémiologique mais représentatifs de la niche écologique, de l'espèce et du type de pathologie infectieuse considérée. C'est la spécificité de la technique.
- La **concordance épidémiologique** est la probabilité de classer dans le même type, les isolats provenant d'une épidémie monoclonale.
- La **polyvalence** est la capacité d'une technique à typer différentes espèces bactériennes avec un minimum de modifications de procédures techniques.
- La **simplicité** de la technique et la **facilité d'interprétation** des résultats (lisibilité) doivent être prises en considération de même que les **coûts** d'équipement et de réactifs.

D'une manière générale, aucun système de typage n'offre de performances idéales. Il est habituellement souhaitable de combiner deux systèmes utilisant des marqueurs indépendants pour obtenir une classification clonale stable (Struelens, 2000).

III-1-5-Les techniques d'agrégation des profils

Différents algorithmes sont disponibles pour construire une représentation graphique ou dendrogramme. Les dendrogrammes sont très utiles pour reconnaître les groupes de profils similaires ou identiques. La mesure des distances dérivées de marqueurs indépendants est indispensable pour ces études (Struelens, 2000).

La méthode de groupement par la distance moyenne pour UPGMA (« Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages »), établie selon les coefficients de similitude, est la plus courante et fournit l'image la plus fidèle de la matrice de distance.

La méthode de Ward regroupe les profils en minimisant l'augmentation des variances intra-groupes. Elle tend parfois à surestimer la similitude entre les profils éloignés.

La méthode de Neighbor-Joining, habituellement utilisée en phylogénie, minimise la longueur totale des branches dont la partie horizontale mesure la distance entre les individus. Les dendrogrammes sont très utiles pour reconnaître les groupes de profils similaires ou identiques.

III-2-Les marqueurs phénotypiques

La présence de ces marqueurs varie en fonction de l'activité de gènes régulateurs. En effet, certains déterminants exprimés en fonction du milieu de culture, de la température d'incubation ou des facteurs environnementaux exercent une pression sélective. C'est pourquoi, il est nécessaire de trouver des marqueurs neutres vis-à-vis de la sélection naturelle. En pratique quotidienne, certains marqueurs phénotypiques peuvent constituer un premier élément d'alerte ou de suivi d'isolats préalablement caractérisés (Struelens, 2000).

III-2-1-L'antibiotype

L'antibiogramme est un acte réalisé quotidiennement. L'émergence d'un nouveau phénotype multi-résistant constitue un signal d'alerte pour le bactériologiste suggérant parfois la dissémination épidémique d'un nouveau clone. Cependant, les souches hospitalières subissant une pression de sélection plus ou moins importante peuvent développer des profils de résistance relativement similaires. Ainsi, l'analyse des co-résistances peut permettre de suspecter une relation entre deux isolats cliniques dans un espace-temps réduit et dans une même unité de lieu.

III-2-2-Le biotype

Dans le cadre du biotype, l'activité métabolique est étudiée (utilisation des sucres, activités enzymatiques, auxanogrammes...). Ce type de marqueur est trop peu discriminant au-delà de l'espèce pour être utilisé seul. Il est généralement peu reproductible.

III-2-3-Le sérotype

Le sérotypage est rapide, facile et simple d'utilisation. Toutefois, au quotidien, toutes les souches ne sont pas sérotypables. Les *antisera* sont coûteux et cette technique demeure souvent réservée, pour certaines espèces bactériennes, aux laboratoires de référence comme système définitif.

III-2-4-Le lysotype

La lysotypie est une méthode lourde où la capacité des souches à résister ou non à la lyse par une bibliothèque de phages est testée. Cette méthode nécessite le maintien de stocks de phages biologiquement actifs. La typabilité de cette méthode est souvent incomplète et cette technique est en général réservée au laboratoire de référence comme système définitif.

III-3-Les marqueurs génotypiques

Deux grands types de techniques génotypiques existent : les techniques basées sur la restriction de l'ADN et les techniques basées sur l'amplification et le séquençage des gènes.

III-3-1-Le génome bactérien

Le génome bactérien comprend en général un chromosome unique d'ADN double brin circulaire. L'arrangement des gènes sur ce chromosome est appelé « carte génétique ». Cet arrangement est très conservé à l'intérieur des espèces et est similaire pour des genres proches. Des éléments génétiques mobiles comme les transposons, les bactériophages et les plasmides peuvent également être présents.

Un gène codant pour une fonction indispensable reste bien conservé car tout événement tendant à le modifier aboutit à la formation d'un individu non viable, éliminé par les mécanismes de sélection. Les ARN ribosomiaux et les enzymes essentielles au métabolisme sont ainsi en général bien conservés dans le monde vivant.

Les mécanismes et la vitesse d'évolution des différentes régions du génome bactérien ne sont pas parfaitement connus. Cependant, il semble que le taux de mutation peut être accéléré en réponse à un stress environnemental. De plus, des *loci* d'adaptabilité rapide ont récemment été localisés au niveau d'éléments d'ADN répétés en tandem, en nombre variable (« variable number tandem repeats » ou V.N.T.R.). Ces sites sont hypermutables du fait de leur caractère répété.

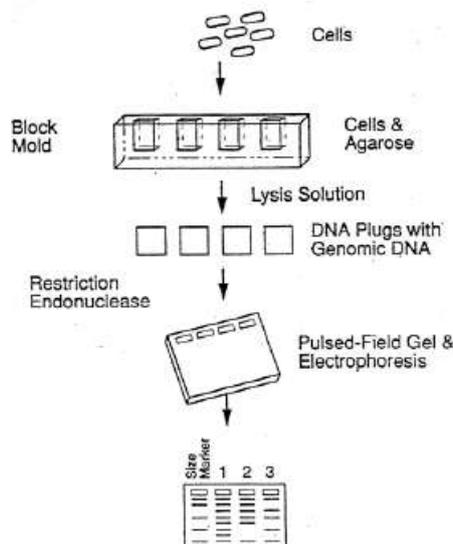
Des délétions ou des duplications d'éléments répétés surviennent ainsi lors du décalage du cadre de lecture de l'ADN polymérase, participant à l'évolution du génome bactérien et donc à la diversité des espèces.

III-3-2-Méthodes par restriction de l'ADN bactérien

III-3-2-1-L'électrophorèse en champs pulsés

L'électrophorèse en champs pulsés (E.C.P. ou P.F.G.E. pour Pulsed Field Gel Electrophoresis) consiste à digérer l'ADN total extrait avec précaution, dans une matrice d'agarose (appelée « plug ») grâce à une enzyme de restriction. Le faible nombre de site de coupure est généralement de l'ordre de 10 à 20. La taille des fragments varie de 30 à 2000 kb (kilobase). Afin de séparer les petits des gros fragments, une électrophorèse classique n'est pas assez discriminante. Un système particulier, le champs pulsé, décrit en 1984, permet cette séparation (Schwartz and Cantor, 1984). Il correspond à l'utilisation de champs électriques activés alternativement, permettant un phénomène de reptation des gros fragments d'ADN au sein du gel d'agarose (Figure 10).

Figure 10 : Schéma explicatif de l'électrophorèse en champs pulsés (Swaminathan, Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications, 1993).



L'analyse des différents profils de bandes se fait à l'aide de logiciels de bio-informatique (Gel compar[®] ou FPQuest[®]).

Tenover *et al.* ont proposé un système de standardisation et d'interprétation des profils obtenus en champs pulsés pour déterminer la relation génétique entre les isolats étudiés (Tenover *et al.*, 1995).

Les règles d'interprétation des profils sont basées sur les faits suivants : les isolats d'une épidémie proviennent d'un ancêtre commun et ont le même génotype mais des événements génétiques survenant au hasard au cours du temps peuvent altérer les profils P.F.G.E.

Les critères sont les suivants ;

- si le profil montre le même nombre de bandes, de taille identique chez deux isolats, les profils sont indistinguables, il s'agit de la même souche ;
- si le profil de l'isolat diffère du profil épidémique par un seul événement génétique (mutation, insertion, délétion) objectivé par une modification de profil de 2 à 3 bandes, les isolats sont considérés comme proches et génétiquement liés ;
- si le profil de l'isolat diffère du profil épidémique par deux événements génétiques (4 à 6 bandes de différences), les isolats sont considérés comme possiblement liés ;
- si le profil de l'isolat diffère du profil épidémique par plus de 3 événements génétiques, les isolats sont considérés comme non liés épidémiologiquement.

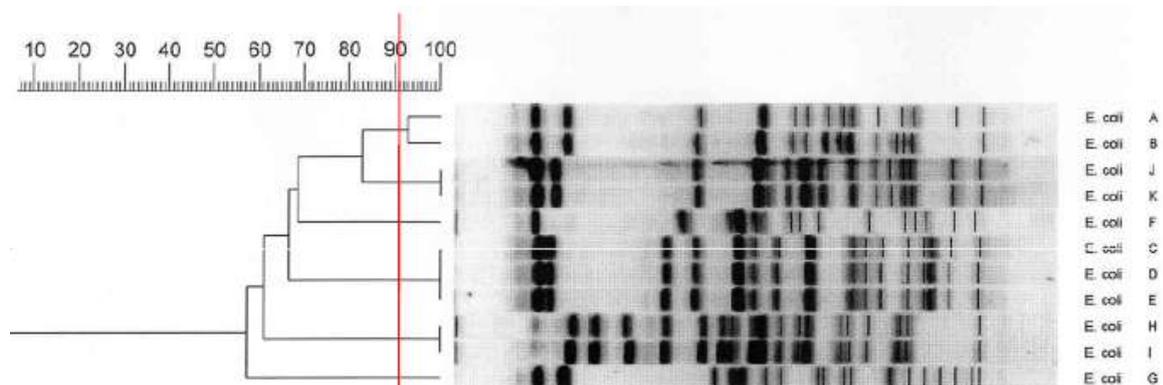
Le calcul du coefficient de Dice peut également être réalisé. Il permet d'établir le pourcentage de similitude entre les isolats testés.

$$\text{Coefficient de Dice} = \frac{\text{Nombre de fragments communs} \times 2}{\text{Nombre total de fragments dans les deux profils}}$$

Des isolats ayant un coefficient de Dice supérieur à 80 % sont généralement considérés comme appartenant au même clone.

Enfin, un arbre phylogénétique ou dendrogramme peut être réalisé afin de comparer le profil de bandes (ou code barre génétique) des bactéries entre elles (Figure 11).

Figure 11 : Exemple de dendrogramme obtenu au laboratoire de Bactériologie du C.H.U. de Nantes avec différentes souches de *E. coli* par P.G.F.E. Les souches J et K sont identiques. Les souches A, B, J, et K semblent appartenir au même clone.



Cette méthode permet la réalisation d'études épidémiologiques locales afin de mettre en évidence une éventuelle transmission d'une souche au sein d'un service clinique ou d'un hôpital. Elle fournit des résultats pour une épidémiologie à court ou moyen terme. L'électrophorèse en champs pulsés reste une technique de référence, avec une excellente résolution, un pouvoir discriminant supérieur à de nombreux autres marqueurs utilisant les profils de restriction et une bonne reproductibilité intra-laboratoire. Par ailleurs, cette technique est applicable à de nombreuses espèces bactériennes (Struelens, 2000).

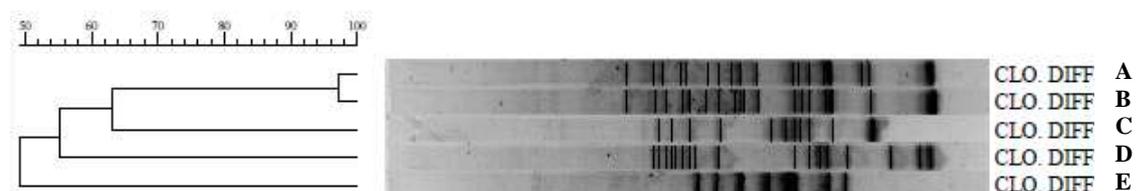
Néanmoins, elle demeure longue (7-12 jours en moyenne) et fastidieuse, nécessitant un équipement spécifique et onéreux (générateur de champs pulsés, cuve spéciale avec système de réfrigération...). De plus, cette technique sophistiquée requiert une expertise technique importante de la part des manipulateurs. Il n'existe pas de protocole universel pour l'ensemble des espèces bactériennes ou pour chaque type d'appareillage. Les résultats obtenus ne sont pas standardisés et standardisables au plan international : la comparaison des profils inter-laboratoires s'avère délicate (Struelens, 2000).

III-3-2-2-La PCR - ribotypage

Le ribotypage est l'analyse des polymorphismes de restriction de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal, aussi appelé RFLP pour « Restriction Fragment Length Polymorphism ». Les ADN codant pour les ARN ribosomaux 16S ou 23S ont une structure stable et conservée dans le temps. Cette analyse est basée sur la coupure de l'ADN par des enzymes de restriction à sites rares suivie d'un Southern blot. La procédure est assez longue et complexe.

La PCR - ribotypage fournit des résultats bien corrélés à ceux du ribotypage. Dans cette technique des amorces s'hybrident avec les parties conservées des gènes des ARN 16S et 23S permettant l'amplification des séquences variables intergéniques 16S-23S. Les fragments de PCR ainsi obtenus, sont séparés par électrophorèse, conduisant à un profil de bande (Figure 12) aussi discriminant que le ribotypage mais plus faible que celui de l'électrophorèse en champs pulsés (Struelens, 2000).

Figure 12 : Exemple de dendrogramme obtenu au laboratoire de Bactériologie du C.H.U. de Nantes avec différentes souches de *C. difficile* par PCR Ribotypage. Les souches A et B sont identiques. Les souches C, D, et E sont différentes.



III-3-3-Méthodes par amplification des gènes bactériens

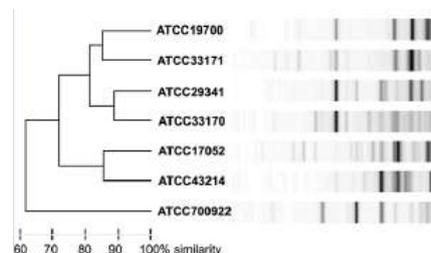
III-3-3-1-L'ERIC 2 PCR ou « Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR »

Cette technique est une REP-PCR pour « Repetitive Extragenic Palindromic » PCR. Elle est basée sur la présence dans le génome des bactéries de séquences répétées. Elle utilise les séquences ERIC (« Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus ») qui sont des séquences répétées intergéniques spécifiques des entérobactéries. Une amorce unique spécifique de ces régions permet l'amplification de fragments d'ADN de taille variable. Les produits de ces PCR aléatoires sont séparés par électrophorèse classique produisant un profil de bandes (Figure 13).

L'ERIC 2 PCR est une méthode à visée épidémiologique limitée dans le temps et l'espace, dont l'exploitation intra-laboratoire est préférable bien que l'exploitation inter-laboratoire reste possible. Cette technique est rapide, flexible, simple et peu chère par rapport à l'électrophorèse en champs pulsés. Cette technique est désormais semi-automatisée avec l'automate Diversilab[®] (bioMérieux).

Elle présente un bon pouvoir de discrimination qui reste cependant inférieur à celui de l'électrophorèse en champs pulsés. L'ERIC2 PCR est une technique de typage épidémiologique à court terme voire moyen terme. Elle peut être utilisée en première intention avant l'électrophorèse en champs pulsés, pour établir le degré de parenté entre les isolats. Si les profils de bandes sont identiques ou très proches, il est judicieux de compléter l'analyse par une électrophorèse en champs pulsés, pour déterminer le degré de similitude entre les isolats cliniques (Struelens, 2000).

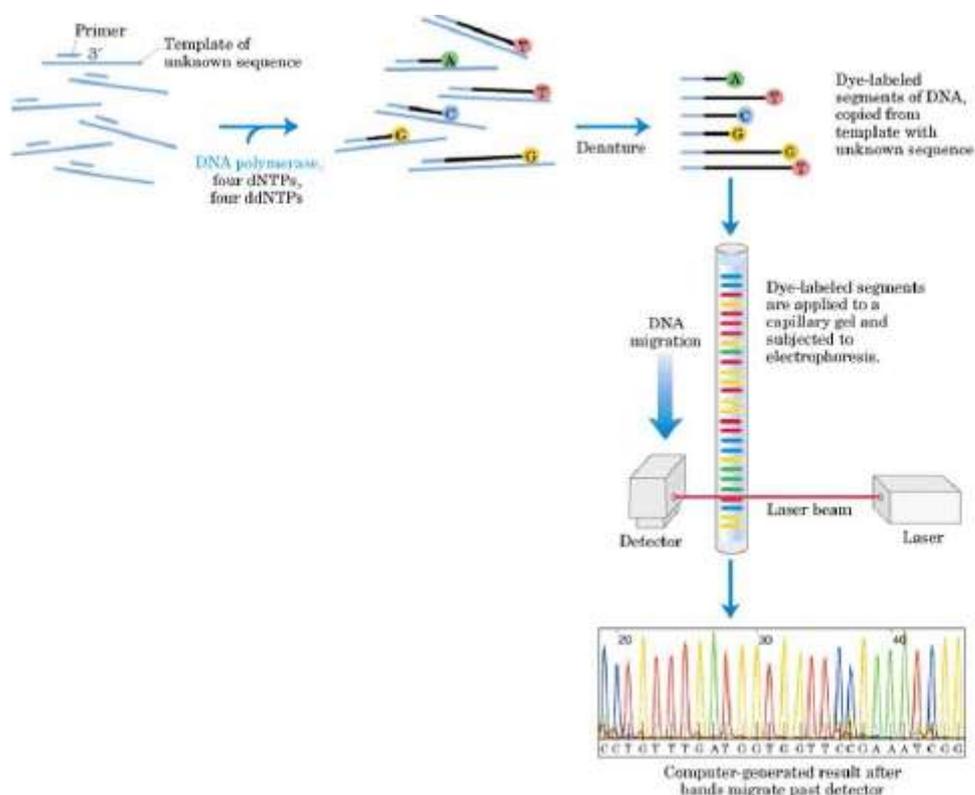
Figure 13 : Exemple de dendrogramme par ERIC2 PCR. Les souches sont différentes.



III-3-3-2-Le Multi-Locus Sequence Type

Cette méthode transpose la technique de l'analyse des isoenzymes appelée « Multi-Locus Enzyme Electrophoresis ». Le M.L.E.E. consistait à étudier le profil de migration électrophorétique de différentes enzymes. Le M.L.S.T. compare les séquences de gènes codant pour des enzymes métaboliques (gènes domestiques d'évolution lente) afin de mesurer la distance génétique entre les différentes souches. L'amplification spécifique, par PCR, de 6 à 10 gènes codant pour des enzymes est le préalable au séquençage de ces gènes (Struelens, 2000). Le séquençage est essentiellement réalisé par la technique de Sanger, qui est une PCR abortive au cours de laquelle sont introduits des acides nucléiques modifiés (ddNTPs) dont l'incorporation aléatoire va bloquer la réaction de polymérisation (Figure 14). Les quatre bases sont marquées par un fluorochrome différent. La taille des fragments abortifs obtenus est déterminée à l'aide d'un séquenceur capillaire. Il sépare les fragments en fonction de leur taille comme une électrophorèse classique, mais il présente l'avantage d'être couplé à une caméra qui détecte, en temps réel, le fluorochrome fixé à la dernière base incorporée. L'étude de la succession des acides nucléiques marqués permet l'obtention de la séquence du fragment d'ADN étudié.

Figure 14 : Le principe du séquençage (extrait livret Applied Biosystem®).



Les séquences obtenues sont alors comparées aux séquences des banques de données. Des allèles sont identifiés pour chaque enzyme et le « Sequence Type » ou ST ainsi que le « Sequence Type Complex » ou STC sont déterminés.

Le M.L.S.T. est une technique lourde, mais standardisée et discriminante. Les résultats obtenus sont, par définition, de type définitif, directement échangeables et comparables entre laboratoires grâce à Internet. Cette méthode est actuellement appliquée à l'épidémiologie à long terme, pour des études macro-épidémiologiques (nationales et internationales) ou phylogénétiques avec formation d'une bibliothèque. De plus, elle présente une excellente reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoire.

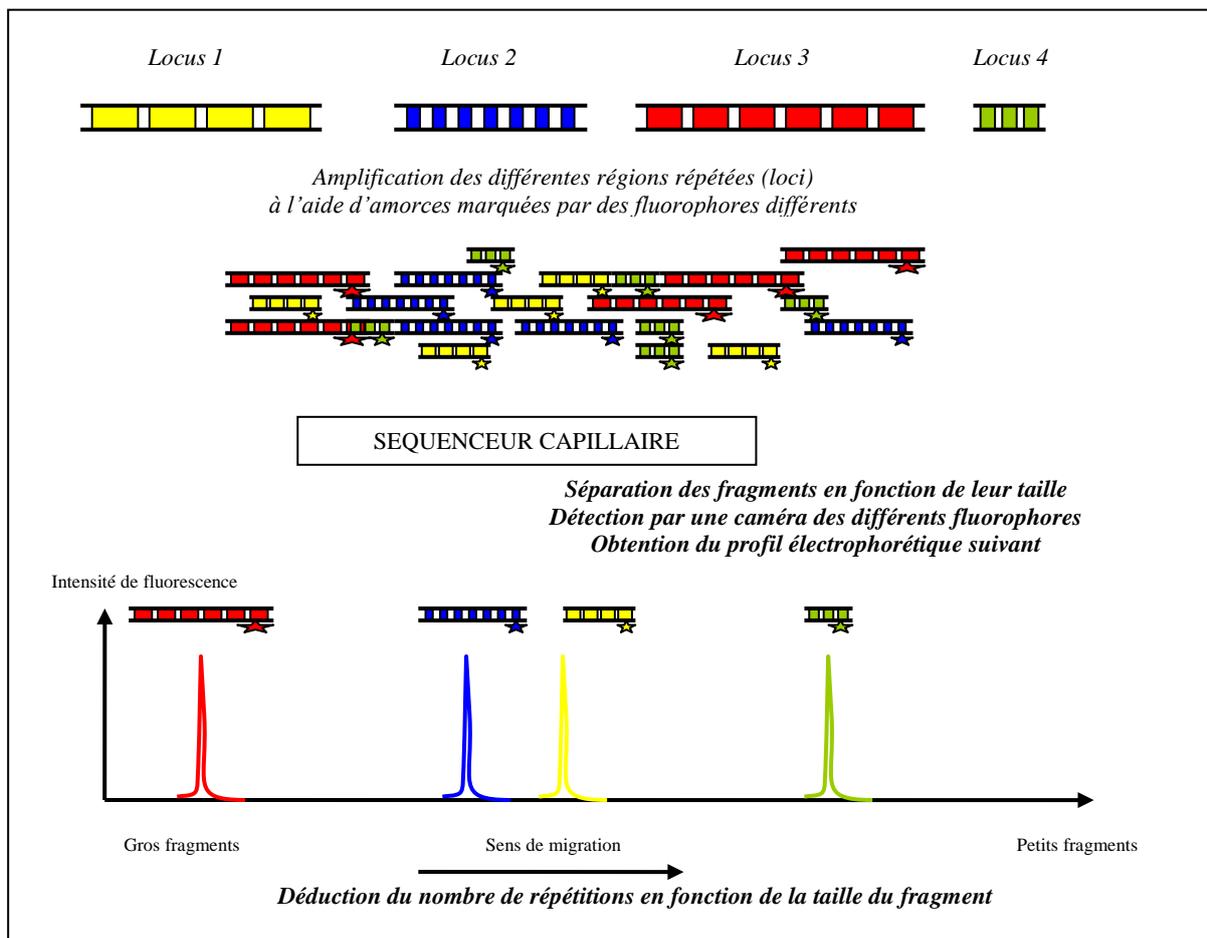
Toutefois, cette technique présente l'inconvénient d'être relativement longue (2 jours minimum en fonction du délai pour obtenir un séquençage), très onéreuse tant du point de vue équipement (investissement dans un séquenceur) que du point de vue réactifs et temps technique.

III-3-3-3-Le Multi-Locus Variable number tandem repeats Analysis

Le M.L.V.A est une application récente des découvertes réalisées ces dernières années sur les séquences répétées lors du séquençage des génomes des cellules procaryotes et eucaryotes. Une des premières applications de l'étude des séquences répétées (SSR pour Short séquences Repeat) est l'analyse des empreintes génomiques réalisée en médecine médico-légale (les tests de paternité, par exemple) (Lebo *et al.*, 2001). La technique Multi-Locus Variable number tandem Analysis (M.L.V.A.) est quant à elle, basée sur le polymorphisme d'une classe de séquences répétées, les V.N.T.R. (variable number of tandem repeats) qui sont une excellente cible pour l'étude des polymorphismes génétiques au sein des génomes bactériens (Lindstedt, 2005). Les V.N.T.R. sont des régions du génome bactérien de fonction inconnue, qui évoluent rapidement. Les sites du génome (*loci*) comprenant ces régions répétées (V.N.T.R.) sont amplifiés par PCR grâce à des amorces adéquates. Le produit d'amplification ainsi obtenu a donc une taille directement proportionnelle au nombre de régions répétées. Depuis une dizaine d'années, de nombreuses méthodes de typage M.L.V.A. ont été développées et améliorées avec l'avènement des techniques informatiques et l'accélération des capacités de séquençage. Un séquenceur capillaire est un équipement capable de mesurer avec une résolution suffisante (1 à 2 pb), la taille du fragment amplifié permettant de déterminer le nombre d'unités répétées.

Dans une technique M.L.V.A. typique, de quelques unes jusqu'à une vingtaine de ces régions répétées (V.N.T.R.) aussi appelées « *loci* », réparties sur l'ensemble du génome de la bactérie sont analysées. Plusieurs de ces régions peuvent être étudiées simultanément en électrophorèse capillaire. Bien que chaque fragment soit amplifié avec des amorces marquées par des fluorophores différents, la taille des fragments obtenue pour chaque région appelée « *locus* », doit être différente pour éviter les chevauchements et les difficultés d'interprétation (Figure 15).

Figure 15 : Schéma explicatif du M.L.V.A.



Les allèles sont les différentes versions existantes pour les régions répétées. L'attribution des allèles en fonction de la taille des différents fragments est réalisée à l'aide de logiciels adaptés à l'analyse de fragments (Gene Mapper[®] ou Bionumerics[®]) paramétrés pour les besoins de l'étude. La découverte de fragments de taille non connue, et donc de nouvelles répétitions, est vérifiée par séquençage et entraîne le reparamétrage du logiciel utilisé.

En général, une méthode de codage simple est définie où le numéro d'allèle correspond au nombre de séquence répétée. L'allèle zéro « 0 » est attribué si aucune répétition n'est obtenue pour un *locus*. Ainsi dans notre exemple (Figure 15) ; le *locus* 1 présente 4 répétitions, le *locus* 2 présente 7 répétitions, le *locus* 3 présente 6 répétitions, le *locus* 4 présente 3 répétitions. Son RT (Repeat Type par analogie avec le Sequence Type « ST » du M.L.S.T.) est donc : 4-7-6-3.

Des bases de données (MLVA-NET ou MLVA-EU, par exemple) peuvent être utilisées pour établir des comparaisons des résultats obtenus entre différents laboratoires (<http://www.mlva.eu> ou <http://www.pasteur.fr/mlva> - Figure 16) (Guigon *et al.*, 2008).

Figure 16 : Exemple de résultats obtenus avec MLVA-NET pour *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium (Guigon *et al.*, 2008).

Isolates information								Fragment sizes					Allele numbers					RT
strain	serotype	phage_type	source	country	year	sourcelab	date_stamp	STTR9	STTR5	STTR6	STTR10	STTR3	STTR9	STTR5	STTR6	STTR10	STTR3	rt
1107-0022			fodder	Norway	2007	NIPH Oslo	2007-11-14	162	227	394	363.00	524.00	1	1	18	14	3	83
1107-0768			human	Norway	2007	NIPH Oslo	2007-11-22	162	239	300	362	549	1	3	3	14	4	91
1107-0778			bird	Norway	2007	NIPH Oslo	2007-11-22	162	252	394	362	550	1	5	18	14	4	92
1107-0793			human	Norway	2007	NIPH Oslo	2007-11-22	162	246	348	360.00	523	1	4	9	19	3	93

Le M.L.V.A. est une méthode simple, relativement rapide (1 jour), standardisée et discriminante. Elle présente une excellente reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoire. Les résultats obtenus sont par définition de type définitif et directement échangeables et comparables entre laboratoires grâce à Internet. Cette méthode a été initialement utilisée pour le sous-typage de souches génétiquement homogènes comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium (Lindstedt, 2005). Elle est maintenant appliquée à l'épidémiologie à court terme, pour des études sur la transmission d'isolats pathogènes au sein d'un service clinique ou d'un hôpital mais également pour des études macro-épidémiologiques (nationales et internationales). De plus, cette technique est adaptable à de nombreux pathogènes. Elle est peu onéreuse du point de vue réactif mais nécessite l'acquisition d'un séquenceur.

PARTIE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

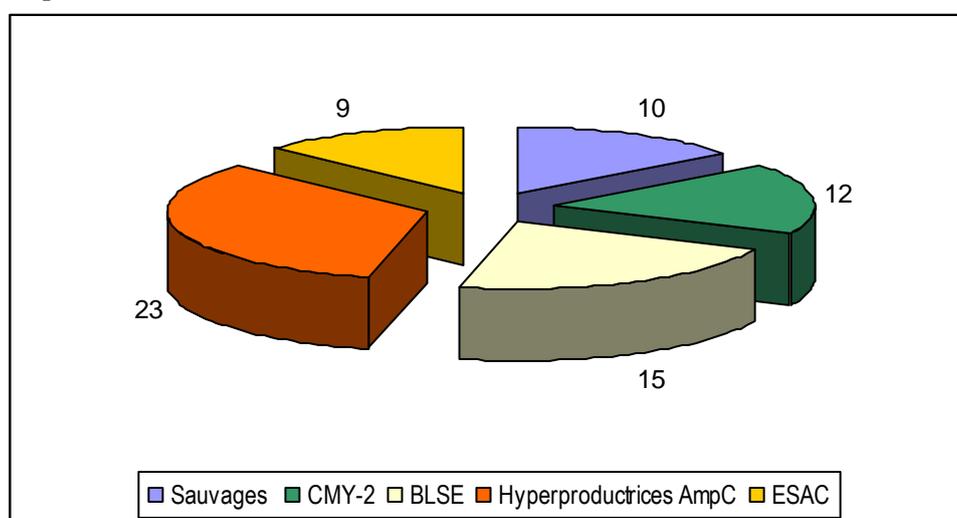
I-Objectifs de notre étude

Lors de ce travail, nous avons souhaité dans un premier temps, mettre au point une technique de M.L.V.A., grâce au soutien technique de la plateforme séquençage-génomique du C.H.U. de Nantes, sous la direction de Nathalie Bourgeois. Ce développement s'est appuyé sur les travaux de Lindstedt *et al.*, réalisés à partir des souches de *E. coli* de la collection ECOR (Lindstedt *et al.*, 2007). Dans un second temps, nous avons déterminé le profil M.L.V.A. d'une cohorte de 70 isolats, issus majoritairement de prélèvements à visée diagnostique entre 2004 et 2009. Certains isolats avaient été antérieurement caractérisés au sein du service (Guillouzouic *et al.*, 2009 ; Corvec *et al.*, 2010 ; Cremet *et al.*, 2010). Enfin, une analyse bioinformatique a permis d'établir d'une part, un arbre phylogénétique de l'ensemble des isolats inclus et, d'autre part, une comparaison des résultats obtenus à ceux d'autres méthodes de typage, notamment le M.L.S.T.

II-Souches bactériennes étudiées

Les 69 isolats de *E. coli* étudiés ont été sélectionnés à partir de la collection du laboratoire de Bactériologie du C.H.U. de Nantes. Cette cohorte comportait des souches sensibles à tous les antibiotiques, dites « sauvages » (n = 10), des souches hyperproductrices de céphalosporinase chromosomique AmpC (n = 23), des souches productrices de céphalosporinase à spectre étendu de type ESAC (n = 9), des souches productrices de céphalosporinases plasmidiques de type CMY-2 (n = 12), et des souches productrices de différentes β -lactamases à spectre étendu (n = 15). La souche de *E. coli* MG1655 K12 était utilisée comme témoin (Figure 17).

Figure 17 : Répartition des isolats de notre étude.



III-Méthodes

III-1-Extraction de l'ADN bactérien

L'extrait d'ADN total a été obtenu par choc thermique. Une anse de 1 µL de culture bactérienne obtenue sur pente Trypticase Soja a été mise en suspension dans 100 µL d'eau distillée stérile. Cette suspension a été portée à ébullition pendant 10 minutes, puis centrifugée 8 minutes à 11 000 tours par minute. Le surnageant (80 µL) a ensuite été aliquoté et congelé à -20°C pour étude ultérieure.

III-2-Le Multi-Locus Variable number tandem repeats Analysis

Notre étude s'est basée sur la publication de Lindstedt *et al.*, utilisant le M.L.V.A. pour typer les souches de *E. coli* de la collection ECOR (Lindstedt *et al.*, 2007). Cette équipe avait préalablement développé le M.L.V.A. pour les entérobactéries entéropathogènes comme *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ou *E. coli* O157 (Lindstedt, 2005). Les régions répétées étaient déterminées en combinant les résultats obtenus lors de l'étude du génome de quatre souches de *E. coli* et deux souches de *Shigella*. L'établissement des *loci* étaient défini en fonction de leur présence dans au moins un des génomes analysés. Les amorces utilisées étaient dégénérées, pour correspondre à l'ensemble des souches. Sept couples d'amorces (Tableau III) étaient utilisés pour amplifier plusieurs régions dites « V.N.T.R. » ou *loci* du génome de la bactérie, appelées CVN, de manière arbitraire.

Tableau III : Caractéristiques des amorces utilisées pour notre étude (*pb = paires de bases).

Couple d'amorces	Séquence (5'→3')	Tm (°C)	Taille (pb*)	Fluorophore	Couleur émission
CVN001-F	ACC-CGG-CTG-GGG-CGA-ATC-C	64	271-697	HEX	Vert
CVN001-R	GGC-GGC-GGT-GTC-AGC-AAA-TC	66			
CVN002-F	AAC-CGT-TAT-GAA-RGR-AAG-TCC-T	46	258-580	HEX	Vert
CVN002-R	TCG-CCC-AGT-AAG-TAT-GAA-ATC	45,3			
CVN003-F	AAA-AAT-CCG-GAT-GAG-WTG-GTC	45,3	357-534	FAM	Bleu
CVN003-R	TTG-CGT-TGT-CAG-TAA-TTT-GTT-CAG	47,2			
CVN004-F	MGC-TGC-GGC-RCT-GAA-GAA-GA	64	284-401	Dragon fly	Jaune
CVN004-R	CCC-GGC-AGG-CGA-AGC-ATT-GT	66			
CVN007-F	ACC-GTG-GCT-CCA-GYT-GAT-TTC	51,2	329-417	FAM	Bleu
CVN007-R	ACC-AGT-GTT-GCG-CCC-AGT-GTC	53,1			
CVN014-F	TCC-CCG-CAA-TCA-GCA-AMA-CAA-AGA	52,3	120-244	FAM	Bleu
CVN014-R	GCA-GCR-GGG-ACA-ACG-GAA-GC	70			
CVN015-F	TAG-GCA-TAG-CGC-ACA-GAC-AGA-TAA	50,6	207-241	FAM	Bleu
CVN015-R	GTA-CCG-CCG-AAC-TTC-AAC-ACT-C	51,6			

F = Forward = sens ; R = Reverse = antisens

Nous avons simplifié les conditions développées par Lindstedt *et al.* En effet, nous sommes passés de deux PCR multiplex et une PCR simplex, avec deux conditions d'amplification différentes à deux PCR multiplex réalisées simultanément sur le même thermocycleur Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystem[®], Foster City, CA, USA), selon le programme détaillé dans les tableaux IV, V et VI (pages 52 et 53).

Tableau IV : Composition de la PCR multiplex A : amplification des CVN002, CVN003, et CVN014.

Réactifs	CC initiale	Volume (en μL)	CC finale
MasterMix Applied [®]	2X	12,5	1X
Amorce CVN002-F	20 μM	1,9	1,52 μM
Amorce CVN002-R	20 μM	1,9	1,52 μM
Amorce CVN003-F	20 μM	0,5	0,4 μM
Amorce CVN003-R	20 μM	0,5	0,4 μM
Amorce CVN014-F	20 μM	1	0,8 μM
Amorce CVN014-R	20 μM	1	0,8 μM
H ₂ O stérile	-	0,7	
Extrait ADN	-	5	
TOTAL		25	

Tableau V : Composition de la PCR multiplex B : amplification des CVN001, CVN004, CVN007 et CVN015.

Réactifs	CC initiale	Volume (en μL)	CC finale
MasterMix Applied [®]	2X	12,5	1X
Amorce CVN001-F	20 μM	1,25	1 μM
Amorce CVN001-R	20 μM	1,25	1 μM
Amorce CVN004-F	20 μM	1,5	1,2 μM
Amorce CVN004-R	20 μM	1,5	1,2 μM
Amorce CVN007-F	20 μM	0,4	0,32 μM
Amorce CVN007-R	20 μM	0,4	0,32 μM
Amorce CVN015-F	20 μM	0,2	0,16 μM
Amorce CVN015-R	20 μM	0,2	0,16 μM
H ₂ O stérile	-	0,8	
Extrait ADN	-	5	
TOTAL		25	

Tableau VI : Conditions d'amplification pour les PCR multiplex A et B.

Dénaturation		95°C	15 min
25 cycles	Dénaturation	94°C	30 sec
	Hybridation	63°C	1 min 30 sec
	Elongation	72°C	1 min 30 sec
Elongation finale		72°C	10 min

Les PCR multiplex A et B ont permis l'étude simultanée de plusieurs *loci*. Les produits d'amplification de taille différente étaient marqués au niveau de l'amorce sens (F=Forward) par des fluorochromes différents au cours de l'amplification. Les produits étaient dilués (1 µL dans un mélange : marqueur de taille GeneScanLIZ 1200 (Applied Biosystem[®]) / formamide HiDi (Applied Biosystem[®])) selon les recommandations du tableau VII et injectés dans le séquenceur capillaire ABI PRISM 3130xl[®] (Applied Biosystem[®], Foster City, CA, USA). Le protocole d'injection de 3 kV pendant 5s (en utilisant du polymère POP7) était identique pour les PCR multiplex A et B.

Tableau VII : Dilution des produits d'amplification pour les PCR multiplex A et B.

Dilution	A	B
Multiplex A (µL)	5	
Multiplex B (µL)		3
H₂O stérile (µL)	40	97
Total (µL)	45	100

La souche de *E. coli* K12 MG1655 a été utilisée comme témoin positif de la réaction. Un témoin négatif (eau distillée stérile « DNA free ») a été systématiquement inclus lors de chaque manipulation.

Préalablement à l'analyse, le paramétrage du logiciel Gene Mapper[®]v3.5 (Applied Biosystems[®]) a été réalisé pour un même standard de taille, un même instrument, un même polymère et un capillaire de même taille. Au début de l'analyse, il a fallu s'assurer que toutes les mobilités électrophorétiques ou pics du marqueur de taille étaient bien attribués de manière à obtenir une belle courbe de calibration. L'analyse des données brutes a été réalisée à l'aide du logiciel Gene Mapper[®]v3.5 (Applied Biosystems[®]) permettant l'attribution des allèles en fonction de la taille des différents fragments amplifiés, marqués par des fluorophores différents. La conversion de la taille des fragments obtenus en allèles a été faite selon les données du tableau VIII (page 54).

L'ensemble des résultats obtenus pour les 69 isolats et le témoin *E. coli* K12 MG1655, a été étudié à l'aide du logiciel BioNumerics® (Applied Maths®, Sint Martens-Latem, Belgium), permettant ainsi la construction d'un dendrogramme. L'index de diversité de Simpson (Hunter and Gaston, 1988) a été calculé grâce au logiciel V-DICE disponible sur internet (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>).

Une étude de la séquence de certains produits de PCR a été conduite pour expliquer et vérifier les résultats obtenus par M.L.V.A. des souches ayant des allèles non décrits. Des amorces identiques mais non marquées par un fluorophore ont été utilisées pour la réaction de séquence, en respectant les mêmes conditions opératoires que celles déterminées pour le M.L.V.A.

Tableau VIII : Conversion de la taille des amplicons en numéro d'allèles, d'après Lindstedt et al. (Lindstedt et al., 2007).

Allele #	Amplicon sizes in basepairs (bp)						
	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015
1	271–307	258–274	417–429	284–296	329–345	120–124	207–217
2	310–346	276–292	432–444	299–311	347–363	126–130	219–229
3	349–385	294–310	447–459	314–326	365–381	132–136	231–241
4	388–424	312–328	462–474	329–341	383–399	138–142	
5	427–463	330–346	477–489	344–356	401–417	144–148	
6	466–502	348–364	Not used	359–371		150–154	
7	505–541	366–382	492–504	374–386		156–160	
8	544–580	384–400	507–519	389–401		162–166	
9	583–619	402–418	522–534			168–172	
10	622–658	420–436	402–414			174–178	
11	661–697	438–454	387–399			180–184	
12		456–472	372–384			186–190	
13		474–490	357–369			192–196	
14		492–508				198–202	
15		510–526				204–208	
16		528–544				210–214	
17		546–562				216–220	
18		564–580				222–226	
19						228–232	
20						234–238	
21						240–244	

III-3-Le Multi-Locus Sequence Typing

Pour l'espèce *E. coli*, la technique M.L.S.T. est basée sur l'étude de sept séquences nucléotidiques de gènes de ménage : *adk* (adénylate kinase), *fumC* (fumarate hydratase), *gyrB* (DNA gyrase), *icd* (isocitrate/isopropylmalate déhydrogénase), *mdh* (malate déhydrogénase), *purA* (adénylosuccinate déhydrogénase), *recA* (ATP/GTP binding motif) (Wirth et al., 2006). Les amorces utilisées, les conditions opératoires, ainsi que les différents allèles décrits sont répertoriés sur le site de l'Environmental Research Institute de l'University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli/>).

En pratique, sept PCR ont été réalisées à l'aide des amorces adéquates. Les produits de PCR ont été purifiés à l'aide de 1 µL d'ExoSap pour 5 µL de produit de PCR, en suivant le programme : 37°C pendant 15 min, puis 80°C pendant 15 min sur le thermocycleur Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystem[®], Foster City, CA, USA), puis conservation à 4°C.

Les amorces M13 sens, M13 antisens, et le Big Dye Terminator[®] (comprenant les ddNTP, les dNTP et l'ADN polymérase) ont été utilisés pour la réaction de séquence de chaque brin selon les conditions détaillées dans le tableau IX.

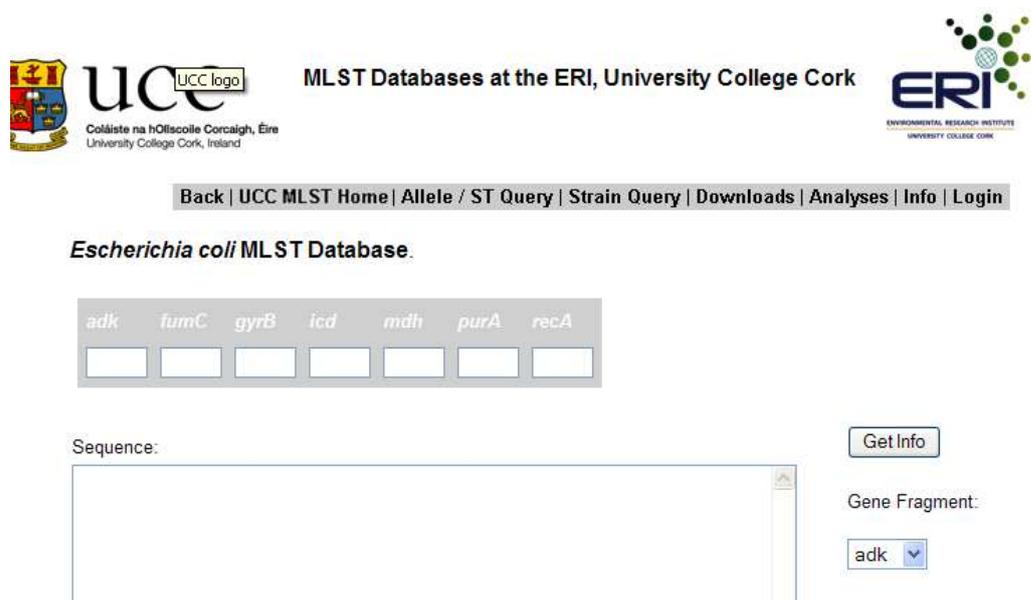
Tableau IX : Conditions pour le séquençage.

25 cycles	Dénaturation	96°C	15 sec
	Hybridation	50°C	5 sec
	Elongation	60°C	3 min

Les produits obtenus ont été purifiés sur Bio-gel G50. Les séquences obtenues ont été déterminées grâce au séquenceur capillaire ABI PRISM 3130xl[®] (Applied Biosystem[®], Foster City, CA, USA) après traitement par 10 µL de formamide.

Au final pour un échantillon, 14 séquences ont été étudiées avec le logiciel MT navigator[®]. Les Sequence Type (ST) et les Sequence Type Complex (STC) ont été obtenus en comparant les séquences des sept fragments à la banque de données sur le site de l'Environmental Research Institute de l'University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli/> - Figure 18).

Figure 18 : Copie d'écran du site de l'Environmental Research Institute de l'University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli/>).



III-4-Détermination du groupe phylogénétique par PCR triplex

La détermination du groupe phylogénétique a été réalisée en appliquant la méthode développée par Clermont *et al.* (Clermont *et al.*, 2000). Cette méthode simple consiste à rechercher par PCR, la présence de *chuA* (gène codant pour une protéine intervenant dans le transport de l'hème), de *yjaA* (gène de fonction inconnue) et d'un fragment anonyme TspE4.C2.

Après amplification, les produits de PCR ont été soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide 9 %, pendant 30 minutes. La révélation, sous lumière U.V., après passage dans un bain de bromure d'éthidium à 0,1% a permis la visualisation de différents profils de bandes (0 à 3 bandes). En fonction de la présence ou de l'absence de ces trois bandes, le groupe phylogénétique de la souche étudiée a été déterminé grâce à un arbre décisionnel (Figures 19 et 20).

Figure 19 : Arbre décisionnel pour la détermination des groupes phylogénétiques (Clermont *et al.*, 2000).

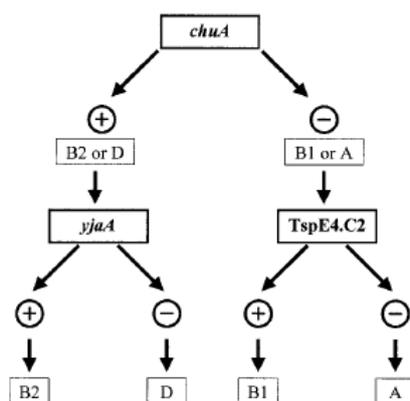


Figure 20 : Exemples de profils de PCR triplex spécifiques des groupes phylogénétiques de *E. coli*.
Ligne 1 et 2, groupe A ; ligne 3, groupe B1 ; ligne 4 et 5, groupe D ; lignes 6 et 7, groupe B2 ;
ligne M, marqueurs de taille (Clermont *et al.*, 2000).



III-5-Détermination du clone O25b-ST131

La détermination rapide du clone de *E. coli* O25b-ST131, appartenant au groupe phylogénétique B2, a été développée par Clermont *et al.* (Clermont *et al.*, 2009). Cette technique est basée sur une double recherche par PCR :

- d'une part, du gène *pabB* (347 pb) retrouvé spécifiquement chez les isolats O25b-ST131 et,
- d'autre part, du gène *trpA* (427 pb) qui sert de contrôle interne d'amplification, permettant la validation de la méthode.

Les conditions opératoires proches de celles publiées par Clermont *et al.* sont résumées dans les tableaux X et XI.

Tableau X : Composition du mélange réactionnel permettant l'amplification des gènes *pabB* et *trpA*.

Réactifs	CC initiale	Volume (en µL)	CC finale
MasterMix Applied	2X	12,5	1X
Amorce O25pabBspe-F	20 µM	1,25	1 µM
Amorce O25pabBspe-R	20 µM	1,25	1 µM
Amorce trpA-F	20 µM	0,75	0,6 µM
Amorce trpA-R	20 µM	0,75	0,6µM
H ₂ O stérile	-	3,5	
Extrait ADN	-	5	
TOTAL		25	

Tableau XI : Conditions d'amplification pour la PCR multiplex *pabB* / *trpA* sur le thermocycleur Thermal Cycler 2720.

Dénaturation	94°C	5 min
30 cycles	Dénaturation	94°C 30 sec
	Hybridation	65°C 30 sec
	Elongation	72°C 1 min
Elongation finale	72°C	7 min

Après amplification, les produits de PCR ont été soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide 9 % pendant 30 minutes et révélés sous lumière U.V. après passage dans un bain de bromure d'éthidium à 0,1%.

III-6-Characterisation des BLSE

Dans les années 1980, la majorité des BLSE dérivait des enzymes de type TEM ou SHV. Depuis la fin des années 1990, la fréquence des CTX-M n'a cessé de croître et elles ont supplanté les anciennes BLSE de type TEM ou SHV. Dans ce contexte, nous avons recherché dans un premier temps les gènes codant pour les CTX-M.

III-6-1-Characterisation des CTX-M

La recherche de β -lactamases à spectre étendu de type CTX-M a été réalisée à l'aide des amorces CTX-M-A1 et CTX-M-A2. En cas de positivité, dans un second temps, l'étude de l'environnement génétique de *bla*_{CTX-M} a été effectuée à l'aide de l'amorce PROM+ ciblant *ISEcp1* et CTX-MA2. Les conditions opératoires antérieurement décrites, sont regroupées dans les tableaux XII, XIII et XIV (page 59). Le séquençage des produits d'amplification obtenus a permis d'identifier le groupe de CTX-M à l'aide de la base de données BLAST disponible en libre accès sur Internet (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

III-6-2-Characterisation des TEM-BLSE

Pour toutes les souches productrices d'une BLSE ne possédant pas un gène *bla*_{CTX-M}, une PCR (TEM-A – TEM-B) a été réalisée à la recherche d'une BLSE de type TEM. Les caractéristiques des amorces et les conditions opératoires sont résumées dans les tableaux XII, XIII et XIV (page 59).

III-6-3-Characterisation des SHV-BLSE

Enfin, pour les souches productrices d'une BLSE non CTX-M, non TEM, une PCR (SHV-5 – SHV-6) a été réalisée à la recherche d'une BLSE de type SHV. Les caractéristiques des amorces et les conditions opératoires sont résumées dans les tableaux XII, XIII et XIV (page 59).

Tableau XII : Amorces utilisées pour la détermination des BLSE de type CTX-M, TEM et SHV (Brasme et al., 2007).

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Localisation
CTX-MA1	5'-SCSATGTGCAGYACCAGTAA-3'	<i>bla</i> _{CTX-M} , amorce sens
CTX-MA2	5'-CCGCRATATGRTTGGTGGTG-3'	<i>bla</i> _{CTX-M} , amorce anti-sens
PROM+	5'-TGCTCTGTGGATAACTTGC-3'	Partie droite de <i>ISEcp1B</i> incluant le promoteur
TEM-A	5'-TAAAATTCTTGAAGACG-3'	<i>bla</i> _{TEM} , amorce sens
TEM-B	5'-TTACCAATGCTTAATCA-3'	<i>bla</i> _{TEM} , amorce anti-sens
SHV-5	5'-TTATCTCCCTGTTAGCCACC-3'	<i>bla</i> _{SHV} , amorce sens
SHV-6	5'-GATTTGCTGATTTGCTCGG-3'	<i>bla</i> _{SHV} , amorce anti-sens

Tableau XIII : Composition du mélange réactionnel permettant la détermination des BLSE de type CTX-M, TEM et SHV.

Réactifs	CC initiale	Volume (en μ L)	CC finale
MasterMix Applied [®]	2X	12,5	1X
Amorce 1	100 μ M	0,125	0,5 μ M
Amorce 2	100 μ M	0,125	0,5 μ M
H ₂ O stérile	-	7,25	
Extrait ADN	-	5	
TOTAL		25	

Tableau XIV : Conditions d'amplification permettant la détermination des BLSE de type CTX-M, TEM et SHV sur le thermocycleur Thermal Cycler 2720.

Dénaturation		94°C	5 min
30 cycles	Dénaturation	94°C	30 sec
	Hybridation	65°C	30 sec
	Elongation	72°C	1 min
Elongation finale		72°C	7 min

PARTIE III : RÉSULTATS

I-M.L.V.A.

I-1-Validation de la technique

La technique M.L.V.A. est une technique de génotypage dont la qualité de la migration détermine la fiabilité. La fiabilité a été appréciée par l'étude de la migration du marqueur de taille. Ce dernier est composé d'une multitude de fragments d'acides nucléiques de taille connue, qui migrent à des temps de rétention précis. Une courbe de calibration (taille en fonction du temps de rétention) a été établie et a permis la détermination de la taille des différents produits de PCR au sein de chaque PCR multiplex. Le témoin négatif n'a donné aucun pic pour chaque CVN étudié.

Sur chaque graphe, une seule couleur d'émission a été analysée. Les bandes grises correspondaient aux zones de taille où pouvaient migrer les pics correspondant aux fragments amplifiés. Les étiquettes sous les pics pour chaque CVN, donnaient dans l'ordre : le numéro d'allèle, la taille (pb) et l'intensité de fluorescence du pic.

Le témoin positif *E. coli* K12 MG1655 a donné les profils suivants (Figures 21 et 22, page 62) en PCR multiplex A et en PCR multiplex B. Le « repeat type » ou RT du MG1655 était :
CVN001 : 5 ; CVN002 : 13 ; CVN003 : 5 ; CVN004 : 8 ; CVN007 : 3 ; CVN014 : 1 ; CVN015 : 1.

Toutes les souches de notre étude ont été passées deux fois et ont pu être typées sans exception par la technique M.L.V.A. La typabilité (ou sensibilité) de cette méthode était donc de 100 %. Il faut noter que l'attribution des allèles du CVN03 n'a pas été faite dans l'ordre croissant de taille des produits de PCR, contrairement aux autres CVN. En effet, la bande grise n°9 du CVN03 (Figure 21, page 62), délimitait l'allèle 05 conformément au tableau VIII (page 54) extrait de la publication de Lindstedt *et al* (Lindstedt *et al.*, 2007).

Figure 21 : Profils du *E. coli* K12 MG1655 obtenus lors de la PCR multiplex A (allèles CVN002, CVN003, CVN014).

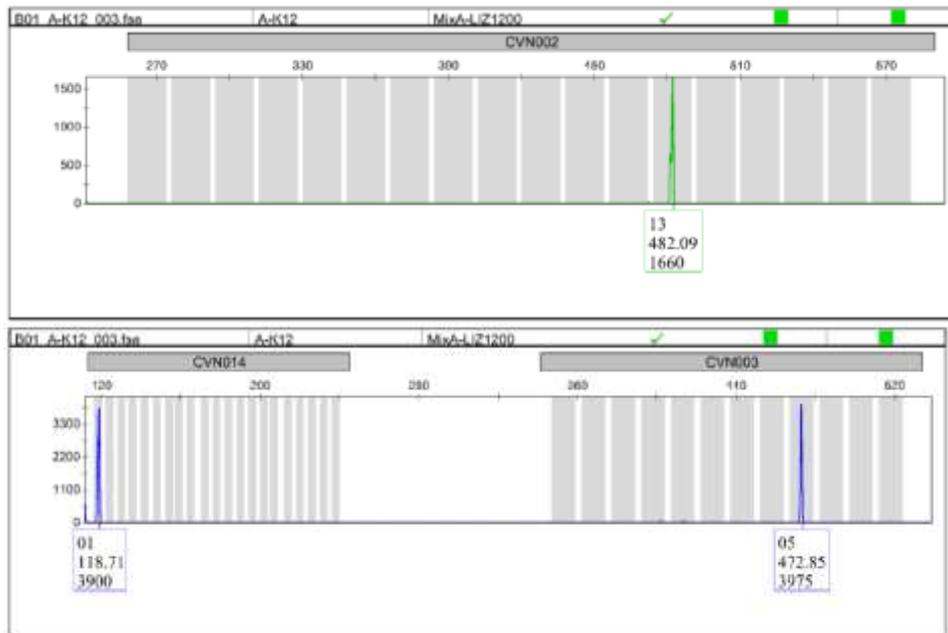
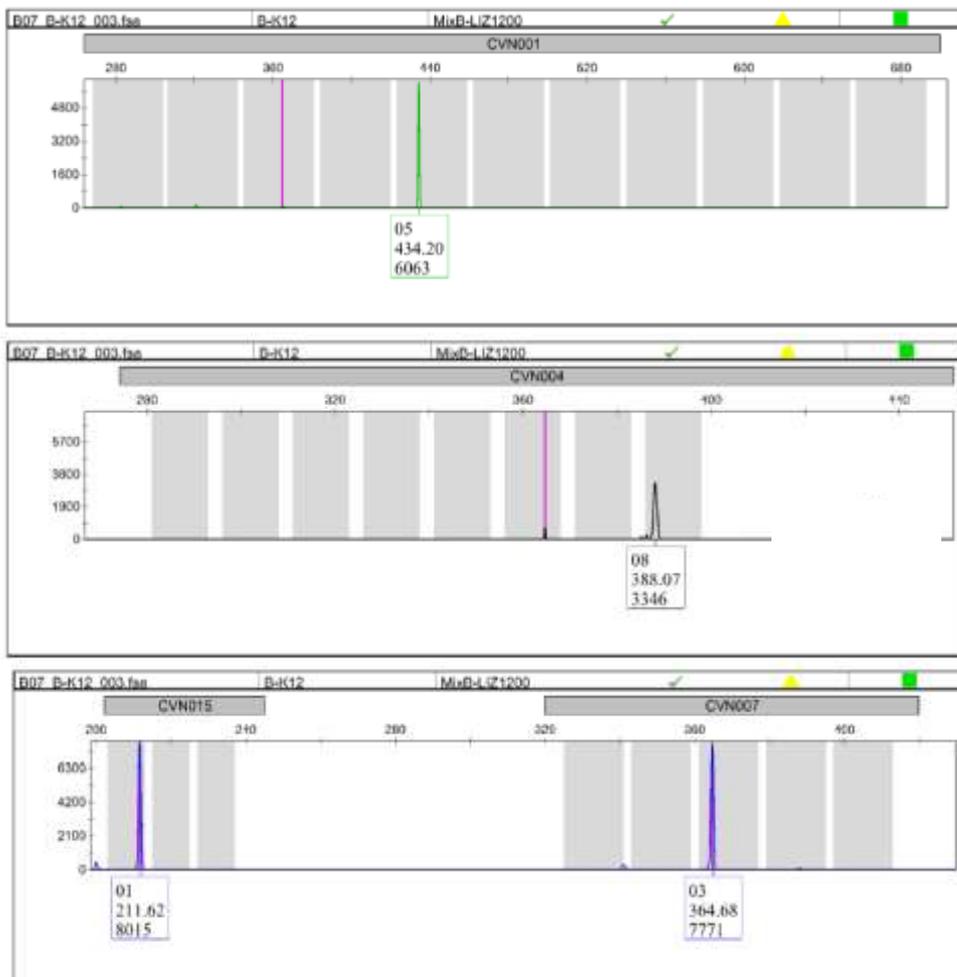


Figure 22 : Profils du *E. coli* K12 MG1655 obtenus lors de la PCR multiplex B (allèles CVN001, CVN004, CVN007, CVN015).



I-2-Analyse des profils obtenus

L'analyse des données brutes réalisée à l'aide du logiciel Gene Mapper[®]v3.5 a permis d'attribuer des allèles, en fonction de la taille des différents fragments amplifiés marqués par des fluorophores différents.

Cependant, certaines souches ont présenté pour le CVN004, des fragments amplifiés de taille plus importante, non définis par Lindstedt *et al.*, constituant probablement de nouveaux allèles. Par ailleurs, d'autres souches ont présenté pour certains *loci* (CVN014 et CVN015), des fragments dont la taille attribuée était différente de celles décrites précédemment. Les produits d'amplification de ces *loci* pour les différentes souches ont été étudiés secondairement par séquençage, pour vérifier la présence d'éléments répétés ou pour mettre en évidence des insertions ou délétions à l'origine de ces différences.

I-2-1-CVN014

Les souches 4009889 (S13) et 5000484 (S14) ont présenté un pic non attribué d'une taille de 112 pb. L'alignement des séquences obtenues pour les produits d'amplification du CVN014 par rapport à celle du *E. coli* K12 MG1655, grâce au logiciel Clustalw[®] (<http://align.genome.jp/>), a mis en évidence l'absence de séquences répétées TGCAGG et une délétion de 7 pb expliquant le pic à 112 pb d'où un allèle zéro pour CVN014 (Figure 23).

Figure 23 : Séquences du CVN014 alignées grâce au logiciel Clustalw[®] des souches 4009889 (S13) et 5000484 (S14).

```
CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

S13-CVN14      -----CTCTTTAGCATGGTTATTCTCCTTGCGGCGCGGCGTGCAAGAGTATCTCACCTT
S14-CVN14      -----ACTTTTAGCATGGTTATTCTCCTTGCGGCGCGGCGTGCCGGAGTATCTCACCTT
K12-CVN14      -----ACTTTTAGCATGGTTATTCTCCTTGCGGCGCGGCGTGCCGGAGTATCTCAGCTT

S13-CVN14      GCGGTG-----GGCCTTTGTATTGCTGATTGCTGGGACAAAAGATAACCATGCTAAAA
S14-CVN14      GCGGTG-----GGCCTTTGTATCGGTGATTGCTGGAACAAAAGAAAACCATGCTAAAA
K12-CVN14      GCGGTGCGGCTCCGGCTTAGCTTCCGTTGTCCCGCTGCAAAAGATAACCATGCTAAAA

S13-CVN14      GTGTTATTACTCTTTGTTTTGCGGGAAA
S14-CVN14      GTGTTATTACTCTTTGTTTTGCGGGAAA
K12-CVN14      GTGTTATTGCTCTTTGTTTTGCGGGAAA
```

De la même manière, pour la souche 05-A148-1, nous avons mis en évidence une insertion de 4 pb et 13 répétitions, correspondant à un allèle 13 pour le CVN014.

I-2-2-CVN015

Un allèle 1 pour le CVN015 a été retrouvé pour la souche 6011571 mais la taille du fragment amplifié était différente des autres allèles 1 déterminés pour d'autres souches (204 au lieu de 210 pb). Après alignement de la séquence obtenue pour la souche 601157 à celle de la souche de référence *E. coli* MG1655 K12, grâce au logiciel Clustalw[®], la répétition attendue et une délétion de 6 pb ont été observées expliquant cette différence de 6 pb.

I-2-3-CVN004

Les produits d'amplification des CVN004 des souches suivantes ont présenté une taille plus importante que celles décrites par Lindstedt et *al.* : 5001984, 5011549, 8011055, 05L471, 30141786, 30204147 et 30136426. Après alignement grâce au logiciel Clustalw[®], nous avons mis en évidence des répétitions supplémentaires pour les allèles de ces souches, expliquant l'augmentation de la taille des fragments. Ainsi, le logiciel Gene Mapper[®]v3.5 a pu être re-paramétré afin d'attribuer ces nouveaux allèles (Tableau XV).

Tableau XV : Résultats obtenus après séquençage permettant l'attribution de nouveaux allèles.

Souche	Taille (pb)	Allèle
8011055	401	9
5011549 05L471 30141786	420	10
30204147 30136426	432	11
5001984	463	13

I-3-Résultats du M.L.V.A.

Le tableau XVI rassemble toutes les données brutes issues du typage par M.L.V.A.

Tableau XVI : Données brutes issues du typage M.L.V.A. pour les 69 isolats de l'étude.

Isolats	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015
5004735	5	0	0	8	3	0	1
5001984	5	0	7	13	3	2	1
5002507	6	0	0	8	3	9	1
5009605	5	0	5	8	3	1	1
5010201	7	0	0	8	3	6	1
5004562	5	9	7	8	4	1	1
5003987	7	0	0	8	3	6	1
5010894	5	0	4	8	3	1	1
5008823	5	0	0	8	3	7	1
5009596	5	0	0	8	3	7	1
99004202	6	0	0	8	3	7	1
99008006	6	0	0	8	3	7	1
96004153	6	0	0	8	3	10	1
99002074	6	0	0	8	3	3	1
05-F108-1	6	0	0	8	3	16	1
MC276	6	0	0	8	3	4	1
99008127	6	0	0	8	3	8	1
9007474	6	0	0	8	3	3	1
9002601	6	0	0	8	3	10	1
99009592	6	0	0	8	3	3	1
HN869	6	0	0	8	3	13	1
960010211	6	0	0	8	3	3	1
96001139	6	0	0	8	3	5	1
05L471	6	0	0	10	3	5	1
594	6	0	0	8	3	8	1
MC397	8	0	0	8	3	2	1
155	6	0	0	8	3	3	1
05-A148-1	6	0	0	8	3	13	1
05-B153-1	6	0	0	8	3	8	1
05-B159-1	0	0	0	8	3	13	1
05-C59-1	6	0	0	8	3	14	1
05-E173-1	6	0	0	8	3	14	1
05-P133-1	6	0	0	8	3	5	1
7014517	6	0	0	8	3	5	1
4009273	6	0	0	8	3	4	1
5000869	6	0	0	8	3	13	1
7008153	6	0	0	8	3	3	1
7008211	6	0	0	8	3	3	1
7008710	6	0	0	8	3	4	1
7010738	6	0	0	8	3	15	1
8009162	6	0	0	8	3	4	1
8009389	6	0	0	8	3	3	1
4010151	6	0	0	8	3	9	1
4003643	6	0	0	8	3	6	1
4003394	4	3	0	8	3	3	1
4003663	6	0	0	8	3	7	1
4009889	5	0	0	8	3	0	1
5000464	5	0	0	8	3	0	1
6011549	5	0	0	10	3	6	1
6011571	6	0	0	8	3	4	1
7008948	6	0	0	8	1	3	1
7014074	5	9	7	8	3	1	1
8008691	6	8	0	8	3	3	1
8011055	7	0	0	9	3	3	1
30141786	5	3	0	10	3	7	1
30189789	6	0	0	8	3	7	1
30166439	6	0	0	8	3	6	1
30152857	5	0	5	8	3	1	1
30204147	6	0	0	11	3	5	1
30123510	5	0	0	8	3	13	1
30214502	5	0	0	11	3	8	1
30194450	7	0	0	8	3	4	1
30203621	5	0	7	8	3	1	1
30197247	7	0	10	8	3	5	1
30198959	3	0	0	3	3	6	1
30134375	7	0	0	8	2	7	3
30136426	6	0	0	11	3	5	1
30163234	6	0	0	8	3	5	1
30168650	6	0	0	8	3	10	1

II-M.L.S.T. et groupes phylogénétiques

Les quinze souches productrices de BLSE ont été typées par M.L.S.T. Les sept produits d'amplification correspondant aux gènes de ménage obtenus pour chaque souche ont été séquencés puis comparés à la banque de données de l'Université de Cork, disponible gratuitement sur Internet. Le groupage phylogénétique a été réalisé sur ces 15 souches. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau XVII.

Tableau XVII : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour le typage des BLSE.

Isolats	Gp. Phylogénétique	ST	STC	Profil Résistance
30141786	D	38	38	CTX-M groupe1
30189789	A	156	156	CTX-M groupe1
30166439	A	783	-	CTX-M groupe1
30152857	A	10	10	CTX-M groupe1
30204147	B2	131	-	CTX-M groupe1
30123510	A	361	-	CTX-M groupe1
30198959	B2	1193	-	TEM
30163234	A	23	23	SHV
30214502	A	1120	-	CTX-M groupe1
30197247	D	70	-	CTX-M groupe9
30168650	A	1001	-	SHV
30194450	A	224	-	CTX-M groupe1
30203621	A	10	10	CTX-M groupe1
30134375	D	457	-	TEM
30136426	B2	131	-	TEM

III-Characterisation des BLSE

La caractérisation moléculaire a permis de mettre en évidence 10 souches productrices de CTX-M avec une nette prédominance du groupe CTX-M-1. Seule une souche présentait une CTX-M du groupe CTX-M-9. Les 5 autres BLSE se répartissaient en 3 TEM et 2 SHV. Le tableau XVII résume les données obtenues.

IV-Tableau récapitulatif des données

Les données obtenues au cours de cette étude sont regroupées dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII : Tableau récapitulatif des données. G.P. : groupe phylogénétique, U : urines, LG : liquide gastrique, H : hémoculture, CP : collection profonde, LP : liquide péritonéal, P : poulet, Co : cochon, B : bétail.

Isolats	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015	G.P.	ST	STC	Profil	Origine
MG1655	5	13	5	8	3	1	1	A	98	10	Sauvage	-
5004735	5	0	0	8	3	0	1	A	46	46	Sauvage	U
5001984	5	0	7	13	3	2	1	A	10	10	Sauvage	LG
5002507	6	0	0	8	3	9	1	A	88	23	Sauvage	H
5009605	5	0	5	8	3	1	1	A	10	10	Sauvage	U
5010201	7	0	0	8	3	6	1	A	1494	-	Sauvage	U
5004562	5	9	7	8	4	1	1	A	617	10	Sauvage	U
5003987	7	0	0	8	3	6	1	A	1494	-	Sauvage	U
5010894	5	0	4	8	3	1	1	A	559	10	Sauvage	U
5008823	5	0	0	8	3	7	1	A	1115	-	Sauvage	H
5009596	5	0	0	8	3	7	1	A	373	168	Sauvage	LP
99004202	6	0	0	8	3	7	1	A	23	23	-11	H
99008006	6	0	0	8	3	7	1	A	23	23	-11	H
96004153	6	0	0	8	3	10	1	A	88	23	-32	CP
99002074	6	0	0	8	3	3	1	A	88	23	-32	U
05-F108-1	6	0	0	8	3	16	1	B1	155	155	-42	P
MC276	6	0	0	8	3	4	1	A	23	23	-42	P
99008127	6	0	0	8	3	8	1	A	23	23	-42	U
9007474	6	0	0	8	3	3	1	A	88	23	-42	U
9002601	6	0	0	8	3	10	1	A	88	23	-42	U
99009592	6	0	0	8	3	3	1	A	88	23	-42	U
HN869	6	0	0	8	3	13	1	A	88	23	-42	U
960010211	6	0	0	8	3	3	1	A	88	23	-42	U
96001139	6	0	0	8	3	5	1	A	23	23	-42	U
05L471	6	0	0	10	3	5	1	B1	453	86	-42	Co
594	6	0	0	8	3	8	1	A	88	23	-42	B
MC397	8	0	0	8	3	2	1	B1	1611	nd	-42	P
155	6	0	0	8	3	3	1	A	88	23	-42	B
05-A148-1	6	0	0	8	3	13	1	A	23	23	-42	P
05-B153-1	6	0	0	8	3	8	1	A	88	23	-42	P
05-B159-1	0	0	0	8	3	13	1	B1	155	155	-42	P
05-C59-1	6	0	0	8	3	14	1	B1	155	155	-42	P
05-E173-1	6	0	0	8	3	14	1	B1	155	155	-42	P
05-P133-1	6	0	0	8	3	5	1	A	23	23	-42	Co
7014517	6	0	0	8	3	5	1	A	88	23	ESAC	U
4009273	6	0	0	8	3	4	1	A	88	23	ESAC	U
5000869	6	0	0	8	3	13	1	A	88	23	ESAC	U
7008153	6	0	0	8	3	3	1	A	88	23	ESAC	U
7008211	6	0	0	8	3	3	1	A	88	23	ESAC	U
7008710	6	0	0	8	3	4	1	A	88	23	ESAC	U
7010738	6	0	0	8	3	15	1	A	410	23	ESAC	U
8009162	6	0	0	8	3	4	1	A	88	23	ESAC	U
8009389	6	0	0	8	3	3	1	A	88	23	ESAC	U
4010151	6	0	0	8	3	9	1	B1	155	155	CMY-2	H
4003643	6	0	0	8	3	6	1	B1	156	156	CMY-2	U
4003394	4	3	0	8	3	3	1	D	68	-	CMY-2	U
4003663	6	0	0	8	3	7	1	B2	12	12	CMY-2	U
4009889	5	0	0	8	3	0	1	A	46	46	CMY-2	U
5000464	5	0	0	8	3	0	1	A	46	46	CMY-2	H
6011549	5	0	0	10	3	6	1	A	540	-	CMY-2	H
6011571	6	0	0	8	3	4	1	D	420	-	CMY-2	CP
7008948	6	0	0	8	1	3	1	B2	978	-	CMY-2	H
7014074	5	9	7	8	3	1	1	A	167	10	CMY-2	CP
8008691	6	8	0	8	3	3	1	D	117	-	CMY-2	U
8011055	7	0	0	9	3	3	1	D	354	354	CMY-2	U
30141786	5	3	0	10	3	7	1	D	38	38	CTX-M	U
30189789	6	0	0	8	3	7	1	A	156	156	CTX-M	U
30166439	6	0	0	8	3	6	1	A	783	-	CTX-M	U
30152857	5	0	5	8	3	1	1	A	10	10	CTX-M	U
30204147	6	0	0	11	3	5	1	B2	131	-	CTX-M	U
30123510	5	0	0	8	3	13	1	A	361	-	CTX-M	U
30214502	5	0	0	11	3	8	1	A	1120	-	CTX-M	U
30194450	7	0	0	8	3	4	1	A	224	-	CTX-M	U
30203621	5	0	7	8	3	1	1	A	10	10	CTX-M	U
30197247	7	0	10	8	3	5	1	D	70	-	CTX-M	U
30198959	3	0	0	3	3	6	1	B2	1193	-	TEM	U
30134375	7	0	0	8	2	7	3	D	457	-	TEM	U
30136426	6	0	0	11	3	5	1	B2	131	-	TEM	CP
30163234	6	0	0	8	3	5	1	A	23	23	SHV	U
30168650	6	0	0	8	3	10	1	A	1001	-	SHV	U

V-Interprétation des données

V-1-Polymorphisme allélique

Tous les *loci* étaient polymorphes. Le tableau XIX décrit pour chaque CVN, la répartition des allèles pour les souches étudiées. Les allèles non définis par Lindstedt *et al.* sont en gris. Par exemple, sept allèles, sur les 11 décrits par Lindstedt *et al.*, ont été mis en évidence pour le *locus* CVN001. Notre étude a aussi permis de mettre en évidence de nouveaux allèles pour le CVN004 (les allèles 9, 10, 11, et 13 soulignés, dans les zones grisées).

Lindstedt *et al.* avait déterminé deux index, « K » et « D », lors de l'étude de la collection ECOR. Ces données sont regroupées dans le tableau XX. La diversité de la répartition présente pour un *locus* ou CVN est notée « K ». Le calcul de l'index de diversité de Simpson, correspondant à la mesure de la variation du nombre de répétition à chaque *locus* ou CVN, est noté « D ». Ces calculs pour notre étude sont indiqués dans le tableau XIX.

Tableau XIX : Fréquence de chaque allèle pour chaque CVN de notre étude

Allèle défini	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015
0	1	64	61	-	-	3	-
1	-	-	-	-	1	6	68
2	-	-	-	-	1	2	-
3	1	2	-	1	66	12	1
4	1	-	1	-	1	6	
5	16	-	2	-	-	8	
6	43	-	-	-		6	
7	6	-	4	-		8	
8	1	1	-	61		4	
9	-	2	-	<u>1</u>		2	
10	-	-	1	<u>3</u>		3	
11	-	-	-	<u>2</u>		-	
12		-				-	
13		-		<u>1</u>		5	
14		-				2	
15		-				1	
16		-				1	
17		-				-	
18						-	
19						-	
20						-	
21						-	
K	7	4	5	6	4	15	2
D	0,56	0,16	0,24	0,24	0,09	0,91	0,03

Tableau XX : Fréquence de chaque allèle pour chaque CVN de l'étude de Lindstedt *et al.*

Allèle défini	CVN001	CVN002	CVN003	CVN004	CVN007	CVN014	CVN015
K	5	6	9	9	4	14	3
D	0,62	0,60	0,73	0,72	0,52	0,90	0,37

Trente-cinq profils M.L.V.A. ont été retrouvés pour 69 souches. Les profils les plus représentés étaient le 6-0-0-8-3-3-1 (11,6 %), le 6-0-0-8-3-5-1 (5,8 %), le 6-0-0-8-3-7-1 (5,8 %) et le 6-0-0-8-3-4-1 (5,8 %). Trente-sept souches sur 69 (53,6 %) possédaient un profil où seul le CVN0014 variait.

V-2-Étude du M.L.V.A. type en fonction du phénotype de résistance

V-2-1-Souches exprimant un mécanisme de résistance chromosomique

Les 23 souches hyperproductrices de céphalosporinase AmpC présentaient douze profils M.L.V.A. différents (Figure 24). Les neuf souches productrices d'une ESAC se répartissaient dans cinq profils M.L.V.A. différents (Figure 25, page 70). Ces souches exprimant un mécanisme de résistance chromosomique principalement de ST23 ou ST155, présentaient une certaine homologie des profils où seul l'allèle 14 variait.

Ces souches avaient le profil 6-0-0-8-3- x -1, x représentant l'allèle du CVN014.

Figure 24 : Arbre phylogénétique d'après MLVA.EU en UPGMA des souches hyperproductrices de céphalosporinases AmpC.

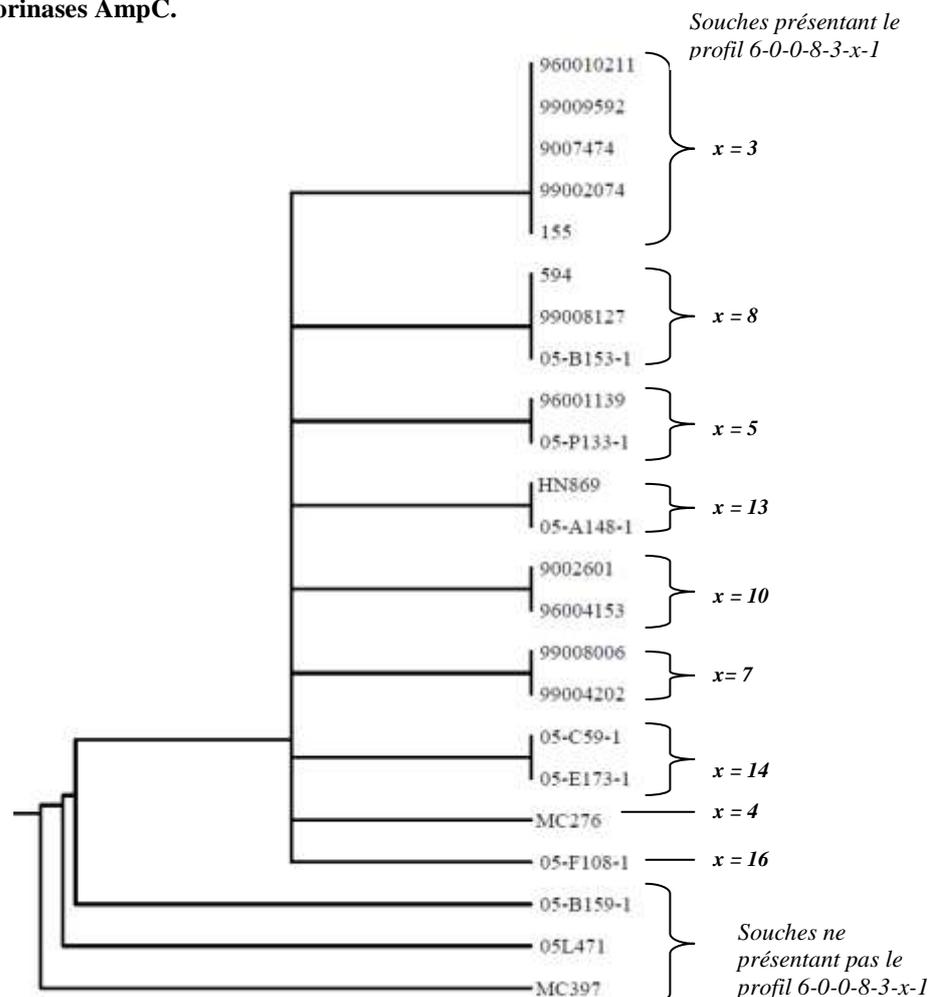
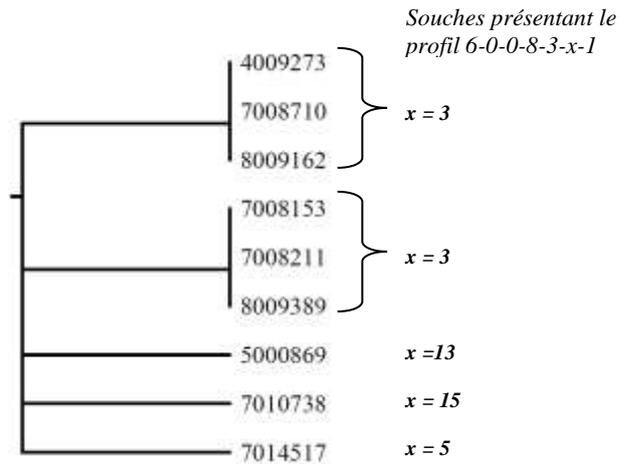


Figure 25 : Arbre phylogénétique d'après MLVA.EU en UPGMA des souches de céphalosporinases à spectre étendu (ESAC).



V-2-2-Souches sauvages ou possédant un mécanisme de résistance plasmidique

Les dix souches sauvages présentaient huit profils M.L.V.A. différents, sans compter la souche témoin MG1655 (Figure 26). Les douze souches productrices d'une CMY-2 se répartissaient dans onze profils M.L.V.A. différents (Figure 27). Les quinze souches productrices d'une BLSE étaient caractérisées par quatorze profils différents (Figure 28). A l'inverse des souches précédentes, les souches sauvages ou possédant un mécanisme de résistance plasmidique (BLSE ou AmpC plasmidique) présentaient des profils plus hétérogènes tant en M.L.V.A. qu'en M.L.S.T.

Figure 26 : Arbre phylogénétique d'après MLVA.EU en UPGMA des souches sauvages.

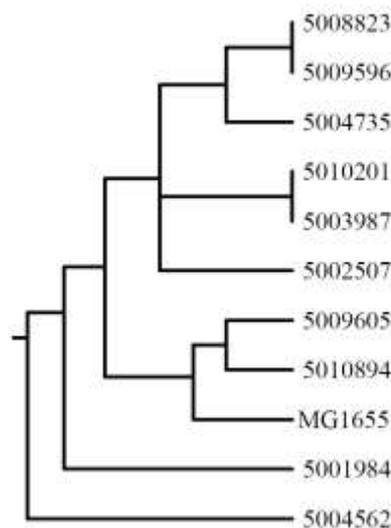


Figure 27 : Arbre phylogénétique d'après MLVA.EU en UPGMA des souches de céphalosporinases plasmidiques (CMY-2).

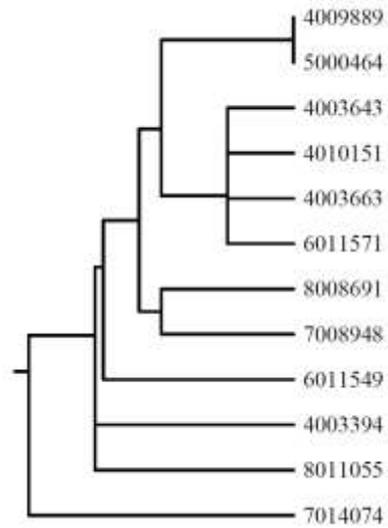
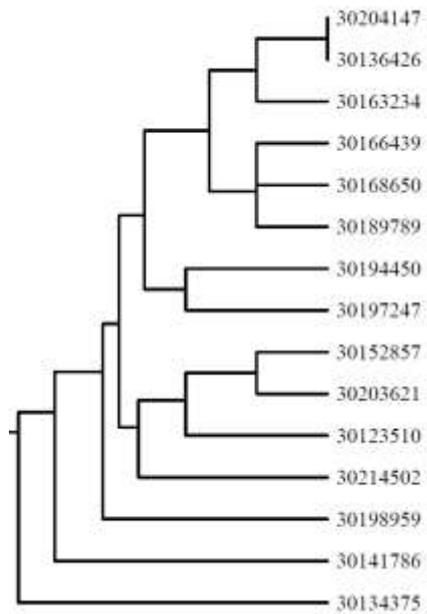


Figure 28 : Arbre phylogénétique d'après MLVA.EU en UPGMA des souches productrices de différentes BLSE.



V-3-Interprétation des arbres phylogénétiques

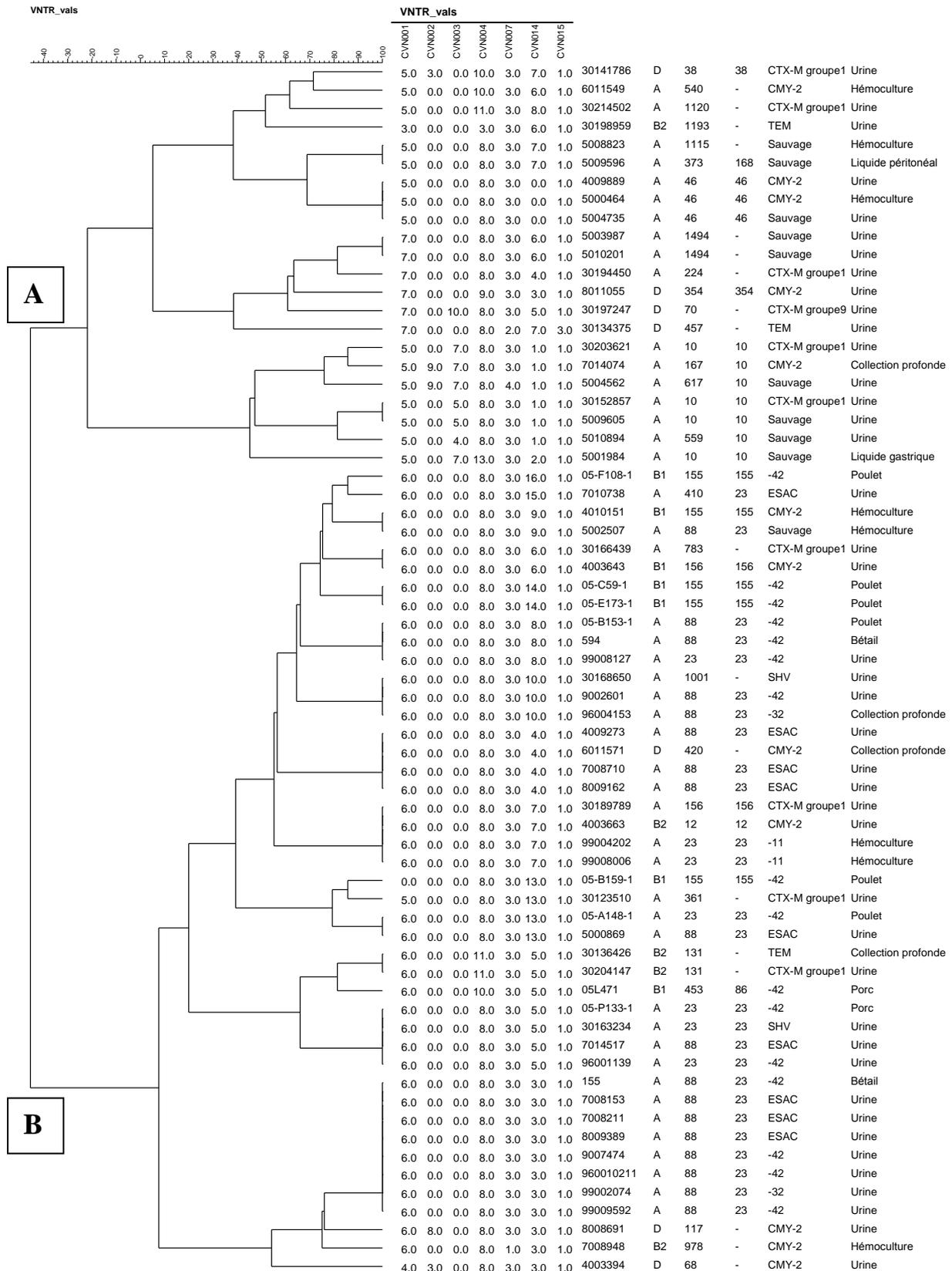
V-3-1-Étude globale

L'étude globale de nos souches a été menée après réalisation d'un arbre phylogénétique ou dendrogramme par la méthode de Ward afin de reconnaître les groupes de profils similaires ou identiques. Bien que cette méthode surestime parfois la similitude entre les profils éloignés, un degré de similitude entre des souches supérieur à 80 % suggère que ces souches sont liées épidémiologiquement. L'arbre phylogénétique réalisé est présenté Figure 29 (page 73).

Dans la première branche A, nous avons retrouvé 22 souches (17 profils M.L.V.A.) avec une majorité de groupe phylogénétique A. Aucune souche d'origine animale n'était représentée. L'étude des profils alléliques M.L.V.A. soulignait une diversité des souches avec des ST et des profils de résistance variés. A noter, que deux souches de groupe phylogénétique A, appartenant au même ST présentaient le même profil allélique mais des profils de résistance différents. De même, trois souches de ST46 présentaient le même profil allélique mais un phénotype de résistance différent. Les sept souches de ST10 présentaient majoritairement des variations du CVN003. Enfin, deux souches de phénotype sauvage appartenant au même ST1494 présentaient le même profil allélique.

Dans la seconde branche B, une certaine homogénéité des profils obtenus était observée. Les profils M.L.V.A. ne variaient que pour le CVN014. Les souches étaient 6-0-0-8-3-*x*-1, *x* représentant l'allèle du CVN014. Cette branche comprenait principalement les souches de groupe phylogénétique A et de STC23 (ST23 ou ST88) et les souches de groupe phylogénétique B1 et de ST155-STC155. Ces souches étaient très proches génétiquement, et regroupaient principalement les souches commensales caractérisées par un promoteur du gène *ampC* muté. Les deux souches de ST131 de groupe phylogénétique B2 présentaient un même profil M.L.V.A. : 6-0-0-11-3-5-1. Les souches dont le promoteur du gène *ampC* était muté en position -11 avaient le même profil M.L.V.A. Les autres souches se répartissaient au sein de différents profils que nous ne pouvions rattacher ni à leur séquence type, ni à leur profil de résistance. Enfin, l'étude du profil de certaines souches animales et humaines montrait qu'elles pouvaient présenter le même profil M.L.V.A., sans pour autant avoir le même profil de résistance.

Figure 29 : Arbre phylogénétique en Ward des souches de notre étude à l'aide du logiciel BioNumerics® (Applied Maths®, Sint Martens-Latem, Belgium).



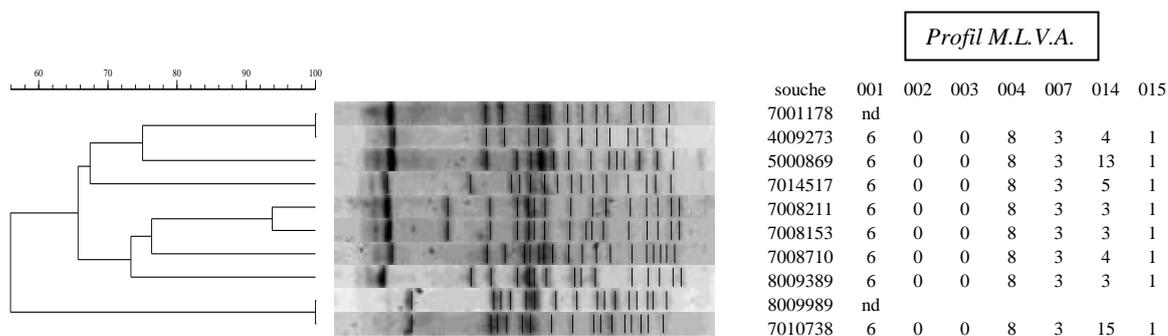
V-3-2-Comparaison M.L.V.A. – P.F.G.E. pour les souches ESAC

Le M.L.V.A. permet la différenciation de certaines souches non distinguables par P.F.G.E., pour cette raison nous avons comparé les résultats du P.F.G.E. au M.L.V.A. pour quelques souches ESAC.

Les ESAC appartiennent toutes au STC23 dont 8/9 appartiennent au ST88. Elles ne diffèrent que par le CVN014 (3, 4, 5, 13 ou 15). Neuf des onze souches ESAC isolées entre janvier 2004 et décembre 2008 au laboratoire de Bactériologie du C.H.U. de Nantes, étudiées par Cremet et *al.*, ont été comparées en champs pulsés et en M.L.V.A (Figure 30). Il en ressort que :

- parmi les trois souches (7008211, 7008153 et 8009389) qui présentaient un profil M.L.V.A. identique, deux possédaient un pulsotype proche (94 % de similitude) mais elles restaient très différentes de la dernière souche.
- parmi les deux souches (4009273 et 7008710) qui possédaient également un profil M.L.V.A. identique, leurs pulsotypes étaient différents.

Figure 30 : Comparaison de souches ESAC par P.G.F.E. par rapport au M.L.V.A.



nd = profil M.L.V.A. non déterminé.

Malgré un effectif réduit, les ESAC étudiées au C.H.U. de Nantes présentait une diversité génétique tant en M.L.V.A. qu'en P.F.G.E.

V-3-3-Étude avec les souches de la collection ECOR

Nous avons secondairement comparé les données de la collection de souches ECOR aux résultats de notre étude : profil M.L.V.A. et ST déterminés. L'analyse a été délicate en raison du grand nombre d'isolats, de leur diversité tant en nature qu'en ST. Néanmoins, les profils M.L.V.A. obtenus pour certaines souches de notre étude étaient cohérents avec ceux obtenus pour des souches de même ST de la collection ECOR.

L'analyse des profils M.L.V.A. de nos souches soulignait une homogénéité des profils des souches appartenant aux mêmes ST et groupes phylogénétiques. Cependant, des souches de la collection ECOR de même profil M.L.V.A. présentaient des ST et des groupes phylogénétiques différents.

Il existait une certaine homogénéité sur le plan génétique de nos souches, probablement liée en partie à nos critères de sélection. Par ailleurs, l'ensemble des souches de la collection ECOR se caractérisait par une répartition plus variée des profils M.L.V.A. en raison de leur provenance. En effet, les souches ECOR sont plus diverses car majoritairement représentées par des souches entéropathogènes d'origine diverse (50 % humaine et 50 % animale, environ).

V-3-4-Comparaison des coûts

ERIC2, P.F.G.E., M.L.S.T., M.L.V.A. sont étudiées et comparées dans le tableau XXI.

L'ERIC2 PCR est une technique facile d'exécution et peu onéreuse. Cependant, dans certains cas, elle doit être complétée par une analyse par électrophorèse en champs pulsés.

L'électrophorèse en champs pulsés (P.F.G.E.) demeure la technique de référence pour le typage épidémiologique de souches impliquées dans une épidémie. Elle n'est toutefois pas adaptée au typage à grande échelle. Elle exige une technicité importante dans sa réalisation et nécessite un délai de réponse entre 7 et 12 jours. Enfin, cette technique reste assez onéreuse, en raison du coût de l'enzyme de restriction et du temps nécessaire à sa réalisation.

Le M.L.S.T est une technique délicate nécessitant une analyse complète des séquences indispensable à l'interprétation. Les études à grande échelle sont pour l'instant fastidieuses parce que longues et onéreuses en raison du séquençage.

La technique M.L.V.A. est assez longue à mettre au point. Cependant, elle est facile à réaliser et à interpréter, ce qui en fait une excellente technique de typage à grande échelle. Les résultats sont obtenus rapidement et son coût est modéré.

Tableau XXI : Comparaison des techniques génotypiques utilisées au C.H.U. de Nantes pour le typage moléculaire de *E. coli*. Le coût est calculé pour 10 souches.

Technique	Difficulté d'exécution	Interprétation	Délai de réponse	Coût réactif	Coût technique	Coût global
ERIC2 PCR	+	Facile si profils différents et difficile si profils identiques	1 journée	5 euros	3 heures soit 102 euros	107 euros
P.F.G.E.	++++	Facile sur une épidémie constituée mais potentiellement difficile sur des souches non reliées	7-12 jours	50 euros	6 heures soit 204 euros	254 euros
M.L.S.T.	+++	Relativement facile	2 jours	250 euros	6 heures soit 204 euros	454 euros
M.L.V.A.	++	Relativement facile	1 journée	37 euros	2 heures soit 68 euros	105 euros

PARTIE IV : DISCUSSION

Le suivi de la circulation voire de la diffusion, parfois rapide, des souches virulentes ou résistantes s'avère crucial dans la gestion du risque infectieux tant sur le plan individuel que collectif. L'étude de la transmission d'un pathogène au sein d'une population permet de déceler l'origine, le mode de contamination et de mesurer l'impact des stratégies de maîtrise des infections épidémiques. La dissémination intercontinentale du clone virulent de *E. coli* O25 : H4 de ST131 producteur de BLSE en est un exemple parfait (Clermont *et al.*, 2008). L'actualité récente a encore souligné ce besoin pour la communauté médicale, de connaître l'origine et les risques de dissémination des souches multi-résistantes comme cette souche de *E. coli* productrice de la carbapénémase NDM-1 qui a fait la une de l'actualité au cours de l'été 2010 (Kumarasamy *et al.*, 2010). En conséquence, il est impératif de disposer d'outils de typage moléculaire, permettant de tracer et de suivre la circulation ou la dissémination de bactéries d'intérêt.

Les principales techniques utilisées pour le typage en routine sont l'ERIC2 PCR, le P.F.G.E., et le M.L.S.T. L'ERIC2 PCR constitue une technique rapide de criblage. Elle a été récemment automatisée par bioMérieux (automate Diversilab®). Le P.F.G.E. et le M.L.S.T sont deux techniques plus discriminantes, indispensables pour identifier et différencier les isolats à l'origine des épidémies (Struelens, 2000). Cependant, ces techniques ne sont pas automatisables et restent parfois d'interprétation délicate. Le M.L.V.A. est une technique de typage moléculaire innovante basée sur l'analyse de différents *loci* présentant des séquences répétées. Dès 2005, Lindstedt a ainsi décrit le M.L.V.A. comme une technique efficace d'investigation des épidémies sur de nombreuses bactéries, en raison de son excellent pouvoir discriminant (Lindstedt, 2005). Le M.L.V.A. est apparu alors comme une alternative aux méthodes conventionnelles contraignantes (complexité de réalisation, pouvoir discriminant trop faible, coût, délai de résultat) et facilement adaptable à des études macro-épidémiologiques à court terme (nationales et internationales) (Guigon *et al.*, 2008). Dès lors, de nombreuses études comparatives entre le M.L.V.A. et les techniques phénotypiques (sérotypage) et génotypiques (P.F.G.E.) ont été menées. Ces études mettaient en évidence un excellent pouvoir discriminant du M.L.V.A. et étaient principalement réalisées sur des pathogènes agents d'infections alimentaires potentiellement graves (*Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157 : H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium) (Noller *et al.*, 2003 ; Lindstedt *et al.*, 2004 ; Murphy *et al.*, 2007). La supériorité du M.L.V.A. par rapport au sérotypage (Bustamante *et al.*, 2010) mais également par rapport au P.F.G.E. (Noller *et al.*, 2003) était mise en évidence.

Par ailleurs, l'analyse des profils M.L.V.A. de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pourrait être constituer une caractéristique de leur origine géographique et un complément au P.F.G.E. par comparaison rapide d'isolats de différents pays (Best *et al.*, 2009). Ainsi aux USA, les C.D.C. (Centers for Disease Control) ont établi un protocole standardisé pour le typage des *E. coli* O157 : H7 qui sont régulièrement à l'origine de S.H.U, mais aussi des *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. La fréquence de ces pathologies aux USA résulte de pratiques différentes dans l'agriculture : culture intensive, épandage des lisiers, élevage intensif des animaux, mode d'abattage et de cuisson des aliments. Les protocoles sont décrits sur PulseNet International (<http://www.pulsenetinternational.org/>). Afin de valider cette technique, une étude de la robustesse et de la reproductibilité de cette méthode a été réalisée pour les *E. coli* O157 : H7 et les résultats étaient excellents (Hyytia-Trees *et al.*, 2010). De plus, le M.L.V.A. peut donner des informations sur d'éventuels cas sporadiques non liés dans le temps et dans l'espace, tout comme le P.F.G.E. (épidémiologie à court terme) (Murphy *et al.*, 2008). Enfin, certains auteurs ont rapporté son intérêt réel pour distinguer des souches non distinguables par P.F.G.E. (Pei *et al.*, 2008).

Le M.L.V.A. initialement développé pour des études de microbiologie alimentaire, a donc ensuite été adapté pour l'investigation rapide de souches cliniques d'infections associées aux soins de phénotype de résistance divers. Dans de nombreuses études sur *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, l'hétérogénéité du profil M.L.V.A. de souches épidémiologiquement non liées contrastait avec l'homogénéité des profils M.L.V.A. des souches liées (Vedy *et al.*, 2007 ; Baines *et al.*, 2008 ; Ben Haj Khalifa *et al.*, 2010). Par ailleurs, le M.L.V.A. était une bonne méthode de typage, adaptée à une pratique quotidienne, plus didactique, facile et rapide que le P.F.G.E. pour *S. aureus* (Vedy *et al.*, 2007). De plus, cette technique s'est avérée être plus discriminante que le *spa* typing ou le M.L.S.T. aussi pour cette espèce (Vu-Thien *et al.*, 2010).

Avec le développement du M.L.V.A. pour le typage d'isolats présentant des facteurs de virulence ou des résistances acquises, nous avons souhaité mettre au point cette méthode de typage pour s'assurer de sa capacité à rechercher la circulation de clones résistants de *E. coli*. Nous avons donc développé cette nouvelle approche de typage sur une cohorte d'isolats de *E. coli* préalablement caractérisés par M.L.S.T. afin d'évaluer sa faisabilité et sa place parmi les techniques disponibles (M.L.S.T. et P.F.G.E.).

Lors du développement de cette nouvelle technique, nous avons constaté une réelle capacité du M.L.V.A. à obtenir rapidement des profils numériques comparables sans ambiguïté et transférables d'un laboratoire à l'autre, ce qui constitue des avantages indéniables. Notre adaptation technique permettant de travailler sur un seul thermocycleur fut assez longue mais a permis d'obtenir une typabilité excellente de 100% (sensibilité) et une excellente reproductibilité. Le pouvoir discriminant (spécificité) de cette technique M.L.V.A. lors de notre étude était correct. Malgré un biais dans la sélection des souches (excès de souches de groupe phylogénétique A, notamment dans le panel des isolats sensibles), trente-cinq profils M.L.V.A. étaient retrouvés pour 69 souches contre 32 profils M.L.S.T. Cinquante-quatre pour cent des souches avaient un profil M.L.V.A. qui ne variait que par le résultat du CVN014, définissant un cluster de souches proches. Les souches exprimant un mécanisme de résistance chromosomique (ST23, ST155) présentaient une homologie des profils où seul l'allèle 14 variait. A l'inverse, les souches sauvages ou possédant un mécanisme de résistance plasmidique (BLSE ou AmpC plasmidique) présentaient des profils plus hétérogènes tant en M.L.V.A. qu'en M.L.S.T. excepté les souches commensales (groupe phylogénétique A) de ST46 et de ST1494 qui possédaient chacune un profil M.L.V.A. typique selon le séquence type. Les 2 souches pathogènes ST131 de groupe phylogénétique B2 qui présentaient un profil de résistance différent (BLSE différentes), avaient le même profil M.L.V.A. Une étude plus approfondie de ce profil pourrait constituer dès lors une piste pour l'exploration de ce type de bactéries porteuses du clone O25 : H4 de ST131 de diffusion intercontinentale décrit par Clermont *et al.* (Clermont *et al.*, 2008).

L'étude du profil des souches animales et humaines a montré que certaines souches présentaient le même profil chez les hommes et les animaux. Cette observation confirme le lien épidémiologique déjà établi par M.L.S.T., secondaire à une transmission croisée lors de la circulation de ces souches (alimentation, promiscuité...). En effet, l'hypothèse d'un portage intrafamilial de souches résistantes et virulentes à haut potentiel de transmission avait été évoquée entre personnes d'une même famille avec les souches de *E. coli* producteur de CTX-M-15 ST131 (Sanders *et al.*, 1997). Par ailleurs, les animaux constituent parfois des réservoirs externes de souches multi-résistantes que l'Homme peut acquérir ; inversement, les souches humaines peuvent également être transmises aux animaux. Ainsi, une étude de Johnson *et al.* a montré sur une longue période, le portage de plusieurs souches et la persistance de ces souches virulentes chez plusieurs membres d'une même famille et leur animal de compagnie (Johnson *et al.*, 2008).

Dans de nombreuses études, le M.L.V.A. semble aussi discriminant, voire plus que le P.F.G.E. Il est en outre plus rapide à exécuter et à interpréter. Certains auteurs ont ainsi rapporté son intérêt réel pour différencier des souches non distinguables par P.F.G.E. (Pei *et al.*, 2008). A la lumière de nos résultats, une des perspectives de ce travail serait une comparaison des pulsotypes de l'ensemble des isolats sélectionnés. L'analyse effectuée pour quelques souches productrices d'ESAC a confirmé les performances du M.L.V.A. Une analyse comparative des souches productrices de CMY-2 de notre sélection aurait montré le même résultat.

L'insertion des souches de la collection ECOR a permis de vérifier la concordance de notre typage avec celui réalisé par Lindstedt *et al.* car nos souches de ST identiques aux souches ECOR avaient souvent le même profil M.L.V.A. De plus, une certaine homogénéité sur le plan génétique de nos souches, probablement liée en partie à nos critères de sélection, contrastait avec l'hétérogénéité des profils des souches de la collection ECOR du fait de leur provenance diverse.

Les résultats de notre étude mettent en lumière toutefois certaines difficultés comme l'attribution des allèles non définis nécessitant la réalisation d'un séquençage pour expliquer le phénomène. Le séquençage est pour l'instant chronophage et incompatible avec l'obtention d'un résultat rapide dans notre pratique quotidienne (Jenke *et al.*, 2010).

L'étude des index de diversité (D) a mis en évidence que le CVN014 était le CVN le plus polymorphe et donc le CVN d'intérêt (D=0,91). Les autres index étaient plutôt faibles (0,03 à 0,24). La comparaison des résultats obtenus à ceux de Lindstedt *et al.*, a révélé que les index de diversité étaient identiques pour le CVN014. A l'inverse, pour les autres CVN, les index obtenus par Lindstedt *et al.* étaient meilleurs (0,32 à 0,72), suggérant que l'étude de ces *loci* était probablement mieux adaptée à l'étude des souches de *E. coli* de la collection ECOR, (majoritairement représentées par des souches entéropathogènes d'origine animale et humaine) et à l'étude de la sous-population de *E. coli* O157 : H7 (Noller *et al.*, 2003 ; Lindstedt *et al.*, 2004).

Par ailleurs, ce schéma de typage développé par Lindstedt *et al.* a aussi été repris par Miko *et al.* en 2010 pour son étude sur les *E. coli* O26 (Miko *et al.*, 2010). Ils concluaient que les V.N.T.R. choisis n'étaient pas adéquats et assez variables pour sa cohorte. Ils suggéraient des améliorations du protocole par ajout de 2 V.N.T.R. supplémentaires, pour ainsi passer à l'étude de 9 V.N.T.R. Ces suggestions sont en accord avec les index « K » et « D » déterminés lors de nos travaux.

L'analyse que nous avons conduite, souligne la difficulté de comparaison et de concordance entre le M.L.V.A. et le M.L.S.T. en raison des objectifs différents de ces deux méthodes. La première est adaptée à l'épidémiologie à court terme des souches car elle étudie les V.N.T.R. qui peuvent varier rapidement sous l'effet des conditions environnementales stressantes ou du manque de nutriments (Cooley *et al.*, 2010). A l'inverse, le M.L.S.T. étudie des gènes stables du métabolisme ; il est plus adapté à l'épidémiologie à long terme (Wirth *et al.*, 2006). Le M.L.S.T. ne peut pas généralement être utilisé pour distinguer des souches liées épidémiologiquement, contrairement au M.L.V.A. qui peut déterminer au sein d'un groupe d'isolats, les isolats liées des isolats non liées épidémiologiquement. Par ailleurs, il convient toujours de préciser la définition des termes « clone » et « souche » et à partir de quel degré de similitude, nous considérons que deux isolats appartiennent à un même clone ou dérivent d'un ancêtre commun. Ces deux techniques ne répondent pas aux mêmes questions et les différentes études de la littérature décrivant des pourcentages de similitude varient pour assurer que deux isolats cliniques sont épidémiologiquement liés.

En conclusion, au quotidien, le M.L.V.A. peut remplacer ou tout au moins compléter d'autres techniques de typage notamment la PCR ERIC2 voire le P.F.G.E. La faisabilité du M.L.V.A. conduirait à utiliser cette nouvelle technique de typage (plus rapide et probablement moins coûteuse) pour d'éventuels futurs cas groupés dans notre établissement, pour *E. coli* mais aussi pour d'autres bactéries fréquemment impliquées (*Acinetobacter baumannii*, *S. aureus*...).

A l'avenir, des études comparatives des profils obtenus par P.F.G.E., M.L.S.T. et M.L.V.A. sur une même cohorte de souches judicieusement choisie devrait permettre des adaptations afin d'augmenter la variabilité des profils alléliques obtenus et, par conséquent, d'accroître encore le pouvoir discriminant de cette technique innovante.

PARTIE V : CONCLUSION

L'établissement d'une relation épidémiologique entre plusieurs cas groupés, au sein d'une même structure hospitalière, au sein d'un même service, au sein d'une même famille, ou au sein d'une structure agroalimentaire est indispensable à la gestion du risque infectieux et est assez souvent difficile à mettre en œuvre. Le typage des souches est alors indispensable. Le choix de la méthode de typage est crucial et dépendant des objectifs de celui-ci. Dans notre pratique quotidienne, des résultats du typage découlent la prise en charge des patients et l'établissement de mesures correctives.

Les objectifs de notre étude étaient d'une part, de développer une nouvelle technique de typage bactérien, la technique M.L.V.A. et, d'autre part d'étudier sa faisabilité et comparer ses résultats aux autres techniques afin de démontrer son intérêt au sein de l'« arsenal » de techniques existantes. Lors de ce travail, 70 isolats de *E. coli* présentant des profils de résistance différents vis-à-vis des β -lactamines, ont été typés et étudiés.

La technique M.L.V.A. est une technique innovante présentant de très nombreux avantages : une typabilité de 100 %, une excellente reproductibilité, un pouvoir discriminant correct malgré un biais lors de la sélection de nos isolats. Les souches exprimant un mécanisme de résistance chromosomique (ST23, ST155) présentaient une homologie des profils où seul l'allèle 14 variait. A l'inverse, les souches sauvages ou possédant un mécanisme de résistance plasmidique (BLSE ou AmpC plasmidique) présentaient des profils plus hétérogènes tant en M.L.V.A. qu'en M.L.S.T. Par ailleurs, son coût est attractif vis-à-vis des autres techniques de typage (M.L.S.T., P.G.F.E., et ERIC 2 PCR) en plus de sa facilité d'exécution et d'interprétation. De plus, elle s'avère facilement adaptable à des études macro-épidémiologiques internationales afin de suivre la circulation voire la diffusion des souches virulentes et résistantes.

A l'avenir, des études comparatives des profils obtenus par P.F.G.E., M.L.S.T. et M.L.V.A. sur une même cohorte de souches judicieusement choisie devrait permettre des adaptations du protocole par ajout de nouveaux *loci* plus discriminants afin d'augmenter la variabilité des profils alléliques obtenus et, par conséquent, accroître encore le pouvoir discriminant de cette technique innovante.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Alsterlund, R., B. Carlsson, L. Gezelius, S. Haeggman and B. Olsson-Liljequist** (2009). "Multiresistant CTX-M-15 ESBL-producing *Escherichia coli* in southern Sweden: Description of an outbreak." Scand J Infect Dis **41**(6-7): 410-5.
2. **Ambler, R. P.** (1980). "The structure of beta-lactamases." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **289**(1036): 321-31.
3. **Ananthan, S. and A. Subha** (2005). "Cefoxitin resistance mediated by loss of a porin in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*." Indian J Med Microbiol **23**(1): 20-3.
4. **Andreishcheva, E. N. and W. F. Vann** (2006). "Gene products required for de novo synthesis of polysialic acid in *Escherichia coli* K1." J Bacteriol **188**(5): 1786-97.
5. **Baines, S. D., R. O'Connor, J. Freeman, W. N. Fawley, C. Harmanus, P. Mastrantonio, E. J. Kuijper and M. H. Wilcox** (2008). "Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in *Clostridium difficile*." J Antimicrob Chemother **62**(5): 1046-52.
6. **Baraduc, R., A. Darfeuille-Michaud, C. Forestier, C. Jallat, B. Joly and V. Livrelly** (2000). *Escherichia coli* et autres *Escherichia*, *Shigella*. In : Précis de bactériologie clinique. F. J, Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C., Editions ESKA 2000: 1115-1126.
7. **Ben Haj Khalifa, A., H. Vu-Thien, C. Pourcel, M. Khedher, M. Mastouri and D. Moissenet** (2010). "[Phenotypic and genotypic (randomly amplified polymorphic DNA analysis and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis) characterization of 96 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the F. Bourguiba hospital (Monastir, Tunisia)]." Pathol Biol (Paris) **58**(1): 84-8.
8. **Best, E. L., M. D. Hampton, S. Ethelberg, E. Liebana, F. A. Clifton-Hadley and E. J. Threlfall** (2009). "Drug-resistant *Salmonella Typhimurium* DT 120: use of PFGE and MLVA in a putative international outbreak investigation." Microb Drug Resist **15**(2): 133-8.
9. **Bingen-Bidois, M., O. Clermont, S. Bonacorsi, M. Terki, N. Brahimi, C. Loukil, D. Barraud and E. Bingen** (2002). "Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains." Infect Immun **70**(6): 3216-26.
10. **Bonnet, R.** (2004). "Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes." Antimicrob Agents Chemother **48**(1): 1-14.
11. **Bonnet, R.** (2006). Bêta-lactamines et Entérobactéries. In : L'antibiogramme 2ème édition, Courvalin P., Leclercq R., Bingen E., Editions ESKA 2000 141-162.
12. **Boyd, D. A., S. Tyler, S. Christianson, A. McGeer, M. P. Muller, B. M. Willey, E. Bryce, M. Gardam, P. Nordmann and M. R. Mulvey** (2004). "Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada." Antimicrob Agents Chemother **48**(10): 3758-64.

13. **Bradford, P. A.** (2001). "Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat." Clin Microbiol Rev **14**(4): 933-51, table of contents.
14. **Brasme, L., P. Nordmann, F. Fidel, M. F. Lartigue, O. Bajolet, L. Poirel, D. Forte, V. Vernet-Garnier, J. Madoux, J. C. Reveil, C. Alba-Sauviat, I. Baudinat, P. Bineau, C. Bouquigny-Saison, C. Eloy, C. Lafaurie, D. Simeon, J. P. Verquin, F. Noel, C. Strady and C. De Champs** (2007). "Incidence of class A extended-spectrum beta-lactamases in Champagne-Ardenne (France): a 1 year prospective study." J Antimicrob Chemother **60**(5): 956-64.
15. **Bush, K., G. A. Jacoby and A. A. Medeiros** (1995). "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure." Antimicrob Agents Chemother **39**(6): 1211-33.
16. **Bustamante, A. V., A. M. Sanso, P. M. Lucchesi and A. E. Parma** (2010). "Genetic diversity of O157:H7 and non-O157 verocytotoxigenic *Escherichia coli* from Argentina inferred from multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)." Int J Med Microbiol **300**(4): 212-7.
17. **Callaway, T. R., M. A. Carr, T. S. Edrington, R. C. Anderson and D. J. Nisbet** (2009). "Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years." Curr Issues Mol Biol **11**(2): 67-79.
18. **Caroff, N., E. Espaze, D. Gautreau, H. Richet and A. Reynaud** (2000). "Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing ampC." J Antimicrob Chemother **45**(6): 783-8.
19. **Clermont, O., S. Bonacorsi and E. Bingen** (2000). "Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group." Appl Environ Microbiol **66**(10): 4555-8.
20. **Clermont, O., H. Dhanji, M. Upton, T. Gibreel, A. Fox, D. Boyd, M. R. Mulvey, P. Nordmann, E. Ruppe, J. L. Sarthou, T. Frank, S. Vimont, G. Arlet, C. Branger, N. Woodford and E. Denamur** (2009). "Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains." J Antimicrob Chemother **64**(2): 274-7.
21. **Clermont, O., M. Lavollay, S. Vimont, C. Deschamps, C. Forestier, C. Branger, E. Denamur and G. Arlet** (2008). "The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup." J Antimicrob Chemother **61**(5): 1024-8.
22. **Cooley, M. B., D. Carychao, K. Nguyen, L. Whitehand and R. Mandrell** (2010). "Effects of environmental stress on stability of tandem repeats in *Escherichia coli* O157:H7." Appl Environ Microbiol **76**(10): 3398-400.
23. **Corvec, S., N. Caroff, E. Espaze, J. Marraillac and A. Reynaud** (2002). "-11 Mutation in the ampC promoter increasing resistance to beta-lactams in a clinical *Escherichia coli* strain." Antimicrob Agents Chemother **46**(10): 3265-7.
24. **Corvec, S., L. Cremet, C. Leprince, S. Dauvergne, A. Reynaud, D. Lepelletier and N. Caroff** (2010). "Epidemiology of *Escherichia coli* clinical isolates producing AmpC plasmidic beta-lactamase during a 5-year period in a French teaching Hospital." Diagn Microbiol Infect Dis **67**(3): 277-81.

25. Corvec, S., A. Prodhomme, C. Giraudeau, S. Dauvergne, A. Reynaud and N. Caroff (2007). "Most *Escherichia coli* strains overproducing chromosomal AmpC beta-lactamase belong to phylogenetic group A." J Antimicrob Chemother **60**(4): 872-6.
26. Cremet, L., N. Caroff, C. Giraudeau, S. Dauvergne, D. Lepelletier, A. Reynaud and S. Corvec (2010). "Occurrence of ST23 complex phylogroup A *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum AmpC beta-lactamase in a French hospital." Antimicrob Agents Chemother **54**(5): 2216-8.
27. Dobrindt, U., M. G. Chowdary, G. Krumbholz and J. Hacker (2010). "Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*." Med Microbiol Immunol.
28. Dupont, M., C. E. James, J. Chevalier and J. M. Pages (2007). "An early response to environmental stress involves regulation of OmpX and OmpF, two enterobacterial outer membrane pore-forming proteins." Antimicrob Agents Chemother **51**(9): 3190-8.
29. Galas, M., J. W. Decousser, N. Breton, T. Godard, P. Y. Allouch and P. Pina (2008). "Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in France." Antimicrob Agents Chemother **52**(2): 786-9.
30. Garau, G., A. M. Di Guilmi and B. G. Hall (2005). "Structure-based phylogeny of the metallo-beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **49**(7): 2778-84.
31. Guigon, G., J. Cheval, R. Cahuzac and S. Brisse (2008). "MLVA-NET--a standardised web database for bacterial genotyping and surveillance." Euro Surveill **13**(19).
32. Guillouzouic, A., N. Caroff, S. Dauvergne, D. Lepelletier, A. Perrin Guyomard, I. Kempf, A. Reynaud and S. Corvec (2009). "MLST typing of *Escherichia coli* isolates overproducing AmpC {beta}-lactamase." J Antimicrob Chemother **63**(6): 1290-2.
33. Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye and T. S. Whittam (1990). "Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*." J Bacteriol **172**(11): 6175-81.
34. Honore, N., M. H. Nicolas and S. T. Cole (1986). "Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*." Embo J **5**(13): 3709-14.
35. Hunter, P. R. and M. A. Gaston (1988). "Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity." J Clin Microbiol **26**(11): 2465-6.
36. Hyytia-Trees, E., P. Lafon, P. Vauterin and E. M. Ribot (2010). "Multilaboratory validation study of standardized multiple-locus variable-number tandem repeat analysis protocol for shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: a novel approach to normalize fragment size data between capillary electrophoresis platforms." Foodborne Pathog Dis **7**(2): 129-36.

37. **Jacoby, G. A.** (2009). "AmpC beta-lactamases." *Clin Microbiol Rev* **22**(1): 161-82, Table of Contents.
38. **James, C. E., K. R. Mahendran, A. Molitor, J. M. Bolla, A. N. Bessonov, M. Winterhalter and J. M. Pages** (2009). "How beta-lactam antibiotics enter bacteria: a dialogue with the porins." *PLoS One* **4**(5): e5453.
39. **Jaureguy, F.** (2009). "[Host and bacterial determinants of *Escherichia coli* extra intestinal infections]." *Med Sci (Paris)* **25**(3): 221-3.
40. **Jaurin, B., T. Grundstrom, T. Edlund and S. Normark** (1981). "The *E. coli* beta-lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation." *Nature* **290**(5803): 221-5.
41. **Jenke, C., D. Harmsen, T. Weniger, J. Rothganger, E. Hyytia-Trees, M. Bielaszewska, H. Karch and A. Mellmann** (2010). "Phylogenetic analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, Germany, 1987-2008." *Emerg Infect Dis* **16**(4): 610-6.
42. **Johnson, J. R., C. Clabots and M. A. Kuskowski** (2008). "Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members." *J Clin Microbiol* **46**(12): 4078-82.
43. **Kumarasamy, K. K., M. A. Toleman, T. R. Walsh, J. Bagaria, F. Butt, R. Balakrishnan, U. Chaudhary, M. Doumith, C. G. Giske, S. Irfan, P. Krishnan, A. V. Kumar, S. Maharjan, S. Mushtaq, T. Noorie, D. L. Paterson, A. Pearson, C. Perry, R. Pike, B. Rao, U. Ray, J. B. Sarma, M. Sharma, E. Sheridan, M. A. Thirunarayan, J. Turton, S. Upadhyay, M. Warner, W. Welfare, D. M. Livermore and N. Woodford** (2010). "Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study." *Lancet Infect Dis* **10**(9): 597-602.
44. **Lartigue, M. F., L. Poirel and P. Nordmann** (2004). "First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in an Enterobacteriaceae isolate in France." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(12): 4929-30.
45. **Lebo, R. V., T. Maher, L. Farrer, E. Y. Fenerci and J. M. Milunsky** (2001). "Highly polymorphic short tandem repeat analyses clarify complex molecular test results." *Diagn Mol Pathol* **10**(3): 179-89.
46. **Leflon-Guibout, V., C. Jurand, S. Bonacorsi, F. Espinasse, M. C. Guelfi, F. Duportail, B. Heym, E. Bingen and M. H. Nicolas-Chanoine** (2004). "Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(10): 3736-42.
47. **Lindstedt, B. A.** (2005). "Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria." *Electrophoresis* **26**(13): 2567-82.
48. **Lindstedt, B. A., L. T. Brandal, L. Aas, T. Vardund and G. Kapperud** (2007). "Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates for use in a genotyping assay." *J Microbiol Methods* **69**(1): 197-205.

49. Lindstedt, B. A., T. Vardund, L. Aas and G. Kapperud (2004). "Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis." J Microbiol Methods **59**(2): 163-72.
50. Lindstedt, B. A., T. Vardund and G. Kapperud (2004). "Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis of *Escherichia coli* O157 using PCR multiplexing and multi-colored capillary electrophoresis." J Microbiol Methods **58**(2): 213-22.
51. Livermore, D. M., R. Canton, M. Gniadkowski, P. Nordmann, G. M. Rossolini, G. Arlet, J. Ayala, T. M. Coque, I. Kern-Zdanowicz, F. Luzzaro, L. Poirel and N. Woodford (2007). "CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe." J Antimicrob Chemother **59**(2): 165-74.
52. Mammeri, H., F. Eb, A. Berkani and P. Nordmann (2008). "Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered in a French hospital." J Antimicrob Chemother **61**(3): 498-503.
53. Mammeri, H., L. Poirel, N. Fortineau and P. Nordmann (2006). "Naturally occurring extended-spectrum cephalosporinases in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **50**(7): 2573-6.
54. Martinez-Martinez, L. (2008). "Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier." Clin Microbiol Infect **14 Suppl 1**: 82-9.
55. Martinez, J. L., M. F. Vicente, A. Delgado-Iribarren, J. C. Perez-Diaz and F. Baquero (1989). "Small plasmids are involved in amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **33**(4): 595.
56. Miko, A., B. A. Lindstedt, L. T. Brandal, I. Lobersli and L. Beutin (2010). "Evaluation of multiple-locus variable number of tandem-repeats analysis (MLVA) as a method for identification of clonal groups among enteropathogenic, enterohaemorrhagic and avirulent *Escherichia coli* O26 strains." FEMS Microbiol Lett **303**(2): 137-46.
57. Miriagou, V., E. Tzelepi, D. Gianneli and L. S. Tzouveleki (2003). "*Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1." Antimicrob Agents Chemother **47**(1): 395-7.
58. Moreno, E., G. Prats, M. Sabate, T. Perez, J. R. Johnson and A. Andreu (2006). "Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*." J Antimicrob Chemother **57**(2): 204-11.
59. Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita and A. Yamaguchi (2002). "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB." Nature **419**(6907): 587-93.
60. Murphy, M., D. Corcoran, J. F. Buckley, M. O'Mahony, P. Whyte and S. Fanning (2007). "Development and application of Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) to subtype a collection of *Listeria monocytogenes*." Int J Food Microbiol **115**(2): 187-94.
61. Murphy, M., D. Minihan, J. F. Buckley, M. O'Mahony, P. Whyte and S. Fanning (2008). "Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of Irish verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from feedlot cattle: uncovering strain dissemination routes." BMC Vet Res **4**: 2.

62. Naas, T., P. Nordmann, G. Vedel and C. Poyart (2005). "Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France." Antimicrob Agents Chemother **49**(10): 4423-4.
63. Navon-Venezia, S., I. Chmelnitsky, A. Leavitt, M. J. Schwaber, D. Schwartz and Y. Carmeli (2006). "Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel." Antimicrob Agents Chemother **50**(9): 3098-101.
64. Nicolas-Chanoine, M. H., J. Blanco, V. Leflon-Guibout, R. Demarty, M. P. Alonso, M. M. Canica, Y. J. Park, J. P. Lavigne, J. Pitout and J. R. Johnson (2008). "Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15." J Antimicrob Chemother **61**(2): 273-81.
65. Nikaido, H. (2003). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited." Microbiol Mol Biol Rev **67**(4): 593-656.
66. Noller, A. C., M. C. McEllistrem, A. G. Pacheco, D. J. Boxrud and L. H. Harrison (2003). "Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates." J Clin Microbiol **41**(12): 5389-97.
67. ONERBA (2004). "rapport d'activité 2004 " ISBN 2-915968-09-8(Ed 2006).
68. Pawlowski, S. W., C. A. Warren and R. Guerrant (2009). "Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea." Gastroenterology **136**(6): 1874-86.
69. Pei, Y., J. Terajima, Y. Saito, R. Suzuki, N. Takai, H. Izumiya, T. Morita-Ishihara, M. Ohnishi, M. Miura, S. Iyoda, J. Mitobe, B. Wang and H. Watanabe (2008). "Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates dispersed across Japan by pulsed-field gel electrophoresis and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis." Jpn J Infect Dis **61**(1): 58-64.
70. Perez-Perez, F. J. and N. D. Hanson (2002). "Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR." J Clin Microbiol **40**(6): 2153-62.
71. Petrella, S., N. Ziental-Gelus, C. Mayer, M. Renard, V. Jarlier and W. Sougakoff (2008). "Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A beta-lactamase KPC-2 identified in an *Escherichia coli* strain and an *Enterobacter cloacae* strain isolated from the same patient in France." Antimicrob Agents Chemother **52**(10): 3725-36.
72. Piatti, G., A. Mannini, M. Balistreri and A. M. Schito (2008). "Virulence factors in urinary *Escherichia coli* strains: phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance." J Clin Microbiol **46**(2): 480-7.
73. Poirel, L., J. W. Decousser and P. Nordmann (2003). "Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene." Antimicrob Agents Chemother **47**(9): 2938-45.
74. Quentin, C., C. Arpin, V. Dubois, C. Andre, I. Lagrange, I. Fischer, J. P. Brochet, F. Grobost, J. Jullin, B. Dutilh, G. Larribet and P. Noury (2004). "Antibiotic resistance rates and phenotypes among isolates of Enterobacteriaceae in French extra-hospital practice." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **23**(3): 185-93.
75. Robbins, J. B., G. H. McCracken, Jr., E. C. Gotschlich, F. Orskov, I. Orskov and L. A. Hanson (1974). "*Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide associated with neonatal meningitis." N Engl J Med **290**(22): 1216-20.

76. **Ruppé, E.** (2010). Epidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. Antibiotiques, . **12**: 3-16.
77. **Sanders, C. C., P. A. Bradford, A. F. Ehrhardt, K. Bush, K. D. Young, T. A. Henderson and W. E. Sanders, Jr.** (1997). "Penicillin-binding proteins and induction of AmpC beta-lactamase." Antimicrob Agents Chemother **41**(9): 2013-5.
78. **Schubert, S., P. Darlu, O. Clermont, A. Wieser, G. Magistro, C. Hoffmann, K. Weinert, O. Tenailon, I. Matic and E. Denamur** (2009). "Role of intraspecies recombination in the spread of pathogenicity islands within the *Escherichia coli* species." PLoS Pathog **5**(1): e1000257.
79. **Schwartz, D. C. and C. R. Cantor** (1984). "Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis." Cell **37**(1): 67-75.
80. **Scoulica, E. V., I. K. Neonakis, A. I. Gikas and Y. J. Tselentis** (2004). "Spread of bla(VIM-1)-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the bla(VIM-1) metallo-beta-lactamase gene." Diagn Microbiol Infect Dis **48**(3): 167-72.
81. **Stenutz, R., A. Weintraub and G. Widmalm** (2006). "The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens." FEMS Microbiol Rev **30**(3): 382-403.
82. **Struelens, M.** (2000). Marqueurs épidémiologiques. In : Précis de bactériologie clinique, Freney J. Renaud F., Hansen W., Bollet C. Editions ESKA 2000 229-248.
83. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing and B. Swaminathan** (1995). "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." J Clin Microbiol **33**(9): 2233-9.
84. **Thiolet , J. M., L. Lacavé, P. Jarno, M. H. Metzger, H. Tronel, C. Gautier, F. L'Hériveau and B. Coignard** (2006). "Prévalence des infections nosocomiales, France, 2006." Bull Epidemiol Hebd 2007 **51-52**: 429-432
85. **Vedy, S., E. Garnotel, J. L. Koeck, F. Simon, S. Molinier and A. Puidupin** (2007). "[Interest of new molecular typing method in the study of hospital transmitted *Staphylococcus aureus* population]." Pathol Biol (Paris) **55**(8-9): 382-9.
86. **Viveiros, M., M. Dupont, L. Rodrigues, I. Couto, A. Davin-Regli, M. Martins, J. M. Pages and L. Amaral** (2007). "Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*." PLoS One **2**(4): e365.
87. **Vu-Thien, H., K. Hormigos, G. Corbineau, B. Fauroux, H. Corvol, D. Moissenet, G. Vergnaud and C. Pourcel** (2010). "Longitudinal survey of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients using a multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis method." BMC Microbiol **10**: 24.
88. **Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel and P. Nordmann** (2005). "Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?" Clin Microbiol Rev **18**(2): 306-25.
89. **Walther-Rasmussen, J. and N. Hoiby** (2007). "Class A carbapenemases." J Antimicrob Chemother **60**(3): 470-82.
90. **Williams, J. D.** (1999). "Beta-lactamases and beta-lactamase inhibitors." Int J Antimicrob Agents **12 Suppl 1**: S3-7; discussion S26-7.

- 91. Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, P. R. Reeves, M. C. Maiden, H. Ochman and M. Achtman (2006). "Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective." Mol Microbiol **60**(5): 1136-51.**
- 92. Yamamoto, S. (2007). "Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*." J Infect Chemother **13**(2): 68-73.**

Nom – Prénoms : PAQUIN Axelle Paulette Marguerite
Titre du mémoire-thèse : Comparaison du typage moléculaire par M.L.V.A. et M.L.S.T. d'une collection de 70 isolats de *E. coli* au C.H.U. de Nantes.

Résumé du mémoire-thèse :

Le M.L.V.A. est une nouvelle technique de typage moléculaire innovante basée sur l'analyse de plusieurs *loci* présentant des séquences répétées. Le but de cette étude était de développer une approche de typage par M.L.V.A. sur une cohorte de souches de *E. coli* préalablement caractérisées par M.L.S.T. Soixante-neuf souches d'origine humaine ou animale et un témoin ont été analysés. La technique développée par Lindsted *et al.* a été adaptée. Une typicité de 100 % et un polymorphisme des *loci* (index de diversité : de 0,03 à 0,91) étaient mis en évidence. Trente-cinq profils M.L.V.A. ont été retrouvés et 54 % des souches présentaient un profil qui ne variait que pour l'allèle 14. Les souches exprimant un mécanisme de résistance chromosomique (ST23, ST155) présentaient une homologie des profils où seul l'allèle 14 variait. A l'inverse, les souches sauvages ou possédant un mécanisme de résistance plasmidique (BLSE ou AmpC plasmidique) présentaient des profils plus hétérogènes tant en M.L.V.A. qu'en M.L.S.T. Cette technique simple et rapide semble être plus discriminante que le M.L.S.T., pour des souches de même ST présentant des profils M.L.V.A. différents. Des études complémentaires devraient comparer ces performances à celles de l'E.C.P. lors d'épidémies ou pour analyser la circulation de certaines souches.

MOTS CLÉS : *Escherichia coli*, M.L.V.A., M.L.S.T., profil de résistance, β -lactamines, épidémiologie
