

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
par

Adèle PRODHOMME

Présentée et soutenue publiquement le 20-10-2008

**Sensibilité diminuée de *Escherichia coli* aux céphalosporines de 3^{ème} génération :
étude génétique et corrélation avec l'utilisation des β -lactamines en thérapeutique**

Président :

M. Alain REYNAUD, Professeur de Bactériologie, Faculté de Pharmacie Nantes

Membres du jury :

M. Stéphane CORVEC, Maître de Conférences de Bactériologie, Faculté de
Médecine Nantes

Mme N. GRIMAUD, Maître de Conférences de Pharmacologie, Faculté de
Pharmacie Nantes

Mme I. HOUIS, Docteur en Pharmacie

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES TABLEAUX	2
LISTE DES FIGURES.....	3
INTRODUCTION.....	6
PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	8
I. Les infections à <i>Escherichia coli</i>.	9
1. Habitat	9
2. Caractères généraux	9
2.1 Morphologie et caractères biochimiques d'identification	9
2.2 Caractères cultureux	10
2.3 Caractères antigéniques.....	11
3. Pouvoir pathogène.....	12
3.1 Notion de groupes phylogénétiques	13
3.2 Facteurs de virulence.....	14
3.3 Relation entre phylogénie et virulence.....	18
3.4 Infections urinaires	19
3.5 Diarrhées	20
3.6 Infections digestives et hépatobiliaires	21
3.7 Méningites et septicémies	21
II. Evolution du comportement de <i>E. coli</i> à l'égard des antibiotiques	21
1. Les β -lactamines.....	21
1.1 Rappel du mécanisme d'action	21
1.2 Principaux mécanismes de résistance	22

1.2.1 Résistance naturelle : production de la céphalosporinase chromosomique AmpC	23
1.2.2 Résistances acquises aux β -lactamines	26
1.2.2.1 Par production de β -lactamases additionnelles	26
1.2.2.2 Par des mécanismes non enzymatiques.....	29
2. Les autres antibiotiques	30
2.1 Les quinolones.....	30
2.2 Le cotrimoxazole.....	31
III. Analyse du comportement des souches de <i>E. coli</i> vis-à-vis des β-lactamines en milieu hospitalier et communautaire	31
1. Evolution des prescriptions de β -lactamines.....	31
1.1 A l'hôpital	31
1.2 En ville	35
2. Evolution de la résistance.....	42
2.1 Analyse de la résistance bactérienne aux antibiotiques	42
2.2 Epidémiologie de la résistance chez <i>E. coli</i>	44
2.2.1 Evolution de la résistance à l'hôpital	44
2.2.2 Evolution de la résistance en ville.....	45
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	50
I. Bases et objectifs de l'étude	51
II. Matériel et méthodes.....	51
1. Souches bactériennes étudiées	51
2. Etude du promoteur du gène <i>ampC</i>	52
2.1 Extraction d'ADN rapide	52
2.2 Amplification enzymatique de l'ADN par PCR	52
2.3 Séquençage de la région promotrice du gène <i>ampC</i>	54
3. Détermination du groupe phylogénétique par PCR triplex.....	55
4. Etude des facteurs de virulence associés.....	56
5. Typage moléculaire par PCR ERIC-2.....	57

III. Résultats	59
1. Détermination du groupe phylogénétique	59
2. Caractéristiques des souches résistantes	59
3. Etude du polymorphisme de la région promotrice du gène <i>ampC</i> des souches sensibles	61
4. Détection de cinq facteurs de virulence chez les isolats cliniques résistants aux β -lactamines.....	62
5. Typage moléculaire par PCR ERIC-2.....	62
 DISCUSSION GENERALE	 69
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	 75
 BIBLIOGRAPHIE	 78

LISTE DES ABREVIATIONS

B.E.T. : Bromure d'éthidium.....	54
BLSE : β -lactamases à spectre étendu.....	23
C1G : Céphalosporines de 1 ^{ère} génération.....	34
C2G : Céphalosporines de 2 ^{ème} génération.....	34
C3G : Céphalosporines de 3 ^{ème} génération.....	26
C4G : Céphalosporines de 4 ^{ème} génération.....	34
CNAM : Caisse Nationale d'Assurance Maladie	40
DDD : Defined daily dose.....	32
D.H.F.R. : Dihydrofolate réductase.....	31
D.H.P.S. : Dihydroptéroate synthétase	31
E.A.R.S.S. : European Antimicrobial Resistance Surveillance System	46
E.C.B.U. : Examen cytobactériologique des urines	48
E.H.E.C. : Enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	15
E.I.E.C. : Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	20
E.P.E.C. : Enteropathogen <i>Escherichia coli</i>	15
E.R.I.C. : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus	57
ES : Etablissement de santé	35
ESAC : European Surveillance of Antibiotic Consumption	32
E.T.E.C. : Enterotoxinogen <i>Escherichia coli</i>	15
FQ : Fluoroquinolone	72
IN : Infection nosocomiale	34
ONERBA : Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques	44
PAI : Ilots de pathogénicité	17
pb : paires de bases	23
PCR : Polymerase chain reaction	51
PG : Peptidoglycane	21
PLP : Protéines liant les pénicillines	21

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Relation entre phylogénie et virulence chez les souches de <i>E. coli</i>	19
Tableau II : Exemples de β -lactamases produites par les bactéries à Gram négatif.....	28
Tableau III : Evolution de la consommation totale d'antibiotiques en ambulatoire dans 25 pays européens entre 1997 et 2003	36
Tableau IV : Liste de l'ensemble des amorces utilisées pour les différentes PCR.....	58
Tableau V : Tableau récapitulatif des conditions expérimentales de l'amplification par PCR pour l'amplification de la région promotrice du gène <i>ampC</i> , le groupage phylogénétique, le typage moléculaire et l'étude des facteurs de virulence	58
Tableau VI : Groupage phylogénétique des souches sensibles de <i>E. coli</i> et des souches de <i>E. coli</i> hyperproductrices de la céphalosporinase AmpC.....	59
Tableau VII : Groupes phylogénétiques, polymorphisme de la séquence du promoteur du gène <i>ampC</i> et CMI à l'égard de la ceftazidime des 55 souches de <i>E. coli</i> hyperproductrices de la céphalosporinase AmpC chromosomique	60
Tableau VIII : Comparaison des polymorphismes génétiques du promoteur du gène <i>ampC</i> les plus fréquemment retrouvés chez les souches sensibles et hyperproductrices de céphalosporinase AmpC	62

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Morphologie de <i>E. coli</i>	9
Figure 2 : Aspect morphologique de colonies de <i>E. coli</i> sur gélose chromogénique après 18h d'incubation à 37°C	10
Figure 3 : Aspect morphologique de colonies de <i>E. coli</i> sur gélose Bromo Crésol Pourpre après 18h d'incubation à 37°C	11
Figure 4 : Aspect morphologique de colonies de <i>E. coli</i> sur gélose au sang de cheval après 18h d'incubation à 37°C	11
Figure 5 : Distribution phylogénétique des souches de la collection ECOR. Les relations phylogénétiques entre les différentes souches ont été déduites de l'analyse de la distance génétique par la méthode du Neighbor-Joining	14
Figure 6 : Facteurs de virulence associés aux infections extra-intestinales à <i>E. coli</i>	16
Figure 7 : Support génétique de la virulence par transfert horizontal de gènes, aboutissant à l'intégration d'îlots de pathogénicité dans le génome d'une bactérie non pathogène.....	17
Figure 8 : Structure des îlots de pathogénicité I et II de la souche uropathogène <i>E. coli</i> J96.	17
Figure 9 : Les îlots de pathogénicité (PAIs) sont des fragments d'ADN de grande taille dont les bornes sont des séquences d'insertion (IS). Ils peuvent être associés à des gènes d'ARN de transfert (ARNt).....	18
Figure 10 : Schéma du mécanisme d'action des β -lactamines.....	22
Figure 11 : Comparaison des séquences du promoteur du gène <i>ampC</i> des souches sauvages (<i>E. coli</i> K ₁₂) et des séquences « consensus » du promoteur du gène <i>ampC</i>	24
Figure 12 : Structure de l'opéron fumarate réductase chez <i>E. coli</i>	24
Figure 13 : Séquence de l'atténuateur du gène <i>ampC</i> : représentation de la structure dite	

« en épingle à cheveux »	25
Figure 14 : Structure de AcrAB-TolC.....	30
Figure 15 : Consommation et distribution des principales classes d'antibiotiques à l'hôpital en Europe en 2002.....	33
Figure 16 : Fréquence relative de consommation au sein des pénicillines à l'hôpital en Europe en 2002.....	34
Figure 17 : Consommation d'antibiotiques en ambulatoire dans 25 pays d'Europe en 2003.	36
Figure 18 : Consommation totale de pénicillines en ambulatoire dans 25 pays d'Europe en 2003	37
Figure 19 : Fréquence de la prescription d'antibiotiques en fonction de l'âge	37
Figure 20 : Consommation d'antibiotiques et incidence des syndromes grippaux.....	38
Figure 21 : Nombre de prescriptions en millions pour la période septembre-février des hivers 2001-2002 à 2003-2004	39
Figure 22 : Consommation des antibiotiques en fonction de l'âge de l'hiver 2001-2002 à l'hiver 2003-2004	39
Figure 23 : Evolution du nombre de prescriptions d'antibiotiques par classe d'âge et par habitant	40
Figure 24 : Evolution du nombre de prescriptions en France par classe d'antibiotiques entre 2001 et 2007	41
Figure 25 : Différents niveaux d'impact des antibiotiques, susceptibles de contribuer à la progression de la résistance bactérienne	42
Figure 26 : Utilité du croisement des données de la résistance bactérienne et de la consommation des antibiotiques.....	43
Figure 27 : Sensibilité aux principaux antibiotiques de souches de <i>E. coli</i> responsables de bactériémies	44

Figure 28 : Place de <i>E. coli</i> dans les infections urinaires en ville.....	45
Figure 29 : Proportion des isolats de <i>E. coli</i> résistants aux aminopénicillines dans les pays participants à l'enquête EARSS en 2002	46
Figure 30 : Proportion des isolats de <i>E. coli</i> résistants aux C3G dans les pays participants à l'enquête EARSS en 2002	47
Figure 31 : Proportion des isolats de <i>E. coli</i> résistants aux C3G dans les pays participants à l'enquête EARSS en 2006	47
Figure 32 : Sensibilité (en %) des souches de <i>E. coli</i> isolées d'infections urinaires communautaires, selon les antécédents d'antibiothérapie.....	48
Figure 33 : Principe général des étapes d'un cycle de PCR.....	53
Figure 34 : Arbre de décision dichotomique pour déterminer le groupe phylogénétique d'une souche de <i>E. coli</i> en utilisant les résultats de l'amplification par PCR des gènes <i>chuA</i> et <i>yjaA</i> et du fragment d'ADN TspE4.C2.....	55
Figure 35 : Exemple de profils de PCR triplex spécifique des groupes phylogénétiques de <i>E. coli</i>	56
Figure 36 : Exemple de comparaison de profils obtenus pour des isolats de <i>E. coli</i> hyperproducteurs de céphalosporinase AmpC après typage moléculaire par ERIC-2 PCR. Migration en gel d'agarose 1,5% 2H30 à 120 Volts.	63

INTRODUCTION

Escherichia coli est une des bactéries les plus fréquemment isolées en Bactériologie médicale. Commensal du tube digestif de l'Homme, le colibacille peut également être à l'origine de nombreux types d'infections. Les souches dites « sauvages » sont sensibles à tous les antibiotiques, ce qui rend les infections qu'elles produisent relativement faciles à traiter, notamment par les β -lactamines. Depuis la découverte de la pénicilline G, de nombreuses familles d'antibiotiques très efficaces ont été mises sur le marché. A chaque commercialisation d'une nouvelle molécule, du fait de leurs importantes capacités d'adaptation génétique, les bactéries ont constamment développé de nouvelles résistances, en fonction de la pression de sélection à laquelle elles se trouvent exposées, en utilisant les possibilités que leur offre leur propre patrimoine génétique, mais aussi celui de leurs congénères.

Chez les bacilles à Gram négatif, le mécanisme prépondérant de résistance aux β -lactamines est lié à la production d'enzymes inactivatrices : les β -lactamases. Chez *E. coli*, une enzyme constitutive chromosomique, la céphalosporinase AmpC, est synthétisée à très bas niveau chez les souches dites « sauvages », sans retentissement sur la prise en charge thérapeutique. L'expression de ce gène *ampC* est régulée par un promoteur situé en amont. Des mutations dans la séquence de ce dernier sont susceptibles de modifier le niveau de production de cette β -lactamase. Son hyperproduction fournit alors un profil caractéristique, se traduisant par un niveau de résistance variable à l'égard des β -lactamines, notamment la ceftazidime (Caroff *et al.*, 1999 ; Caroff *et al.*, 2000 ; Corvec *et al.*, 2002).

Les objectifs de notre étude étaient de comparer un panel de 100 souches de *E. coli* sensibles à toutes les β -lactamines à une cohorte de 55 isolats cliniques de *E. coli* hyperproducteurs de céphalosporinase AmpC. Ce travail a consisté d'une part, à déterminer le groupe phylogénétique de ces souches et comparer le polymorphisme génétique de la région promotrice du gène *ampC* impliqué dans la régulation de l'expression de cette β -lactamase et, d'autre part, à détecter chez ces deux groupes d'isolats, la présence ou l'absence de cinq facteurs de virulence représentatifs de la pathogénicité de *E. coli*.

Dans un premier temps, nous présenterons un rappel des connaissances actuelles sur les infections causées par *E. coli* et son comportement vis-à-vis des antibiotiques, en particulier les β -lactamines, que ce soit en milieu communautaire ou hospitalier. L'étude expérimentale, que nous avons publiée, sera ensuite présentée et commentée. Enfin, nous aborderons une

discussion générale sur l'intérêt des données rapportées et les perspectives qu'elles peuvent ouvrir.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Les infections à *Escherichia coli*

Escherichia coli fut isolé par Escherich, en 1885. Elle est l'espèce-type du genre *Escherichia* qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle fait partie des espèces les plus fréquemment isolées en Bactériologie médicale.

1. Habitat

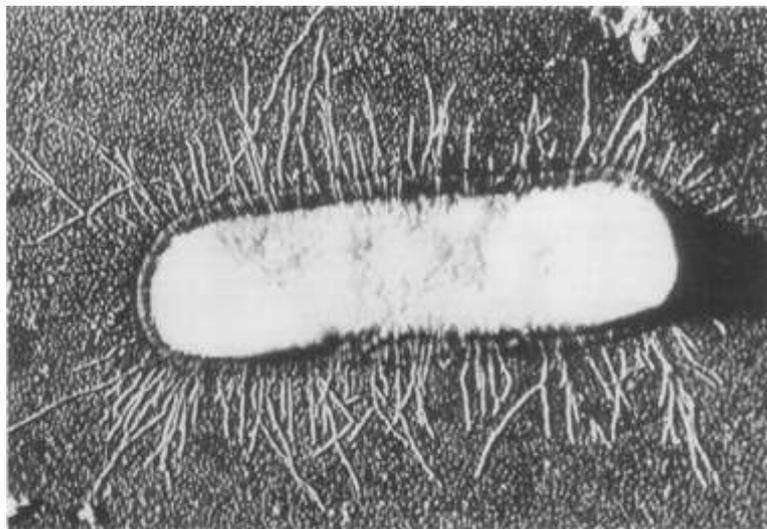
E. coli est un hôte normal du tube digestif de l'Homme. L'appellation commune "colibacille" est une contraction de « bacille du côlon » rappelant son caractère de bactérie commensale du tube digestif. Chez l'Homme, elle constitue l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie sous-dominante. Cette bactérie est également présente au niveau du revêtement cutanéomuqueux, à proximité des orifices naturels, et elle demeure très répandue dans l'environnement (eaux, sols, aliments) (Baraduc *et al.*, 2000).

2. Caractères généraux

2.1 Morphologie et caractères biochimiques d'identification

E. coli possède les caractères classiques des Entérobactéries : c'est un bacille à Gram négatif, assez grand (1-1,5 x 2-6 μm), aéro-anaérobie facultatif, oxydase négatif, généralement mobile grâce à une ciliature péritriche (Figure 1). Il réduit les nitrates en nitrites et fermente le glucose (en général avec production de gaz).

Figure 1 : Morphologie de *E. coli* (Johnson, 1991).



Les principaux caractères biochimiques permettant de différencier *E. coli* des autres Entérobactéries sont : la fermentation du lactose, la production d'indole, la présence d'une β -galactosidase et d'une lysine-décarboxylase, la fermentation du mannitol et du sorbitol, l'absence d'arginine-dihydrolase, d'uréase, de tryptophane-désaminase, et l'absence de production d' H_2S et d'acétoïne (Baraduc *et al.*, 2000).

L'identification se fait à l'aide de différentes galeries regroupant tous les caractères biochimiques et enzymatiques de différenciation des Entérobactéries, notamment les galeries Api20E[®], Id 32E[®] et IdGN[®] grâce au système automatisé Vitek2[®] (Biomérieux, France). Plus récemment, l'apparition de géloses chromogéniques (substrats incolores incorporés dans le milieu gélosé, conduisant à la production d'un métabolite coloré lors du développement bactérien) autorise une orientation de l'identification bactérienne, en routine au laboratoire, après 18 à 24h de culture à 37°C (Figure 2).

Figure 2 : Aspect morphologique de colonies de *E. coli* sur gélose chromogénique après 18h d'incubation à 37°C.



2.2 Caractères cultureux

E. coli est une bactérie non exigeante, qui se développe en 18 à 24h sur milieux gélosés 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, non pigmentées. Sur milieux lactosés additionnés d'un indicateur coloré de pH, les colonies sont généralement lactose positif (Figure 3, page 11). Sur gélose au sang, elles peuvent présenter une β -hémolyse (Figure 4, page 11).

Figure 3 : Aspect morphologique de colonies de *E. coli* sur gélose Bromo Crésol Pourpre après 18h d'incubation à 37°C.



Figure 4 : Aspect morphologique de colonies de *E. coli* sur gélose au sang de cheval après 18h d'incubation à 37°C.



2.3 Caractères antigéniques

L'étude des différents antigènes, permet de classer par sérotypes les souches appartenant à une même espèce. La détermination des sérotypes présente un intérêt épidémiologique pour certaines entérobactéries, notamment pour *E. coli*.

Trois principaux types d'antigènes sont retrouvés chez *E. coli* :

- Antigène O ou somatique :

Cet antigène est localisé au niveau de la paroi. De nature lipopolysaccharidique, il correspond en fait à l'endotoxine bactérienne. Il est toujours présent (il en existe environ 160 différents) et constitue un des facteurs de virulence de cette bactérie.

- Antigène H ou flagellaire :

De nature protéique, il n'existe que chez les bactéries mobiles, donc pourvues de flagelles. Il en existe environ 52 types.

- Antigènes dits de surface :

- Antigène K ou capsulaire : de nature polysaccharidique, il constitue une enveloppe d'importance variable. Il en existe environ 70 types différents, dont l'antigène capsulaire K1, mis en évidence chez les souches impliquées dans les méningites néonatales.
- Antigène F : protéique, présent chez les souches ayant des propriétés d'adhérence.

Le sérotype rassemble les spécificités des antigènes O, H et si possible K. Sa détermination permet de caractériser une souche, en particulier les souches pathogènes et épidémiques. C'est le cas, par exemple, du sérotype O157:H7 des souches entérohémorragiques, responsables d'épidémies de colites hémorragiques et du syndrome hémolytique et urémique (Orskov, 1986).

3. Pouvoir pathogène

Chez l'homme, la colonisation par *E. coli* est précoce, puisqu'elle se produit au moment de l'accouchement, par contact avec la flore périnéale issue de la flore fécale. Cette bactérie revêt donc un double visage, soit comme commensal de la flore digestive, soit comme agent de différents types d'infections. *E. coli* peut être responsable d'un nombre varié de pathologies. Toutefois, trois types de syndromes majeurs résultent de l'infection par des

souches de *E. coli* pathogènes : les infections urinaires, les infections digestives (diarrhées, infections hépatobiliaires et autres), et les méningites et septicémies.

La survenue d'une infection dépend toujours de facteurs liés à l'hôte et de facteurs liés à la bactérie, comme la présence d'un certain nombre de facteurs de virulence plus ou moins spécifiques de la souche incriminée.

La notion de « groupes phylogénétiques » et celle de « pouvoir pathogène » sont liées. En effet, dans les dix dernières années, des études ont permis de répartir les souches de *E. coli* en quatre groupes phylogénétiques principaux, aux caractéristiques différentes en terme de pathogénicité, de facteurs de virulence et de résistance aux antibiotiques (Bingen *et al.*, 1998 ; Boyd *et al.*, 1998 ; Picard *et al.*, 1999 ; Duriez *et al.*, 2001 ; Jauréguy, 2007).

3.1 Notion de groupes phylogénétiques

La phylogénie, souvent représentée par un arbre phylogénétique, montre les relations de parenté entre des entités supposées avoir un ancêtre commun. Il existe plusieurs techniques de construction des arbres phylogénétiques, plus ou moins rapides et plus ou moins fiables.

Une des méthodes conduisant au groupage phylogénétique est la Multi Locus Enzyme Electrophoresis (M.L.E.E.) ou étude du polymorphisme des enzymes par électrophorèse. La charge électrostatique d'une protéine est déterminée par sa séquence en acides aminés et influence sa distance de migration durant l'électrophorèse. Les variants mobiles d'une enzyme peuvent ainsi être corrélés aux différents allèles du gène structural correspondant. A partir d'une collection de souches de référence ECOR (Ochman *et al.*, 1984), l'étude de la variation allélique de gènes codant pour des enzymes du métabolisme (pour avoir un échantillon représentatif des gènes structuraux du génome bactérien), a permis la subdivision en quatre groupes phylogénétiques (A, B1, B2 et D) des isolats de *E. coli* (Figure 5, page 14) (Herzer *et al.*, 1990).

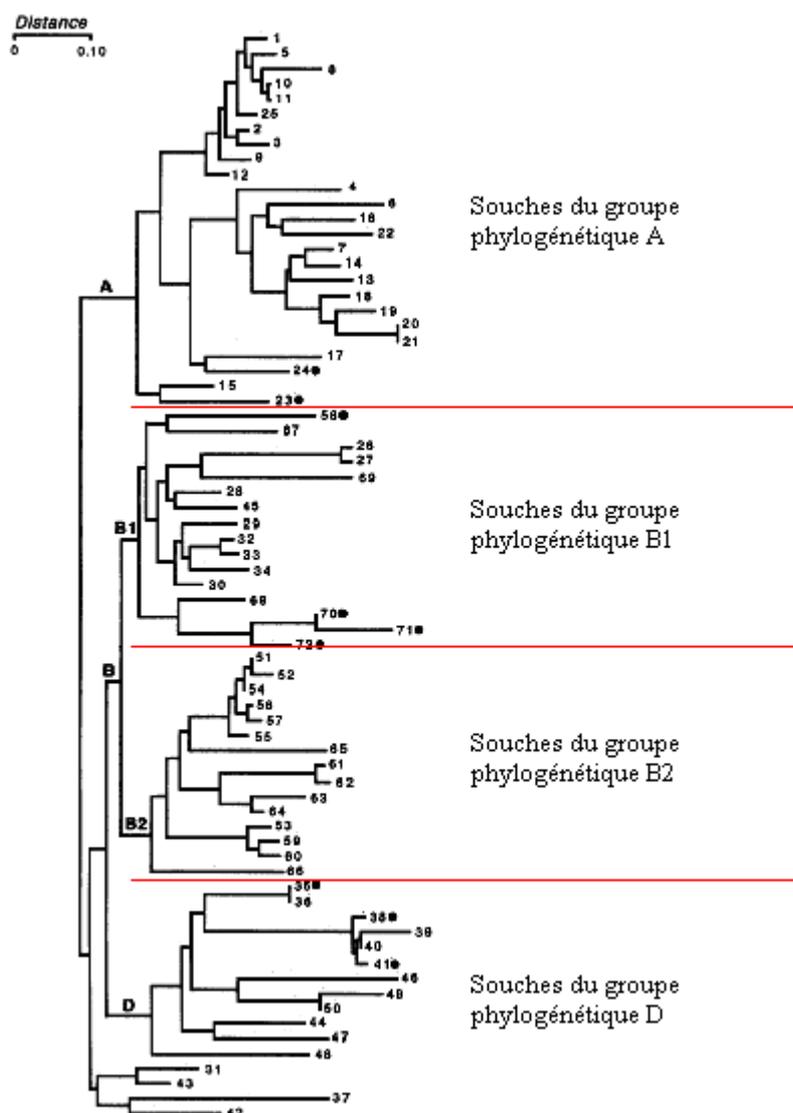
La caractérisation des groupes phylogénétiques a permis de définir 2 entités :

les souches pathogènes dites « extra-intestinales », appartenant majoritairement au groupe B2 et, dans une moindre mesure, au groupe D (Bingen *et al.*, 1998 ; Boyd *et al.*, 1998 ; Picard *et al.*, 1999),

les souches dites « commensales » comprenant les groupes phylogénétiques A et B1 (Duriez *et al.*, 2001).

Plus récemment, une méthode plus rapide et plus simple a été mise en place pour le groupage phylogénétique. Elle est basée sur une PCR triplex, c'est-à-dire utilisant trois couples d'amorces ciblant deux gènes *chuA* et *yjaA* et un fragment d'ADN de fonction inconnue. La combinaison de la présence ou de l'absence de ces trois marqueurs permet une détection rapide du groupe phylogénétique (Clermont *et al.*, 2000).

Figure 5 : Distribution phylogénétique des souches de la collection ECOR. Les relations phylogénétiques entre les différentes souches ont été déduites de l'analyse de la distance génétique par la méthode du Neighbor-Joining (Herzer *et al.*, 1990).



La virulence bactérienne se définit par la capacité d'une souche bactérienne à survivre, s'adapter, se multiplier et disséminer à l'intérieur d'un hôte. Le point commun entre les nombreux facteurs de virulence est leur capacité à exercer des effets délétères sur la cellule eucaryote, en intervenant dans des processus tels que la synthèse des protéines, la division cellulaire, la sécrétion des ions ou encore la transcription.

On peut distinguer quelques grands groupes de facteurs de virulence :

a) les toxines :

- les toxines thermolabiles, produites par les souches entérotoxigènes (E.T.E.C.), ayant une structure et une fonction extrêmement proches de celles de la toxine cholérique. Le principal symptôme clinique est alors une diarrhée aqueuse.
- les toxines thermostables comprenant la toxine STa, produite par les E.T.E.C. ainsi que par certaines souches de *E. coli* entéropathogènes (E.P.E.C.), et la toxine STb, spécifique des E.T.E.C.
- les vérotoxines ou toxines shiga-like, produites par les souches de *E. coli* entérohémorragiques (E.H.E.C.). Dans certains cas, elles peuvent être responsables du syndrome hémolytique et urémique qui associe atteinte rénale, anémie hémolytique et thrombopénie.
- l'hémolysine, codée par le gène *hly*.
- le cytotoxic necrotizing factor, codé par le gène *cnf1*.

b) les facteurs d'adhésion et de colonisation des tissus de l'hôte :

- les fimbriae : ce sont des adhésines de nature pilique qui jouent un rôle majeur dans l'adhérence des souches de *E. coli* aux cellules eucaryotes. Ces fimbriae sont produits de façon spécifique par certaines souches, comme par exemple, les fimbriae de type P

et de type S, plus fréquemment présents chez les souches uropathogènes. Les P-fimbriae sont codés par l'opéron *pap*. Ce dernier comprend une batterie de gènes dont *papG*, responsable des fonctions d'adhérence. Les fimbriae de type S sont codés par différents gènes, dont *sfa/foc* (Bingen-Bidois *et al.*, 2002).

- l'intimine est une protéine de la membrane externe, responsable de l'adhésion « intime » des souches de *E. coli* entéropathogènes et entérohémorragiques aux cellules épithéliales.

c) la capsule :

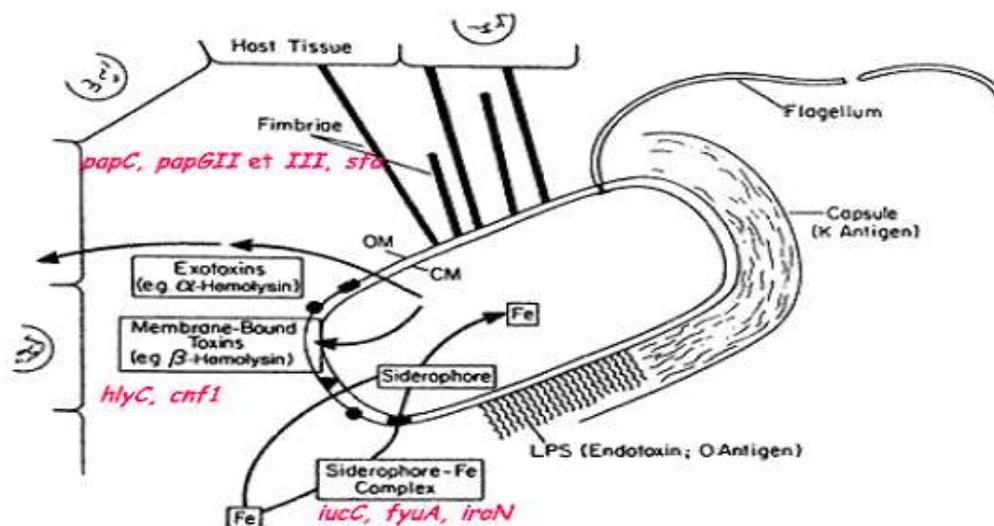
Certaines souches de *E. coli* produisent une capsule, notamment les souches de sérotype capsulaire K1, responsables de méningites infantiles (Bingen-Bidois *et al.*, 2002).

d) les sidérophores ou systèmes de capture du fer :

L'aérobactine, codée par le gène *iucC*, est capable de déplacer le fer de ses protéines de liaison et de le transporter vers la bactérie (Bingen-Bidois *et al.*, 2002).

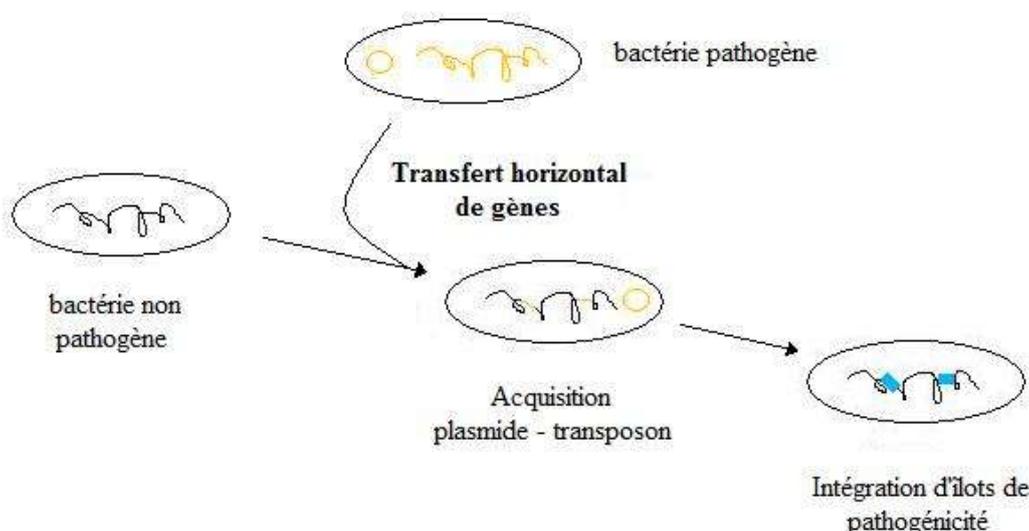
L'ensemble de ces facteurs de virulence est illustré sur la figure 6.

Figure 6 : Facteurs de virulence associés aux infections extra-intestinales à *E. coli* (Johnson, 1991 ; Jauréguy, 2007).



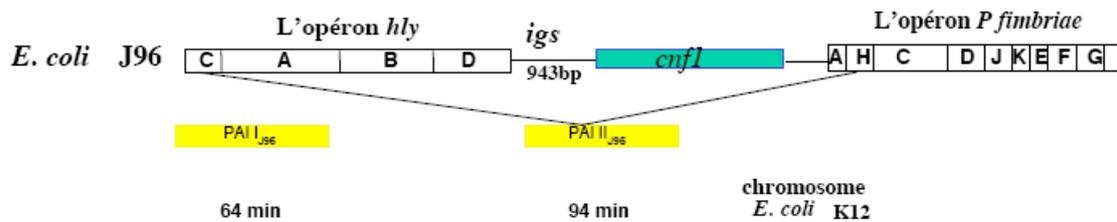
Les gènes de virulence des bactéries pathogènes, qui codent pour des toxines ou des adhésines, peuvent être localisés sur des éléments génétiques mobiles, transmissibles, comme les transposons, les plasmides ou les bactériophages (Figure 7, page 17) (Hacker *et al.*, 1997).

Figure 7 : Support génétique de la virulence par transfert horizontal de gènes, aboutissant à l'intégration d'îlots de pathogénicité dans le génome d'une bactérie non pathogène (www.unice.fr/inserm-toxin-bacteria/master%20present%202.pdf).



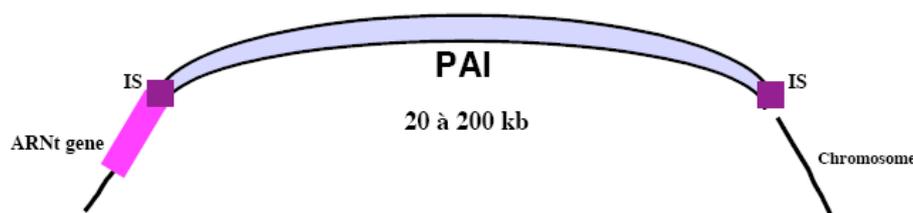
Ces gènes peuvent également être localisés au niveau de régions particulières sur le chromosome bactérien, appelées « îlots de pathogénicité ». Les îlots de pathogénicité (PAIs) sont retrouvés chez les bactéries à Gram négatif comme chez les bactéries à Gram positif. Ils sont présents dans le génome des souches pathogènes d'une espèce donnée mais absents ou rarement présents dans les variants non pathogènes de la même espèce. Ces PAIs sont de grandes régions d'ADN (jusqu'à 200 kilobases), dont le contenu en bases G et C diffère généralement de celui du chromosome, et transportent souvent plus d'un gène de virulence, comme le montre la figure 8.

Figure 8 : Structure des îlots de pathogénicité I et II de la souche uropathogène *E. coli* J96 (www.unice.fr/inserm-toxin-bacteria/master%20present%202.pdf).



Dans la plupart des cas, ces îlots sont délimités par des séquences d'ADN spécifiques telles que des séquences d'insertion (IS) (Figure 9, page 18). Ces structures sont régulièrement associées à des gènes d'ARN de transfert, constituant des cibles pour l'intégration dans le chromosome de ces éléments (Hacker *et al.*, 1997).

Figure 9 : Les îlots de pathogénicité (PAIs) sont des fragments d'ADN de grande taille dont les bornes sont des séquences d'insertion (IS). Ils peuvent être associés à des gènes d'ARN de transfert (ARNt) (www.unice.fr/inserm-toxin-bacteria/master%20present%202.pdf).



3.3 Relation entre phylogénie et virulence

Grâce au groupage phylogénétique, les souches de *E. coli* peuvent être séparées en deux entités : d'une part, les souches pathogènes extra-intestinales, regroupant les souches du groupe phylogénétique B2 et, dans une moindre mesure, du groupe phylogénétique D ; et d'autre part, les souches commensales appartenant aux groupes phylogénétiques A et B1. Dans une étude menée par Johnson *et al.* en 2001, sur 182 souches de *E. coli* isolées d'hémocultures, 118 appartenaient au groupe B2 (soit 69%), contre 23 au groupe D (soit 14%), 21 au groupe A (soit 12%), et 8 au groupe B1 (soit 5%). Le groupe phylogénétique B2 est le plus fréquemment représenté dans les bactériémies, suivi du groupe D, puis A et B1. Le tableau I page 19 compare les caractéristiques des souches de groupe phylogénétique B2 à celles des souches dites « non B2 » (groupes phylogénétiques A, B1 et D). Il souligne

également celles de l'hôte. Ainsi, une relation simple semble exister entre la pathogénicité d'une souche (son arsenal de facteurs de virulence) et son groupe phylogénétique.

Il est également intéressant de noter la relation inverse entre la fréquence du nombre de facteurs de virulence et la résistance aux antibiotiques. En effet, les souches du groupe phylogénétique B2 sont isolées le plus fréquemment lors d'infections chez des sujets immunocompétents. Ces bactéries possèdent généralement de nombreux facteurs de virulence mais demeurent relativement sensibles aux antibiotiques. A l'inverse, les souches de *E. coli* dites « commensales » infectent davantage les patients immunodéprimés hospitalisés, ayant bénéficié de différents traitements antibiotiques dans les semaines précédentes. Par conséquent, la pression de sélection induite entraînerait l'émergence de souches résistantes au sein de la flore commensale du tube digestif (Jauréguy, 2007).

Tableau I : Relation entre phylogénie et virulence chez les souches de *E. coli* (Jauréguy, 2007)

<i>Escherichia coli</i>	Groupe B2	Groupes A, B1, D
Sujets	Immunocompétents	Immunodéprimés
Gènes de virulence	Fréquents	Rares
Modèle animal	Létales	Non létales
Résistance aux antibiotiques	Rare	Fréquente

3.4 Infections urinaires

E. coli est responsable de la majorité des infections urinaires survenant sur un arbre urinaire anatomiquement normal (cystites, pyélonéphrites).

Différents facteurs de risque ont été identifiés : le sexe féminin (urètre plus court et plus grande proximité entre le méat urétral et l'anus), l'existence d'anomalies morphologiques de l'arbre urinaire, un sondage vésical, les rapports sexuels ou une hygiène déficiente (Jensen & Walter, 2007).

De nombreuses études se sont intéressées à l'importance épidémiologique de *E. coli* dans les infections urinaires. Le projet ECO SENS (étude épidémiologique prospective multinationale) a analysé la prévalence et la sensibilité aux antibiotiques des agents uropathogènes responsables d'infections urinaires communautaires non compliquées, chez les

femmes âgées de 18 à 65 ans. La collecte des 1960 échantillons d'urine s'est déroulée entre janvier 1999 et janvier 2000 dans 240 centres de 17 pays (Europe et Canada). *E. coli* représentait ainsi 80% de la totalité des uropathogènes isolés en milieu communautaire en France (Kahlmeter, 2000).

A l'hôpital, *E. coli* est l'agent pathogène en cause dans 50 à 60% des cas d'infections urinaires. En effet, d'autres bactéries, plus rarement isolées en communautaire, peuvent être responsables d'infections urinaires comme par exemple *Klebsiella pneumoniae* ou *Pseudomonas aeruginosa* (REMIC 2007).

3.5 Diarrhées

Bien que *E. coli* soit un hôte naturel du tube digestif, certaines souches peuvent coloniser la muqueuse digestive et être responsables d'infections intestinales, en respectant ou en détruisant les entérocytes, avec parfois production de toxines. Elles sont classées en quatre catégories principales :

- *E. coli* entéro-pathogènes (E.C.E.P. = E.P.E.C.) :

Ils 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 est due à l'adhésion précoce aux entérocytes de l'intestin grêle, et à la capacité de production de lésions histopathologiques au niveau des microvillosités intestinales (Baraduc *et al.*, 2000).

- *E. coli* entéro-toxinogènes (E.C.E.T. = E.T.E.C.) :

Ils constituent la principale cause de diarrhée infantile dans les pays en voie de développement et sont fréquemment responsables de la diarrhée du voyageur ou « turista ». Le pouvoir pathogène est dû à leur capacité à coloniser les entérocytes de l'intestin grêle, et à sécréter des entérotoxines entraînant une fuite d'eau et d'électrolytes par augmentation de la production intra-entérocytaire d'AMPc et de GMPc (Baraduc *et al.*, 2000).

- *E. coli* entéro-invasifs (E.C.E.I. = E.I.E.C.) :

Les E.I.E.C. provoquent un syndrome dysentérique analogue à celui développé par les shigelles. Ils ont la capacité d'envahir et de se multiplier dans les cellules épithéliales du côlon (Baraduc *et al.*, 2000).

- *E. coli* entérohémorragiques (E.C.E.H. = E.H.E.C.) :

Ces bacilles, notamment le sérotype O157:H7, sont responsables de colites hémorragiques. La principale complication est le syndrome hémolytique et urémique. Le pouvoir pathogène des E.H.E.C. est lié à deux propriétés des bactéries : l'adhérence aux cellules intestinales et la synthèse d'exotoxines appelées « Shiga-like toxines » (SLT-I et SLT-II) ou vérotoxines (VT I et VT II) en raison de leur activité sur les cellules Vero en culture (Baraduc *et al.*, 2000).

3.6 Infections digestives et hépatobiliaires

E. coli est fréquemment isolé lors des infections digestives ou hépatobiliaires telles que les péritonites après perforation intestinale, les appendicites, les suppurations abdominales, les cholécystites aiguës ou chroniques et les ictères infectieux. Il peut être également impliqué lors de surinfections post-chirurgicales (Baraduc *et al.*, 2000).

3.7 Méningites et septicémies

E. coli est responsable d'un grand nombre de septicémies nosocomiales et communautaires, dont le point de départ est souvent digestif ou urinaire. D'après une étude réalisée par le réseau Ile-de-France en 2004, *E. coli* est responsable de 39,5% des bactériémies recensées en ville et de 19,8% des bactériémies à l'hôpital, ces chiffres étant en augmentation par rapport à 1996 (Robert, 2007).

Cette bactérie peut être également retrouvée comme agent de méningites bactériennes chez les nouveaux-nés. Les souches de *E. coli* fréquemment impliquées possèdent l'antigène capsulaire K1 (Bingen & Bonacorsi, 2005).

II. Evolution du comportement de *E. coli* à l'égard des antibiotiques

1 Les β -lactamines

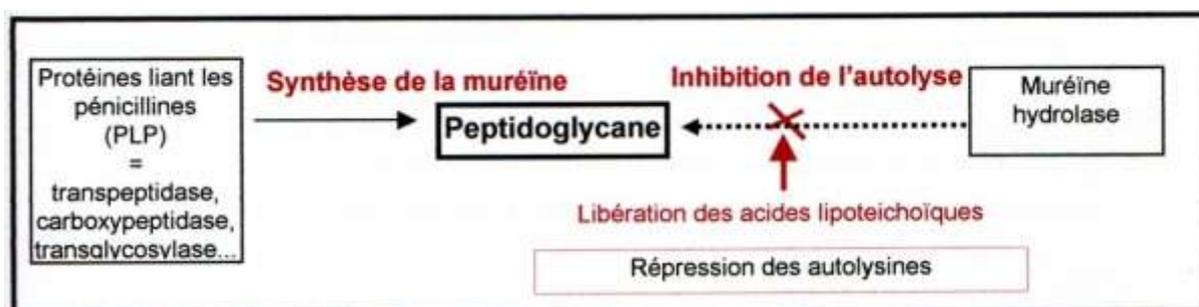
1.1 Rappel du mécanisme d'action

Les β -lactamines agissent en bloquant la synthèse du principal constituant de la paroi bactérienne : le peptidoglycane (PG). Elles agissent essentiellement sur des bactéries en phase exponentielle de croissance. Leur action s'exerce au niveau des protéines à activité enzymatique impliquées à la phase pariétale de la synthèse du PG. Leur cible est donc constituée par les protéines liant les pénicillines ou PLP. Ces PLP sont situées à la face externe de la membrane cytoplasmique. Elles possèdent des activités de transglycosylases, carboxypeptidases et transpeptidases.

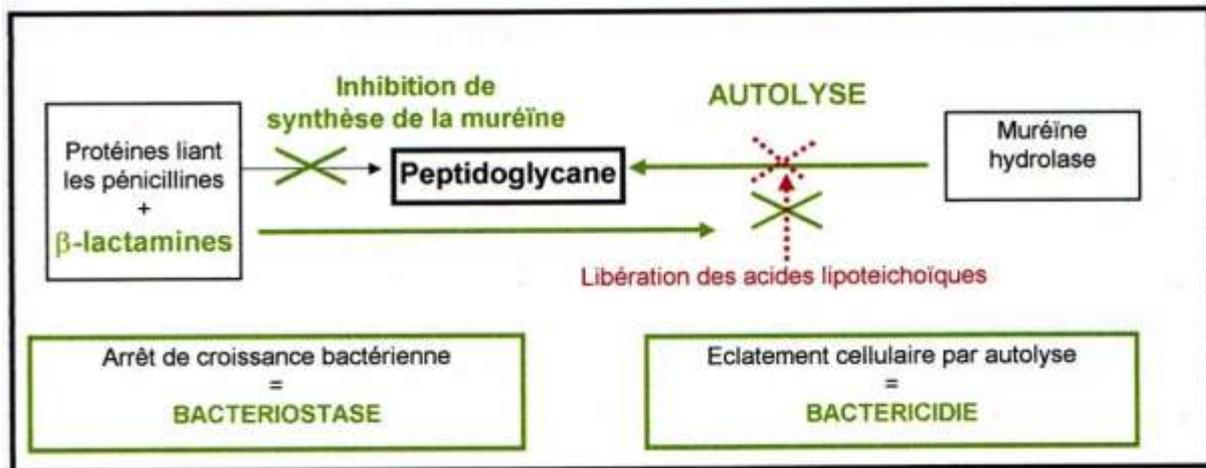
Pour atteindre leurs cibles, les β -lactamines franchissent la membrane externe des bactéries à Gram négatif grâce à des canaux transmembranaires : les porines. Elles se fixent ensuite par un mécanisme enzymatique, du fait de leur analogie structurale avec le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala du PG. Il y a alors ouverture du cycle β -lactame, par rupture de la liaison amide, et formation d'un complexe pénicilloïl-enzyme covalent. Ainsi, le métabolisme du PG est perturbé, provoquant une modification morphologique de la bactérie (formes ovoïdes, filamenteuses). L'effet bactéricide nécessite l'intervention complémentaire d'enzymes physiologiques, appelées autolysines ou muréines hydrolases, anormalement activées par les perturbations de la synthèse pariétale (Figure 10).

Figure 10 : Schéma du mécanisme d'action des β -lactamines.

En l'absence de β -lactamines :



En présence de β -lactamines :



1.2 Principaux mécanismes de résistance

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 liée au patrimoine génétique, stable, transmise à la descendance de la cellule bactérienne, et en général non transférable d'une bactérie à une autre. La résistance acquise résulte d'une modification du patrimoine génétique, et 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, dont le support est généralement un élément mobile (plasmide, transposon ou intégron).

E. coli est naturellement sensible aux antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram négatif. Il est encore fréquent d'isoler des souches dites « sauvages », sensibles à tous les antibiotiques dont l'ensemble des β -lactamines. L'actualisation régulière des statistiques de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries hospitalières permet de mettre à disposition des bactériologistes et surtout des cliniciens des données utiles pour leur pratique quotidienne en améliorant le caractère probabiliste des antibiothérapies empiriques (Nijssen *et al.*, 2004, Bhavnani *et al.*, 2006). D'après les dernières données du programme de surveillance de la résistance SENTRY, environ 50% des souches de *E. coli* sont résistantes à l'ampicilline et 20 à 25% des souches sont résistantes à l'association aux inhibiteurs de β -lactamases (amoxicilline-acide clavulanique). En revanche, moins de 5% des souches sont résistantes à la ceftazidime, soit par hyperproduction de céphalosporinase, soit par production d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE). La résistance à l'imipénème reste aujourd'hui encore rarement rapportée (Nijssen *et al.*, 2004 ; Lartigue *et al.*, 2007).

1.2.1 Résistance naturelle : production de la céphalosporinase chromosomique AmpC

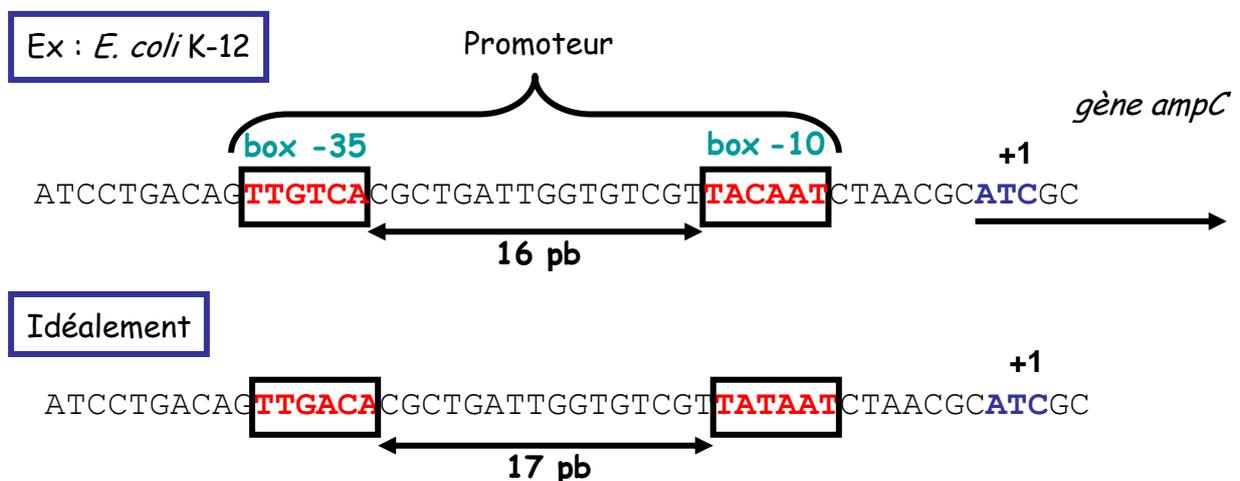
E. coli est donc une espèce généralement sensible à l'ensemble des β -lactamines. Toutefois, cette bactérie possède une céphalosporinase chromosomique AmpC, constitutive. Chez les souches dites « sauvages », elle est synthétisée à très bas niveau, sans conséquence pour la prise en charge thérapeutique.

Sa synthèse est régulée par un promoteur situé en amont du gène *ampC*. A l'inverse des bactéries du groupe III qui possèdent une céphalosporinase chromosomique inductible, *E. coli* ne possède pas de gène régulateur *ampR* (Jacobs *et al.*, 1997). Le mécanisme prépondérant à l'origine de l'hyperproduction de cette enzyme est lié à une régulation transcriptionnelle. La force du promoteur dépend de la séquence de deux hexamères, appelés box -35 et box -10 (ou Pribnow box), constituant le promoteur, site de reconnaissance de l'ARN polymérase.

Il existe des séquences dites « consensus » : TTGACA pour la box -35 et TATAAT pour la box -10. Plus la séquence réelle est proche de ces séquences dites « consensus », plus le promoteur est fort. Par ailleurs, la distance entre les deux hexamères participe également à cette régulation transcriptionnelle. Ainsi chez *E. coli*, la distance optimale est de 17 paires de bases (pb) (Beutel *et al.*, 1990).

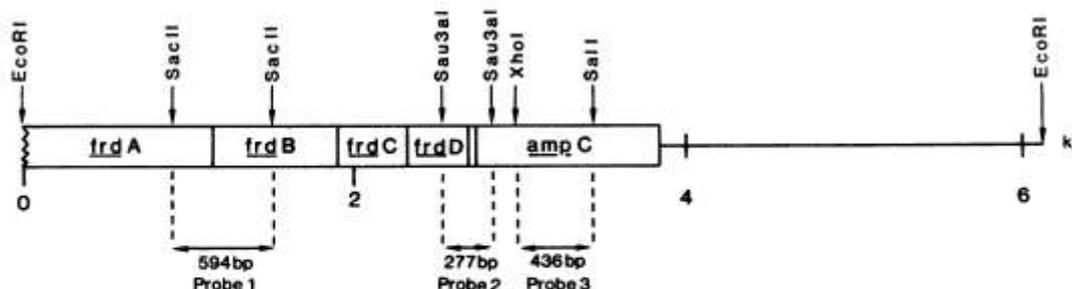
Le promoteur des souches sauvages diffère de ces séquences « consensus », par les séquences TTGTCA en position -35 et TACAAT en position -10, la distance séparant les deux hexamères étant de 16 pb seulement, comme le montre la figure 11 (Jaurin *et al.*, 1981).

Figure 11 : Comparaison des séquences du promoteur du gène *ampC* des souches sauvages (*E. coli* K₁₂) et des séquences « consensus » du promoteur du gène *ampC*.



Une autre particularité de ce promoteur est la présence d'un atténuateur, probablement responsable de la très faible expression du gène donc de la très faible quantité d'enzyme produite induisant un niveau de résistance non détectable chez les souches sauvages. Cet atténuateur du gène *ampC* sert de terminateur de transcription pour l'opéron fumarate-réductase, qui contient quatre gènes (*frdA*, *frdB*, *frdC* et *frdD*) (Figure 12).

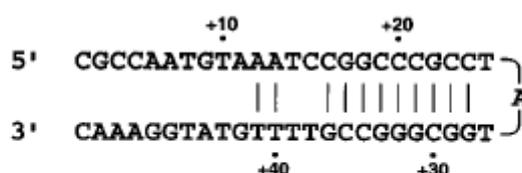
Figure 12 : Structure de l'opéron fumarate réductase chez *E. coli* (Bergström *et al.*, 1983).



Le promoteur du gène *ampC* est localisé dans le dernier gène structural de cet opéron (Cole, 1984). En fait, la séquence codant pour les 12 acides aminés de l'extrémité C-terminale du gène *frdD* et le promoteur du gène *ampC* se chevauchent (Bergström *et al.*, 1983). Cet atténuateur possède une structure dite « en épingle à cheveux », dont l'efficacité pour induire un signal de terminaison dépend de sa séquence, en nombre de paires de bases et en pourcentage de GC (Figure 13, page 25). Des mutations dans la région de l'atténuateur contribuent également à l'hyperproduction de l'enzyme AmpC, en déstabilisant la structure en épingle à cheveux, et conduisant à une transcription accrue.

Les mutations décrites dans le promoteur et/ou l'atténuateur du gène *ampC* de *E. coli* ont pu être observées, d'une part, chez des mutants résistants obtenus *in vitro* (Jaurin *et al.*, 1982) et, d'autre part, à partir de souches cliniques (Olsson *et al.*, 1982 et 1983 ; Caroff *et al.*, 1999 et 2000 ; Low *et al.*, 2001 ; Siu *et al.*, 2003, Tracz *et al.*, 2007).

Figure 13 : Séquence de l'atténuateur du gène *ampC* : représentation de la structure dite « en épingle à cheveux » (Siu *et al.*, 2003).



Ainsi, par sélection sur des milieux contenant de l'ampicilline, il a été possible d'isoler des mutants hyperproducteurs de céphalosporinase AmpC. Trois types différents ont pu être obtenus : des mutants en position -32 (box -35), des mutants en position -11 (Pribnow box) et des mutants ampP15G16, présentant une insertion d'une paire de base, augmentant la distance intergénique entre les séquences conservées (Jaurin *et al.*, 1982).

Au début des années 1980, Olsson *et al.* ont séquencé la région promotrice de six β -lactamases AmpC provenant de souches cliniques présentant des concentrations minimales inhibitrices à l'égard de l'ampicilline comprises entre 38 et 190 mg/L. L'analyse de ces séquences a permis de mettre en évidence différentes mutations situées en positions -88, -82, -42, -32, -18, -1 et +58. Plus récemment, Caroff *et al.* ont retrouvé, chez des souches cliniques, les mêmes mutations, mais également des mutations dans l'atténuateur, en positions +24 et +31.

La mutation en position -42 constitue, semble-t-il, l'évènement génétique le plus fréquent, créant une nouvelle box -35 par décalage du cadre de lecture, et une homologie parfaite avec la séquence consensus.

Ainsi, la présence de certaines mutations entraîne une hyperexpression de la céphalosporinase AmpC, induisant un haut niveau de résistance vis-à-vis de nombreuses β -lactamines, incluant les céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G), notamment la ceftazidime.

Chez *E. coli*, la résistance aux oxyiminocéphalosporines par hyperproduction de céphalosporinase a été étudiée par différentes équipes, soulignant l'importance de diverses mutations dans les régions promotrices (Caroff *et al.*, 1999 et 2000 ; Corvec *et al.*, 2002 ; Tracz *et al.*, 2007). Alors que ces mutations paraissaient mutuellement exclusives, l'évolution vers la résistance s'est poursuivie, avec la description de l'accumulation de deux des principales mutations en positions -32 et -11 (Tracz *et al.*, 2007). Plus récemment, l'élargissement du spectre d'hydrolyse de cette β -lactamase AmpC constitutive a été démontré, à l'égard du céfépime en particulier, avec une accumulation d'évènements génétiques entraînant des modifications qualitatives (mutations et insertions dans l'oméga loop et l'H10 hélix) et quantitatives (mutations dans le promoteur et l'atténuateur transcriptionnel) de la céphalosporinase de *E. coli*. Ces enzymes ont été caractérisées et dénommées ESAC, pour Extended Spectrum AmpC (Mammeri *et al.*, 2006 et 2008).

1.2.2 Résistances acquises aux β -lactamines

Ces mécanismes de résistance acquise aux β -lactamines peuvent être de trois ordres :

- Inactivation de l'antibiotique par production de β -lactamases additionnelles.
- Diminution de la quantité d'antibiotique atteignant la cible par diminution de la perméabilité membranaire ou par expression de systèmes d'efflux ;
- Modification de la cible des β -lactamines, à savoir les Protéines Liant les Pénicillines (PLP) ;

1.2.2.1 Par production de β -lactamases additionnelles

La production d'enzymes inactivatrices constitue le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines chez les bactéries à Gram négatif. Ces β -lactamases entraînent l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame. Elles restent localisées dans l'espace périplasmique situé sous la membrane externe (Jehl *et al.*, 2003).

Actuellement, plusieurs centaines de β -lactamases ont été identifiées chez différentes espèces bactériennes. Cette diversité a entraîné de nombreuses tentatives de classification.

Ces enzymes sont classées :

- soit en fonction de leur spectre d'activité enzymatique (classification de K. Bush) (Bush *et al.*, 1995),
- soit en fonction de la séquence en acides aminés du site actif de l'enzyme (classification d'Ambler) (Ambler, 1980).

La classification structurale de Ambler distingue quatre classes de β -lactamases : A, B, C et D. Les enzymes appartenant aux classes A, C et D sont des sérine- β -lactamases alors que la classe B rassemble les métallo-enzymes Zinc-dépendantes, dont le site actif est une cystéine. Ces β -lactamases additionnelles sont codées par des gènes plasmidiques au sein de structures de type intégron ou transposon. Leur profil d'hydrolyse conditionne en grande partie le profil de sensibilité aux β -lactamines des bactéries qui les produisent (Tableau II, page 28).

La première β -lactamase chez les bactéries à Gram négatif codée par un plasmide (TEM-1) a été découverte et décrite dès les années 60. Depuis, à chaque commercialisation d'une nouvelle β -lactamine, réputée stable à l'hydrolyse par les β -lactamases, de nouvelles résistances ont été décrites. Ainsi, depuis 30 ans, les β -lactamases de classe A, et notamment TEM-1 et SHV-1, ont évolué par mutations ponctuelles dans deux directions différentes :

soit en élargissant leur spectre et en devenant capables de dégrader des molécules non hydrolysées par TEM-1, telles que les C3G : il s'agit des BLSE, dérivant pour la plupart de TEM-1, TEM-2 ou SHV-1 (Bradford, 2001) ;

soit en devenant résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases tels que l'acide clavulanique : ce sont les β -lactamases TRI (TEM Résistantes aux Inhibiteurs) (Bradford, 2001).

Alors que ces mutations étaient réputées pour être mutuellement exclusives, de nouveaux variants de TEM-1 ont été décrits avec les deux types de mutations et nommés CMT pour Complex Mutant TEM (Robin *et al.*, 2007).

Tableau II : Exemples de β -lactamases produites par les bactéries à Gram négatif (Jacoby *et al.*, 2005).

Bêta-lactamase	Exemples	Substrats	Inhibition par l'acide clavulanique	Classe moléculaire
A large spectre	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Pénicilline G, aminopénicillines, carboxypénicillines, pipéracilline, céphalosporines à spectre étroit	+++	A
	OXA	Substrats du groupe des β -lactamases à spectre large + cloxacilline, méthicilline et oxacilline	+	D
A spectre étendu (BLSE)	TEM, SHV	Substrats du groupe des β -lactamases à spectre large + oxyiminocéphalosporines et monobactames (aztréonam)	++++	A
	CTX-M	Substrats du groupe des BLSE +, pour certaines d'entre elles, le céfépime	++++	A
	OXA	Idem famille des CTX-M	+	D
	Autres (PER-1, PER-2, BES-1, GES/IBC, SFO-1, TLA-1, VEB-1, VEB-2)	Idem famille des TEM et des SHV	++++	A
AmpC	ACC-1, ACT-1, CFE-1, CMY, DHA-2, FOX, LAT, MIR-1, MOX-1, MOX-2	Substrats du groupe des BLSE + céphamycines	0	C
Carbapénémases	IMP, VIM, GIM-1, SPM-1	Substrats du groupe des BLSE + céphamycines	0	B

(métallo- β -enzymes) KPC-1, KPC-2, KPC-3	et carbapénèmes Substrats du groupe des BLSE + céphamycines et carbapénèmes	+++	A
OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-48	Substrats du groupe des BLSE + céphamycines et carbapénèmes	+	D

+, +++, et ++++ renseignent de la relative sensibilité à l'inhibition

Jusque dans les années 90, les études européennes de surveillance des BLSE recensaient presque exclusivement des variants de TEM et SHV, très fréquemment retrouvés chez les souches de *Klebsiella* spp., le plus souvent à l'hôpital. La situation épidémiologique mondiale a changé de manière spectaculaire au début des années 2000 avec l'émergence des CTX-M. En effet, ces enzymes sont devenues les BLSE prédominantes dans beaucoup de pays dont la France, avec comme hôte préférentiel le colibacille, notamment en ville. Aujourd'hui, il existe plus de 70 CTX-M différentes, elles sont divisées en cinq groupes en fonction de leur homologie de séquence nucléotidique. Leur support génétique est le plus souvent un grand plasmide conjugatif associant différents gènes de résistance, soulignant les possibles co-résistances, co-sélections, et le risque de diffusion de ces gènes de résistance (Bradford, 2001; Livermore *et al.*, 2007).

1.2.2.2 Par des mécanismes non enzymatiques

La résistance aux β -lactamines peut relever d'un mécanisme différent de l'inactivation enzymatique : soit par diminution de la pénétration transmembranaire plus ou moins associée à un phénomène d'efflux actif, soit par modification de la cible des β -lactamines (les PLP). Chez *E. coli*, cette résistance non enzymatique concerne un nombre réduit de souches.

Résistance par modification de porines

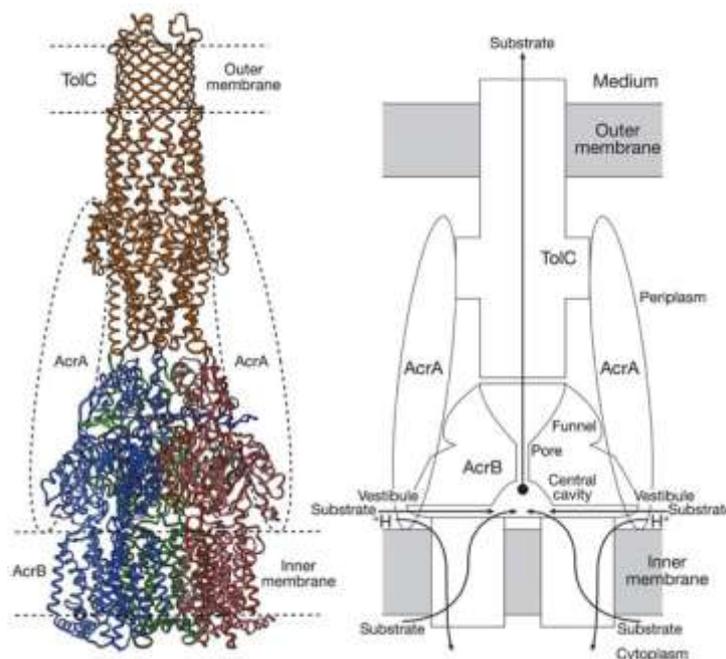
Elle implique essentiellement la diminution ou la disparition de protéines de membrane externe ou porines (OmpF ou OmpC), dont le rôle physiologique est de permettre la diffusion de substrats hydrophiles tels que certains antibiotiques (Mainardi et Gutmann, 1998). L'association d'une perte de porine à la production de une ou plusieurs β -lactamases entraîne une accumulation de mécanismes de résistance avec la possibilité d'un haut niveau de résistance aux β -lactamines, y compris aux carbapénèmes (Poirel *et al.*, 2004).

Résistance par un système d'efflux

Les systèmes d'efflux associent trois types de protéines assurant l'évacuation de l'antibiotique au travers des membranes cytoplasmique et externe, au fur et à mesure de sa pénétration dans la bactérie. Chez *E. coli*, les protéines TolC, AcrA et AcrB constituent le système d'efflux majeur. TolC est un composant de la membrane externe, AcrA est une protéine de la membrane cytoplasmique avec un domaine périplasmique important et AcrB est la protéine « pompe » localisée dans la membrane cytoplasmique (Figure 14, page 30). Une mutation dans la séquence de ces gènes ou dans le gène régulateur *acrR* peut avoir pour effet une hyperactivité de cette pompe et donc une résistance accrue vis-à-vis des antibiotiques concernés (Zgurskaya *et al.*, 2000).

Figure 14 : Structure de AcrAB-TolC

(<http://www.nature.com/nature/journal/v419/n6907/images/nature01050-f5.2.jpg>)



Les autres antibiotiques

Dans le cadre des infections urinaires à *E. coli*, les principaux antibiotiques utilisés, autres que les β -lactamines, sont les fluoroquinolones et le cotrimoxazole.

2.1 Les quinolones

Les quinolones sont des inhibiteurs de deux enzymes, l'ADN-gyrase et la topo-isomérase IV. Ces protéines enzymatiques tétramériques, constituées de deux sous-unités α et deux sous-unités β , jouent un rôle d'une part, dans le surenroulement de l'ADN et, d'autre part, dans les phénomènes de décaténation et de ségrégation de l'ADN lors de la division bactérienne.

Le principal mécanisme de résistance est l'altération des cibles ADN gyrase et topo-isomérase IV. Le niveau de résistance aux différentes quinolones variera selon les acides aminés modifiés et la ou les sous-unités concernées (Jehl *et al.*, 2003).

D'autres mécanismes peuvent être mis en jeu : une diminution de la perméabilité membranaire, un efflux actif et la protection de la cible par acquisition de déterminants plasmidiques, les gènes *qnr*. Ce dernier repose sur la synthèse de protéines (QnrA, QnrB, QnrS) capables de se fixer sur les sous-unités GyrA et GyrB de l'ADN-gyrase, empêchant l'action de blocage des quinolones (Mammeri *et al.*, 2005).

2.2 Le cotrimoxazole

Le cotrimoxazole est constitué par l'association du triméthoprim et du sulfaméthoxazole, deux antibiotiques agissant sur la voie des folates, aboutissant à la synthèse des acides nucléiques. Le triméthoprim est un inhibiteur de la DiHydroFolate Réductase (D.H.F.R.) et le sulfaméthoxazole est un analogue structural de l'Acide ParaAminoBenzoïque, provoquant une inhibition compétitive de la DiHydroPtéroate Synthétase (D.H.P.S.).

La résistance peut s'observer à deux niveaux : résistance par modification de cible (mutation ou hyperproduction de D.H.F.R. et/ou de D.H.P.S., D.H.F.R. additionnelles) et résistance par imperméabilité avec des mutations au niveau des porines (Jehl *et al.*, 2003 ; Huovinen *et al.*, 1995).

III. Analyse du comportement des souches de *E. coli* vis-à-vis des β -lactamines en milieu hospitalier et communautaire

1. Evolution des prescriptions de β -lactamines

Soixante ans après l'introduction de la pénicilline en thérapeutique infectieuse, les antibiotiques représentent une part non négligeable de la consommation pharmaceutique en France et dans le monde. En 2001, la France figurait parmi les pays les plus prescripteurs et consommateurs d'antibiotiques, avec environ 100 millions de prescriptions par an, dont 80% en ville (premier rang européen) et 20% à l'hôpital. En ville, 30% des prescriptions étaient inappropriées, dans la mesure où elles étaient destinées à traiter soit des infections ORL et respiratoires, essentiellement d'étiologie virale, soit à prévenir d'éventuelles surinfections bactériennes (Direction Générale de la Santé, 2001).

1.1 A l'hôpital

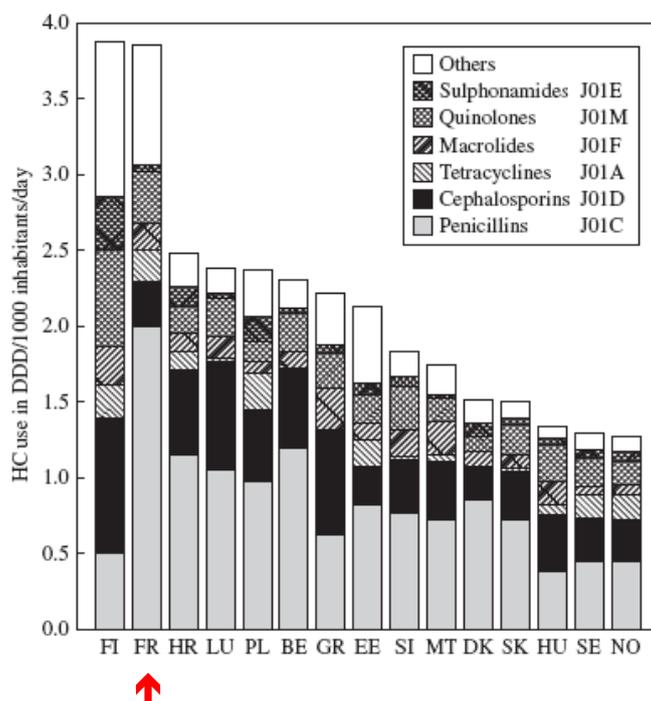
L'hôpital est souvent considéré comme l'épicentre de la résistance aux antibiotiques. Les patients hospitalisés, de plus en plus âgés, souffrent souvent d'une altération de l'état général, d'une déficience du système immunitaire, exigeant parfois le recours à une thérapeutique antibiotique intense et prolongée. Une antibioprofylaxie est également souvent instaurée lors d'interventions diagnostiques ou thérapeutiques invasives. Ces différents éléments, ainsi que l'emploi fréquent de dispositifs médicaux invasifs (cathéter, sonde, etc...), contribuent à un plus grand risque de colonisation et de transmission croisée avec le développement potentiel d'infections liées aux soins. Par conséquent, la pression de sélection des antibiotiques chez les patients hospitalisés est importante. La prévalence de la résistance aux antibiotiques, chez ces patients, est plus forte, avec parfois des échecs des thérapeutiques empiriques.

Le Plan national pour préserver l'efficacité des antibiotiques de novembre 2001, mis en place par la Direction Générale de la Santé suite à la consommation excessive et inappropriée des antibiotiques, prévoyait que d'ici fin 2005, chaque établissement de santé devait se doter d'une organisation lui permettant d'assurer un bon usage des antibiotiques (Direction Générale de la Santé, 2001). A l'hôpital, cet usage raisonné est difficile à faire respecter en raison de situations cliniques complexes et de la multiplicité des prescripteurs concernés. En effet, il a été constaté que 40% des patients hospitalisés recevaient des antibiotiques soit pour un traitement curatif, soit dans le cadre d'une antibioprofylaxie. En chirurgie, 30 à 50% des

prescriptions étaient prophylactiques, mais environ 90% d'entre elles étaient inappropriées. De plus, de 20 à 50% des prescriptions d'antibiotiques ne correspondaient pas aux recommandations (Direction Générale de la Santé, 2001). Des mesures prévues par ce Plan ont été mises en oeuvre comme l'élaboration de références nationales, la désignation d'un médecin référent en antibiothérapie, et l'implication du Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN) et du Comité du médicament et des dispositifs médicaux stériles (COMEDIMS).

D'après une étude rétrospective de l'ESAC (European Surveillance of Antibiotic Consumption) sur la consommation hospitalière des antibiotiques dans 15 pays européens de 1997 à 2002, la consommation des hôpitaux français était, en 2002, de 3,9 DDD/1000 patients/jour, alors que la médiane en Europe se situait à 2,1 DDD/1000 patients/jour (Figure 15, page 33). L'unité de mesure DDD signifie « defined daily dose » ou « dose définie journalière » et correspond à la posologie journalière de référence d'un médicament dans son indication principale pour un adulte de 70 kg.

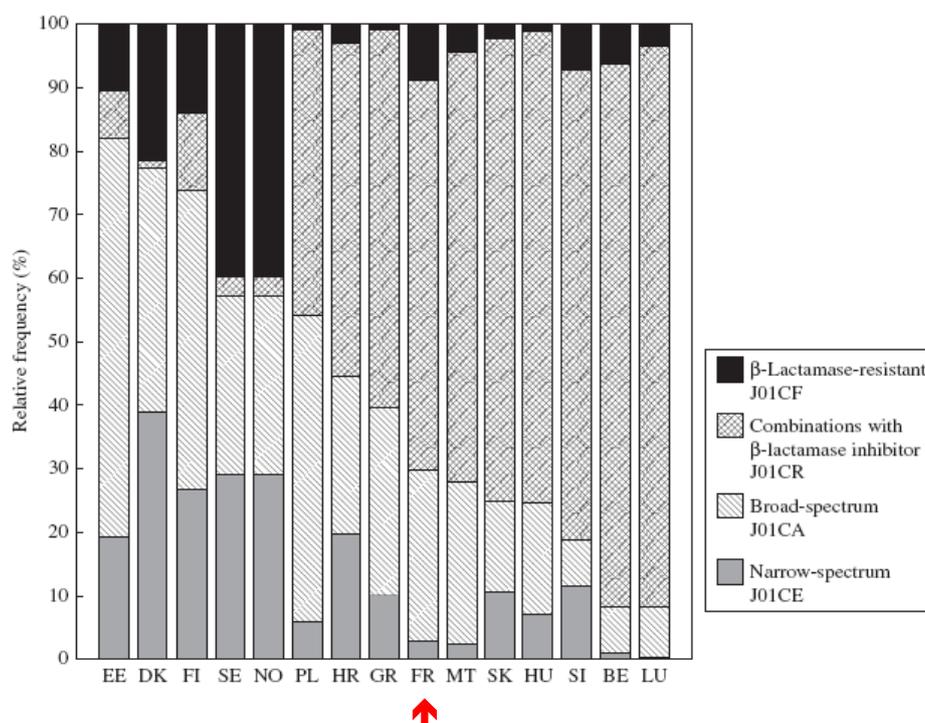
Figure 15 : Consommation et distribution des principales classes d'antibiotiques à l'hôpital en Europe en 2002. N.B : Les données de la Finlande incluent la consommation des maisons de retraite et des centres de soins (Vander Stichele *et al.*, 2006).



La France était le plus gros consommateur hospitalier d'antibiotiques en Europe, les données de la Finlande incluant la consommation des maisons de retraite et des centres de soins. Par ailleurs, la proportion de la consommation hospitalière par rapport à la consommation totale d'antibiotiques (ambulatoire et hospitalière) était de 10,7% en France. Il est intéressant de noter que les pays avec une forte consommation d'antibiotiques dans les hôpitaux étaient ceux qui avaient également une consommation d'antibiotiques importante en ambulatoire.

En 2002 en France, l'association amoxicilline - acide clavulanique était la pénicilline la plus prescrite et consommée à l'hôpital (environ 55%). En Europe, la consommation de cet antibiotique variait de 85% en Belgique et au Luxembourg à moins de 12% dans cinq pays du nord de l'Europe (Finlande, Estonie, Norvège, Suède et Danemark), comme le montre la figure 16, page 34.

Figure 16 : Fréquence relative de consommation au sein des pénicillines à l'hôpital en Europe en 2002 (Vander Stichele *et al.*, 2006).



En France, dans la famille des céphalosporines, les C3G demeuraient les plus prescrites (environ 45%), suivies des C1G (environ 30%), des C2G (environ 20%) et des C4G (environ

5%). A l'inverse, le Danemark utilisait à l'hôpital presque exclusivement les C2G (87%), alors que la Belgique consommait près de 20% de C4G.

Cette enquête a permis de mettre en évidence une grande variation des prescriptions hospitalières d'antibiotiques chez 15 pays européens. La (sur)consommation hospitalière semble relever, pour certains d'entre eux, d'habitudes de prescription et d'aspects démographiques (densité de population) et épidémiologiques locaux. La consommation hospitalière totale ainsi que la proportion relative des différentes classes d'antibiotiques étudiées sont restées relativement stables entre 1997 et 2002. Deux constatations sont à noter : d'une part, l'augmentation de la consommation de l'association amoxicilline - acide clavulanique, probablement due à un choix fréquent en tant que traitement de première intention ; et d'autre part, l'augmentation de la consommation de certains antibiotiques de prescription souvent hospitalière (certaines C3G, les C4G, et les carbapénèmes), liée en partie à l'évolution des résistances aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif.

Plus récemment, en juin 2006, dans le cadre du programme national de lutte contre les infections nosocomiales, le Ministère de la Santé a demandé à l'Institut de Veille Sanitaire de conduire une enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales (IN). Le but de cette enquête, coordonnée par le Réseau national d'alerte d'investigations et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN), était de décrire de façon détaillée, un jour donné, les IN survenant dans l'ensemble des services et des établissements de santé (ES) français. Deux mille trois cent trente sept ES représentant 95% des lits d'hospitalisation en France ont participé, incluant 358 467 patients. Le jour de l'enquête, la prévalence des patients infectés et des patients traités par antibiotiques était respectivement de 4,97% et 15,52%. Les infections urinaires (30%) étaient les IN les plus fréquentes dans toutes les disciplines, à l'exception de la réanimation et de la chirurgie, où les pneumopathies et les infections du site opératoire étaient respectivement les plus fréquentes. *E. coli* était le principal micro-organisme responsable d'IN (25%), devant *Staphylococcus aureus* (19%) et *Pseudomonas aeruginosa* (10%). Parmi les entérobactéries, 14,9% étaient de sensibilité diminuée ou résistantes au céfotaxime ou à la ceftriaxone (C3G). Les pénicillines (32%), les fluoroquinolones (18,8%) et les C3G (11,5%) étaient les familles les plus fréquemment prescrites, représentant près des 2/3 de l'ensemble des antibiotiques prescrits. L'association amoxicilline - acide clavulanique était l'antibiotique le plus prescrit (20,3%), suivi par l'ofloxacine (8,2%), l'amoxicilline (6,8%) et la ceftriaxone (6,6%) (Coignard *et al.*, 2007).

1.2 En ville

L'étude rétrospective menée par l'ESAC s'est également intéressée à la consommation ambulatoire en Europe de 1997 à 2003. Les données récoltées étaient exprimées en DDD/1000 habitants/jour. Elles correspondaient à des données de remboursement de prescriptions pour 12 pays et à des données de ventes pour 13 pays. La consommation variait d'un facteur 3 entre le pays le plus consommateur d'antibiotiques (Grèce) et le pays en consommant le moins (Pays-Bas) (Figure 17, page 36).

Globalement, le volume de consommation d'antibiotiques en ambulatoire a augmenté dans la majorité des pays européens entre 1997 et 2003. Certains pays comme la Belgique ou la France ont réussi à inverser la tendance depuis 1999-2000 avec une diminution de la consommation. Ces changements sont probablement liés aux campagnes nationales pour « le bon usage des antibiotiques » lancées respectivement en 2000 et en 2002, ces deux pays étant les seuls à avoir engagé de telles démarches (Ferech *et al.*, 2006 ; Goossens *et al.*, 2006). La France, premier consommateur européen d'antibiotiques entre 1997 et 2002, a été remplacée par la Grèce en 2003 (Tableau III, page 36). L'augmentation continue des ventes d'antibiotiques en Grèce pourrait être en partie expliquée par l'émergence d'exportation de médicaments vers d'autres pays membres de l'Europe pratiquant des prix plus élevés.

Figure 17 : Consommation d'antibiotiques en ambulatoire dans 25 pays d'Europe en 2003 (Ferech *et al.*, 2006).

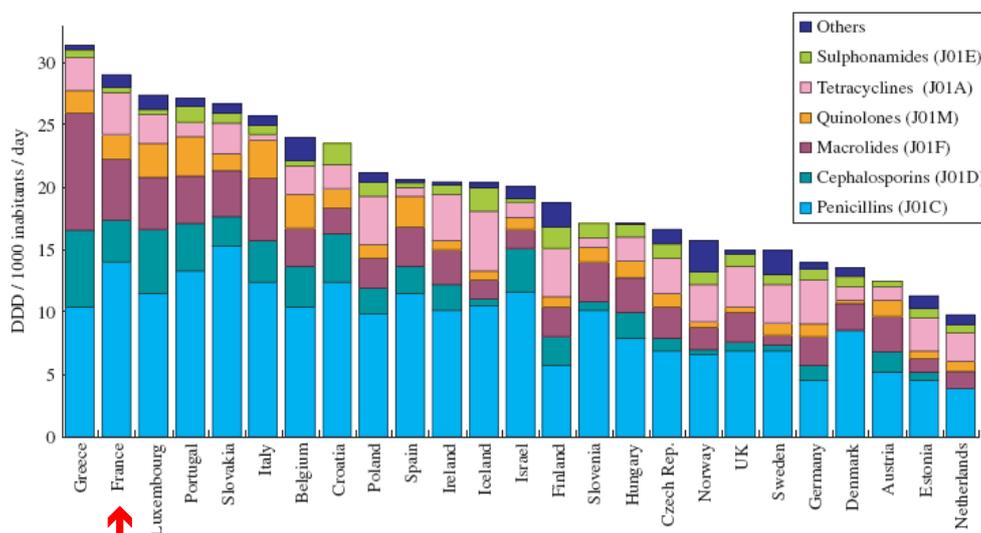


Tableau III : Evolution de la consommation totale d'antibiotiques en ambulatoire dans 25 pays européens entre 1997 et 2003 (DDD/1000 habitants/jour).

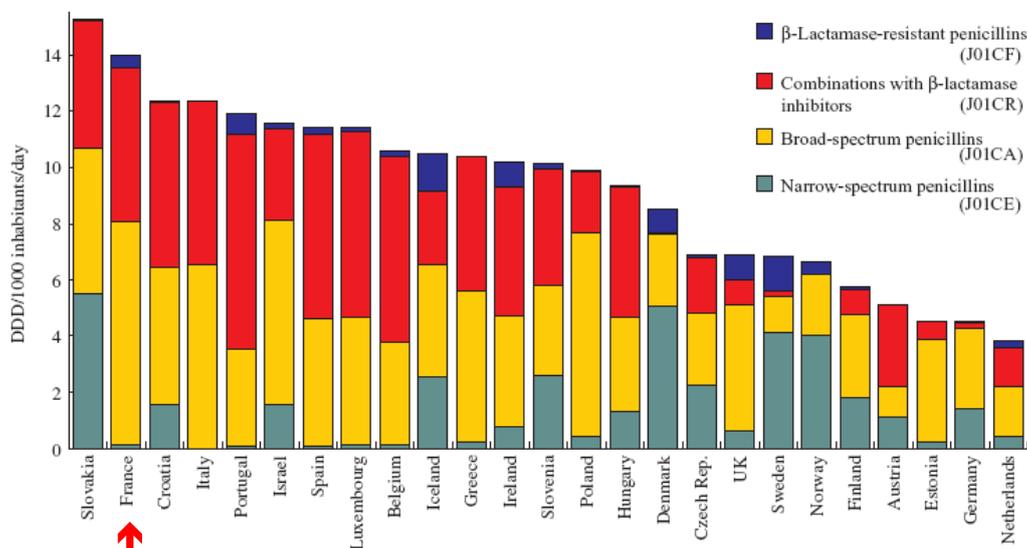
	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Autriche		12,51	13,19	12,34	11,86	11,75	12,49
Belgique	25,44	26,36	26,21	25,26	23,73	23,82	24,22

Croatie				18,42	17,65	21,61	23,5
République tchèque		18,27	18,62	18,56	18,49	17,09	16,65
Danemark	12,22	12,74	12,13	12,19	12,82	13,32	13,58
Estonie						11,67	11,34
Finlande	19,38	18,44	18,41	18,97	19,7	17,83	18,73
France	33,02	33,56	34,33	33,24	32,71	32,05	28,97
Allemagne	14,57	14,63	14,94	14,89	13,82	13,76	13,9
Grèce	25,06	24,86	28,5	29,13	29,43	30,53	31,4
Hongrie		18,62	23,92	18,91	19,11	17,05	19,63
Islande	22,12	22,98	21,58	20,47	20,28	20,98	20,36
Irlande	17,34	17,21	19,03	18,52	19,87	19,82	20,48
Israël						19,55	20,06
Italie			24,5	24,03	25,16	24,38	25,63
Luxembourg	25,78	25,48	26,72	25,68	26,08	26,42	27,34
Pays Bas	10,21	10,07	10,09	9,86	9,93	9,83	9,78
Norvège		15,45			15,67	14,78	15,72
Pologne	16,56	20,7	22,18	22,64	24,77	21,14	
Portugal	23,22	23,2	24,98	24,93	24,25	26,14	27,1
Slovaquie				25,59	27,99	25,56	26,63
Slovénie	17,51	19,3	19,76	18,01	17,36	16,4	17,1
Espagne	21,39	20,9	20,45	19,43	18,7	19,35	20,58
Suède	14,64	15,53	15,82	15,5	15,81	15,42	14,88
Gde Bretagne	16,87	15,76	14,46	13,98	14,48	14,49	14,9

Rq : Pour l'Islande, les données utilisées sont les données de la consommation totale (incluant la consommation hospitalière)

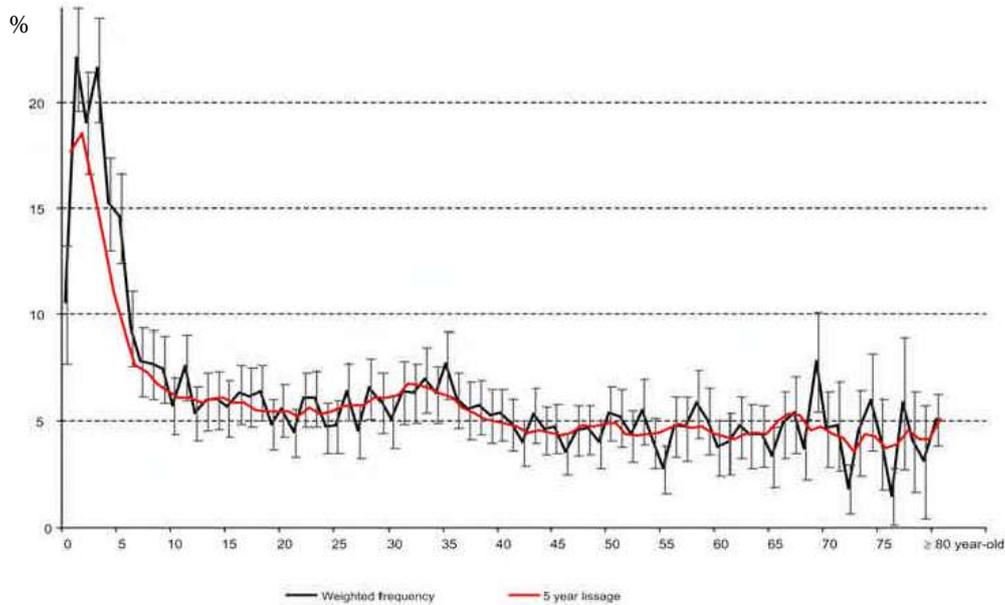
La consommation des pénicillines en France a augmenté entre 1997 et 1999 (17,12 à 17,61 DDD/1000 habitants/jour), et ensuite diminué à partir de 2000 (14 DDD/1000 habitants/jour en 2003). Les pénicillines à large spectre étaient les plus prescrites (Figure 18).

Figure 18 : Consommation totale de pénicillines en ambulatoire dans 25 pays d'Europe en 2003. N.B. : Les données de l'Islande incluent la consommation ambulatoire et hospitalière (Ferech *et al.*, 2006).



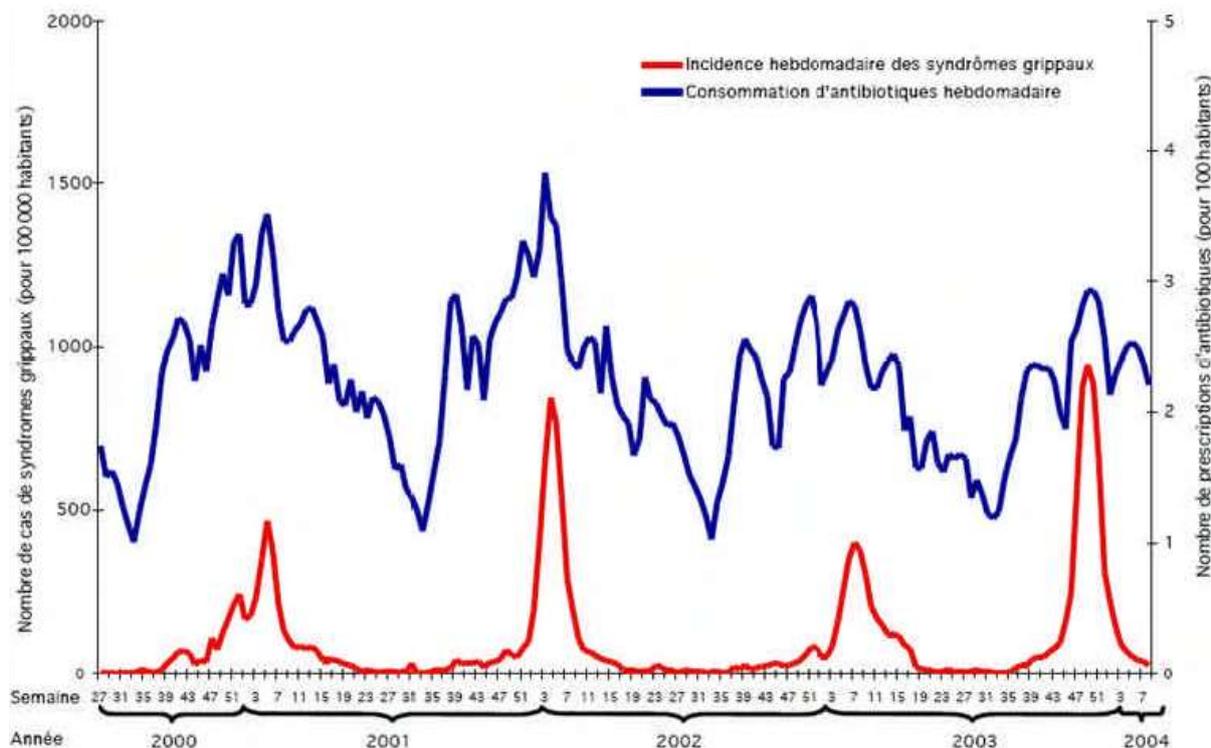
En France, une étude menée de 1992 à 2000 a montré que les enfants d'âge inférieur à 7 ans étaient en moyenne trois fois plus exposés aux antibiotiques que les sujets plus âgés, comme l'indique la figure 19 (Sommet *et al.*, 2004).

Figure 19 : Fréquence de la prescription d'antibiotiques en fonction de l'âge (pour 100 personnes-mois) (Sommet *et al.*, 2004).



Deux types de populations étaient définies : les individus âgés de moins de 15 ans et les personnes à partir de 15 ans. Dans ces deux populations, l'indication majeure de prescription d'antibiotiques était l'infection respiratoire d'étiologie présumée virale (quasiment 50% des prescriptions d'antibiotiques chez les moins de 15 ans, dont 40% de β -lactamines). Le terme « infection respiratoire d'étiologie présumée virale » comprenait les rhino-pharyngites, les trachéites aiguës, les bronchites aiguës et les syndromes grippaux. L'angine était la seconde pathologie où des antibiotiques étaient le plus fréquemment prescrits, alors que près de 80% des cas étaient d'origine virale. D'après une étude menée par l'I.N.S.E.R.M. et l'Institut Pasteur sur l'évolution de la consommation des antibiotiques en ville (Pradier *et al.*, 2004), un parallélisme net entre l'incidence des syndromes grippaux et la consommation d'antibiotiques était constaté, comme le montre la figure 20.

Figure 20 : Consommation d'antibiotiques et incidence des syndromes grippaux (Pradier *et al.*, 2004).



Cette étude a confirmé qu'en ambulatoire, une proportion assez importante d'antibiotiques est prescrite dans des indications non justifiées pour lesquelles ils ne sont pas bénéfiques ; ils participent alors activement à la pression de sélection et à l'émergence éventuelle de souches résistantes.

Une fois les données corrigées des fluctuations épidémiques des syndromes grippaux, il est intéressant de noter que le nombre global de prescriptions pendant les périodes de référence étudiées (de septembre à février) a diminué entre 2001 et 2004. L'analyse de la consommation d'antibiotiques en fonction de l'âge sur cette même période a révélé une baisse de 23,1% chez les moins de 15 ans et de 20,6% chez les 0-5 ans (Figures 21 et 22).

Figure 21 : Nombre de prescriptions en millions pour la période septembre-février des hivers 2001-2002 à 2003-2004 (données corrigées des fluctuations épidémiques) (Pradier *et al.*, 2004).

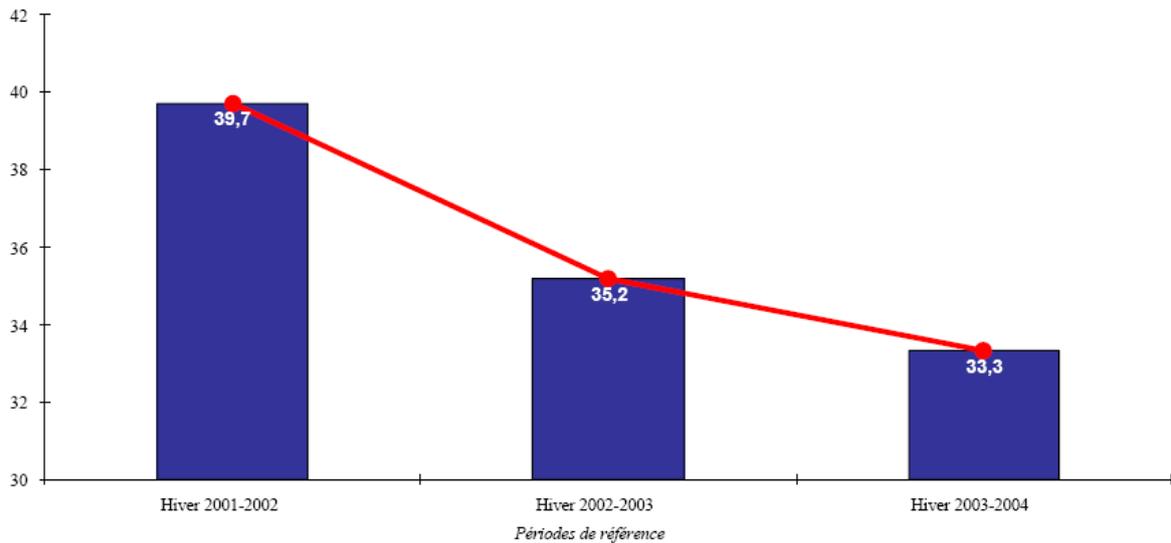
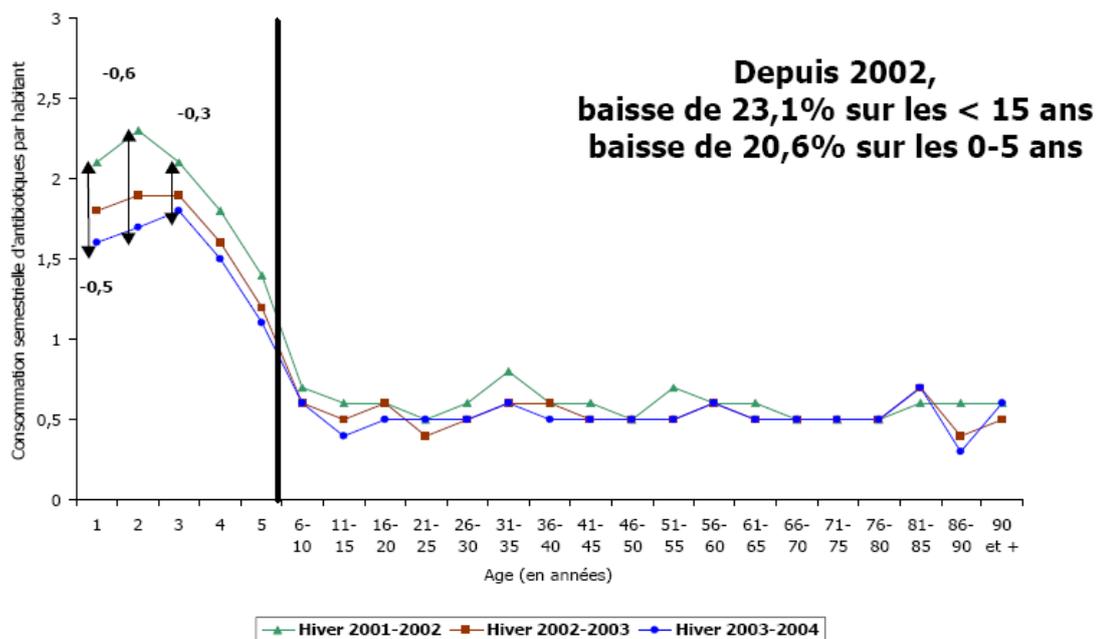


Figure 22 : Consommation des antibiotiques en fonction de l'âge de l'hiver 2001-2002 à l'hiver 2003-2004 (données corrigées des fluctuations épidémiques) (Pradier *et al.*, 2004).

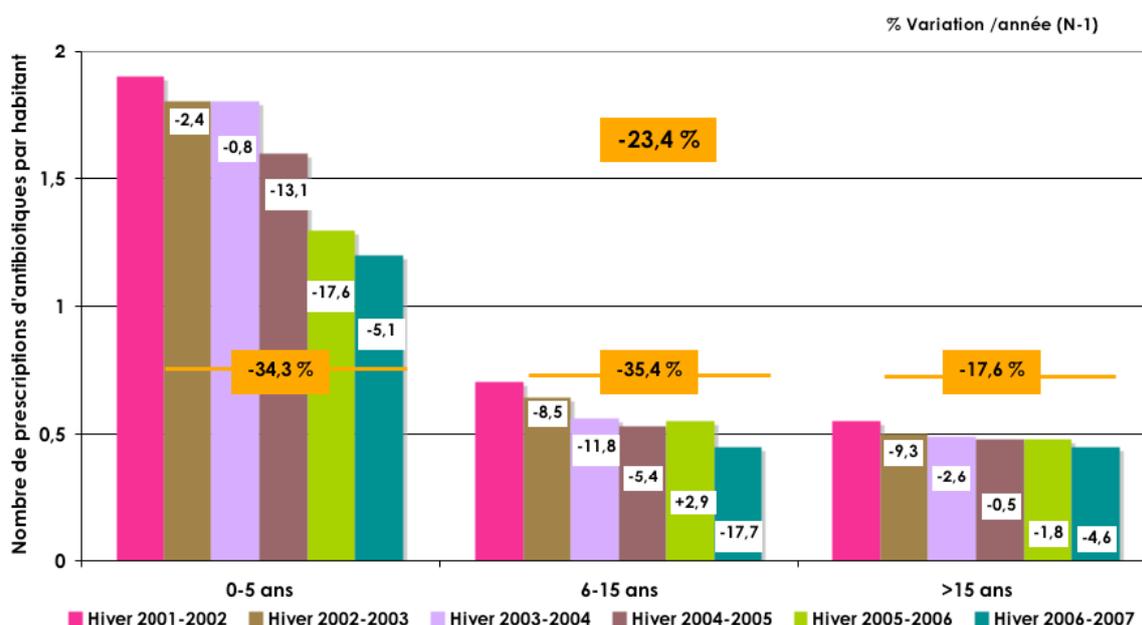


L'une des principales raisons de cette diminution de prescription/consommation a été le lancement dès 2002 de la campagne nationale « Les antibiotiques, c'est pas automatique » par la Caisse Nationale d'Assurance Maladie (CNAM), suite à la parution du Plan national pour préserver l'efficacité des antibiotiques en novembre 2001, avec pour objectifs majeurs d'une part, la réduction de la consommation d'antibiotiques chez les enfants âgés de 0 à 6 ans et, d'autre part, la diminution des prescriptions d'antibiotiques lors d'infections du tractus respiratoire, en majorité d'origine virale (Direction Générale de la Santé, 2001). En ville, cette campagne s'est traduite par la diffusion de messages publicitaires et des interventions chez les

médecins généralistes, avec notamment la promotion du test de diagnostic rapide (TDR) dans le cas d'angines à *Streptococcus pyogenes*.

Lors du communiqué de presse de janvier 2008, la CNAM a annoncé les résultats de ces cinq années de campagne. Une baisse de la consommation d'antibiotiques de 23,4 % a été constatée depuis le lancement du programme. Ce recul s'est même ancré en profondeur avec une diminution de 6,3 % au cours de l'hiver 2006-2007 contre 4,6 % l'hiver précédent. Au total, environ 850 millions d'euros de dépenses ont été évitées depuis 2002 (Caisse Nationale d'Assurance Maladie, 2008). En cinq ans de programme, la baisse de la consommation a été deux fois plus forte chez les enfants (moins de 15 ans) que chez les adultes. Chez les 0-5 ans, le recul de la consommation (-34,3 %) s'est maintenu à un rythme élevé depuis le début du programme. En 2007, les enfants de 0 à 2 ans prenaient près d'un traitement antibiotique de moins par hiver qu'en 2002 (Figure 23).

Figure 23 : Evolution du nombre de prescriptions d'antibiotiques par classe d'âge et par habitant (Guillemot *et al.*, 2008).

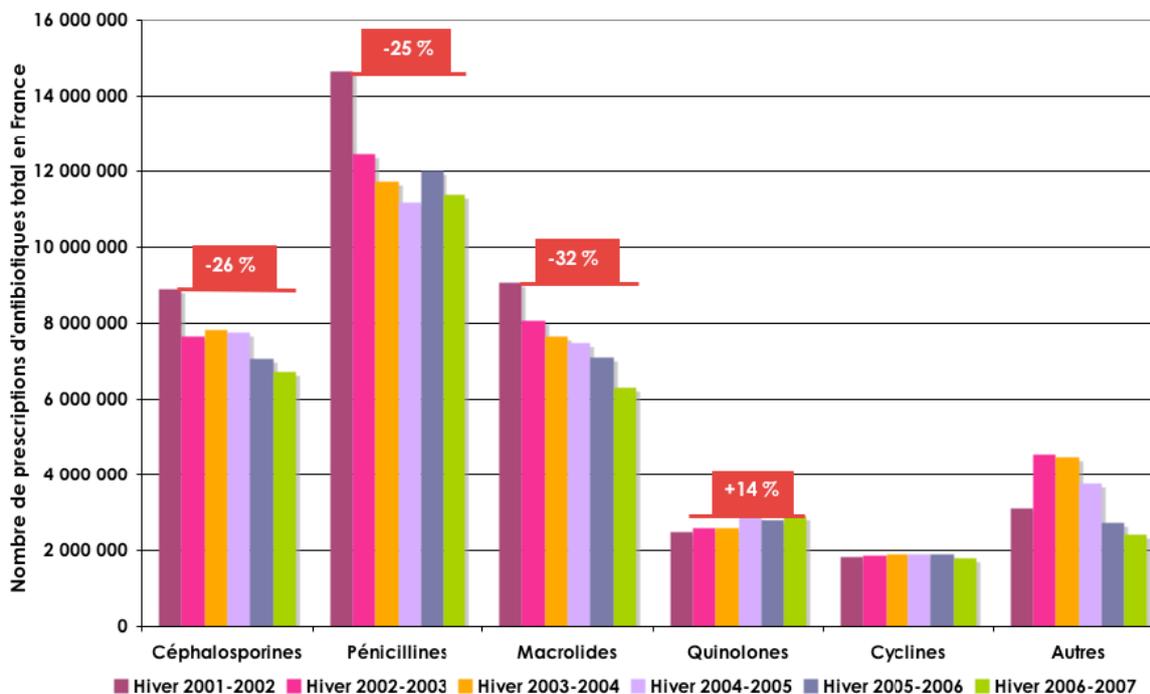


Cette évolution est très positive au sein d'une population initialement la plus consommatrice d'antibiotiques et donc par la même très concernée par le développement des résistances bactériennes. Cette baisse peut également s'expliquer par l'extension de la couverture vaccinale anti-pneumococcique qui a permis de réduire le nombre d'infections.

Depuis le début du programme, une baisse de la consommation de trois classes d'antibiotiques a été constatée (Figure 24). Les pénicillines ont enregistré une diminution de consommation de 25% entre 2002 et 2007. Ce recul est d'autant plus significatif qu'il s'agit traditionnellement de la catégorie d'antibiotiques la plus consommée. La consommation des

macrolides et des céphalosporines a baissé respectivement de 32% et 26% depuis 2002. En revanche, il a été constaté une hausse de la consommation des quinolones (+3,6%) par rapport à l'hiver précédent et de près de 14 % depuis 2002 (Guillemot *et al.*, 2008).

Figure 24 : Evolution du nombre de prescriptions en France par classe d'antibiotiques entre 2001 et 2007 (Guillemot *et al.*, 2008).



Malgré la baisse conséquente enregistrée en cinq ans, la France demeure toujours le 2^{ème} pays le plus consommateur d'antibiotiques en Europe derrière la Grèce. Si la consommation ne constitue pas l'unique facteur de développement des résistances bactériennes, une corrélation entre la consommation d'antibiotiques prescrits dans un pays et le niveau des résistances bactériennes existe (Monnet, 2000) ; par conséquent, la France compte parmi les pays européens les plus touchés par ce phénomène. Les menaces sur la Santé Publique de l'évolution des résistances bactériennes aux antibiotiques sont réelles, tant sur le plan individuel que sur le plan collectif, compromettant l'efficacité des traitements. Elles imposent un choix des molécules adapté à chaque situation clinique, pour ne pas épuiser inutilement cette ressource thérapeutique. Sans cet usage raisonné, des infections aujourd'hui bénignes, comme les infections urinaires ou intestinales provoquées par *E. coli*, pourraient ainsi connaître une recrudescence et devenir plus graves (Guillemot *et al.*, 2008).

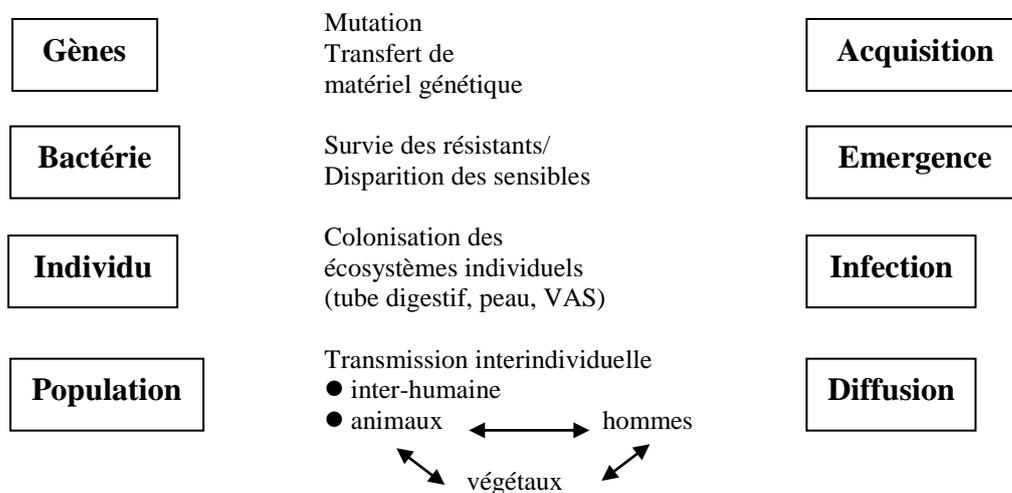
2. Evolution de la résistance

2.1 Analyse de la résistance bactérienne aux antibiotiques

A chaque nouvelle classe d'antibiotiques mise sur le marché depuis 1950 (macrolides, tétracyclines, céphalosporines, fluoroquinolones...etc...), les bactéries ont été capables de s'adapter avec de nouveaux mécanismes de résistance. L'enjeu actuel est donc de chercher les stratégies d'utilisation des antibiotiques les moins propices au développement de la résistance.

Le pourcentage de souches résistantes à un antibiotique donné a souvent tendance à augmenter en fonction du temps d'utilisation de cet antibiotique. C'est le résultat de la pression de sélection des antibiotiques. En effet, l'administration d'un antibiotique chez un individu provoque la disparition ou la diminution du nombre de bactéries sensibles à cet antibiotique et, de ce fait, favorise la sélection des mutants résistants, ainsi que des espèces possédant une résistance naturelle. L'antibiotique agit comme un révélateur et sélectionne la population de mutants résistants (Figure 25).

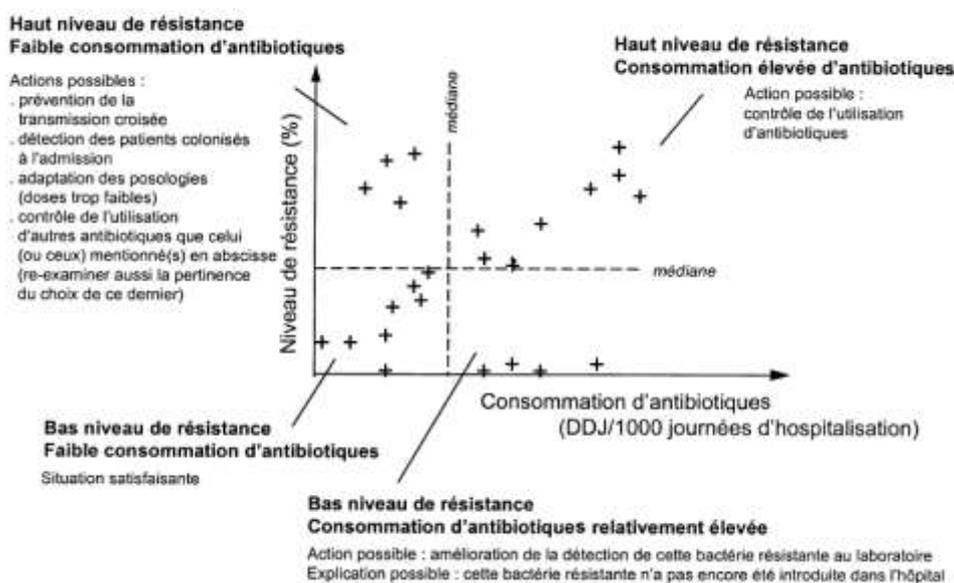
Figure 25 : Différents niveaux d'impact des antibiotiques, susceptibles de contribuer à la progression de la résistance bactérienne (Guillemot et Leclercq, 2005).



Différentes méthodes d'analyse prospective des risques de résistance ont été développées au fil des années. Les méthodes pharmaco-épidémiologiques, qui consistent à relier la consommation d'antibiotiques dans une population donnée à la prévalence de la résistance aux antibiotiques dans cette population (Guillemot, 2001), ont introduit une nouvelle unité de mesure internationale, la « dose définie journalière » ou « Defined Daily Dose » (DDD). Une DDD est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé, pour chaque dénomination commune internationale (DCI), comme étant une posologie journalière de « référence » pour un adulte de 70 kg dans l'indication principale du médicament dans son utilisation en ville.

Les limites de l'interprétation des résultats exprimés en DDD tiennent, par exemple, au fait qu'il s'agit d'une unité théorique qui ne peut pas correspondre à la réalité des pratiques, qu'il n'existe ni DDD spécifique de l'hôpital, ni de DDD adaptée à l'usage des antibiotiques en pédiatrie. Elle peut être assimilée à une extrapolation du nombre de jours de traitement et permet des comparaisons entre les classes d'antibiotiques, les années et les pays (Guillemot *et al.*, 2004). En 2000, Monnet a proposé un schéma montrant l'utilité de la confrontation des données de la résistance et des consommations des antibiotiques, dans le but de décrire quatre situations distinctes, validant le concept qu'une forte consommation d'antibiotiques est associée à une augmentation des résistances, mais qu'une augmentation de la résistance avec une faible consommation soulève plusieurs axes d'amélioration, en particulier la maîtrise de la diffusion des bactéries résistantes aux antibiotiques (Figure 26). Il est également possible de faire correspondre le niveau de résistance (en %) en ordonnées avec la proportion de patients exposés à un antibiotique donné sur l'axe des abscisses (Lepelletier, 2006).

Figure 26 : Utilité du croisement des données de la résistance bactérienne et de la consommation des antibiotiques (Monnet, 2000).



2.2 Epidémiologie de la résistance chez *E. coli*

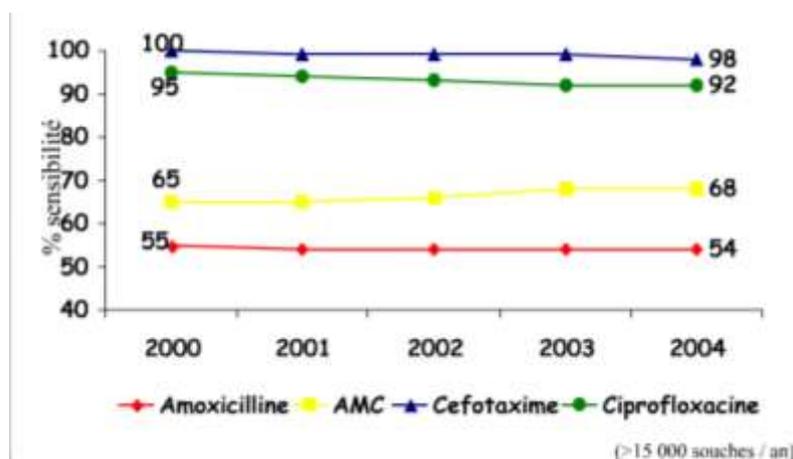
2.2.1 Evolution de la résistance à l'hôpital

A l'hôpital, limiter la transmission des bactéries résistantes implique des mesures d'hygiène professionnelle (précautions complémentaires), destinées à contrôler la diffusion de bactéries responsables d'infections nosocomiales. Si l'efficacité de ces mesures est certaine, il

n'en reste pas moins que l'exposition des populations hospitalisées aux antibiotiques crée un avantage sélectif des bactéries résistantes comparativement aux bactéries sensibles (Guillemot *et al.*, 2004).

D'après une étude réalisée entre 2000 et 2004, dans le cadre du réseau REUSSIR de l'ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques), 55% des souches de *E. coli* restent sensibles à l'amoxicilline. Il est intéressant de remarquer que l'association à l'acide clavulanique (inhibiteur de pénicillinase) permet de rattraper seulement 10% à 15% d'efficacité des pénicillines du groupe A. Par ailleurs, une toute petite tendance à la baisse d'efficacité est notée pour les C3G et les fluoroquinolones chez les souches de *E. coli* responsables de bactériémies (Figure 27).

Figure 27 : Sensibilité aux principaux antibiotiques de souches de *E. coli* responsables de bactériémies (Robert, 2007).



En France, cette évolution s'est accentuée ces quatre dernières années avec l'arrivée à l'hôpital des BLSE de type CTX-M, ainsi que l'émergence des céphalosporinases plasmidiques, notamment de type CMY-2. Selon l'ONERBA, parmi les souches d'entérobactéries productrices de BLSE, la proportion de souches de *E. coli* est passée de 9,5% en 2001 à 48,7% en 2005 (Robert, 2007).

Au C.H.U. de Nantes, la proportion d'isolats cliniques de *E. coli* producteurs de BLSE au sein des Entérobactéries, est passée de 62% en 2005 à 79% en 2007. La densité d'incidence de détection d'une souche de *E. coli* possédant une BLSE pour 1000 journées d'hospitalisation a donc été multipliée par 5 en 2 ans, passant de 0,02 à 0,10. De plus, la proportion de *E. coli* producteur de BLSE au sein des Entérobactéries isolées résistantes aux C3G est passée de 17% (1/6) en 2004 à 60% (18/30) en 2005 et à 81% (50/61) en 2006 (Lepelletier, 2006).

Aujourd'hui, la majorité des BLSE retrouvées, à l'hôpital comme en ville, sont des enzymes de type CTX-M. L'émergence rapide de ces enzymes est due à leur support génétique, des éléments mobiles (plasmides conjugatifs), de transmission aisée entre entérobactéries. Les souches productrices de CTX-M sont généralement multirésistantes (résistances associées aux fluoroquinolones et aux aminosides) et posent un réel souci de prise en charge thérapeutique.

2.2.2 Evolution de la résistance en ville

E. coli est responsable d'environ 80% à 90% des infections urinaires en ville, comme l'a confirmé l'étude Aforcopi-bio de 2003 (Figure 28).

Figure 28 : Place de *E. coli* dans les infections urinaires en ville (Robert, 2007)

Entérobactéries	% relatif
<i>Escherichia coli</i>	80,0%
<i>Proteus mirabilis</i>	4,5%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,0%
Autres EB	4,5%

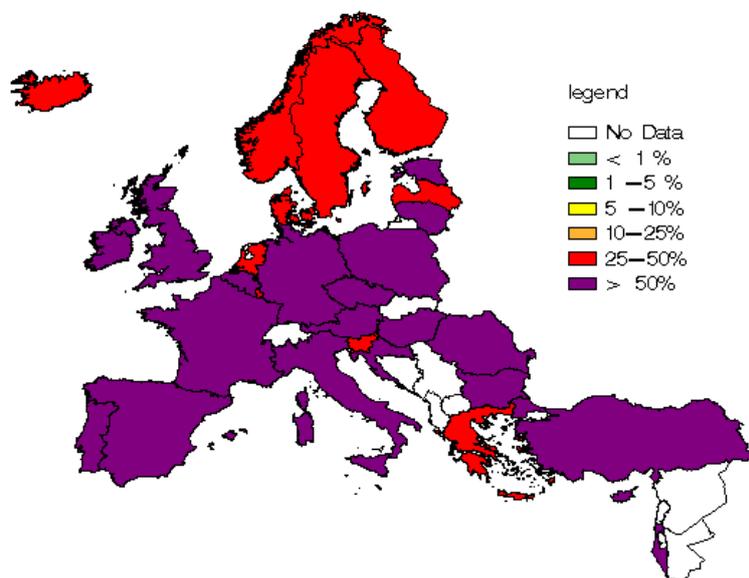
(420 infections urinaires)

Le projet multinational ECO-SENS a étudié la prévalence et la sensibilité des agents pathogènes responsables des infections urinaires non compliquées de la femme (18-65 ans) acquises en milieu communautaire, sur 1960 échantillons d'urine récoltés entre 1999 et 2000 dans 240 centres provenant de 17 pays (16 pays européens et le Canada). *E. coli* représentait environ 80% des bactéries uropathogènes isolées dans tous les pays. Le taux de résistance moyen de *E. coli* à l'ampicilline était de 30% (27,6% en France), et moins de 2% des souches urinaires étaient résistantes à l'association amoxicilline-acide clavulanique (1,5% en France) (Kahlmeter *et al.*, 2003). Ces niveaux de résistance ont progressé depuis. A l'inverse, certains antibiotiques utilisés spécifiquement dans le traitement des infections urinaires (fosfomycine, nitrofurantoïne) montraient des taux étonnamment bas de résistance, malgré des années d'utilisation. Deux hypothèses pourraient expliquer ces constatations : d'une part, ces antibiotiques sont peu utilisés à l'hôpital, et, d'autre part, ils n'ont pas été utilisés comme promoteurs de croissance chez les animaux d'élevage (Kahlmeter *et al.*, 2003).

A l'époque, les conclusions de ce rapport soulignaient l'importance de reconsidérer l'utilisation des sulfonamides, du triméthoprime et de l'amoxicilline dans le traitement des infections urinaires non compliquées, ces antibiotiques étant source d'échecs thérapeutiques. Par ailleurs, l'utilisation grandissante des fluoroquinolones, notamment en Espagne et au Portugal, apparaissait déjà comme problématique devant l'augmentation du niveau de résistance vis-à-vis de ces antibiotiques.

L'European Antimicrobial Resistance Surveillance System (E.A.R.S.S.) a été créé en 1998 par la Commission Européenne pour établir un réseau de surveillance de la résistance visant des actions de santé publique. Lors de son bilan annuel 2006 (http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202006%20Def_tcm61-44176.pdf), l'E.A.R.S.S. a analysé l'évolution de la résistance des souches de *E. coli* entre 2001 et 2006 en Europe. La résistance à l'égard des aminopénicillines se situait au dessus de 40% pour la plupart des pays. En France, la proportion de souches de *E. coli* résistantes est restée stable aux environs de 50%, entre 2002 (52,3%) et 2006 (52,9%) (Figure 29).

Figure 29 : Proportion des isolats de *E. coli* résistants aux aminopénicillines dans les pays participants à l'enquête EARSS en 2006. (<http://www.rivm.nl/earss/database/>)



En 2002, la majorité des pays européens affichait une résistance à l'égard des C3G en dessous de 1% chez les souches de *E. coli*. Ce pourcentage a augmenté significativement depuis. En France, la résistance aux C3G a plus que doublé entre 2002 (0,8%) et 2006 (2%) (Figures 30 et 31).

Figure 30 : Proportion des isolats de *E. coli* résistants aux C3G dans les pays participants à l'enquête EARSS en 2002. (<http://www.rivm.nl/earss/database/>)

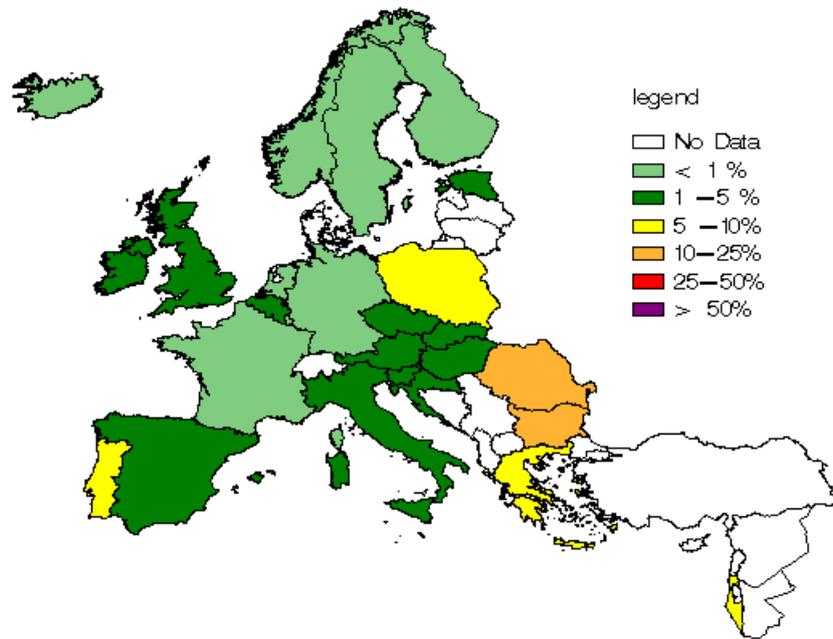
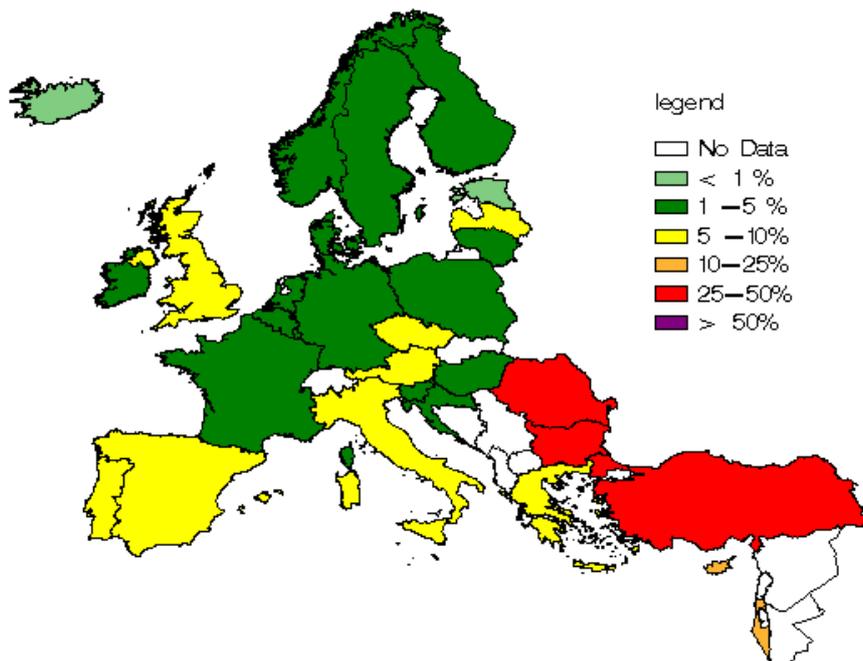


Figure 31 : Proportion des isolats de *E. coli* résistants aux C3G dans les pays participants à l'enquête EARSS en 2006. (<http://www.rivm.nl/earss/database/>)



En 2006, seulement 48% des isolats de *E. coli* étaient des souches dites « sauvages », c'est-à-dire, sensibles à tous les antibiotiques. La résistance unique aux aminopénicillines était le phénotype le plus fréquent (32%), suivi de la co-résistance aminopénicillines-fluoroquinolones (8,4%). Par ailleurs, la résistance aux fluoroquinolones des colibacilles isolés en France a presque doublé entre 2002 et 2007, passant de 8,2% à 14,8%.

En France, une étude menée par l'ONERBA en 2005 a mis en évidence l'impact de l'antibiothérapie administrée dans les 6 derniers mois sur la sensibilité des souches de *E. coli* isolées d'infections urinaires communautaires, démontrant ainsi une moindre sensibilité de ces isolats aux antibiotiques administrés (Figure 32).

Figure 32 : Sensibilité (en %) des souches de *E. coli* isolées d'infections urinaires communautaires, selon les antécédents d'antibiothérapie.

(<http://www.infectiologie.com/public/congres/2005/CP/cp5-1-delarbre.pdf>)

Sensibilité à	Tt par B-lactamine dans 6 derniers mois		Tt par quinolone dans 6 derniers mois	
	Oui N=66	Non N=340	Oui N=56	Non N=354
Amox	41	64	54	60
Co-amox	41	67	59	62
Ac. NaI	83	87	63	91
Cipro	94	94	78	97

(Réseau Afrcopi-Bio 2000)

Des études épidémiologiques récentes ont également identifié l'impact de l'antibiothérapie dans l'émergence de souches de *E. coli* productrices de BLSE, notamment en milieu communautaire (Calbo *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que les souches productrices de BLSE sont souvent également résistantes à la ciprofloxacine (Bradford, 2001). La diffusion de ce type de souches représente un véritable danger pour la Santé Publique. En effet, en ville, les fluoroquinolones (53%) et les β -lactamines (24%) représentent la majorité des traitements prescrits avant examen cyto bactériologique des urines (E.C.B.U.) (Robert, 2007).

Sur le plan local, dans la région des Pays de Loire, Medqual (centre d'information et de ressources à vocation régionale pour le bon usage des anti-infectieux) a lancé une veille épidémiologique depuis 2004. Le but est de faire un état des lieux de l'écologie bactérienne communautaire régionale, puis de suivre l'évolution des résistances aux antibiotiques chez deux bactéries stratégiques en raison de leur fréquence d'isolement : *E. coli* et *Staphylococcus aureus*.

Pour *E. coli*, les données ont été recueillies auprès du réseau de laboratoires d'analyses médicales (LAM) volontaires des principales villes de la région. Quatre-vingt quinze pour cent des données sont des résultats d'E.C.B.U. Il est important de signaler que les techniques d'antibiogramme permettant de déterminer le profil de résistance (S : sensible ; I :

intermédiaire ; R : résistant) des souches bactériennes testées varient d'un laboratoire à un autre, ceci résultant de différences d'interprétation des résultats phénotypiques.

En 2004, les LAM des Pays de Loire participants recensaient 39,3% de souches de *E. coli* de sensibilité diminuée ou résistantes aux aminopénicillines, et 22,5% d'isolats de sensibilité diminuée ou résistants à l'association amoxicilline + acide clavulanique. En 2007, la résistance aux aminopénicillines est restée relativement stable (39%), mais a diminué fortement pour l'association amoxicilline-acide clavulanique (7,8% de souches résistantes). Cette différence pourrait s'expliquer par une proportion plus importante de souches classées intermédiaires d'après l'antibiogramme en 2007, alors que cette distinction n'a pas été réalisée en 2004. Enfin, en 2007, 1,2% des souches de *E. coli* collectées étaient résistantes aux C3G étudiées (ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone), soulignant à nouveau l'impact de l'émergence des BLSE de type CTX-M en ville (<http://www.medqual.fr/pro/admin.php>).

ETUDE EXPERIMENTALE

I. Bases et objectifs de l'étude

Ces travaux se sont inscrits dans la continuité d'études antérieures réalisées au laboratoire de Bactériologie du C.H.U. de Nantes. La base du travail a consisté en une étude comparative d'un panel de 100 isolats de *E. coli* sauvages, sensibles à l'ensemble des β -lactamines et une

cohorte de 55 souches de *E. coli* résistantes par hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique AmpC.

Après avoir vérifié que ces souches n'étaient pas épidémiologiquement reliées par ERIC-2 PCR, les objectifs étaient de comparer ces deux groupes d'isolats cliniques :

- d'une part, en déterminant le groupe phylogénétique, et en analysant le polymorphisme génétique de la région promotrice du gène *ampC* impliqué dans l'expression de cette β -lactamase ;
- et, d'autre part, en recherchant la présence de cinq facteurs de virulence, particulièrement impliqués dans les processus physiopathologiques.

II. Matériel et méthodes

1. Souches bactériennes étudiées

Cinquante-cinq souches cliniques de *E. coli* dont le phénotype était compatible avec une hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique AmpC ont été sélectionnées sur une période de 12 ans au C.H.U. de Nantes. Le critère d'hyperproduction de la céphalosporinase était basé sur la sensibilité diminuée ou la résistance à la céfoxitine ainsi qu'aux C3G, en particulier la ceftazidime, avec un test de synergie négatif avec l'acide clavulanique, permettant d'exclure les isolats producteurs de BLSE. Ces souches provenaient de diverses natures de prélèvements : urines (35 soit 63,6%), sang (9 soit 16,4%), plaies infectées de différentes localisations (5 soit 9,1%), bile (1 soit 1,8%), liquide amniotique (2 soit 3,6%), placenta (1 soit 1,8%), liquide péritonéal (1 soit 1,8%) et prélèvement vaginal (1 soit 1,8%).

Ces souches ont été comparées à 100 souches cliniques de *E. coli* sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés, et isolées à partir d'urines (25 soit 25%), de sang (25 soit 25%), de liquides péritonéaux (30 soit 30%), de prélèvements broncho-alvéolaires (10 soit 10%) et de liquides gastriques (10 soit 10%).

2. Etude du promoteur du gène *ampC*

2.1 Extraction d'ADN rapide

Après une culture de 24h des souches étudiées, trois à quatre colonies étaient prélevées avec une anse de 1µL et déposées dans un tube Eppendorf contenant 100 µL d'eau distillée stérile. L'ADN était extrait par ébullition pendant 10 minutes au bain-marie puis par centrifugation à 11 000 tours/min pendant 7 minutes. Le surnageant (80 µL) contenant l'ADN était prélevé pour chaque isolat et pouvait être conservé 10 à 15 jours au congélateur à -20°C.

2.2 Amplification enzymatique de l'ADN par PCR

Principe de la PCR :

Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase pour copier une séquence spécifique d'ADN (séquence d'intérêt ou ADN cible). Cette méthode permet de générer d'importantes quantités d'un fragment d'ADN choisi à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel) grâce à l'introduction de deux amorces nucléotidiques (« primers »).

Le mélange réactionnel comprend :

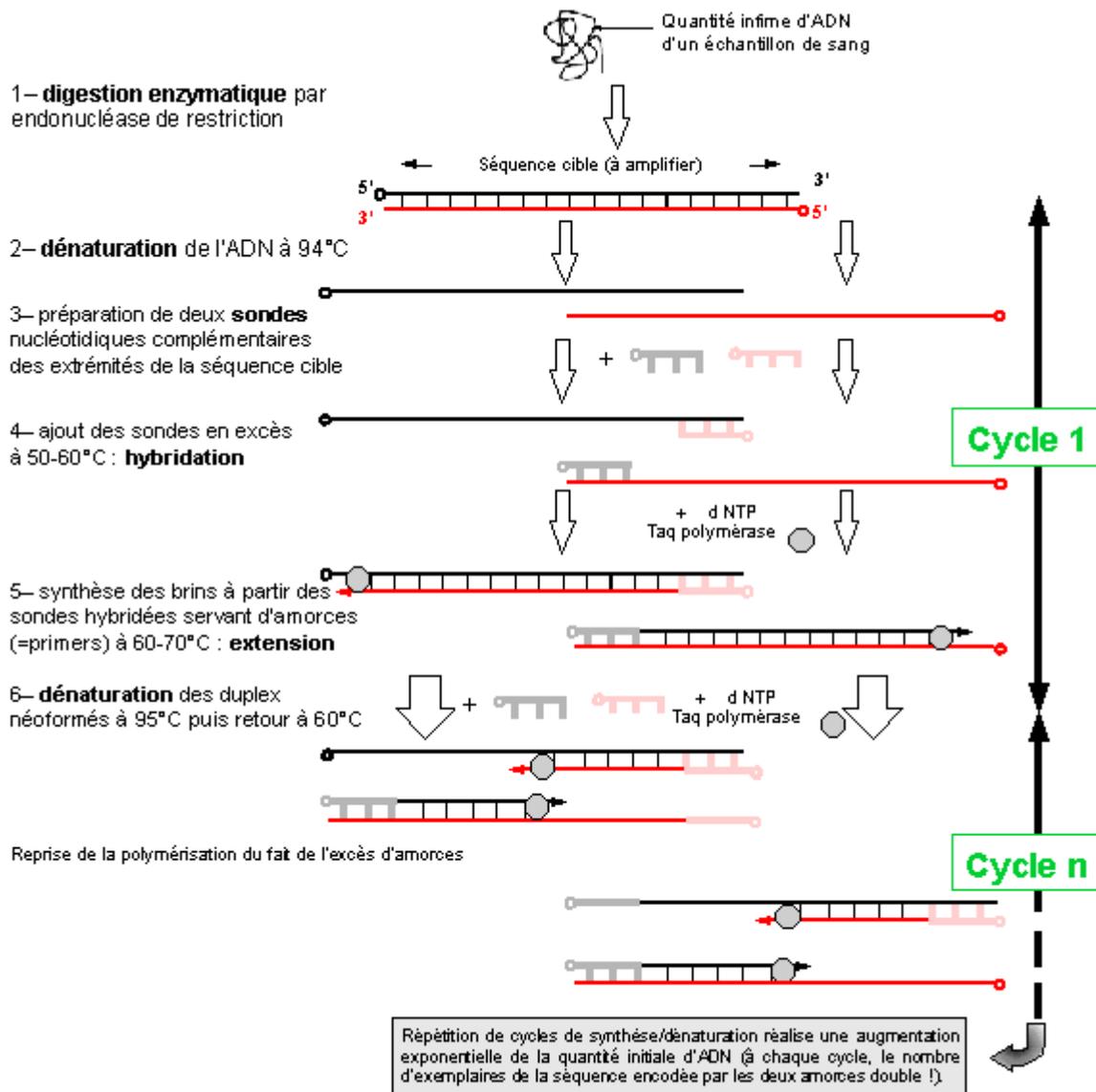
- l'extrait d'ADN ;
- la Taq polymérase ;
- les 4 désoxyribonucléosides triphosphates A, T, C, G ;
- le tampon ;
- les amorces.

Un cycle d'amplification comporte trois étapes : (Figure 33, page 53)

- la **dénaturation** à 94°C qui sépare les deux brins d'ADN ;
- l'**hybridation** des amorces à une température comprise entre 40 et 70°C en fonction des amorces choisies ;
- l'**élongation** et la synthèse de brins d'ADN complémentaires en aval des amorces grâce à l'action de la Taq polymérase à 72°C.

Chaque cycle voit doubler la quantité d'ADN présente dans le milieu. Pour avoir une quantité analysable d'ADN, 30 cycles sont en principe réalisés.

Figure 33 : Principe général des étapes d'un cycle de la réaction de PCR
(<http://www.inrp.fr/Acces/biotic/biomol/techgen/html/schempcr.htm>).



Conditions expérimentales de l'amplification :

Les amorces AB1 (5'-GATCGTTCTGCCGCTGTG-3') et AmpC2 (5'-GGCAGCAAATGTGGAGCAA-3'), correspondant respectivement aux nucléotides -151/-134 et +120/+101, étaient utilisées pour amplifier un fragment d'une taille de 271 paires de bases (pb) contenant le promoteur du gène *ampC* et l'atténuateur transcriptionnel (Tableau IV, page 58). L'amplification était réalisée dans un volume final de 50 µL contenant : 27,25 µL d'eau, 5 µL de tampon, 3 µL de MgCl₂, 0,25 µL de chaque amorce, 1 µL de chaque nucléotide, 0,25 µL de Taq polymérase et 10 µL d'extrait d'ADN. Trente cycles de PCR étaient nécessaires comprenant chacun : 30 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'hybridation à 56°C et 1 min d'élongation à 72°C, avec une étape d'extension finale de 7 min à 72°C (Tableau V, page 58).

Migration

Dix microlitres de chaque produit de PCR étaient déposés avec 2 µL de colorant dans les puits d'un gel d'agarose à 1,5%. Une migration électrophorétique était effectuée pendant 1h à 100 volts, en tampon TBE 1X.

Révélation et interprétation

Les gels étaient immergés dans une solution de bromure d'éthidium (B.E.T.) pendant 10 min. La révélation des gels était ensuite faite sous lampe U.V.

2.3 Séquençage de la région promotrice du gène *ampC*

Principe

Le séquençage des gènes amplifiés était réalisé par la méthode enzymatique de Sanger, ou méthode de terminateurs de chaîne. Celle-ci repose sur le principe suivant : la synthèse d'ADN est interrompue quand, à la place d'un désoxyribonucléotide normal (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), un didésoxyribonucléotide (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) est utilisé. Des fragments de longueurs différentes sont alors obtenus. Chaque type de didésoxyribonucléotide est marqué par un fluorochrome spécifique.

La réaction comprend trois étapes : hybridation de l'amorce de séquençage, action de la Taq polymérase, migration des fragments et détection par fluorescence.

Après traitement informatique des données, on obtient un électrophorégramme dont l'analyse détermine la séquence d'intérêt.

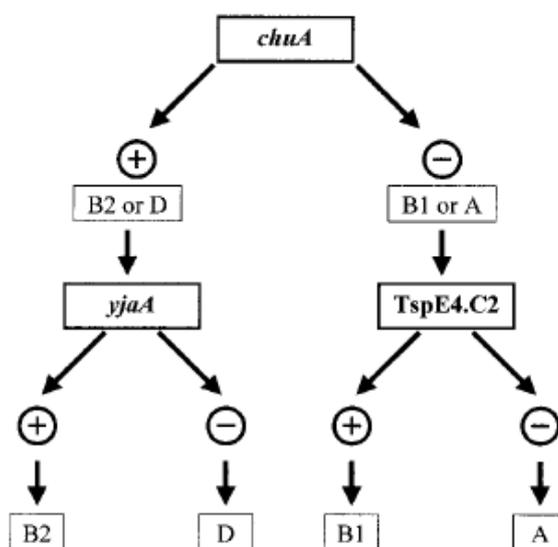
Réalisation

Les fragments de PCR étaient purifiés et séquencés en utilisant le système ABI PRISM Big Dye terminator cycle system (Applied Biosystems). Après purification sur résine Bio-Gel[®], les produits de séquençage étaient analysés par électrophorèse capillaire sur ABI PRISM 3100[®]. Le logiciel Navigator (Applied Biosystems) nous a ensuite permis d'obtenir et d'analyser ces séquences. L'ensemble des analyses informatiques a été réalisé par l'utilisation de logiciels gratuits disponibles sur Internet via le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

3. Détermination du groupe phylogénétique par PCR triplex

Nous avons choisi d'appliquer la méthode développée par Clermont *et al.* en 2000 (Clermont *et al.*, 2000). Un arbre décisionnel simple a été établi pour déterminer les quatre principaux groupes phylogénétiques, en fonction de la présence ou de l'absence de trois marqueurs génétiques : les gènes *chuA* et *yjaA* ainsi que le fragment TspE4C2 (Figure 34). Le gène *chuA* code pour une protéine intervenant dans le transport de l'hème, retrouvé chez les souches entérohémorragiques O157:H7. Le gène *yjaA* a été identifié sur le génome de la souche de *E. coli* K-12 mais reste de fonction inconnue. Enfin, TspE4C2 est un fragment d'ADN anonyme issu de la banque d'extraction (Tableau IV, page 58).

Figure 34 : Arbre de décision dichotomique pour déterminer le groupe phylogénétique d'une souche de *E. coli* en utilisant les résultats de l'amplification par PCR des gènes *chuA* et *yjaA* et du fragment d'ADN TspE4.C2 (Clermont *et al.*, 2000).



Conditions expérimentales de l'amplification

Trente cycles de PCR étaient réalisés dans les mêmes conditions expérimentales que celles de l'amplification de la région promotrice du gène *ampC* (Tableau V, page 58).

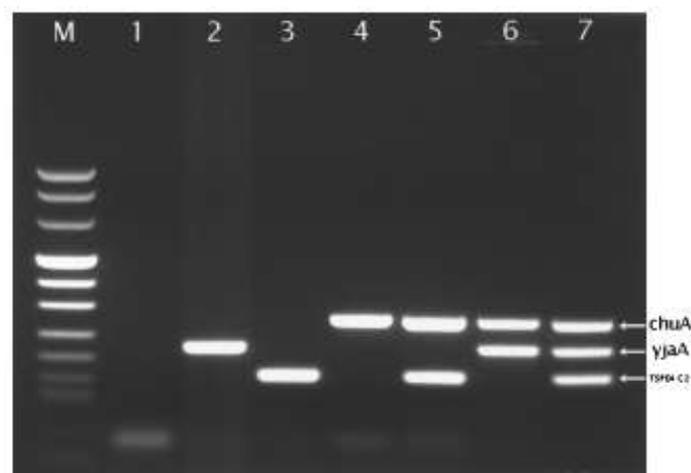
Migration

Les migrations ont été effectuées dans les mêmes conditions expérimentales que celles de l'amplification de la région promotrice du gène *ampC*.

Révélation et interprétation

Les gels étaient immergés dans du B.E.T. pendant 10 minutes. La révélation était ensuite faite sous lampe U.V. La figure 35 représente un exemple de la détermination des groupes phylogénétiques en fonction de la présence ou de l'absence des trois marqueurs génétiques choisis précédemment (Clermont *et al.*, 2000).

Figure 35 : Exemple de profils de PCR triplex spécifique 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 (Clermont *et al.*, 2000).



4. Etude des facteurs de virulence associés

Cinq gènes associés à la virulence de *E. coli* ont été recherchés par PCR multiplex pour les 55 souches hyperproductrices de la céphalosporinase AmpC : les allèles *papG* II et III (fimbriae de type P), *sfa/foc* (fimbriae de type S), *hly* (hémolysine) et *iucC* (système de capture du fer) (Bingen-Bidois *et al.*, 2002).

Deux PCR, triplex et duplex respectivement, ont été mises en œuvre, l'une détectant les gènes *hly*, *iucC* et *sfa/foc*, et l'autre détectant les gènes *papGII* et *papGIII*.

Les conditions expérimentales de l'amplification par PCR étaient identiques à celles de l'amplification de la région promotrice du gène *ampC*. Les migration, révélation et interprétation ont été effectuées également dans les mêmes conditions.

5. Typage moléculaire par PCR ERIC-2

Principe

E.R.I.C. est l'abréviation de Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus. L'amorce ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') désigne une séquence consensus répétée, retrouvée au niveau de régions extragéniques de différentes Entérobactéries (Tableau IV, page 58). Cette séquence conservée intergénique d'une longueur de 126 pb est présente à la fois sur les brins sens et antisens de l'ADN (Versalovic *et al.*, 1991).

L'amorce ERIC-2 est utilisée pour l'amplification par PCR de régions de tailles variables entre ses éléments répétés tout au long du chromosome bactérien.

Cette technique de génotypage permet d'obtenir des profils multibandes autorisant une comparaison et une analyse rapide en épidémiologie moléculaire. L'utilisation de ces séquences non codantes multicopies présente l'avantage de disposer d'une réponse rapide sur l'éventuel lien épidémiologique entre des isolats. Par contre, elle présente un moindre pouvoir discriminant par rapport à la technique de l'électrophorèse en champ pulsé (Pulsed Field Gel Electrophoresis) (Davin-Regli *et al.*, 1996).

Conditions expérimentales de l'amplification

Une étape initiale de dénaturation de 90 s à 94°C précédait 44 cycles de PCR comprenant 15 s de dénaturation à 94°C, 15 s d'hybridation à 40°C et 1 min d'élongation à 72°C, avec une étape d'extension finale de 7 min à 72°C (Tableau V, page 58).

Migration

Dix microlitres de chaque produit de PCR étaient déposés avec 2 µL de colorant dans les puits d'un gel d'agarose à 1,5%. Une migration électrophorétique était effectuée pendant 2H30 à 120 volts, en tampon T.B.E. 1X.

Révélation et interprétation

Les gels étaient immergés dans du B.E.T. pendant 10 minutes. La révélation était ensuite faite sous lampe U.V.

Tableau IV : Liste de l'ensemble des amorces utilisées pour les différentes PCR.

	gènes cibles	Nom amorces	Séquences choisies
Groupe phylogénétique	<i>chuA</i> <i>yjaA</i> TspE4C2	chuA1 chuA2 yjaA1 yjaA2 TspE4C2.1 TspE4C2.2	5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3' 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3' 5'-TGAAGTGT CAGGAGACGCTG-3' 5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3' 5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3' 5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'
Amplification de la région promotrice du gène <i>ampC</i>	<i>ampC</i>	AB1 AmpC2	5'-GATCGTTCTGCCGCTGTG-3' 5'-GGGCAGCAAATGTGGAGCAA-3'
Typage moléculaire		ERIC-2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'
Etude des facteurs de virulence	<i>papGII</i> <i>papGIII</i> <i>sfa/foc</i> <i>hly</i> <i>iucC</i>	papGII.1 papGII.2 papGIII.1 papGIII.2 sfa.1 sfa.2 hly.1 hly.2 aer.1 aer.2	5'-GGGATGAGCGGGCCTTTGAT-3' 5'-CGGGCCCCCAAGTAACTCG-3' 5'-GGCCTGCAATGGATTTACCTGG-3' 5'-CCACCAAATGACCATGCCAGAC-3' 5'-CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC-3' 5'-CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA-3' 5'-AGGTTCTTGGGCATGTATCCT-3' 5'-TTGCTTTGCAGACTGCAGTGT-3' 5'-AAACCTGGTTTACGCAACTGT-3' 5'-ACCCGTCTGCAAATCATGGAT-3'

Tableau V : Tableau récapitulatif des conditions expérimentales de l'amplification par PCR pour l'amplification de la région promotrice du gène *ampC*, le groupage phylogénétique, le typage moléculaire et l'étude des facteurs de virulence.

	Amplification de la région promotrice du gène <i>ampC</i>	Groupage phylogénétique	Typage moléculaire
Temps et température de l'étape initiale de dénaturation	absente		90s à 94°C
Nombre de cycles de PCR	30		44
Temps et température de dénaturation	30s à 94°C		15s à 94°C
Temps et température d'hybridation	30s à 56°C		15s à 40°C
Temps et température d'élongation	60s à 72°C		60s à 72°C
Temps et température de l'extension finale	7min à 72°C		

III. Résultats

1. Détermination du groupe phylogénétique

Dans un premier temps, le groupe phylogénétique de l'ensemble des souches de *E. coli* de l'étude a été déterminé par PCR multiplex. L'ensemble des souches provenait de prélèvements de patients hospitalisés dans différentes unités du C.H.U. de Nantes (Urgences médicales et chirurgicales, Réanimation adulte, Pédiatrie, Chirurgie, Médecine interne, Gynéco-obstétrique).

L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau VI.

Tableau VI : Groupage phylogénétique des souches sensibles de *E. coli* et des souches de *E. coli* hyperproductrices de la céphalosporinase AmpC.

Groupes phylogénétiques	Souches sensibles de <i>E. coli</i> (n=100)	Souches de <i>E. coli</i> hyperproductrices de la céphalosporinase AmpC (n=55)
A	13	47
B1	10	5
B2	66	1
D	11	2

Les souches hyperproductrices de céphalosporinase AmpC chromosomique appartenait beaucoup plus fréquemment au groupe phylogénétique A que les souches sensibles. Parmi les souches hyperproductrices, 47 appartenait au groupe phylogénétique A (85.5%), 5 au groupe B1 (9.1%), 2 au groupe D (3.6%) et 1 au groupe B2 (1.8%). Par contre, parmi les 100 souches sensibles, la majorité appartenait au groupe phylogénétique B2 (66%). Les groupes phylogénétiques A, D et B1 étaient constitués respectivement de 13, 11 et 10 isolats.

2. Caractéristiques des souches résistantes

Différentes mutations dans les régions stratégiques ont été détectées au niveau du promoteur du gène *ampC*. Parmi les 55 souches hyperproductrices de céphalosporinase AmpC, 45 présentaient une mutation en position -42 (81,8%), 6 en position -32 (10,9%) et 3 en position -11 (5,5%). Une seule souche possédait une insertion entre les box -35 et -10. Ces mutations/insertion étaient associées à une modification génétique au niveau de l'atténuateur (positions +17 à +37) chez 19 isolats (34,5%). Parmi les 45 souches présentant la mutation la plus fréquente en position -42 (C→T) au niveau du promoteur du gène *ampC*, 39 appartenait au groupe phylogénétique A (86,7%), 5 au groupe B1 (11,1%) et 1 au groupe D (2,2%), comme le montre le Tableau VII.

Tableau VII : Groupes phylogénétiques, polymorphisme de la séquence du promoteur du gène *ampC* et CMI à l'égard de la ceftazidime des 55 souches de *E. coli* hyperproductrices de la céphalosporinase AmpC chromosomique.

Nombre de souches	Mutations dans le promoteur <i>ampC</i> ^a	Groupes phylogénétiques	CMI de la ceftazidime (mg/L)
1	-88 -82 -42 -18 -1 <u>+31</u> +58	A	128
5	-88 -82 -42 -18 -1 <u>+23</u> +58	A	16-64
5	-88 -82 -42 -18 -1 <u>+32</u> +58	A	8-32
2	-88 -82 -42 -18 -1 <u>ins atten (21)</u> +58	A	8-32
2	-88 -82 -42 -18 -1 <u>ins atten (34)</u> +58	A	16
20	-88 -82 -42 -18 -1 +58	A	4-16
2	-88 -82 -61 -42 -18 -1 +58	A	8
1	-88 -82 -42 -18 -1 <u>+31</u> +42 +58	A	4
1	-88 -82 -61 -42 -18 -7 -1 +58	A	4
1	-88 -82 -32 -18 -1 +5 <u>+24</u> +58	A	64
4	-88 -82 -32 -18 -1 +58	A	1-4
3	-88 -82 -18 -11 -1 +58	A	0.5
5	-88 -82 -42 -18 -1 +58	B1	2-16
1	-73 -61 ins (-14) <u>+24</u>	B2	2
1	-88 -82 -61 -42 -18 -1 <u>+31</u> +58	D	32
1	-32	D	0.5

ins atten : insertion d'1 pb dans l'atténuateur du gène *ampC*

Les caractères en gras indiquent les mutations majeures causant une hyperproduction de la céphalosporinase AmpC

Les caractères soulignés indiquent des événements génétiques (mutations ou insertions) survenant dans l'atténuateur du gène *ampC*

^aComparé avec le promoteur du gène *ampC* de *E. coli* K₁₂

Cinq isolats sur 6 présentant une mutation en position -32 au niveau du promoteur appartenaient également au groupe phylogénétique A, le dernier appartenant au groupe phylogénétique D. Les trois isolats présentant une mutation en position -11 appartenaient aussi au groupe phylogénétique A. La souche présentant une insertion d'une pb entre les box

-35 et -10, conduisant à une distance de 17 pb (16 pb dans le promoteur d'origine) appartenait au groupe B2.

Différents travaux antérieurs ont montré que les mutations conduisant à l'hyperproduction de céphalosporinase chromosomique apparaissent souvent associées à une trame génétique caractéristique avec un polymorphisme aux positions -88, -82, -18, -1 et +58, par rapport à la séquence de référence de *E. coli* K₁₂ (GenBank accession number J01611). Ces polymorphismes ont été retrouvés au sein de chaque isolat dont le promoteur du gène *ampC* était muté en position -42. Cinq des 6 souches dont le promoteur était muté en position -32 présentaient également les mêmes polymorphismes. Il est intéressant de noter que la souche avec une seule modification en position -32, appartenait au groupe phylogénétique D. Enfin, une seule souche, de groupe phylogénétique D, avait une trame génétique identique aux autres souches hyperproductrices de la céphalosporinase AmpC (-88, -82, -18, -1, +58) (Tableau VII, page 60).

3. Etude du polymorphisme de la région promotrice du gène *ampC* des souches sensibles

Ce polymorphisme génétique aux positions -88, -82, -18, -1 et +58 a également été détecté chez 13% des promoteurs du gène *ampC* des isolats sensibles (Tableau VIII, page 62). Ces souches appartenaient également aux groupes phylogénétiques A et B1 dits « non virulents ».

Les souches sensibles du groupe phylogénétique B2 présentaient des polymorphismes en positions -73 (C→T) et +81 (G→A) du promoteur du gène *ampC*, polymorphismes jamais détectés chez les souches des groupes A et B1. De plus, un polymorphisme en position -28 (G→A) était présent chez 50% d'entre elles.

Par ailleurs, le polymorphisme détecté en position -70 (C→T) était associé aux souches appartenant au groupe phylogénétique D.

Tableau VIII : Comparaison des polymorphismes génétiques du promoteur du gène *ampC* les plus fréquemment retrouvés chez les souches sensibles et hyperproductrices de céphalosporinase AmpC.

Groupe phylogénétique Nombre de souches (%)	Souches sensibles d' <i>E. coli</i> (n=100)					Souches résistantes d' <i>E. coli</i> (n=55)				
	A	B1	B2	D	Total	A	B1	B2	D	Total
	13 (13)	10 (10)	66 (66)	11 (11)	100	47 (85)	5 (9)	1 (2)	2 (4)	55
Polymorphismes les + fréquents ^a										
-88 -82 -18 -1 +58	4	9	0	0	13	47	5	0	1	53
-73 -28 +17 +58	0	0	29	0	29	0	0	0	0	0
-73 +81	0	0	20	0	20	0	0	0	0	0
-73 +58 +63 +81	0	0	10	0	10	0	0	0	0	0
+70	0	0	0	6	6	0	0	0	0	0
Pas de polymorphisme	8	1	0	0	9	0	0	0	0	0
Autres	1	0	7	5	13	0	0	1	1	2

^aComparé au promoteur du gène *ampC* d'*E. coli* K₁₂

4. Détection de cinq facteurs de virulence chez les isolats cliniques résistants aux β -lactamines.

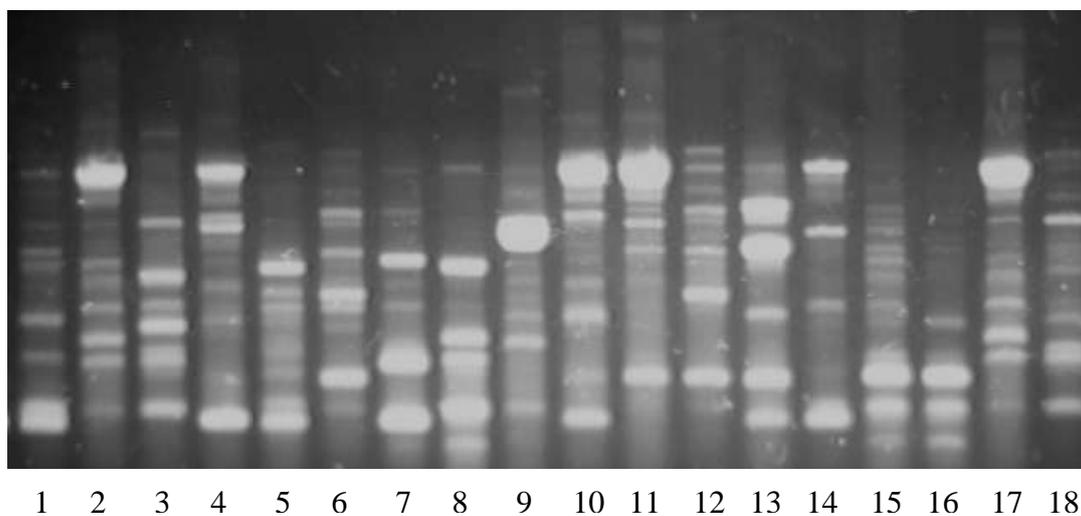
Lors de cette étape, nous avons souhaité connaître le profil de virulence des 55 souches hyperproductrices de céphalosporinase AmpC en détectant par PCR multiplex cinq facteurs de virulence généralement impliqués dans les processus physiopathologiques.

Dans le système de capture du fer « aérobactine », le sidérophore hydroxamate (*iucC*) a été détecté dans 70% des isolats (74% des isolats du groupe phylogénétique A), mais aucun d'entre eux, à l'exception de la souche du groupe phylogénétique B2, ne produisait l'adhésine codée par le gène *sfa/foc*. L'hémolysine codée par le gène *hly* a été trouvée dans seulement trois souches (5%) : une appartenant au groupe phylogénétique B2, une au groupe phylogénétique A et la dernière au groupe phylogénétique B1. Enfin, les allèles *papGII* et *papGIII* qui codent pour les fimbriae de type P ont été détectés chez trois et deux souches respectivement, toutes appartenant au groupe phylogénétique A, isolées d'urines et présentant une mutation dans le promoteur du gène *ampC* en position -42.

5. Typage moléculaire par PCR ERIC-2

Bien que moins discriminante que la technique de référence (électrophorèse en champ pulsé), le typage moléculaire conduit par PCR ERIC-2 a permis de démontrer une diversité génétique et l'absence probable de lien épidémiologique entre les 55 isolats de colibacilles résistants aux C3G isolés sur une période de 12 ans au C.H.U. de Nantes, comme le montre la figure 36.

Figure 36 : Exemple de comparaison de profils obtenus pour des isolats de *E. coli* hyperproducteurs de céphalosporinase AmpC après typage moléculaire par ERIC-2 PCR. Migration en gel d'agarose 1,5% 2H30 à 120 Volts.



Most *Escherichia coli* strains overproducing chromosomal AmpC β -lactamase belong to phylogenetic group A

Stéphane Corvec^{1,2}, Adèle Prodhomme¹, Cécile Giraudeau¹, Sandie Dauvergne²,
Alain Reynaud^{1,2} and Nathalie Caroff^{2*}

¹Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, CHU, Nantes, France; ²JE 2437, Génétique des Interactions hôte-microorganisme, Faculté de Pharmacie, Université de Nantes, France

Received 11 May 2007; returned 11 June 2007; revised 4 July 2007; accepted 6 July 2007

Objectives: To determine the phylogenetic group and the production of different virulence factors (VFs) of a collection of *Escherichia coli* strains overproducing their chromosomal AmpC cephalosporinase.

Methods: Fifty-five *E. coli* strains, isolated over a 12 year period, and previously identified as AmpC overproducers by increased MICs of third-generation cephalosporins without extended-spectrum β -lactamase production (negative double-disc synergy test), were phylogrouped by multiplex PCR. As a comparison, 100 *E. coli* clinical isolates, susceptible to all β -lactams, were also tested by the same method. The *ampC* promoter sequence was determined for all these isolates. ERIC-2 PCR (where ERIC stands for enterobacterial repetitive intergenic consensus) was used to compare the isolates. Search for virulence-associated genes (*papG* alleles, *sfa/foc*, *hly* and *iucC*) was performed by multiplex PCR for the 55 AmpC overproducers.

Results: Most of the AmpC overproducers (47/55) belonged to phylogenetic group A, correlated with a low prevalence of the main VFs in these strains. The -32, -42 and -11 mutations, responsible for AmpC overproduction, were usually associated with DNA polymorphisms at positions -88, -82, -18, +1 and +58 in the *ampC* promoter. In the control susceptible isolates, these polymorphisms were detected in 13 *ampC* promoters (9 group B1 and 4 group A). These polymorphisms were never associated with the main phylogenetic group B2, representing 66% of the susceptible isolates.

Conclusions: AmpC overproduction was clearly correlated with non-virulent commensal phylogenetic groups A and B1, and absence of the main *E. coli* VFs. Susceptible isolates harbouring the same sequence polymorphisms as AmpC overproducers also belonged to commensal phylogenetic groups.

Keywords: *E. coli*, virulence, cephalosporinase, promoter

Introduction

Escherichia coli usually produces only very small amounts of a chromosomal, non-inducible class C cephalosporinase. However, laboratory mutants and clinical strains overproducing this enzyme have been described in detail. Overproduction is linked to various mutations in strategic parts of the *ampC* promoter leading to increased transcription rates and, as a consequence, increased production of the enzyme and high-level resistance to numerous β -lactams, including third-generation cephalosporins.¹

The most frequent mutation is located at position -42, creating a new -35 box, with perfect homology with the consensus

hexamer. Other mutations have also been described at positions -32 and -11, and at various positions of the transcriptional attenuator. The latter are supposed to destabilize the hairpin structure of the attenuator, resulting in increased *ampC* expression. An 8–280-fold increase in *ampC* expression has been detected by RT-PCR according to the different mutations present in the promoters.²

E. coli is by far one of the most important bacterial pathogens, according to the number and diversity of community and nosocomial infections it can cause. Most *E. coli* strains causing human infections belong to the virulent, extraintestinal phylogenetic group B2 (or D) and possess a panel of virulence factors (VFs) such as adhesins or haemolysins.³

*Correspondence address: Laboratoire de Bactériologie, JE 2437, Faculté de Pharmacie, Université de Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes Cédex 01, France. Tel: +33-2-40-41-29-48; Fax: +33-2-40-41-29-52; E-mail: nathalie.caroff@univ-nantes.fr

Phylogenetic groups of *E. coli* AmpC overproducers

Recently, fluoroquinolone-resistant *E. coli* isolates have been shown to belong essentially to non-virulent, commensal A or B1 phylogenetic groups.^{4,5} This study was conducted to determine the phylogenetic group of non-related *E. coli* strains overproducing chromosomal AmpC.

Materials and methods

Bacterial strains and antimicrobial susceptibility

Fifty-five *E. coli* strains presenting a β -lactam resistance pattern compatible with AmpC overproduction were collected at Nantes University Hospital during a 12 year period. AmpC overproduction was suspected on reduced susceptibility to cefoxitin and third-generation cephalosporins, particularly ceftazidime, and absence of synergy with clavulanate (negative double-disc synergy test). The MICs of ceftazidime were determined using the Etest method. For most strains, spectrophotometric data were determined previously using cefalotin as a substrate.² The source of isolation of these strains was mostly urine (35), but also blood (9), wounds of different localizations (5), bile (1), amniotic fluid (2), placenta (1), peritoneal fluid (1) and vaginal swab (1).

These strains were compared with 100 non-repeat *E. coli* susceptible to all antibiotics including β -lactams and isolated from urine (25), blood cultures (25), peritoneal fluid (30), respiratory samples (10) and gastric fluid (10).

Amplification and sequencing of the *ampC* promoter

Primers AB1 (5'-GATCGTCTGCGCTGTG-3') and ampC2 (5'-GGGCAGCAAATGTGGAGCAA-3') corresponding to nucleotides -151/-134 and +120/+101, respectively (GenBank accession number J01611) were used to amplify a 271 bp fragment of the *ampC* promoter. Boiled lysates were used as template DNA. PCRs were performed in a final volume of 50 μ L containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each nucleotide, 0.5 μ M of each primer and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase. PCR conditions were as follows: 90 s of denaturation at 94°C, 30 s of denaturation at 57°C and 30 s of extension at 72°C, with a final extension step of 7 min at 72°C.

The PCR fragment was purified and sequenced with the ABI PRISM Big dye terminator v1.1 cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Sequence analysis was performed on an 3130XL genetic analyser DNA sequencer (Applied Biosystems). The *ampC* promoter sequences were compared with the *ampC* promoter sequence of *E. coli* K-12.⁶

Determination of phylogenetic group by multiplex PCR

Phylogenetic group was determined using a triplex-PCR targeting *chuA*, *yja* and TSPE4.⁷ The pattern of PCR products obtained allowed the classification into one of the four phylogenetic groups: A, B1, B2 and D.

Virulence-associated genes

Five virulence-associated genes, *papG* alleles II and III, *hly*, *stx* and the siderophore gene *iucC*, were searched for by multiplex PCR as previously described⁷ for the 55 AmpC-overproducing strains.

Molecular typing by ERIC-2 PCR (where ERIC stands for enterobacterial repetitive intergenic consensus)

DNA was extracted with the QIAGEN DNA kit and measured by Nanodrop[®] spectrophotometer. Ten nanograms was used for PCR with the ERIC-2 primer (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGTGAGCG-3'). Conditions of amplification were: initial denaturation of 90 s at 94°C; followed by 44 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 40°C and 60 s at 72°C; with a final extension step of 7 min at 72°C.

Results

Most AmpC overproducers belong to phylogroup A

In this study, the phylogenetic group of a collection of *E. coli* strains overproducing their chromosomal cephalosporinase has been determined. Strains were collected during a 12 year period from different patients hospitalized in various clinical units and compared by an ERIC-2 method, excluding an epidemic situation (data not shown). As a comparison, 100 non-repeat β -lactam-susceptible clinical isolates were grouped by the same method.

AmpC overproducers belonged much more frequently to phylogenetic group A than the susceptible isolates [47/55 (85%) versus 13/100 (13%), $P < 0.0001$]. Out of the 55 AmpC overproducers, 47 belonged to phylogenetic group A (85.5%), 5 to group B1 (9.1%), 2 to group D (3.6%) and 1 to group B2 (1.8%). Out of the 100 susceptible isolates, 66 belonged to phylogenetic group B2, 11 belonged to phylogenetic group D and 13 and 10 to phylogenetic groups A and B1, respectively.

Various mutations known to increase *ampC* transcription rate were present in the *ampC* promoter of the 55 AmpC overproducers: at positions -42 (45 isolates, 81.8%), -32 (6 isolates, 10.9%) and -11 (3 isolates, 5.5%); a single isolate had an insertion between the -35 and -10 boxes. In 19 isolates, these mutations/insertion were associated with a genetic modification in the transcriptional attenuator (positions +17 to +37).

Among the 45 isolates presenting the most frequent -42 (C→T) mutation in the *ampC* promoter, 39 belonged to phylogenetic group A, 5 to group B1 and 1 to group D (Table 1). Five out of six isolates presenting a -32 mutation in the *ampC* promoter were also from phylogenetic group A, the last one being from phylogenetic group D. The three isolates presenting the mutation at position -11 in the Pribnow box belonged to group A. The strain presenting an insertion of 1 bp between the -35 and -10 boxes, inducing a 17 bp interbox distance instead of 16 in the native promoter, belonged to phylogenetic group B2.

Genetic framework

Mutations leading to AmpC overproduction usually occurred on a specific genetic framework, with polymorphisms at positions -88, -82, -18, -1 and +58. These polymorphisms were found in each isolate harbouring the -42 mutation in the *ampC* promoter. Five out of six isolates with a -32 mutation also had the same polymorphisms. Interestingly, the AmpC overproducer presenting a single change at position -32, without the -88, -82, -18, -1 and +58 mutations, belonged to phylogenetic group D. A single strain classified in phylogenetic group D had a genetic framework similar to other AmpC overproducers (-88, -82, -18, -1 and +58).

Table 1. Phylogenetic groups and *ampC* promoter sequences for 55 *E. coli* strains overproducing AmpC

Number of strains	<i>ampC</i> promoter mutations ^a	Phylogenetic groups	MIC of ceftazidime (mg/L), range
1	-88 -82 -42 -18 -1 +31 +58	A	128
5	-88 -82 -42 -18 -1 +23 +58	A	16-64
5	-88 -82 -42 -18 -1 +32 +58	A	8-32
2	-88 -82 -42 -18 -1 <i>ins atten</i> (21) +58	A	8-32
2	-88 -82 -42 -18 -1 <i>ins atten</i> (34) +58	A	16
20	-88 -82 -42 -18 -1 +58	A	4-16
2	-88 -82 -61 -42 -18 -1 +58	A	8
1	-88 -82 -42 -18 -1 +31 +42 +58	A	4
1	-88 -82 -61 -42 -18 -7 -1 +58	A	4
1	-88 -82 -32 -18 -1 +5 +24 +58	A	64
4	-88 -82 -32 -18 -1 +58	A	1-4
3	-88 -82 -11 -18 -1 +58	A	0.5
5	-88 -82 -42 -18 -1 +58	B1	2-16
1	-73 -61 <i>ins</i> (-14) +24	B2	2
1	-88 -82 -61 -42 -18 -1 +31 +58	D	32
1	-32	D	0.5

ins atten, 1 bp insertion in the *ampC* attenuator.

Bold font indicates main mutations causing AmpC overproduction.

Underlining indicates genetic events (mutations or insertions) occurring in the *ampC* attenuator.

^aCompared with *ampC* promoter of *E. coli* K12.⁵

These polymorphisms were also detected in 13% of the *ampC* promoters from susceptible isolates (Table 2). The susceptible isolates with these -88, -82, -18, -1 and +58 mutations also belonged to non-virulent phylogenetic groups, particularly B1.

Among susceptible isolates, all B2 isolates presented polymorphisms at positions -73 (C→T) and +81 (G→A) in the *ampC* promoter, which were never detected in phylogenetic groups A or B1. In addition, the polymorphism at position -28 (G→A) occurred in 50% of susceptible isolates belonging to phylogenetic group B2. On the other hand, the single polymorphism at position +70 (C→T) was associated with phylogenetic group D.

VFs

The following step was the search for five selected VFs by multiplex PCR to characterize the virulence pattern of the 55 AmpC overproducers. Among the aerobactin system, the hydroxamate siderophore (*iucC*) was detected in 70% of the isolates (74% of the isolates from group A), but none of them, except the group B2 isolate, produced *sfa/foc* adhesin. Haemolysin was only detected in three strains (5%), one from phylogenetic group B2, one from group A and the another one from phylogenetic group B1; two of them were isolated from blood cultures. Finally, *papGH* and *papGHI* alleles were detected in three and two isolates, respectively, all of them being from phylogenetic group A, isolated from urine and presenting a -42 mutation in the *ampC* promoter.

Discussion

It has been demonstrated recently that fluoroquinolone-resistant *E. coli* isolates belonged to non-pathogenic phylogenetic group A or B1.^{4,5} Conversely, Pitout et al. have recently demonstrated that extended-spectrum β-lactamase producers mostly belong to group D and B2. In particular, CTX-M14-producing strains were more likely to belong to phylogenetic group D, although CTX-M15 strains mostly belonged to group B2.⁶

The study presented here showed that *E. coli* strains overproducing chromosomal AmpC were significantly more likely to belong to phylogenetic group A than susceptible isolates. Prevalence of the different phylogenetic groups in the 100 susceptible isolates was in perfect concordance with what is usually described for extraintestinal clinical isolates, i.e. a predominance of B2 isolates, and to a lesser extent group D isolates.⁵

The most frequent mutation leading to AmpC overproduction was located at position -42, creating a new displaced -35 box, modifying the *ampC* transcription start. This mutation was particularly associated with phylogenetic group A. Other genetic events responsible for AmpC overproduction occurred either in the -35 and -10 boxes, increasing the homology with the consensus TTGACA and TATAAT hexamers, or in the interbox sequence. In 35% of the strains, an additional genetic event modifying the *ampC* attenuator (positions +17 to +37 in the *ampC* gene) was detected. This hairpin structure is a transcriptional terminator for the fumarate-reductase operon located upstream of the *ampC* gene. The mutations in this structure are supposed to increase the transcription rate by decreasing the stability of the hairpin. However, Tracz et al.² have recently demonstrated by quantifying *ampC* transcripts that these mutations in the attenuator have a very mild impact on *ampC* transcription rate. To support this hypothesis, here we detected two susceptible isolates with mutations at positions +22 (C→T), +26 (T→G), +27 (A→T) and +32 (G→A) in the attenuator. Both belonged to phylogroup D. Among the resistant strains mutated in the attenuator, 17 out of 19 isolates belonged to phylogenetic group A (one D and one B2). It is interesting to notice that, in our study, the most resistant isolates (MIC of ceftazidime >16 mg/L) were always associated with a -42 or -32 mutation with a substitution in the attenuator. We cannot exclude that the destabilization can be different and the impact on transcription may vary, depending on the localization of the genetic event in the hairpin.

Phylogenetic groups of *E. coli* AmpC overproducers

Table 2. Comparison between phylogenetic groups and *ampC* promoter polymorphism in 100 susceptible and 55 resistant *E. coli* isolates

Phylogenetic group Number of strains (%)	<i>E. coli</i> susceptible isolates (n = 100)					<i>E. coli</i> resistant isolates (n = 55)				
	A	B1	B2	D	total	A	B1	B2	D	total
	13 (13)	10 (10)	66 (66)	11 (11)	100	47 (85)	5 (9)	1 (2)	2 (4)	55
Most frequent polymorphisms ^a										
-88 -82 -18 -1 +58	4	9	0	0	13	47	5	0	1	53
-73 -28 +17 +81	0	0	29	0	29	0	0	0	0	0
-73 +81	0	0	20	0	20	0	0	0	0	0
-73 +58 +63 +81	0	0	10	0	10	0	0	0	0	0
+70	0	0	0	6	6	0	0	0	0	0
No polymorphism	8	1	0	0	9	0	0	0	0	0
Others	1	0	7	5	13	0	0	1	1	2

^aCompared with *ampC* promoter of *E. coli* K12.⁶

None of the isolates had an insertion sequence in the *ampC* promoter, as recently described by Tracz *et al.*² in two clinical strains and one laboratory-selected strain.

An interesting point was that mutations responsible for AmpC overproduction were mostly associated with polymorphisms in the *ampC* gene at positions -88, -82, -18, -1 and +58.

The same polymorphisms were detected in 13% of the susceptible isolates, belonging only to phylogenetic group A or B1.

It has been demonstrated that fluoroquinolone-resistant phylogenetic group A isolates have a marked decrease of VFs. This is probably not due to a 'loss' of VFs during conversion from fluoroquinolone susceptibility to resistance, but more likely to the co-existence of two distinct populations, the less virulent being selected from the gut flora during fluoroquinolone treatment.⁹ It has been suggested that veterinary use of fluoroquinolones could play a role in the selection.

For AmpC overproducers, we confirmed the very low prevalence of the main VFs, in perfect concordance with what was expected for strains belonging to phylogenetic group A. Our results for VFs were in correlation with the data of Bingen-Bidois *et al.*⁵ *iacC* was the only VF ubiquitous in this group, detected in 70% of the isolates, compared with 55% of the group A isolates tested by Bingen-Bidois *et al.* *stx/loc* adhesin, frequent in B2 isolates, was absent in all the 47 isolates from phylogenetic group A tested here. Haemolysin was detected only in three isolates, two of them being from blood. It has been shown that haemolysin is most frequently produced by bacteraemia isolates.¹⁰

We can suspect that AmpC overproducers also represent a quite distinct population of *E. coli*, according to the polymorphisms detected by sequencing in the *ampC* promoter. The data on polymorphisms confirm that loss of virulence does not occur when the strains become resistant by cephalosporinase overproduction, but more probably it represents a distinct population from the virulent B2 isolates, characterized by a different genetic framework. As suggested by Pitout *et al.*⁸ for CTX-M producers, these various patterns reveal a complex evolutionary history for *E. coli* isolates.

It has been established that increased resistance linked with chromosomal mutations can have a biological cost for bacteria, resulting in reduced fitness without antibiotic selection. This

phenomenon has been particularly studied for mutations occurring in *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* for fluoroquinolone-resistant strains.¹¹ However, this loss of fitness could be cancelled by compensatory mutations in clinical isolates. It would be of particular interest to study the fitness of these isolates presenting various mutations or combinations of mutations in the *ampC* promoter.

Acknowledgements

This work was presented in part at the Seventeenth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Munich, Germany, 2007 (Abstract P1016).

Funding

This work was funded by the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche (UPRES-JE2437).

Transparency declarations

None to declare.

References

- Caroff N, Espaze E, Béard I *et al.* Mutations in the *ampC* promoter of *Escherichia coli* isolates resistant to oxyminocephalosporins without extended spectrum β -lactamase production. *FEMS Microb Lett* 1999; **173**: 459–65.
- Tracz DM, Boyd DA, Bryce E *et al.* *ampC* gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett* 2007; **270**: 265–71.
- Bingen-Bidois M, Clermont O, Bonacorsi S *et al.* Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect Immun* 2002; **70**: 3216–26.

4. Moreno E, Prats G, Sabaté M et al. Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 204–11.
5. Johnson JR, Kuskowski MA, O'Bryan TT et al. Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among *Escherichia coli* urine sample isolates from Israeli women with acute uncomplicated cystitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 26–31.
6. Jaurin B, Grundström T. *ampC* cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **78**: 4897–901.
7. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; **66**: 4555–8.
8. Pitout JD, Laupland KB, Church DL et al. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4667–70.
9. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA et al. Spontaneous conversion to quinolone and fluoroquinolone resistance among wild-type *Escherichia coli* isolates in relation to phylogenetic background and virulence genotype. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4739–44.
10. Bonacorsi S, Houdouin V, Mariani-Kurkdjian P et al. Comparative prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* causing urinary tract infection in male infants with and without bacteremia. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1156–8.
11. Komp Lindgren P, Marcusson LL, Sandvang D et al. Biological cost of single and multiple norfloxacin resistance mutations in *Escherichia coli* implicated in urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2343–51.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Escherichia coli est une bactérie très fréquemment rencontrée en microbiologie médicale. Elle est responsable de nombreuses infections. Elle demeure généralement sensible à de nombreux antibiotiques, y compris les β -lactamines. Cependant, certains isolats cliniques sont résistants par production de β -lactamases, soit acquises par l'intermédiaire d'éléments mobiles (plasmides, transposons...), soit produites naturellement. Chez *E. coli*, la céphalosporinase chromosomique AmpC diffère des autres β -lactamases chromosomiques de classe C puisque sa synthèse n'est pas inductible mais constitutive (Corvec *et al.*, 2002). En raison d'une régulation transcriptionnelle, la production de céphalosporinase AmpC dépend majoritairement de la force du promoteur du gène *ampC*. Naturellement, cette bactérie synthétise de très faibles quantités de cette enzyme, sans retentissement sur le phénotype de résistance des souches dites « sauvages ». Dans moins de 5% des cas, un certain nombre d'évènements peuvent conduire à une hyperexpression de la céphalosporinase naturelle, avec pour conséquence une résistance des souches à l'égard des β -lactamines, incluant les C3G, notamment la ceftazidime (Caroff *et al.*, 1999 et 2000 ; Corvec *et al.*, 2002 ; Tracz *et al.*, 2007).

La détermination du groupe phylogénétique et l'analyse de la production de différents facteurs de virulence chez des souches de *E. coli* hyperproductrices de céphalosporinase AmpC présentait un réel intérêt en raison de l'importance de *E. coli* comme agent d'infections communautaires ou nosocomiales et de la possible prescription des C3G pour leur traitement.

Lors de notre étude, les souches résistantes à la ceftazidime, par hyperproduction de céphalosporinase chromosomique appartenaient beaucoup plus fréquemment au groupe phylogénétique A, dit « commensal », que les souches sensibles. Parmi les souches sensibles, 66% des isolats appartenaient au groupe phylogénétique B2, et respectivement 13%, 11% et 10% aux groupes phylogénétiques A, D et B1. Ces résultats sont conformes à ceux retrouvés dans la littérature (Johnson *et al.*, 2001). En effet les souches de *E. coli* de groupe phylogénétique B2 sont plus fréquemment pathogènes mais demeurent en général relativement sensibles aux antibiotiques.

Parmi la cohorte de souches résistantes aux C3G, les mutations stratégiques aux positions -42, -32 et -11 ont été détectées au niveau du promoteur du gène *ampC*. La mutation en position -42, créant une nouvelle box -35, était la plus fréquente et conduisait à une hyperproduction de la céphalosporinase AmpC. Cette mutation était particulièrement liée au groupe phylogénétique A. Cinq isolats sur six présentant une mutation en position -32 au

niveau du promoteur et les trois isolats présentant une mutation en position -11 appartenaient également au groupe phylogénétique A. Cette prédominance du groupe phylogénétique A parmi les isolats de *E. coli* hyperproducteurs de la céphalosporinase chromosomique AmpC suggère une possible sélection *via* les antibiotiques au sein de la flore commensale digestive des patients fragiles.

Chez 35% des souches résistantes, une modification génétique supplémentaire a été détectée au niveau de l'atténuateur. Ces mutations intervenant dans la structure en « épingle à cheveux » sont supposées augmenter le taux de transcription du gène *ampC* en permettant une meilleure fixation de l'ARN polymérase. Cependant, Tracz *et al.* ont récemment montré que ces mutations au niveau de l'atténuateur ont un impact moindre sur le taux de synthèse de la céphalosporinase AmpC (Tracz *et al.*, 2007). Parmi les souches résistantes présentant une mutation au sein de l'atténuateur, 17 des 19 isolats appartenaient aussi au groupe phylogénétique A. Il est également intéressant de noter que, dans notre étude, les souches résistantes avec les CMI de ceftazidime les plus élevées étaient toujours associées aux mutations en positions -42 ou -32 avec une substitution au sein de l'atténuateur. La déstabilisation de la structure en « épingle à cheveux » pourrait dépendre de la localisation de l'évènement génétique, et donc influencer sur le taux de transcription du gène *ampC*.

Les différentes mutations responsables de l'hyperproduction de la céphalosporinase AmpC étaient fréquemment associées au polymorphisme génétique aux positions -88, -82, -18, -1, et +58 du gène *ampC*. Cette trame génétique caractéristique a été détectée chez 13% des promoteurs du gène *ampC* des souches sensibles. Il est intéressant de noter que ces souches appartenaient soit au groupe phylogénétique A, soit au groupe phylogénétique B1. Ce polymorphisme génétique avait déjà été rapporté lors de plusieurs études en 2000 et 2002 (Caroff *et al.*, 2000 ; Corvec *et al.*, 2002). Il semble donc que les mutations stratégiques au sein du promoteur du gène *ampC*, responsables d'une augmentation de production de la céphalosporinase AmpC, surviennent au sein d'une trame génétique définie (mutations en positions -88, -82, -18, -1, et +58), et qu'il pourrait suffire d'une unique mutation additionnelle pour conférer à ces isolats de *E. coli* un phénotype hyperproducteur avec une résistance à l'égard des C3G.

Ces résultats expérimentaux ont permis de mettre en évidence une relation étroite entre le groupe phylogénétique A dit « commensal », et le phénotype hyperproducteur de céphalosporinase chromosomique. Ce phénotype pourrait représenter une population distincte des souches virulentes de groupe phylogénétique B2. Ces isolats, souvent dépourvus des

facteurs de virulence principaux, sont détectés essentiellement chez des patients hospitalisés et fragilisés (Bingen-Bidois *et al.*, 2002). La pression de sélection répétée, exercée par les antibiotiques sur ces souches commensales, pourrait expliquer l'émergence de ces souches. Les événements génétiques produits (mutations, insertions ou délétions), détectés au niveau du promoteur du gène *ampC*, conduisent à une hyperproduction de céphalosporinase AmpC et donc à des souches résistantes. En 2008, Mammeri *et al.* ont analysé des isolats de *E. coli* résistants par production d'une β -lactamase de type AmpC, chromosomique ou plasmidique. La majorité des souches, de groupes phylogénétiques A et B1, étaient de sensibilité diminuée aux céphalosporines à spectre élargi, et synthétisaient, soit une céphalosporinase chromosomique AmpC à spectre élargi (ESAC pour extended-spectrum AmpC), soit une céphalosporinase plasmidique. Certaines possédaient des mécanismes de résistance combinés. Ces travaux ont souligné l'évolution de la résistance aux C3G chez le colibacille par hyperproduction de céphalosporinase AmpC et l'émergence des β -lactamases de type ESAC, conduisant à des difficultés de traitement des infections produites par ces souches dans les hôpitaux.

Dans une étude menée par Lepelletier *et al.* en 2006, il a été démontré que l'exposition de patients hospitalisés aux β -lactamines, en particulier l'amoxicilline-acide clavulanique et les C3G, était significativement associée à la résistance à la ceftazidime. Les prescriptions d'amoxicilline-acide clavulanique en ville ou en début d'hospitalisation contribuaient au déséquilibre de la flore intestinale, sélectionnant des bactéries de la flore sous-dominante, laissant apparaître des souches naturellement plus résistantes, et pouvant devenir résistantes à la ceftazidime par exposition aux C3G, habituellement prescrites plus tardivement lors de l'hospitalisation. De même, l'exposition des patients aux fluoroquinolones (FQ) était significativement associée à la résistance à l'ofloxacine. En effet, le service d'urologie avait la plus forte proportion de patients exposés aux FQ et présentait le taux de résistance aux FQ le plus élevé chez les isolats de *E. coli*. Par ailleurs, l'équipe de Johnson a démontré que les isolats résistants aux FQ de groupe phylogénétique A possédaient beaucoup moins de facteurs de virulence que les souches sensibles aux FQ (Johnson *et al.*, 2005). Ce n'est probablement pas dû à une « perte » de facteurs de virulence mais plutôt à une coexistence de deux populations distinctes, la moins virulente étant sélectionnée au sein de la flore intestinale pendant le traitement par FQ. Récemment, il a été démontré que des isolats de *E. coli* uropathogènes résistants aux FQ appartenaient également majoritairement aux groupes phylogénétiques « non pathogènes » A et B1 (Moreno *et al.*, 2006). Ces souches présentaient également peu de facteurs de virulence. A l'inverse, Pitout *et al.* ont constaté que des souches de *E. coli* productrices de BLSE isolées au Canada appartenaient pour la plupart aux groupes

phylogénétiques B2 et D. Plus précisément, les souches productrices de l'enzyme CTX-M14 appartenait majoritairement au groupe phylogénétique D, alors que les souches productrices de CTX-M15 étaient davantage du groupe phylogénétique B2. L'antibiothérapie doit donc être judicieusement prescrite, notamment à l'hôpital où la pression de sélection par les antibiotiques et les caractéristiques du patient (immunodépression, sonde à demeure,...) constituent des facteurs de risque importants de sélection de souches résistantes.

Trente-cinq souches de *E. coli* hyperproductrices de céphalosporinase AmpC sur 55 (soit 63,6%) étaient isolées d'urines de patients hospitalisés au C.H.U. de Nantes. La prévalence importante de *E. coli* en tant qu'agent responsable d'infections urinaires ainsi que la grande fréquence d'apparition de ces infections, que ce soit en milieu communautaire ou hospitalier, impose un suivi rigoureux de l'évolution de la résistance aux antibiotiques de cet agent pathogène, notamment son comportement vis-à-vis des β -lactamines et des FQ, ce qui a été institué au niveau européen en 1998 grâce au réseau EARSS. Concernant les FQ, la situation est préoccupante car la consommation a augmenté de près de 15% en France depuis 2002 (Guillemot *et al.*, 2008), et le taux de souches de *E. coli* résistantes aux FQ a progressé d'environ 7%, passant de 8,2% en 2002 à 14,8% en 2007 (<http://www.rivm.nl/earss/database/>). Ces évolutions épidémiologiques ont des répercussions sur l'utilisation des antibiotiques en ville comme à l'hôpital, nécessitant, de la part de tous les professionnels de santé, une promotion d'un usage raisonné et mieux adapté.

Dès les années 1950, parallèlement au développement de l'antibiothérapie chez l'Homme, les antibiotiques ont été utilisés chez l'animal. En 1997, la consommation des antibiotiques atteignait 100 000 tonnes par an en Europe, quantité presque également répartie entre consommation humaine et usage vétérinaire (Laval, 2000). Chez l'animal, l'usage des antibiotiques pouvait être de deux natures: soit comme molécule anti-infectieuse, soit en tant que facteur de croissance. Depuis le 1^{er} janvier 2006, l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance dans les aliments pour animaux est interdite. Les bactéries isolées chez les animaux et celles isolées chez l'Homme, qu'elles soient infectantes ou colonisantes, partagent les mêmes mécanismes de résistance, témoignant d'une absence d'étanchéité entre le monde animal et les populations humaines. Il existe donc un risque de transfert de bactéries résistantes ou de gènes de résistance de bactéries d'origine animale à celles d'origine humaine, et réciproquement. Plusieurs mécanismes de transmission existent : *via* la chaîne alimentaire, *via* l'environnement, ou *via* le contact direct avec les animaux (Bouchardon *et al.*, 2006). Le risque de transmission d'un mécanisme de résistance d'une bactérie isolée chez un animal à l'Homme est variable et dépend de différents facteurs intervenant dans ce processus

(nombre d'animaux traités, type d'antibiotique et modalités d'utilisation) (Faye, 2005). Des gènes de résistance, portés par des éléments mobiles pouvant être impliqués dans la diffusion de la résistance entre l'animal et l'Homme, ont été décrits chez des souches de *Salmonella* spp. ou de *E. coli* isolées en médecine humaine et en élevage. Bien que différentes mesures aient été prises au fil des années, il existe un risque de Santé Publique, qui doit conduire à une meilleure utilisation des antibiotiques dans les filières d'élevage mais aussi dans le monde médical (Laval, 2000).

Le pharmacien d'officine est un acteur privilégié de la politique du bon usage des antibiotiques de part sa proximité avec les patients. Il veille au respect de la posologie, de la durée de traitement et prévient des éventuels effets indésirables ainsi que de la façon de les atténuer voire de les éviter. Par ailleurs, il peut conseiller des mesures hygiéno-diététiques, parfois suffisantes pour diminuer le risque d'infections urinaires. Ce rôle d'éducateur de la Santé Publique lui permet également de détecter les mauvaises habitudes prises par certains patients et de les rectifier, en communiquant, grâce à ses connaissances, sur les risques d'un mésusage des antibiotiques contribuant à l'émergence de la résistance.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Lors de notre étude, les souches résistantes par hyperproduction de céphalosporinase chromosomique AmpC sélectionnées étaient majoritairement de groupe phylogénétique A et possédaient peu de facteurs de virulence. Les mutations en positions -42, -32 et -11, responsables de l'augmentation de la production de la céphalosporinase chromosomique AmpC étaient fréquemment associées avec un polymorphisme génétique présent aux positions -88, -82, -18, -1 et +58 par rapport à la séquence de référence de *E. coli* K₁₂. A l'inverse, parmi les 100 souches sensibles utilisées comme témoins, cette même trame génétique a été détectée chez 13 promoteurs du gène *ampC*, de souches appartenant soit au groupe phylogénétique A, soit au groupe B1.

Quels sont alors les contextes et les modalités d'émergence de ces isolats de *E. coli* hyperproducteurs de céphalosporinase chromosomique AmpC ?

Les souches sensibles aux β -lactamines de groupe phylogénétique A ou B1 pourraient constituer un excellent réservoir au sein des flores commensales humaines ou animales. Elles constituent également d'excellents candidats pour évoluer vers la résistance, suscitant des problèmes infectieux et thérapeutiques potentiellement importants, compte tenu de la fréquence des infections à *E. coli*, tant en milieu communautaire qu'à l'hôpital.

L'analyse de la littérature révèle une dichotomie entre les souches communautaires, généralement sensibles et avec de nombreux facteurs de virulence, et les souches hospitalières, généralement résistantes aux antibiotiques avec peu de facteurs de virulence, comme nous l'avons confirmé.

Afin de répondre aux deux hypothèses, sélection *in vivo* au sein des flores sous pression de sélection par les antibiotiques et/ou impact des souches isolées chez les animaux *via* l'alimentation, les perspectives de ce travail nécessitent d'envisager :

- 1- de déterminer la fréquence de mutation des souches de *E. coli* de phénotype sauvage présentant des caractéristiques de groupe phylogénétique et de polymorphisme du promoteur du gène *ampC* différents ;
- 2- de caractériser les mutants, certaines mutations apparaissent-elles préférentiellement en fonction de la trame génétique pré-existante ?
- 3- de déterminer l'impact de ces mutations par des études de compétition bactérienne : « fitness » bactérien ou coût biologique ?
- 4- enfin, d'analyser par typage moléculaire l'éventuelle appartenance à un complexe clonal de ces souches de *E. coli* de groupe phylogénétique A, sensibles ou résistantes, présentant le même polymorphisme génétique au sein du promoteur du gène *ampC*.

L'ensemble des résultats devrait permettre d'établir un lien entre l'antibiothérapie et les conditions d'apparition des bactéries résistantes. L'émergence de la résistance aux antibiotiques est un effet secondaire d'une antibiothérapie plus ou moins bien adaptée. A la différence d'autres effets secondaires bien connus des pharmaciens d'officine (toxicité, allergie, troubles digestifs...), qui n'ont que des conséquences individuelles à court terme, l'effet d'un usage non raisonné des antibiotiques sur la résistance concerne toute la collectivité et peut se manifester à distance dans le temps. On parle alors de véritable « impact écologique » sur les flores commensales. Les résistances bactériennes menacent en effet l'efficacité des traitements et de plus en plus d'infections bactériennes, même banales comme les infections urinaires à *E. coli*, relèvent d'un nombre limité d'antibiotiques.

Aujourd'hui, le pharmacien d'officine est un acteur clé de la prévention. Il doit informer et communiquer aux patients l'intérêt d'un usage approprié et raisonné des antibiotiques afin de préserver l'efficacité de ces médicaments. La dispensation de traitements antibiotiques et les conseils hygiéno-diététiques pour les infections urinaires non compliquées de la femme de moins de 65 ans constitue un acte quotidien à l'officine.

BIBLIOGRAPHIE

- Ambler R. P. 1980. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **289**:321-331.
- Andremont A. 2003. Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. *ASM News.* **69**:601-607.
- Andremont A., Cohen R., Drugeon H. 2004. How can antibiotics' capacity of selecting bacterial resistance be assessed. *Med. Mal. Infect.* **34**:109-111.
- Baraduc R., Darfeuille-Michaud A., Forestier C., Jallat C., Joly B. and Livrelli V. 2000. *Escherichia coli* et autres *Escherichia*, *Shigella*. In : Précis de bactériologie clinique. Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. Editions ESKA 2000. 1115-1126.
- Bergström S., Lindberg F.P., Olsson O. and Normark S. 1983. Comparison of the overlapping *frd* and *ampC* operons of *Escherichia coli* with the corresponding DNA sequences in other Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **155**:1297-1305.
- Beutel B., Record M.T. 1990. *E. coli* promoter spacer regions contain non-random sequences which correlate to spacer length. *Nucleic Acids Res.* **18**:3597-3603.
- Bhavnani S.M., Ambrose P.G., Craig W.A., Dudley M.N., Jones R.N. 2006. Outcomes evaluation of patients with ESBL- and non-ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species as defined by CLSI reference methods : report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn. Microbiol. Infect Dis.* **54**:231-236.
- Bingen E., Picard B., Brahimi N., Mathy S., Desjardins P., Elion J., and Denamur E. 1998. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J. Infect. Dis.* **177**:642-650.
- Bingen E., Bonacorsi S. 2005. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitidis. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**:373-381.
- Bingen-Bidois M, Clermont O., Bonacorsi S., Terki M., Brahimi N., Loukil C., Barraud D. and Bingen E. 2002. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect. Immun.* **70**:3216-3226.
- Bouchardon A., Brisabois A., Chaslus-Dancla E., Colin P., Dabernat H., Guillemot D., Leclercq R., Mégraud F., Schlemmer B. et Toutain P.L. 2006. Section III : Diffusion de la résistance à l'Homme et conséquences pour la santé publique. Dans : Rapport de l'AFFSA 2006 : Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. <http://fulltext.bdsp.ehesp.fr/Afssa/Rapports/2006/35821-35822.pdf?0XJM3-33G60-JXGD3-X6XJK-34333>
- Boyd E.F. and Hartl D.L. 1998. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *J. Bacteriol.* **180**:1159-1165.

Bradford P.A. 2001. Extended Spectrum β -Lactamases in the 21st century : characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:933-951.

Bush K., Jacoby G.A. and Medeiros A.A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1211-1233.

Caisse Nationale d'Assurance Maladie. 2008. Communiqué de presse – Programme Antibiotiques : un premier cap est franchi, la mobilisation pour le bon usage doit se poursuivre. http://www.ameli.fr/fileadmin/user_upload/documents/DP_Antibiotiques_10-01-2008.pdf

Calbo E., Romani V., Xercavins M., Gomez L., Vidal C.G., Quintana S., Vila J., and Garau J. 2006. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**:780-783.

Caroff N., Espaze E., Berard I., Richet H. and Reynaud A. 1999. Mutations in the *ampC* promoter of *Escherichia coli* isolates resistant to oxyiminocephalosporins without extended spectrum β -Lactamase production. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**:459-465.

Caroff N., Espaze E., Gautreau D., Richet H. and Reynaud A. 2000. Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:783-788.

Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of *E. coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4555-4558.

Coignard B., Thiolet J.M., Lacavé L. 2007. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, juin 2006. Résultats préliminaires, janvier 2007. http://www.invs.sante.fr/publications/2007/enp2006_resultats_preliminaires/enp_2006_resultats_preliminaires.pdf

Cole S.T. 1984. Molecular and genetic aspects of the fumarate reductase of *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* **12**:237-238.

Corvec S., Caroff N., Espaze E., Marraillac J., and Reynaud A. 2002. -11 mutation in the *ampC* promoter increasing resistance to β -lactams in a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3265-3267.

Davin-Regli A., Monnet D., Saux P., Bosi C., Charrel R., Barthelemy A., and Bollet C. 1996. Molecular epidemiology of *Enterobacter aerogenes* acquisition : one-year prospective study in two intensive care units. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1474-1480.

Direction Générale de la Santé. 2001. Plan national pour préserver l'efficacité des antibiotiques. <http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/antibio/sommaire.htm>

Direction Générale de la Santé. 2006. Bilan du Plan pour préserver l'efficacité des antibiotiques 2001-2005. http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/plan_antibio_2001/bilan_plan.pdf

Drlica K. 2003. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:11-17.

Duriez P., Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E., Chaventré A., Elion J., Picard B. and Denamur E. 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiol.* **6**:1671-1676.

EARSS : cartes. <http://www.rivm.nl/earss/database/>

EARSS : bilan 2006. http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202006%20Def_tcm61-44176.pdf

Faye K. 2005. Current position in veterinary use of antibiotics: impact on antibiotic resistance of bacteria in animal and human health. *Antibiotiques.* **7**:47-52.

Ferech M., Coenen S., Malhotra-Kumar S., Dvorakova K., Hendrickx E., Suetens C. and Goossens H. 2006. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) : outpatient antibiotic use in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:401-407.

Ferech M., Coenen S., Dvorakova K., Hendrickx E., Suetens C. and Goossens H. 2006. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) : outpatient penicillin use in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:408-412.

Goossens H., Guillemot D., Ferech M., Schlemmer B., Costers M., Van Breda M., Baker L.J., Cars O. and Davey P.G. 2006. National campaigns to improve antibiotic use. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **62**:373-379.

Guillemot D. 2001. How to evaluate and predict the epidemiologic impact of antibiotic use in humans : the pharmacoepidemiologic approach. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**:19-23.

Guillemot D., Maugendre P., Chauvin C., Sermet C. 2004. Consommation des antibiotiques en France. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 2004.* **32-33**:144-147.

Guillemot D. and Leclercq R. 2005. Impact de l'exposition des populations sur le risque de résistance bactérienne. *Med. Mal. Infect.* **35**:212-220.

Guillemot D., Boëlle P.Y. and Bernède-Bauduin C. 2008. Evolution de la consommation d'antibiotiques en ville (2002-2007) : objectif quasiment atteint.

http://www.ameli.fr/fileadmin/user_upload/documents/DP_Antibiotiques_10-01-2008.pdf

Hacker J., Blum-Oehler G., Mühldorfer I., Tschäpe H. 1997. Pathogenicity island of virulent bacteria : structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**:1089-1097.

Herzer P.J., Inouye S., Inouye M., and Whittam T.S. 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:6175-6181.

Howard A., Magee J.T., Fitzgerald K.A., Dunstan F.D. 2001. Factors associated with antibiotic resistance in coliform organisms from community urinary tract infection in Wales. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:305-313.

Huovinen P., Sundström L., Swedberg G., Sköld O. 1995. Trimetoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:279-289.

Ilots de pathogénicité (PAIs) : www.unice.fr/inserm-toxin-bacteria/master%20present%202.pdf

Institut National de Recherche Pédagogique :

<http://www.inrp.fr/Acces/biotic/biomol/techgen/html/schempcr.htm>

Jacobs C., Frere J.M. and Normak S. 1997. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible β -Lactam resistance in Gram-negative bacteria. *Cell.* **88**:823-832.

Jacoby G.A., Munoz-Price L.S. 2005. The new β -lactamases. *N. Engl. J. Med.* **352**:380-391.

Jauréguy F. 2007. Apport de la génomique dans les sepsis à *E. coli*.

http://www.outcomerea.org/AVConf/CMI_ECOLI_19JUN2007/Genomique_et_E_COLI/Presentation_Files/index.html

Jaurin B., Grunström T., Edlund T., Normark S. 1981. The *E. coli* β -lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature.* **290**:221-225.

Jaurin B., Grunström T. and Normark S. 1982. Sequence elements determining *ampC* promoter strength in *Escherichia coli*. *Embo. J.* **7**:875-881.

Jehl F., Chomar M., Weber M. and Gérard A. 2003. De l'antibiogramme à la prescription. 2^{ème} édition. Editions Biomérieux.

Jensen C.S. and Walter S. 2007. Urinary tract infections : occurrence, causes and prevention. *Ugeskr. Laeger.* **169**:4265-4268.

Johnson J.R., O'Bryan T.T., Kuskowski M., Maslow J.N. 2001. Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and *papA* alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. *Infect. Immun.* **69**:5363-5374.

Kahlmeter G. 2000. The ECO SENS Project : a prospective, multinational, multicentre epidemiological survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens-interim report. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**,Suppl S1,15-22.

Kahlmeter G., Menday P., and Cars O. 2003. Non-hospital antimicrobial usage and resistance in community-acquired *Escherichia coli* urinary tract infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:1005-1010.

Komp Lindgren P., Marcusson L.L., Sandvang D. *et al.* 2005. Biological cost of single and multiple norfloxacin resistance mutations in *Escherichia coli* implicated in urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2343-2351.

Lartigue M.F., Poirel L., Poyart C., Réglie-Poupet H., Nordmann P. 2007. Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* **13**:315-317.

Laval A. 2000. Veterinary use of antibiotics and resistance in man: what relation? *Pathol. Biol.* **48**:940-944.

Lepelletier D. 2006. Thèse d'Université. Rôle de l'antibiothérapie et des facteurs liés à l'hôte et à l'hospitalisation sur le risque de colonisation et d'infection par des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Lepelletier D., Caroff N., Riochet D., Bizouarn P., Bourdeau A., Le Gallou F., Espaze E., Reynaud A. and Richet H. 2006. Risk-factors for gastro-intestinal colonisation with resistant Enterobacteriaceae among hospitalised patients : a prospective study. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:974-979.

Livermore D.M., Canton R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini G.M., Arlet G., Ayala J., Coque T.M., Kern-Zdanowicz I., Luzzaro F., Poirel L. and Woodford N. 2007. CTX-M : changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:165-174.

Low A.S., McKenzie F.M., Gould I.M., and Booth I.R. 2001. Protected environments allow parallel evolution of a bacterial pathogen in a patient subjected to long-term antibiotic therapy. *Mol. Microbiol.* **42**:619-630.

Mainardi J.L. and Gutmann L. 1998. Mechanisms underlying resistance of the bacteria responsible for nosocomial infections. *Pathol. Biol.* **46**:253-260.

Mammeri H, Van De Loo M., Poirel L., Martinez-Martinez L. and Nordmann P. 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:71-76.

Mammeri H., Poirel L., Fortineau N., Nordmann P. 2006. Naturally occurring extended-spectrum cephalosporinases in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2573-2576.

Mammeri H., Eb F., Berkani A., Nordmann P. 2008. Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered in a French hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:498-503.

Medqual : <http://www.medqual.fr/pro/admin.php>

Monnet D.L. 2000. Consommation d'antibiotiques et résistance bactérienne. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.* **19**:409-417.

Moreno E., Prats G., Sabaté M. *et al.* 2006. Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**:204-211.

NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

Njissen S., Florijn A., Bonten M.J., Schmitz F.J., Verhoef J., Fluit A.C. 2004. β -lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European *Enterobacteriaceae* isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **24**:585-591.

Ochman H. and Selander R.K. 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* **157**:690-693.

Olsson O., Bergström S. and Normark S. 1982. Identification of a novel *ampC* β -Lactamase promoter in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Embo. J.* **1**:1411-1416.

Olsson O., Bergström S., Lindberg F.P. and Normark S. 1983. AmpC β -Lactamase hyperproduction in *Escherichia coli* : natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from *Shigella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:7556-7560.

ONERBA : Résistance aux antibiotiques : des chiffres de l'ONERBA au bon usage
<http://www.infectiologie.com/public/congres/2005/CP/cp5-1-delarbre.pdf>

Orskov F. 1986. *Escherichia*. In : Bergey's manual of systematic Bacteriology. Vol 1. N.R. Krieg, Hold J.G.

PCR, étapes : <http://www.inrp.fr/Access/biotic/biomol/techgen/html/schempcr.htm>

Picard B., Garcia J.S., Gouriou S., Duriez P., Brahimi N., Bingen E., Elion J., and Denamur E. 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* **67**:546-553.

Poirel L., Héritier C., Spicq C., Nordmann P. 2004. *In vivo* acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3831-3.

Pradier C., Bernède C., Martel P., Boelle P.Y., Guillemot D. 2004. Evolution de la consommation d'antibiotiques en ville : résultats 2004. <http://www.infectiologie.com/public/congres/2005/CT/CT11-2-pradier.pdf>

Priest P., Yudkin P., McNulty C., Mant D. 2001. Antibacterial prescribing and antibacterial resistance in English general practice : cross sectional study. *BMJ.* **323**:1037-1041.

Nom – Prénoms : PRODHOMME Adèle Laure Anne

Titre de la thèse : Sensibilité diminuée de *Escherichia coli* aux céphalosporines de 3^{ème} génération : étude génétique et corrélation avec l'utilisation des β -lactamines en thérapeutique

Résumé de la thèse :

La présence de certaines mutations au niveau du promoteur situé en amont du gène *ampC* entraîne une hyperexpression de la céphalosporinase chromosomique AmpC, induisant un haut niveau de résistance vis-à-vis de nombreuses β -lactamines, incluant les céphalosporines de 3^{ème} génération. Nous avons étudié comparativement un panel de 100 souches de *E. coli* sensibles à toutes les β -lactamines avec 55 isolats cliniques de *E. coli* hyperproducteurs de la céphalosporinase AmpC, de façon à déterminer le groupe phylogénétique de ces souches, comparer le polymorphisme génétique de la région promotrice du gène *ampC*, et à détecter chez les souches résistantes, la présence ou l'absence de cinq facteurs de virulence représentatifs de la pathogénicité de *E. coli*. Les souches hyperproductrices de céphalosporinase AmpC appartenaient beaucoup plus fréquemment au groupe phylogénétique A que les souches sensibles et présentaient une trame génétique caractéristique avec un polymorphisme aux positions -88, -82, -18, -1 et +58, par rapport à la séquence de référence de *E. coli* K₁₂. Par ailleurs, les souches sensibles présentant ce même polymorphisme appartenaient également au groupe phylogénétique A, et pourraient constituer un réservoir au sein de la flore digestive et être d'excellents candidats pour évoluer vers la résistance.

MOTS CLÉS : *Escherichia coli*, céphalosporinase chromosomique AmpC, β -lactamine, groupe phylogénétique, génétique

JURY :

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

ASSESEURS : M. Stéphane CORVEC, Maître de Conférences de Bactériologie, Faculté de Médecine Nantes

Mme Nicole GRIMAUD, Maître de Conférences de Pharmacologie, Faculté de Pharmacie Nantes

Mme Isabelle HOUIS, Docteur en Pharmacie

Adresse de l'auteur : 2 rue Paul Cézanne 44110 Châteaubriant