

ANNÉE 2003

**MÉMOIRE DU DIPLÔME
D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 18 juin 2003

Par Pascale RAUD

Conformément aux dispositions de l'Arrêté
du 10 Septembre 1990, tient lieu de :

THÈSE

Pour le

DIPLÔME D'ÉTAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Etude de la diversité génétique des souches de *Klebsiella pneumoniae*
productrices de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE),
isolées au C.H.U de Nantes, de 1990 à 2001.**

JURY

Président : M. le Professeur A. REYNAUD.
Directeur de Thèse : Mme le Docteur N. CAROFF.
Membres du Jury : M. le Professeur P. LUSTENBERGER.
M. le Docteur E. ESPAZE.
M. le Docteur D. BOUTOILLE.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	8
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES PHOTOS	11
INTRODUCTION.....	12
<u>Première partie</u> : GÉNÉRALITÉS	14
1- Résistance des entérobactéries aux bêta-lactamines	15
1.1- Différents mécanismes de résistance aux bêta-lactamines.....	15
1.1.1- Imperméabilité	15
1.1.2- Modification des PLP.....	15
1.1.3- Production de bêta-lactamases.....	15
1) Mécanisme de l'inactivation enzymatique.....	15
2) Classification des bêta-lactamases.....	16
1.2- Support génétique de la résistance	17
1.2.1- Résistance par mutation chromosomique.....	18
1.2.2- Résistance par acquisition de matériel génétique exogène.....	18
1) Plasmides.....	18
<i>A- Structure et propriétés générales.....</i>	18
<i>B- Fonctions physiologiques.....</i>	18

<i>C- Autres implications</i>	19
2) Transposons.....	19
3) Intégrons.....	21
<i>A- Définition</i>	21
<i>B- Structure des intégrons</i>	21
<i>C- Structure des cassettes</i>	22
<i>D- Mouvement des cassettes</i>	23
<i>E- Expression des cassettes</i>	24
<i>F- Nature des cassettes</i>	24
4) Mécanismes de transfert du matériel génétique.....	25
<i>A- Transformation</i>	25
<i>B- Transduction</i>	25
<i>C- Transposition</i>	26
<i>D- Conjugaison</i>	27
2- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
2.1- Ecologie - habitat.....	31
2.2- Morphologie et principaux caractères biochimiques.....	31
2.3- Caractères cultureux.....	32
2.4- Pouvoir pathogène.....	32
2.4.1- Modes de transmission.....	32
2.4.2- Facteurs de risque des infections nosocomiales à <i>K. pneumoniae</i>	33
2.4.3- Pouvoir pathogène.....	34
1) Infections bronchopulmonaires.....	34
2) Infections urinaires.....	34

3) Bactériémies et septicémies.....	34
4) Autres infections.....	35
2.5- Facteurs de Virulence.....	35
2.5.1- Capsule bactérienne.....	35
1) Adhérence.....	36
2) Immunité non spécifique.....	36
3) Immunité spécifique.....	36
2.5.2- Pili (fimbriae).....	36
1) Pili de type 1.....	36
2) Pili de type 3.....	37
3) Autres types d'adhésines.....	37
2.5.3- Sidérophores.....	37
2.5.4- Résistance aux facteurs bactéricides du sérum et lipopolysaccharide.....	37
2.6- Résistance aux antibiotiques.....	38
2.6.1- Résistance naturelle.....	38
2.6.2- Résistance acquise.....	39
1) Pénicillinases plasmidiques.....	39
A- <i>Activité des BLSE</i>	41
B- <i>Principales BLSE rencontrées chez K. pneumoniae</i>	41
C- <i>Epidémiologie des BLSE</i>	45
2) Céphalosporinases plasmidiques.....	46
3) Autres phénotypes de résistance.....	46
2.7- Epidémiologie.....	48
2.7.1- Notions générales	48

2.7.2- Méthodes de typage.....	49
1) Techniques phénotypiques.....	49
A- Biotypage.....	49
B- Antibiogramme.....	49
C- Sérotypie.....	49
D- Autres méthodes phénotypiques.....	50
2) Techniques génotypiques.....	50
A- Analyse plasmidique.....	50
B- Profil de restriction génomique.....	51
C- Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN chromosomique.....	51
D- Electrophorèse en champ pulsé.....	51
E- Polymerase Chain Reaction (PCR).....	51
<u>Seconde partie</u> : MATÉRIEL ET MÉTHODES	54
1- Souches bactériennes.....	55
2- Etude de la sensibilité aux antibiotiques	56
3- Etude du transfert de résistance par conjugaison bactérienne.....	56
4- Mise en évidence de la production de bêta-lactamase à spectre étendu	56
4.1- Méthodes phénotypiques	57
4.1.1- Test de synergie en croix	57
4.1.2- Test OXOID	58
4.2- Méthodes génotypiques : amplification par PCR et séquençage du gène <i>bla</i> _{TEM}	59
4.2.1- Principe	59
4.2.2- Réalisation pratique	59

4.2.3- Détection des produits d'amplification	60
4.2.4- Séquençage des produits de PCR.....	60
5- Typage des souches par électrophorèse en champ pulsé (ECP)	61
5.1- Principe	61
5.2- Réalisation pratique	62
5.2.1- Lyse et extraction de l'ADN	62
5.2.2- Restriction et électrophorèse	62
5.2.3- Révélation des profils de macrorestriction	63
5.2.4- Interprétation des profils de restriction	63
6- Isolement et étude des plasmides extraits des transconjugants.....	65
6.1- Extraction de l'ADN plasmidique.....	65
6.1.1- Principe	65
6.1.2- Réalisation pratique	65
1) Extraction à l'aide du kit Nucleobond.....	65
2) Méthode d'Ish-Horowicz et Burke.....	67
6.2- Etude des plasmides extraits des transconjugants.....	68
6.2.1- Principe	68
6.2.2- Réalisation pratique	68
7- Isoélectrofocalisation des bêta-lactamases des transconjugants.....	69
7.1- Principe	69
7.2- Réalisation pratique	69
7.2.1- Extraction des bêta-lactamases	69
7.2.2- Détermination du point isoélectrique des bêta-lactamases	70

Troisième partie : RÉSULTATS	72
1- Répartition des souches de <i>K. pneumoniae</i> étudiées	73
1.1- Répartition par prélèvements	73
1.2- Répartition par unités fonctionnelles	73
1.3- Répartition annuelle	74
2- Etude du comportement à l'égard des antibiotiques	75
2.1- Sensibilité aux bêta-lactamines	75
2.2- Sensibilité aux aminosides	77
2.3- Sensibilité aux autres antibiotiques	77
3- Mise en évidence de la production de BLSE par techniques phénotypiques et génotypiques.....	82
3.1- Détection phénotypique	82
3.2- Détection génotypique	82
4- Typage des souches par électrophorèse en champ pulsé (ECP).....	83
5- Transfert de résistance par conjugaison bactérienne	86
5.1- Transfert de la résistance aux bêta-lactamines.....	86
5.1.1- Résultats des antibiogrammes	86
5.1.2- Mise en évidence de la production de BLSE	89
1) Test de synergie en croix	89
2) Test OXOID	89
5.1.3- Etude du pI des BLSE acquises par les transconjugants.....	90
5.1.4- Séquençage du gène codant la BLSE extraite du transconjugant Tc/Kp2.....	91
5.2- Transfert de la résistance aux aminosides	91
5.3- Transfert de la résistance aux autres familles d'antibiotiques	91
6- Profils de restriction plasmidiques	94

<u>Quatrième partie : DISCUSSION</u>	97
<u>CONCLUSION</u> :.....	103
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> :.....	105

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> :	Classification des bêta-lactamases, selon Ambler.....	17
<u>Tableau II</u> :	Principales bêta-lactamases à spectre étendu de type TEM rencontrées chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	43
<u>Tableau III</u> :	Principales bêta-lactamases à spectre étendu de type SHV rencontrées chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	44
<u>Tableau IV</u> :	Origine des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> étudiées.....	55
<u>Tableau V</u> :	Conséquences des événements génétiques sur les profils de restriction obtenus par électrophorèse en champ pulsé.....	64
<u>Tableau VI</u> :	Bêta-lactamases de référence utilisées pour la détermination du point isoélectrique des bêta-lactamases à spectre étendu par isoélectrofocalisation.....	71
<u>Tableau VII</u> :	Concentrations minimales inhibitrices (CMI - mg/L) obtenues pour le céfotaxime et la ceftazidime, par le système Vitek2 [®] (bioMérieux), et interprétation correspondante, pour les 32 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ..	76
<u>Tableau VIII</u> :	Phénotypes de résistance aux aminosides des 32 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	77
<u>Tableau IX</u> :	Comportement à l'égard des antibiotiques des 32 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Kp) : résultat de l'antibiogramme automatisé Vitek2 [®] (bioMérieux) ou de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.....	79
<u>Tableau X</u> :	Résultats comparés du comportement à l'égard des bêta-lactamines des 13 transconjugants (Tc/Kp) et des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> donatrices correspondantes ; valeur des concentrations minimales inhibitrices des différentes bêta-lactamines testées par l'automate Vitek2 [®]	87
<u>Tableau XI</u> :	Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI - mg/L) de céfotaxime et de ceftazidime et catégorisation clinique correspondante, fournies par l'automate Vitek2 [®] (bioMérieux), pour les 13 transconjugants ; comparaison avec les résultats des souches donatrices de <i>Klebsiella pneumoniae</i> correspondantes.....	88
<u>Tableau XII</u> :	Point isoélectrique des bêta-lactamases à spectre étendu extraites à partir des 13 transconjugants	90
<u>Tableau XIII</u> :	Résultats comparés concernant le transfert de la résistance aux aminosides, au chloramphénicol, à la tétracycline et au cotrimoxazole, lors des expériences de conjugaison réalisées pour le transfert de la résistance par production de bêta-lactamase à spectre étendu.....	93

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> :	Mode d'action des bêta-lactamases de type sérine enzyme.....	16
<u>Figure 2</u> :	Schéma d'organisation des principaux transposons.....	20
<u>Figure 3</u> :	Structure de la région 5' d'un intégron.....	21
<u>Figure 4</u> :	Structure d'une cassette.....	22
<u>Figure 5</u> :	Mouvement des cassettes.....	23
<u>Figure 6</u> :	Résistances aux antibiotiques et antiseptiques codées par les intégrons.....	24
<u>Figure 7</u> :	Schéma de la transposition d'un élément IS (Insertion Sequence).....	26
<u>Figure 8</u> :	Schéma de la conjugaison bactérienne.....	28
<u>Figure 9</u> :	Représentation schématique des facteurs de pathogénicité des <i>Klebsiella</i>	38
<u>Figure 10</u> :	Schéma récapitulatif des principales méthodes de typage moléculaire.....	53
<u>Figure 11</u> :	Schéma du test de synergie en croix utilisé pour la détection des bêta-lactamases à spectre étendu.....	57
<u>Figure 12</u> :	Schéma du test "Combination Disk Method" (OXOID) permettant la détection des bêta-lactamases à spectre étendu	58
<u>Figure 13</u> :	Représentation schématique du système d'électrophorèse en champ pulsé CHEF...	61
<u>Figure 14</u> :	Schéma de l'isoélectrofocalisation.....	69
<u>Figure 15</u> :	Représentation des 32 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, isolées de 1990 à 2001, en fonction du prélèvement d'origine.....	73
<u>Figure 16</u> :	Répartition des 32 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, selon le service d'origine.....	74
<u>Figure 17</u> :	Répartition des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, par années.....	74
<u>Figure 18</u> :	Comportement des 32 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , vis-à-vis du cotrimoxazole, de la tétracycline et du chloramphénicol	78

Figure 19 :	Exemples du résultat de la détection du gène <i>bla</i> _{TEM} par PCR, chez 10 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	82
Figure 20 et 21 :	Profil obtenu par électrophorèse en champ pulsé, à partir de l'ADN génomique de 22 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , après digestion par l'enzyme de restriction <i>SpeI</i>	84
Figure 22 :	Profil de 10 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , isolées de 1994 à 2001	84
Figure 23 :	Dendrogramme obtenu après analyse des pulsotypes des 32 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> étudiées, à l'aide du logiciel informatique GelCompar®	85
Figure 24 :	Résultats de l'isoélectrofocalisation des bêta-lactamases à spectre étendu extraites des 13 transconjugants	90
Figure 25 :	Pourcentages de transfert de la résistance aux aminosides, au chloramphénicol, au cotrimoxazole et à la tétracycline, obtenus lors des expériences de conjugaison réalisées pour le transfert de la résistance par production de bêta-lactamase à spectre étendu.....	92
Figure 26 :	Profils de restriction de l'ADN plasmidique extrait du transconjugant Tc/Kp1, après migration par électrophorèse en champ pulsé	94
Figure 27 :	Profils de restriction de l'ADN plasmidique extrait des transconjugants Tc/Kp12 et Tc/Kp32, digéré par les enzymes <i>EcoRI</i> , <i>PvuII</i> , <i>ClaI</i> et <i>PstI</i> , obtenus après migration par électrophorèse en champ pulsé.....	94
Figure 28 :	Résultats de l'électrophorèse de l'ADN plasmidique des transconjugants obtenus à partir des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> appartenant au clone A, sous forme native et après digestion par l'enzyme de restriction <i>PvuII</i>	95
Figure 29 :	Profils de restriction des plasmides extraits des transconjugants obtenus à partir des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> appartenant au clone A, après digestion par les enzymes <i>ClaI</i> et <i>PstI</i>	96

LISTE DES PHOTOS

<u>Photo 1</u> :	ADN plasmidique visualisé par microscopie électronique.....	18
<u>Photo 2</u> :	Représentation schématique des principaux mécanismes de transfert de matériel génétique.....	25
<u>Photo 3</u> :	Conjugaison bactérienne visualisée par microscopie électronique.....	29
<u>Photo 4</u> :	Morphologie de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , sur frottis coloré par la méthode de Gram.....	32
<u>Photo 5</u> :	Mise en évidence de la capsule de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , sous la forme d'un halo clair entourant la bactérie.....	35
<u>Photo 6</u> :	Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé d'une souche sauvage de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
<u>Photo 7</u> :	Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé d'une souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> présentant une résistance acquise par production de pénicillinase.....	39
<u>Photo 8</u> :	Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé d'une souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> présentant une résistance acquise par production de bêta-lactamase à spectre étendu.....	40
<u>Photo 9</u> :	Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé d'une souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> présentant une résistance acquise par production de céphalosporinase plasmidique.....	46
<u>Photo 10</u> :	Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé d'une souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> présentant une résistance acquise à l'imipénème.....	47
<u>Photo 11</u> :	Image de synergie en « bouchon de champagne » révélant l'inhibition d'une bêta-lactamase à spectre étendu par l'acide clavulanique.....	58
<u>Photo 12</u> :	Activité enzymatique des bêta-lactamases à spectre étendu extraites des 13 transconjugants, évaluée par décoloration d'un gel à base d'iode et d'amidon, additionné de benzylpénicilline.....	70

INTRODUCTION

La mise sur le marché des céphalosporines de 3^{ème} génération a facilité le traitement de nombreuses infections sévères provoquées par des bactéries à Gram négatif. Cependant, la prescription croissante de ces antibiotiques a rapidement été associée à l'émergence de souches bactériennes résistantes. Depuis la description, en 1983, de la résistance transférable aux céphalosporines de 3^{ème} génération, liée à la production de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE), de nombreuses épidémies impliquant des bactéries productrices de ce type d'enzymes, ont été décrites.

Les BLSE sont des enzymes qui confèrent une résistance aux céphalosporines à large spectre (céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone) et aux monobactames (aztréonam), mais qui n'affectent pas les céphamycines (céfoxitine, céfotétan) ni les carbapénèmes (méro-pénème ou imipénème). Elles peuvent être inhibées par des inhibiteurs de bêta-lactamases, de type acide clavulanique. La plupart de ces enzymes dérivent des bêta-lactamases de type TEM-1, TEM-2 ou SHV-1, par substitution d'un ou plusieurs acides aminés, résultant de mutations ponctuelles au niveau des gènes parentaux, *bla*_{TEM} ou *bla*_{SHV}, codant pour ces enzymes à spectre moins large. Les gènes codant pour les BLSE sont habituellement portés par des structures mobiles (plasmides, généralement de grande taille, ou transposons), ce qui conditionne leur grand pouvoir de dissémination entre différentes souches bactériennes, de même espèce ou d'espèces différentes, grâce à divers mécanismes de transferts génétiques, tels que la transformation, la transduction, la transposition et surtout la conjugaison bactériennes. De plus, ces gènes sont souvent associés, sur ces plasmides, à des gènes codant pour la résistance à d'autres familles d'antibiotiques, telles que les aminosides, les sulfamides, le chloramphénicol ou les cyclines, entraînant l'émergence de bactéries multirésistantes.

Klebsiella pneumoniae a longtemps constitué l'espèce d'entérobactéries chez laquelle la production de BLSE était la plus fréquemment décrite. Aujourd'hui, ces enzymes sont détectées chez de nombreuses autres espèces d'entérobactéries, notamment *Enterobacter aerogenes*. L'augmentation, à l'échelle mondiale, de la résistance médiée par ces enzymes, parmi les souches d'entérobactéries, constitue une menace importante pour la santé publique, justifiant les efforts réalisés, afin de comprendre et circonscrire la propagation de ces bactéries multirésistantes. Cependant, l'épidémiologie des infections et colonisations à bactéries productrices de BLSE est parfois complexe : en effet, la dissémination de la résistance peut être liée à la diffusion de souches, de plasmides, ou d'autres gènes de résistance. Afin d'analyser l'épidémiologie de ces souches, plusieurs marqueurs phénotypiques et surtout génotypiques peuvent être utilisés.

Les objectifs de cette étude étaient de mettre en évidence le degré de diversité génétique des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE et notamment de comparer les souches isolées il y a une dizaine d'années à celles actuellement détectées, d'identifier le support génétique de cette résistance et d'étudier les possibilités de transfert des BLSE produites par ces souches, ainsi que les résistances susceptibles d'être co-transférées en raison d'un même support plasmidique. Pour cela, nous avons eu recours à diverses techniques de biologie moléculaire, telles que la PCR, le séquençage, l'électrophorèse en champ pulsé, les profils de restriction plasmidique, ainsi qu'à des expériences de conjugaison bactérienne.

Première partie :

GÉNÉRALITÉS

1- Résistance des entérobactéries aux bêta-lactamines :

La famille des entérobactéries comprend de très nombreuses espèces qui diffèrent les unes des autres par leur sensibilité aux antibiotiques en général, et aux bêta-lactamines en particulier.

Classiquement, le comportement d'une souche bactérienne vis-à-vis d'une bêta-lactamine dépend d'au moins 3 facteurs :

- la perméabilité de sa paroi, qui conditionne la pénétration de l'antibiotique ;
- la production de bêta-lactamases, naturelles ou acquises, inactivant l'antibiotique ;
- l'affinité de l'antibiotique pour ses cibles, appelées protéines de liaison à la pénicilline (PLP).

La résistance bactérienne aux bêta-lactamines peut s'expliquer par 3 principaux mécanismes.

1.1- Différents mécanismes de résistance aux bêta-lactamines :

1.1.1- Imperméabilité :

La pénétration des bêta-lactamines à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif se fait *via* des pores, formés dans la membrane par des protéines appelées porines, qui permettent la diffusion passive de petites molécules dans l'espace périplasmique. La modification (mutation) de ces porines peut contribuer, en diminuant la pénétration de ces antibiotiques, à la résistance bactérienne.

1.1.2- Modification des PLP :

Ce mécanisme de résistance est rencontré, le plus souvent, chez les bactéries à Gram positif, chez lesquelles l'affinité des bêta-lactamines pour leur cible peut être réduite.

1.1.3- Production de bêta-lactamases :

1) Mécanisme de l'inactivation enzymatique :

Chez les bactéries à Gram négatif, la production de bêta-lactamases constitue le principal mécanisme de résistance aux bêta-lactamines. Secrétées dans l'espace périplasmique, ces enzymes sont capables d'hydrolyser le cycle bêta-lactame qui constitue la structure de base de cette famille d'antibiotiques, inactivant ainsi l'antibiotique (Figure 1, p.16).

- **Classe C ou céphalosporinases :**

Ces enzymes, codées par le gène *ampC*, le plus souvent de localisation chromosomique, peuvent être surexprimées et entraîner une résistance aux amino-, carboxy- et uréidopénicillines, ainsi qu'aux céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} générations et à l'aztréonam. En revanche, elles hydrolysent peu les céphalosporines de 4^{ème} génération (céfépime, cefpirome).

- **Classe D ou oxacillinase :**

Cette classe regroupe des bêta-lactamases de structures très hétérogènes, dont certaines possèdent un spectre étroit tel que OXA1, d'autres un spectre plus large (OXA20, 23...).

Tableau I : Classification des bêta-lactamases, selon Ambler.

Classe	Substrats préférés	Support génétique	Types	Site actif	Fréquence
A	Pénicillines	Chromosomique ou plasmidique	Pénicillinase de staphylocoque ; enzymes TEM, SHV des entérobactéries	Sérine	Fréquentes
B	Céphalosporines et carbapénèmes	Chromosomique	Céphalosporinase de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> .	Cystéine	Rares
C	Céphalosporines	Chromosomique ou plasmidique	Céphalosporinase <i>ampC</i> des entérobactéries.	Sérine	Fréquentes
D	Pénicillines	Plasmidique ou porté par des intégrons	Pénicillinases OXA ou PSE rencontrées chez <i>Pseudomonas</i> et certaines entérobactéries.	Sérine	Rares

1.2- Support génétique de la résistance :

Les bactéries peuvent acquérir la résistance aux antibiotiques, soit en modifiant leur génome par mutation, soit en incorporant des gènes provenant d'autres micro-organismes, grâce à divers mécanismes de transfert génétique, tels que la transformation, la transduction, la transposition et la conjugaison.

1.2.1- Résistance par mutation chromosomique :

Le chromosome bactérien peut être le support de la résistance bactérienne aux antibiotiques, soit de manière naturelle (résistance naturelle programmée dans le génome bactérien), soit à la suite de mutations ponctuelles modifiant l'information génétique « endogène », dont la fréquence est cependant faible, de l'ordre de 10^{-8} - 10^{-10} , habituellement.

L'utilisation de l'antibiotique peut donc sélectionner les souches résistantes. Afin d'éviter les échecs thérapeutiques, il est possible d'avoir recours à une association d'antibiotiques, afin de diminuer la fréquence d'émergence des mutants, pendant le traitement.

1.2.2- Résistance par acquisition de matériel génétique exogène :

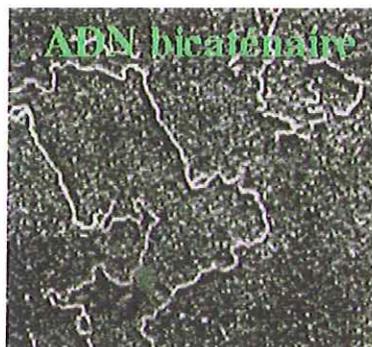
Les résistances extra-chromosomiques, dont le support est un gène porté par un plasmide ou un transposon qui peuvent être acquis par conjugaison ou, plus rarement, par transduction, représentent un pourcentage beaucoup plus important des résistances acquises. Elles peuvent concerner plusieurs antibiotiques, lorsque les gènes correspondants sont situés sur le même plasmide ou transposon.

1) Plasmides :

A- Structure et propriétés générales (Jacoby G. A. et al., 1991) :

Les plasmides (Photo 1) sont des molécules d'ADN extra-chromosomiques, circulaires, bicaténaires, de localisation cytoplasmique. Leur réplication est indépendante de celle du génome bactérien.

Photo 1 : ADN plasmidique visualisé par microscopie électronique.



B- Fonctions physiologiques :

Les plasmides portent souvent des gènes utiles aux bactéries, mais non indispensables à leur croissance normale ou à leur division.

Ils sont capables de transférer entre souches de même espèce (transfert intraspécifique) et, dans certaines conditions, entre souches d'espèces différentes (transfert interspécifique) : ils sont dits conjugatifs.

Chez certaines espèces, ils induisent l'apparition de structures de surface : les pili qui permettent l'arrimage des bactéries entre elles. Ils sont porteurs d'un groupe de gènes *tra* qui codent pour toutes les protéines nécessaires à l'appariement avec une autre bactérie ne possédant pas de plasmide de fertilité F, ainsi qu'au transfert du plasmide au travers d'un pont conjugatif entre la cellule donatrice et la cellule réceptrice. La donatrice transfère son plasmide de résistance à la réceptrice, tout en conservant une copie de ce plasmide pour elle-même. L'exposition à un seul des antibiotiques pour lesquels le plasmide porte un gène de résistance peut fournir la pression sélective nécessaire, pour maintenir la résistance aux autres antibiotiques pour lesquels le plasmide porte également des gènes de résistance.

Outre la résistance aux antibiotiques, ces éléments génétiques codent pour de nombreuses autres propriétés, notamment des facteurs de virulence impliqués en pathologie humaine.

C- Autres implications :

Les plasmides sont utilisés en génétique moléculaire comme vecteurs de clonage, en vue de produire des quantités quasiment illimitées du fragment d'ADN cloné que l'on désire étudier.

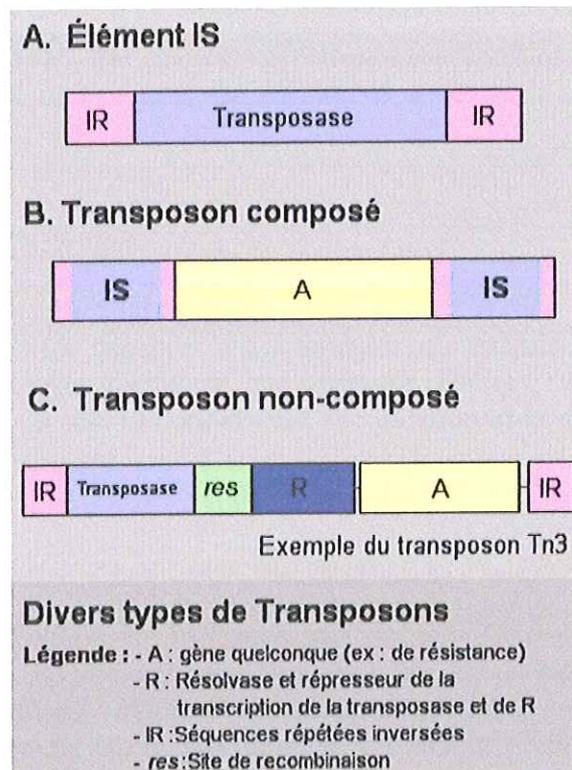
2) Transposons :

Les transposons sont des brins d'ADN bicaténaires, souvent appelés « gènes sauteurs », capables de promouvoir leur translocation d'un réplicon sur un autre ou en un autre site du même réplicon, malgré l'absence d'homologie entre les ADN qui inter-agissent ; cependant, il existe parfois des zones privilégiées d'insertion. Leur présence peut contribuer à la résistance aux antibiotiques, par l'apport de gènes codant pour cette résistance ou en modifiant l'expression de gènes de la bactérie.

Les 3 types de transposons les plus fréquents sont (Figure 2, p. 20) :

- **les éléments IS** (Insertion Sequence) : transposons les plus courts, composés d'une transposase et de deux séquences répétées inversées à leurs extrémités (IR). Leur insertion dans un gène, brisant le cadre de lecture de celui-ci, entraîne son inactivation. Ils peuvent également empêcher l'initiation ou la régulation de la transcription, s'ils s'insèrent dans la région promotrice de ce gène.
- **les transposons composés** : correspondent à deux éléments IS encadrant une séquence d'ADN contenant, par exemple, un gène de résistance. Sous l'action de la transposase, les deux éléments IS, ainsi que le gène qu'ils entourent, sont transposés « d'un bloc ».
- **les transposons non composés** : groupe très varié contenant des IR, des gènes de résistance, un site de recombinaison et d'autres gènes tels que ceux codant pour une transposase et une résolvasse.

Figure 2 : Schéma d'organisation des principaux transposons.



La transposition nécessite la présence d'enzymes particulières, habituellement codées par le transposon lui-même :

- **la transposase** : cette enzyme coupe l'ADN aux extrémités du transposon dans l'ADN donneur et insère ce transposon dans l'ADN receveur, en un site spécifique. Après l'insertion du transposon, cette séquence sera répliquée.
- **l'intégrase**, quant à elle, est plutôt utilisée pour recombinaison un ADN circulaire dans une séquence spécifique ou pour promouvoir l'échange d'un gène de résistance à l'intérieur même d'un transposon non composé.

Pour les gènes de résistance, trois catégories de transposons ont été décrites, sur des bases structurales et fonctionnelles :

- **les transposons de la famille Tn3**, codant pour les bêta-lactamases de type TEM-1 ; Ils portent, à leurs extrémités, deux séquences identiques d'environ 40 paires de bases en orientation opposée, et codent pour des enzymes impliquées dans la transposition.
- **les transposons composites** (Cf p.19).
- **les transposons conjugatifs** sont des éléments génétiques mobiles, capables de promouvoir leur transfert par un mécanisme apparenté à la conjugaison, soit du chromosome d'une bactérie donatrice au chromosome d'une bactérie réceptrice, soit d'un plasmide à un autre, expliquant le développement de plasmides de multi-résistance aux antibiotiques, soit encore d'un plasmide à un chromosome.

Pour la majorité des intégrons de classe 1, la **région 3'** contient trois cadres de lecture ouverts. Le premier : *qacEDI* est un dérivé tronqué du gène *qacE* codant pour la résistance aux ammoniums quaternaires. Le second cadre de lecture est le gène *sulI* qui code pour la résistance aux sulfamides. Le troisième cadre de lecture, désigné *ORF5*, ne code pour aucune fonction connue.

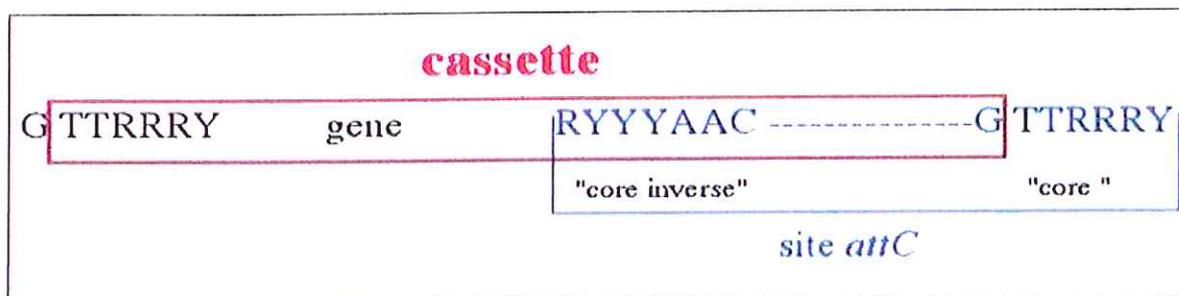
Les intégrons diffèrent des transposons par plusieurs caractéristiques :

- les cassettes ne contiennent aucun gène codant pour une protéine catalysant leur mouvement, la recombinase étant présente sur la partie immobile de l'intégron ;
- les cassettes ne sont pas flanquées, à leurs extrémités, de séquences répétées inversées.

C- Structure des cassettes (Recchia G. D. et al., 1995) :

Les cassettes ont des tailles et des fonctions très variables, mais possèdent une organisation commune. Une cassette est constituée d'un gène adjacent à un site spécifique de recombinaison *attC*, reconnu par l'intégrase. Le site *attC* est constitué de séquences relativement conservées, inversées, répétées, imparfaites, dont la taille varie de 57 à 141 paires de bases. Deux séquences inversées répétées de 7 paires de bases sont constamment retrouvées aux deux extrémités de chaque site *attC* et désignées core et core inverse (Figure 4). Le core de séquence consensus GTTRRRY est localisé à l'extrémité droite du site *attC* et le core inverse de séquence complémentaire RYYYAAC, à l'extrémité gauche. Les premiers sites *attC* décrits avaient une taille de 59 pb, ce qui explique leur désignation dans différentes publications par **élément 59-pb**, terminologie désormais obsolète.

Figure 4 : Structure d'une cassette.

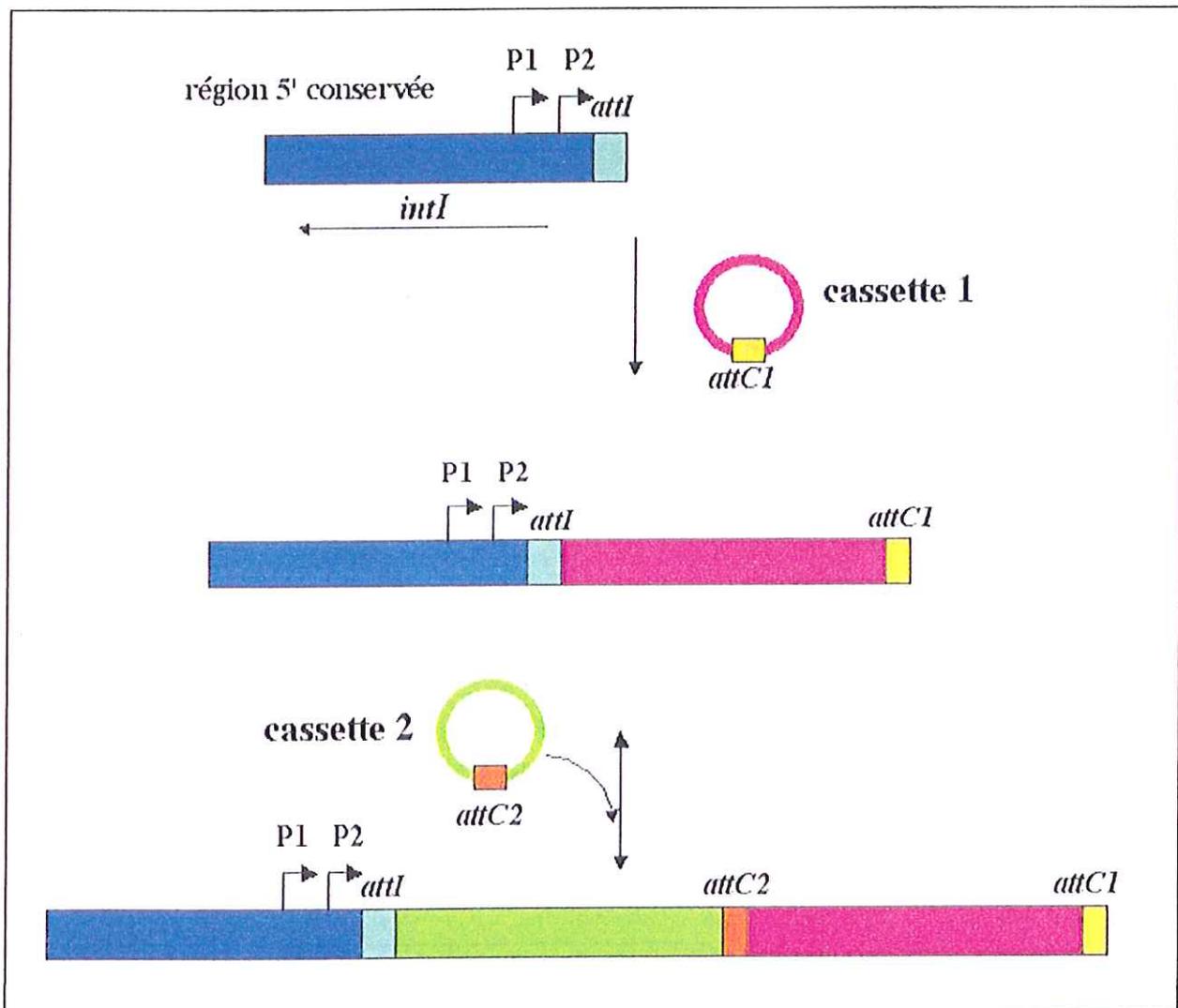


Il existe une grande variété de sites *attC*. Certains, dont la séquence est très conservée, sont associés à des gènes de résistance très différents, alors que certains gènes apparentés sont associés à des sites *attC* hétérologues.

D- Mouvement des cassettes :

Certaines cassettes ont été retrouvées dans différentes classes d'intégrons. Toutes peuvent apparemment être intégrées dans les trois classes d'intégrons. Cependant, les études sur le mouvement des cassettes ont principalement porté sur les intégrons de classe 1. Il a été démontré que les cassettes intégrées sous forme linéaire peuvent, après excision, générer une forme libre circulaire. Le mouvement des cassettes se fait donc essentiellement par insertion-excision sous forme circulaire, par un mécanisme de recombinaison entre deux sites spécifiques, catalysé par l'intégrase. L'évènement de "crossing-over" se produit entre le G d'un site core GTTRRRY et le premier T d'un deuxième site core. Les intégrations de cassettes se font préférentiellement au site *attI* (Figure 5).

Figure 5 : Mouvement des cassettes.



E- Expression des cassettes (Collis C. M. et al., 1995) :

Les cassettes sont toutes orientées dans la même direction et sont généralement dépourvues de promoteur. Les gènes sont co-transcrits, comme au sein d'un opéron, sous la dépendance d'une région promotrice, localisée dans la région 5' conservée de l'intégron.

L'expression des cassettes est tributaire de la position par rapport au promoteur, les gènes localisés dans des cassettes éloignées étant faiblement exprimés. La pression de sélection exercée par les antibiotiques peut favoriser des réarrangements de cassettes, afin de permettre le positionnement d'une cassette faiblement exprimée à une localisation plus proche du promoteur.

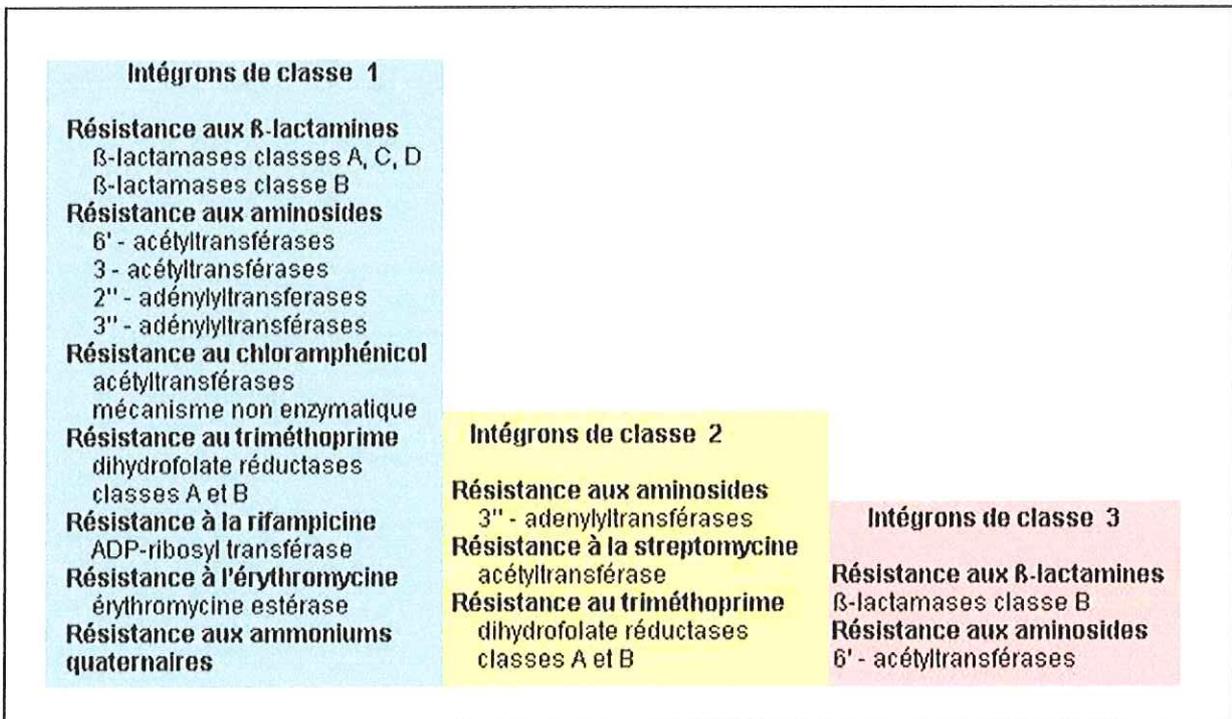
De rares cassettes possèdent leur propre promoteur, telles que *cmlA* et *cmlA2*, responsables de la résistance au chloramphénicol par un mécanisme non enzymatique.

F- Nature des cassettes :

Plus de 60 cassettes impliquées dans la résistance aux antibiotiques ou aux antiseptiques ont été décrites (Figure 6).

Ce mécanisme génétique de résistance bactérienne acquise vis-à-vis des antibiotiques, le plus récemment mis en évidence, montre l'étonnante aptitude des bactéries à s'adapter, donc à survivre.

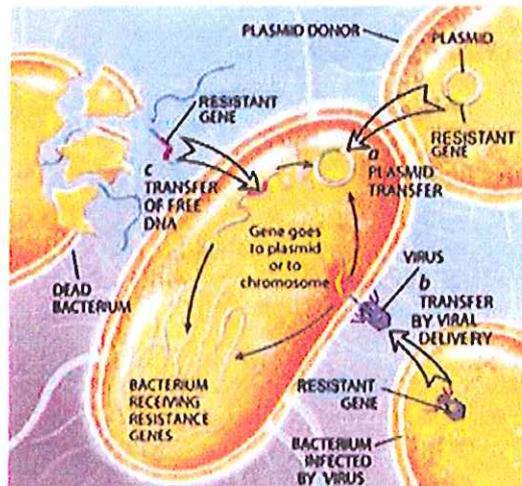
Figure 6 : Résistances aux antibiotiques et antiseptiques codées par les intégrons



4) Mécanismes de transfert du matériel génétique :

Pour réaliser des échanges de matériel génétique, les bactéries disposent de divers modes de transfert tels que la transformation, la transduction, la transposition et la conjugaison (Photo 2).

Photo 2 : Représentation schématique des principaux mécanismes de transfert de matériel génétique ([http : // www.microbes-edu.org/etudiant/antibio3.html](http://www.microbes-edu.org/etudiant/antibio3.html)).



A- Transformation :

Elle résulte de l'incorporation d'ADN nu du milieu extérieur avec, pour conséquence, l'acquisition définitive, par la bactérie réceptrice, de caractères héréditaires de la bactérie donatrice d'ADN.

Pour qu'un ADN étranger pénètre dans une bactérie, celle-ci doit être dans un état physiologique particulier, appelé état de compétence, caractérisé par la présence, à la surface de la bactérie, de récepteurs d'ADN et de diverses protéines (protéines membranaires fixant l'ADN, autolysines de la paroi, nucléases...). Cet état particulier et transitoire de la paroi permet le passage trans-pariétal d'ADN. Après pénétration, l'ADN étranger s'intègre dans le chromosome bactérien par recombinaison. Dans le cas de plasmides, ceux-ci demeurent extra-chromosomiques et se répliquent de façon autonome.

B- Transduction :

La transduction est un mode de transfert d'ADN d'une cellule bactérienne à une autre, par l'intermédiaire d'un bactériophage, particule infectieuse parasite strict des bactéries, constitué d'un génome (ADN mono- ou bicaténaire, ou ARN), protégé par une capsidie protéinique.

Les bactériophages peuvent prélever des fragments d'ADN chromosomique ou plasmidique chez une bactérie dite donatrice, notamment des gènes de résistance aux antibiotiques, et les transférer à une bactérie réceptrice, dans le génome de laquelle ces fragments pourront s'intégrer par recombinaison et devenir partie intégrante du patrimoine génétique de la bactérie infectée.

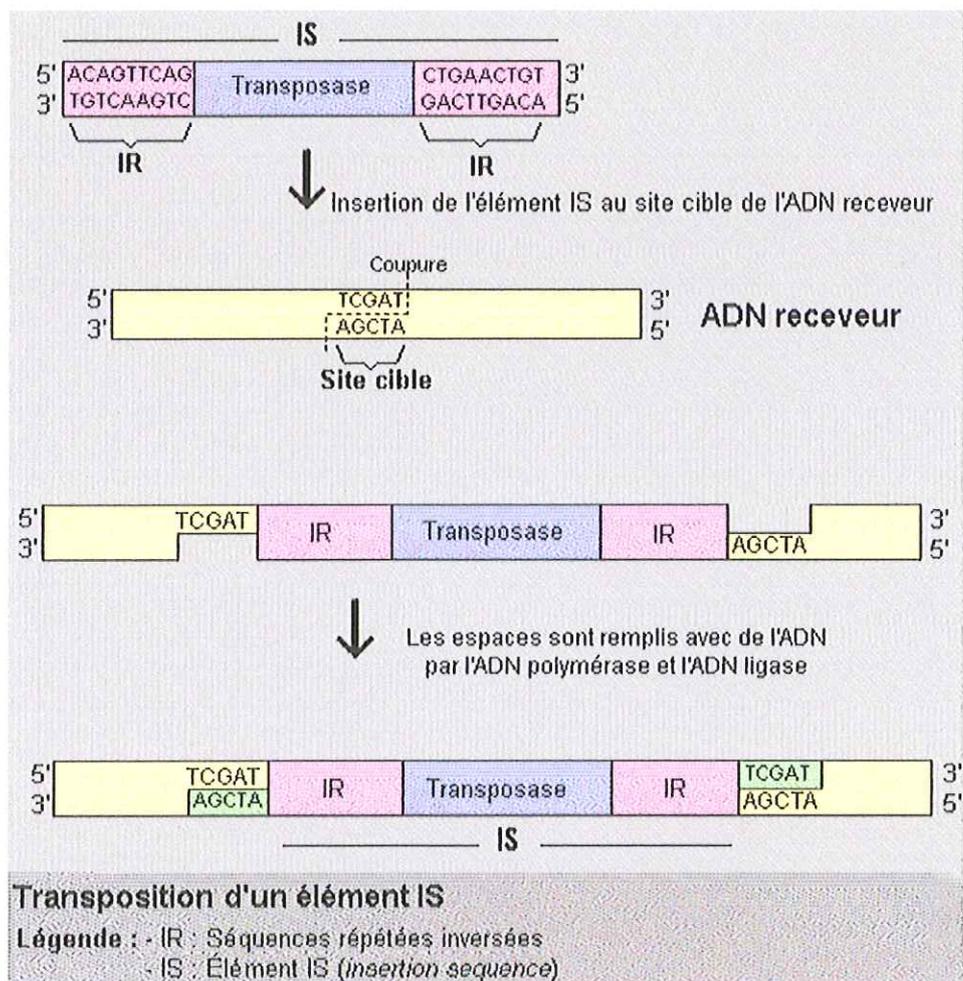
C- Transposition (Figure 7) :

Certains segments d'ADN, faisant partie du matériel génétique de la bactérie, ont la capacité de se déplacer le long du chromosome bactérien ou d'un plasmide. Ces éléments mobiles ou transposons sont susceptibles de se mouvoir du chromosome vers le plasmide ou du plasmide vers le chromosome bactérien, propriété médiée par une enzyme appelée transposase, portée par l'élément transposable.

Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être portés par des transposons, ce qui explique la capacité de ces gènes à se répandre rapidement au sein des populations bactériennes, donnant naissance à des souches résistantes à de nombreux antibiotiques (Heritage J. *et al.*, 1992).

La transposition est un phénomène assez rare, du fait de la possible inactivation du gène dans lequel l'élément a été transposé, pouvant entraîner des conséquences désastreuses pour la cellule. Ce mécanisme est minutieusement régulé : en effet, chaque transposon possède un mécanisme de régulation de sa propre transposition, de sorte que cette transposition n'est pas fréquente et n'entraîne généralement pas la mort de la cellule.

Figure 7 : Schéma de la transposition d'un élément IS (Insertion Sequence).



D - Conjugaison :

a) Définition et description du processus (Figure 8, p. 28) :

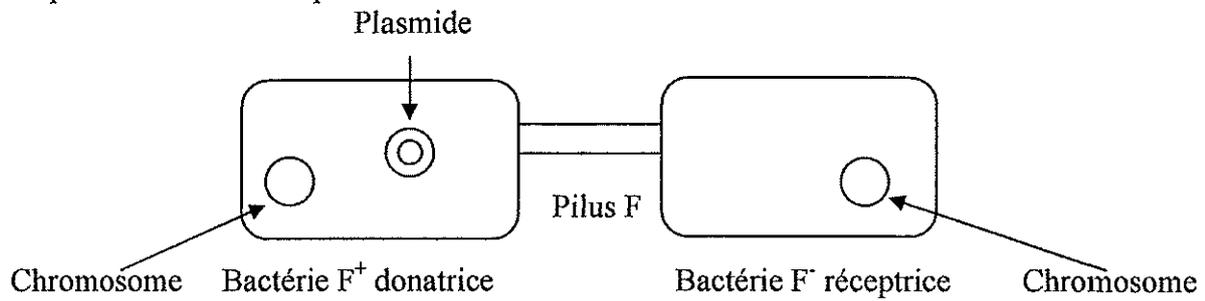
La conjugaison bactérienne est un processus grâce auquel les bactéries peuvent échanger du matériel génétique, par l'intermédiaire de plasmides. Or, les gènes de résistance aux antibiotiques sont fréquemment portés par des plasmides et peuvent ainsi, par ce mécanisme, être transférés d'une bactérie à une autre. Ces transferts plasmidiques expliquent la facilité avec laquelle ces résistances acquises, à la différence des mutations chromosomiques, peuvent disséminer dans le monde bactérien, provoquant des problèmes thérapeutiques.

La conjugaison est un processus sexuel strict qui nécessite un contact préalable et un appariement entre bactéries de sexes différents, avec formation d'un pont cytoplasmique permettant des échanges de matériel génétique entre les deux bactéries. La qualité de donneur est conférée par la possession d'un plasmide appelé facteur de fertilité ou facteur F, qui permet la synthèse de pili sexuels, structures filamenteuses protéino-aqueuses, codées par des gènes *tra*, qui se lient à la surface de la bactérie réceptrice F⁻, pour former une paire ou couple de bactéries donatrice-réceptrice, rendant possible le transfert de gènes. Les extrémités spécifiques des pili reconnaissent des zones de contact à la surface des bactéries réceptrices, s'y fixent et se rétractent, rapprochant les deux bactéries de sexes différents, ce qui permet un contact cellulaire étroit, suivi du transfert d'un ADN simple brin de la cellule donatrice à la cellule réceptrice : le plasmide est clivé au niveau de l'un de ses brins, en un site appelé *oriT* (origine du transfert) qui est localisé à côté des gènes *tra*. Le brin intact sert alors de matrice pour la synthèse de l'ADN, tandis que le brin coupé est déplacé et transféré dans la cellule réceptrice où débute la synthèse d'un brin complémentaire d'ADN. Le plasmide est transféré de telle sorte que les gènes *tra* soient les derniers transférés. Le plasmide devient circulaire dans la bactérie réceptrice, pour donner une cellule F⁺, puis les 2 bactéries se séparent.

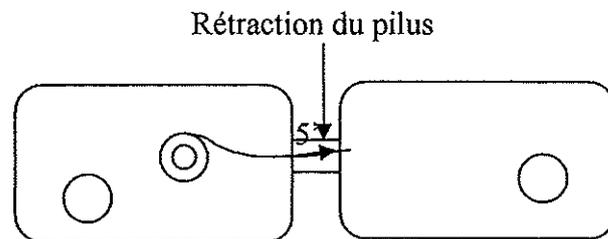
Ce mode de transfert d'information génétique est très largement rencontré dans le monde bactérien.

Figure 8 : Schéma de la conjugaison bactérienne.

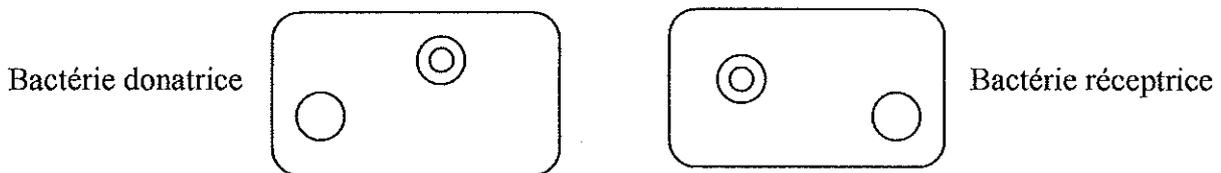
1- Les pili F de la bactérie donatrice F^+ lui permettent de s'associer à la bactérie réceptrice F^- . L'opération transfère le plasmide de la bactérie F^+ à la bactérie F^- .



2- Synthèse et transfert unidirectionnel de l'ADN monobrin qui est dupliqué puis circularisé dans la bactérie réceptrice :



3- Les 2 bactéries possèdent chacune une copie du plasmide :

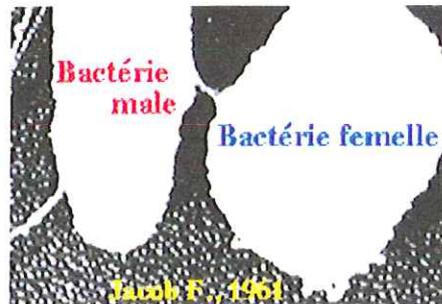


b) Caractères généraux :

La conjugaison bactérienne se caractérise par :

- la nécessité d'un contact entre bactéries (accouplement) ;
- la notion de polarité du transfert : il y a une bactérie donatrice (bactérie mâle ou fertile) et une bactérie réceptrice (bactérie femelle) ; le transfert se fait uniquement dans le sens mâle → femelle (Photo 3).

Photo 3 : Conjugaison bactérienne visualisée par microscopie électronique.



- le caractère de fertilité (caractère mâle) est responsable du transfert ; il est porté par un plasmide particulier, appelé plasmide sexuel.

La conjugaison peut se faire chez les bactéries à Gram négatif et chez les bactéries à Gram positif ; des bactéries appartenant à des espèces, des genres ou même des familles différents peuvent conjuguer.

c) Conjugaison chez les bactéries à Gram négatif :

- *Transfert $F^+ \times F^-$:*

Le plasmide F est constitué d'un ADN double brin circulaire de 95 kilobases (Kb), doué de réplication autonome. Il contient au moins 20 gènes impliqués dans le processus de transfert. Les bactéries possédant ce plasmide sont des bactéries mâles ou F^+ , capables de transférer le facteur F vers des bactéries femelles ou F^- . Le facteur F transféré n'est pas pour autant perdu par la bactérie donatrice, car il se réplique en même temps qu'il transfère.

La présence de pili sexuels, codés par les plasmides sexuels, est essentielle pour établir le contact entre les bactéries.

- *Transfert $Hfr \times F^-$:*

Le plasmide F peut s'intégrer de manière stable au chromosome. Les bactéries obtenues sont des bactéries mâles devenues incapables de transférer le facteur F, mais capables de transférer des marqueurs chromosomiques. On les appelle des bactéries Hfr (Hfr = haute fréquence de recombinaison). La fréquence de cet événement est de l'ordre de 10^{-6} , survenant en de nombreux endroits du chromosome bactérien, mais préférentiellement en quelques sites déterminés. L'intégration est réversible, grâce à un mécanisme d'excision qui a lieu à la

même fréquence que l'intégration. C'est pourquoi chaque population de bactéries F^+ contient quelques Hfr et chaque population de Hfr contient quelques F^+ .

La conjugaison entre une bactérie Hfr et une bactérie F^- se caractérise par une faible fréquence de transfert du caractère sexuel et une haute fréquence de transfert des gènes chromosomiques, qui peuvent se recombiner avec les gènes de la bactérie réceptrice, pour lui donner un nouveau phénotype.

d) Conjugaison chez les bactéries à Gram positif :

Elle concerne, en particulier, les genres *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces* et *Clostridium*. A la différence des bactéries à Gram négatif, le contact n'est pas réalisé par l'intermédiaire de pili. Les receveurs relâchent dans le milieu externe des peptides diffusibles, sensibles aux protéases et résistants à la chaleur : les phéromones, qui induisent chez les donneurs (porteurs de plasmides conjugatifs) la synthèse d'une protéine de surface, sorte d'adhésine qui provoque la formation de grands agrégats entre donneurs et receveurs. Ces agrégats sont le site de transferts génétiques dont les mécanismes demeurent encore inconnus.

2- Klebsiella pneumoniae

K. pneumoniae est une bactérie appartenant à la famille des Enterobacteriaceae ; elle représente l'espèce-type du genre *Klebsiella*.

2.1- Ecologie - habitat :

K. pneumoniae est une espèce ubiquitaire, isolée chez l'Homme et les animaux, du sol, des eaux de surface ou usées, des végétaux et de divers aliments. Elle fait partie de la flore commensale de la peau et des muqueuses de l'Homme et des animaux, où elle existe toujours en faible quantité. Chez l'Homme, *K. pneumoniae* est en particulier un saprophyte du nasopharynx et du tractus gastro-intestinal. Les taux de colonisation varient beaucoup d'une étude à l'autre : ils seraient de 5 à 38 % dans le tube digestif et de 1 à 6 % au niveau du nasopharynx (Rose H. D. *et al.*, 1968, Thom B. T. *et al.*, 1970, Davis T. J. *et al.*, 1974, Rosenthal S. *et al.*, 1975). En milieu hospitalier, on observe une élévation de ces taux, proportionnelle à la durée du séjour. Le portage chez les patients hospitalisés est ainsi estimé à 77 % dans le tube digestif, 19 % dans le pharynx et 42 % sur les mains (Rose H. D. *et al.*, 1968, Johanson W. G. *et al.*, 1969, Selden R. *et al.*, 1971, Pollack M. *et al.*, 1972, Davis T. J. *et al.*, 1974).

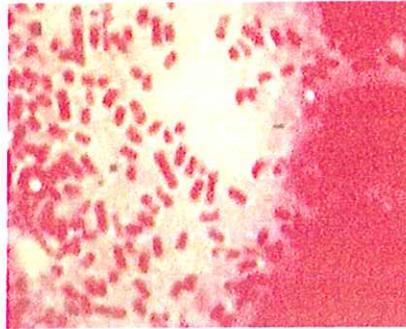
2.2- Morphologie et principaux caractères biochimiques :

K. pneumoniae est un bacille à Gram négatif de 1 à 4 µm de long sur 0,4 à 0,6 µm de large, à coloration souvent bipolaire plus ou moins nette, immobile, généralement entouré d'une capsule polyosidique (Photo 4, p.32), donnant un aspect muqueux assez typique du genre. C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, qui présente les caractères biochimiques suivants :

- oxydase négative
- catalase positive
- nitrate-réductase positive
- fermentation de nombreux sucres dont le glucose
- β-galactosidase positive
- uréase positive
- VP (réaction de Voges-Proskauer – production d'acétoïne) positive
- tryptophane-désaminase négative
- arginine-dihydrolase négative
- ornithine-décarboxylase négative
- absence de production d'H₂S.

La production d'indole et celle d'uréase sont des caractères distinctifs importants entre les différentes espèces de *Klebsiella*.

**Photo 4 : Morphologie de *Klebsiella pneumoniae*,
sur frottis coloré par la méthode de Gram.**



2.3- Caractères culturaux :

K. pneumoniae est une bactérie non exigeante qui se développe facilement sur des milieux gélosés non enrichis tels que la gélose trypticase-soja (TS), la gélose lactosée au Bromocrésol pourpre (BCP) ou la gélose CLED (Cystine-lactose-électrolyte-déficient), à une température optimale de 37°C, en atmosphère ordinaire. Au bout de 18 à 24 heures d'incubation, on obtient des colonies arrondies, lactose positives, muqueuses, de 3 à 4 mm de diamètre, généralement bombées et translucides.

2.4- Pouvoir pathogène :

K. pneumoniae est l'une des seules espèces du genre *Klebsiella* responsable d'infections communautaires, notamment d'infections bronchopulmonaires telles que des pneumonies lobaires nécrosantes, des abcès pulmonaires ou des pleurésies purulentes. Elle est également impliquée dans des infections intra-abdominales et des infections urinaires.

La grande majorité des infections à *K. pneumoniae* surviennent cependant chez des patients hospitalisés, chez lesquels elle est souvent responsable d'infections nosocomiales. Présentes dans l'environnement hospitalier, au niveau des individus (patients, personnel soignant) ou de l'environnement inerte (surfaces, instruments, solutés), ces bactéries sont sélectionnées du fait de leur capacité à résister aux antibiotiques. Comme les bactéries pathogènes opportunistes, *K. pneumoniae* exprime sa pathogénicité essentiellement chez des sujets âgés (Gouby A. *et al.*, 1994), immunodéprimés ou souffrant de pathologies diverses telles que alcoolisme, diabète ou broncho-pneumopathie chronique obstructive.

2.4.1- Modes de transmission :

La transmission de ces bactéries d'un patient à un autre se fait facilement par les mains du personnel soignant (Coovadia Y. M. *et al.*, 1992) ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical (infections croisées) qui constituent, avec le tube digestif des patients hospitalisés, les deux principales sources incriminées au cours des infections nosocomiales (Casewell M. W. *et al.*, 1977, Montgomerie J. Z. *et al.*, 1979). Le malade peut

ainsi s'infecter avec ses propres bactéries, à la faveur d'un acte invasif tel qu'une intervention chirurgicale au niveau de l'intestin et/ou en raison d'une fragilité particulière. Leur capacité à diffuser rapidement (Kühn I. *et al.*, 1993) peut conduire à des épidémies, notamment dans les services de Néonatalogie (Hart C. A. *et al.*, 1993, Reish O. *et al.*, 1993, Macrae M. B. *et al.*, 2001, Lebessi E. *et al.*, 2002), de Pédiatrie et de Soins intensifs (Venezia R. A. *et al.*, 1995, Royle J. *et al.*, 1999, Szabo D. *et al.*, 1999).

2.4.2- Facteurs de risque des infections nosocomiales à *K. pneumoniae* :

Les souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE sont plus fréquemment isolées chez des patients présentant un ou plusieurs facteurs de risque, parmi lesquels on peut citer :

- hospitalisation dans un service ayant une activité médicale lourde et complexe tel que la Réanimation, médicale ou chirurgicale (Decré D. *et al.*, 2000), les Soins intensifs, la Chirurgie, l'Urologie, les Grands brûlés, l'Hématologie ou la Cancérologie, services prenant en charge des malades fréquemment immunodéprimés, présentant le plus souvent des pathologies sévères (Decré D. *et al.*, 2000, Peña C. *et al.*, 1998) et donc particulièrement sensibles aux infections.
- hospitalisation prolongée.
- âge : les personnes âgées et les nouveaux-nés, en particulier les prématurés, sont particulièrement réceptifs.
- pathologie sous-jacente : immunodéprimés, polytraumatisés, grands brûlés.
- certains traitements, tels qu'une antibiothérapie antérieure, déséquilibrant la flore des patients et sélectionnant des bactéries résistantes. La prescription d'antibiotiques à large spectre ou d'une association de plusieurs antibiotiques, est significativement associée à l'acquisition de *Klebsiella* par le patient (Rose H. D. *et al.*, 1968, Pollack M. *et al.*, 1972). Les traitements immunodépresseurs et les chimiothérapies constituent également des facteurs favorisant.
- réalisation d'actes invasifs nécessaires au traitement, responsables d'une effraction de la peau et des muqueuses, avec parfois mise en place de matériel étranger dans des sites normalement stériles : sondage urinaire, pose d'un cathéter, ventilation artificielle, intubation trachéale, sondes gastriques qui provoquent des troubles de déglutition, favorisant les inhalations de bactéries dans les voies aériennes, et interventions chirurgicales.
- contaminations exogènes (environnement hospitalier, travaux, visites...).
- présence d'autres malades infectés au sein de la même unité de soins.

2.4.3- Pouvoir pathogène :

1) Infections bronchopulmonaires :

L'espèce *K. pneumoniae* est souvent rencontrée lors d'infections bronchopulmonaires. Le tableau typique est celui d'une pneumonie à début brutal, se traduisant par une fièvre élevée, associée à des frissons, des douleurs thoraciques, un syndrome pseudo-grippal et une toux s'accompagnant de crachats, souvent hémoptoïques. Le plus souvent, il s'agit d'une pneumonie alvéolaire, plus rarement d'une bronchopneumonie, avec tendance à l'abcédation multiple. La contamination des poumons se fait par voie aérienne ou sanguine, chez des malades souvent immunodéprimés. Ces pneumonies, souvent favorisées par une atteinte pulmonaire sous-jacente (atélectasie...), peuvent se compliquer de pleurésie purulente, par envahissement de la plèvre par contiguïté.

2) Infections urinaires :

Le tractus urinaire est l'un des sites les plus fréquents des infections à *K. pneumoniae*, en particulier en milieu hospitalier, où cette bactérie est responsable de 6 à 17 % de l'ensemble des infections urinaires nosocomiales, toutes unités de soins confondues. Rarement isolée au cours du premier épisode d'infection urinaire lors duquel *Escherichia coli* est, de loin, l'espèce la plus fréquente, elle est essentiellement retrouvée chez des patients diabétiques, des patients porteurs de sondes urinaires ou des patients ayant subi une intervention chirurgicale au niveau de l'arbre urinaire. On observe ainsi des infections urinaires faisant suite à la mise en place de sondes urinaires dans de mauvaises conditions d'hygiène. Ces infections tenaces restent souvent localisées à la vessie (cystite) et sont, en général, assez bien tolérées. Cependant, il existe un risque de pyélonéphrite et surtout de dissémination septicémique.

3) Bactériémies et septicémies :

Les souches de *K. pneumoniae* peuvent essaimer par voie sanguine, à partir d'un foyer cutané ou muqueux. Cette espèce représente la deuxième bactérie impliquée dans les bactériémies nosocomiales à Gram négatif, après *E. coli* (Siu L. K. *et al.*, 1999, Silva J. *et al.*, 2001, Kim B.-N. *et al.*, 2002). Les bactériémies primaires, liées à l'infection de cathéters (Peña C. *et al.*, 2001), responsable d'une inoculation directe de bactéries dans le sang, sont assez fréquentes, mais la plupart des bactériémies sont secondaires à des infections urinaires, des pneumopathies ou des infections intra-abdominales. Les bactériémies primaires impliquent le plus souvent des souches productrices de BLSE, qui présenteraient une plus grande capacité d'adhérence aux cathéters (Di Martino P. *et al.*, 1996) que les souches sauvages de *K. pneumoniae*. Le pronostic de ces septicémies est souvent sévère car, d'une part, elles surviennent principalement chez des malades aux systèmes de défense affaiblis (Kim Y.-K. *et al.*, 2002) et, d'autre part, ces bactéries sont souvent résistantes à de nombreux antibiotiques.

4) Autres infections :

K. pneumoniae peut être responsable de diverses infections nosocomiales, secondaires à des soins ou des gestes chirurgicaux. Elle est ainsi impliquée dans des infections post-opératoires du site chirurgical, des thrombophlébites, des cholécystites, des diarrhées, ainsi que des infections péritonéales.

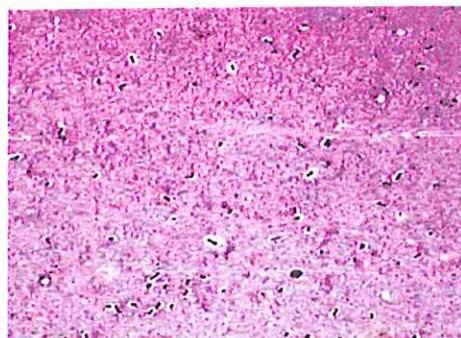
2.5- Facteurs de virulence :

Les facteurs de virulence mis en œuvre par la bactérie diffèrent selon le site de l'infection. De nombreux facteurs contribuant à la pathogénicité de cette bactérie ont été identifiés (Figure 9, p. 38).

2.5.1- Capsule bactérienne :

K. pneumoniae est une bactérie entourée d'une capsule, de nature polysaccharidique, impliquée dans la pathogénie, par son rôle dans l'adhérence des bactéries aux cellules-hôtes et leur protection contre le système immunitaire de l'hôte, spécifique ou non spécifique. Les sous-unités de cette capsule, composées de 4 à 6 sucres (fucose, galactose, mannose) et, très souvent, d'acides glycuroniques (composés chargés négativement), peuvent être classées en plus de 80 types sérologiques (Orskov L. *et al.*, 1984). Le matériel capsulaire forme d'épais amas de structures fibrillaires recouvrant la surface bactérienne et apparaissant, à la coloration de Gram, sous la forme d'un halo clair, entourant la bactérie (Photo 5).

Photo 5 : Mise en évidence de la capsule de *Klebsiella pneumoniae*, sous la forme d'un halo clair entourant la bactérie.



1) Adhérence :

La capsule bactérienne est impliquée dans l'adhérence de la bactérie aux cathéters, sondes et autres dispositifs médicaux utilisés dans les hôpitaux, dont elle permet la colonisation. Elle augmente également l'adhérence de la bactérie aux cellules intestinales et celle des bactéries entre elles.

2) Immunité non spécifique :

Lorsqu'une bactérie parvient à pénétrer chez un hôte, celui-ci réagit en mobilisant ses défenses spécifiques et non spécifiques, constituées, entre autres, des protéines du complément et des cellules phagocytaires. La capsule, premier constituant de la bactérie à entrer en contact avec le système immunitaire, protège, d'une part, de la phagocytose par les polynucléaires et les monocytes-macrophages (Podschun R. *et al.*, 1992, Podschun R. and Ullmann U., 1992, Simoons-Smit A. M. *et al.*, 1986) et peut, d'autre part, nuire à l'activation du complément. En effet, elle peut interférer dans la reconnaissance entre la fraction C3b et le récepteur auquel celle-ci doit se lier de façon non spécifique, sur la paroi cellulaire bactérienne, afin de permettre l'activation de la voie alterne du complément. De plus, la capsule peut inhiber l'opsonisation de la bactérie et prévient la destruction de celle-ci par les facteurs bactéricides du sérum (Williams P. *et al.*, 1983).

3) Immunité spécifique :

Les antigènes polysaccharidiques capsulaires sont des antigènes T-indépendants, favorisant la production d'anticorps opsonisants qui facilitent la phagocytose des souches capsul es. Ces anticorps sont cependant souvent de classe IgM, anticorps de faible affinité, ou des IgG₂. De plus, la grande diversité antigénique explique que l'immunité acquise soit souvent prise en défaut. Pour *K. pneumoniae*, on décrit plus de 80 antigènes de type K. Même si l'hôte réussit à produire des anticorps anti-capsulaires, certaines bactéries parviennent à contourner cette défense, en relâchant une certaine quantité de leur capsule dans l'environnement. Les anticorps reconnaissent ces capsules libres et sont ainsi saturés, ne pouvant donc plus agir sur la bactérie.

2.5.2- Pili (fimbriae) :

Les propriétés d'adhérence des entérobactéries sont généralement médiées par différents types de pili, projections filamenteuses situées à la surface de la bactérie, qui permettent à celle-ci de se rapprocher étroitement des surfaces muqueuses de l'hôte et de s'y fixer. Il existe différents types de pili, dont deux prédominent chez *K. pneumoniae*.

1) Pili de type 1 (pili commons) :

Adhésines les mieux connues, ils permettent à la bactérie de se lier aux muqueuses ou aux cellules épithéliales des tractus urogénital, respiratoire et intestinal (Clegg S. *et al.*, 1897).

Ils jouent un rôle dans la pathogénie des infections urinaires basses et des pyélonéphrites, du fait de leur capacité à se lier aux cellules du tube proximal.

2) Pili de type 3 :

Les souches de *K. pneumoniae* exprimant ce type de pili sont capables d'adhérer aux cellules endothéliales et épithéliales du tractus respiratoire, ainsi qu'aux cellules uro-épithéliales. Au niveau des reins, ces pili interviennent dans l'adhérence des bactéries aux membranes tubulaires, à la capsule de Bowman et aux vaisseaux sanguins.

3) Autres types d'adhésines :

D'autres adhésines ont été plus récemment décrites : l'adhésine CF29K qui permet l'adhérence de ces bactéries aux cellules intestinales (Darfeuille-Michaud A. *et al.*, 1992) ; l'adhésine KPF-28 dont le rôle est encore mal connu (Di Martino P. *et al.*, 1996).

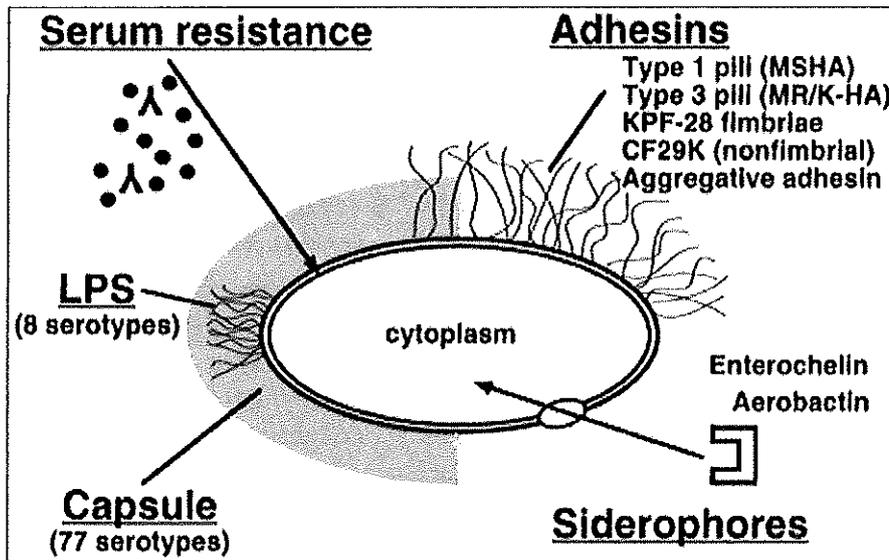
2.5.3- Sidérophores :

La croissance des bactéries dans les tissus de l'hôte est également limitée par la quantité insuffisante de fer disponible, le fer constituant un facteur de croissance essentiel pour la bactérie. Pour pallier cette difficulté, *K. pneumoniae*, comme beaucoup d'autres bactéries, sécrète des chélateurs du fer, de haute affinité et de faible poids moléculaire, appelés sidérophores, capables d'entrer en compétition avec les cellules de l'hôte vis-à-vis du fer (Griffiths E. *et al.*, 1988), dont la grande majorité se trouve lié aux protéines intra- et extracellulaires.

2.5.4- Résistance aux facteurs bactéricides du sérum et lipopolysaccharide (LPS) :

A côté de la phagocytose par les polynucléaires et les cellules mononucléées, la première ligne de défense de l'organisme contre l'invasion microbienne inclut l'effet bactéricide du sérum médié, en partie, par les protéines du complément. Après leur cascade d'activation, ces protéines s'accumulent à la surface du microorganisme, sous la forme d'un complexe d'attaque membranaire (CAM) qui aboutit à la formation d'un pore dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif, entraînant leur lyse osmotique (Taylor P. W. *et al.*, 1983). La capsule polysaccharidique, en couvrant et masquant le lipopolysaccharide (LPS), endotoxine assimilable aux antigènes somatiques (antigènes O) de la bactérie, qui constitue un autre facteur de pathogénicité de celle-ci, constituerait une surface incapable d'activer le complément. Chez certains types capsulaires, les chaînes latérales O polysaccharidiques du LPS pourraient cependant, en traversant cette capsule, être exposées à la surface de la bactérie. Après activation du complément, la fraction C3b se déposerait sur les molécules de LPS. Cependant, se fixant préférentiellement sur la plus longue chaîne O, la fraction C3b se trouverait éloignée de la membrane bactérienne, empêchant ainsi la formation du complexe d'attaque membranaire et, par conséquent, l'altération de cette membrane responsable de la mort de la cellule bactérienne.

Figure 9 : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité des *Klebsiella*
(d'après Podschun R. and Ullmann U., 1998).



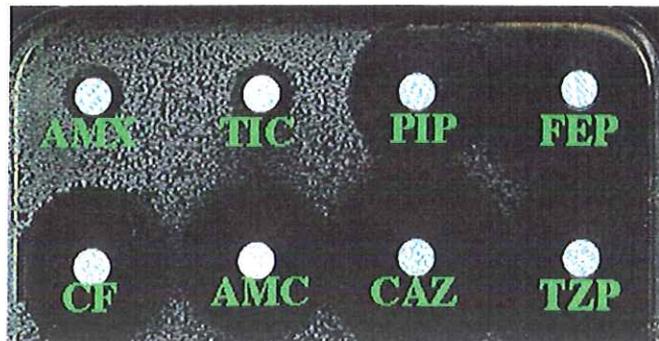
2.6- Résistance aux antibiotiques :

2.6.1- Résistance naturelle :

Concernant le comportement à l'égard des bêta-lactamines, *K. pneumoniae* est classée au sein du groupe 2 des entérobactéries dont le phénotype, souvent appelé phénotype « pénicillinase à bas niveau », se caractérise par la production naturelle, constitutive et à bas niveau, d'une pénicillinase chromosomique de type SHV-1, inactivant la benzylpénicilline, les amino- et carboxypénicillines. Le bas niveau de résistance se traduit par la persistance, sur l'antibiogramme, d'une petite zone d'inhibition autour du disque de carboxypénicilline (ticarcilline) et souvent même autour du disque d'aminopénicilline (amoxicilline). Cette bêta-lactamase naturelle est inhibée par de faibles concentrations d'inhibiteurs tels que l'acide clavulanique ou le sulbactam, d'où la sensibilité observée vis-à-vis des associations amoxicilline - acide clavulanique, ampicilline - sulbactam et ticarcilline - acide clavulanique (Photo 6, p. 39).

La fréquence de ce phénotype en milieu hospitalier est de l'ordre de 65 à 75 %, alors que les souches de *K. pneumoniae* isolées en pathologie communautaire présentent, pour la plupart, le phénotype sauvage (Thabaut A. *et al.*, 1990).

Photo 6 : Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé d'une souche sauvage de *Klebsiella pneumoniae*.



AMX : amoxicilline ; TIC : ticarcilline ; CF : céfalotine ; AMC : amoxicilline - acide clavulanique ; PIP : pipéracilline ; FEP : céfépime ; CAZ : ceftazidime ; TZP : pipéracilline - tazobactam.

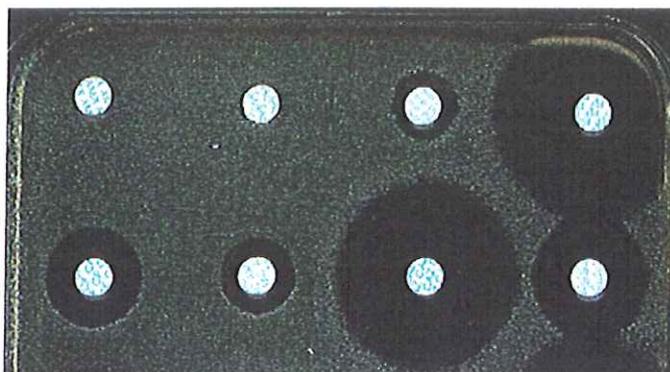
Par ailleurs, les souches de *K. pneumoniae* sont généralement sensibles à la colistine, aux fluoroquinolones, aux nitrofuranes, à l'association triméthoprim - sulfaméthoxazole, ainsi qu'aux aminosides et céphalosporines.

2.6.2- Résistance acquise :

1) Pénicillinases plasmidiques :

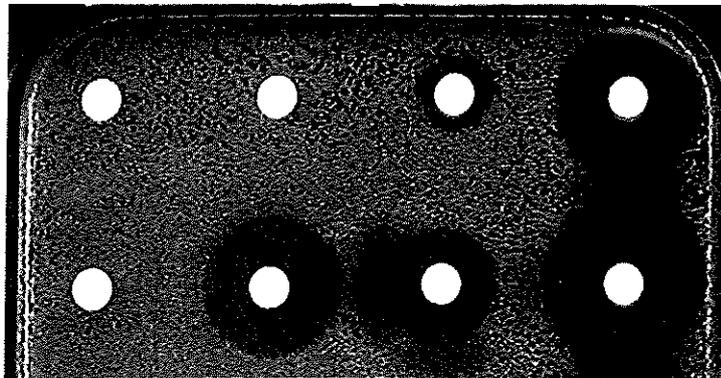
En réponse à la pression de sélection exercée par les bêta-lactamines, des souches de *K. pneumoniae* ont acquis des plasmides porteurs de gènes codant pour des bêta-lactamases de type TEM et SHV leur permettant d'hydrolyser les céphalosporines de 1^{ère} génération et certaines pénicillines à spectre large (Photo 7).

Photo 7 : Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* présentant une résistance acquise par production de pénicillinase (voir légende photo 6).



En 1980, l'introduction des céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G), ayant une meilleure activité antibactérienne et réputées non hydrolysables par les bêta-lactamases de type TEM, a constitué un réel progrès thérapeutique (Wiedemann B. *et al.*, 1989). Malheureusement, suite à l'importante prescription de ces antibiotiques, la résistance acquise aux C3G a rapidement été observée chez certaines souches de *K. pneumoniae*, isolées essentiellement en milieu hospitalier. En 1983, Knothe G. P. *et al* ont décrit, pour la première fois, une résistance aux céphalosporines à large spectre chez des souches de *K. pneumoniae*. Ce nouveau phénotype de résistance était lié à la production d'une bêta-lactamase plasmidique ayant évolué par mutation et qui, en raison de son large spectre d'activité, fut dénommée bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) (Sirot D., 1995). Cette enzyme, désignée SHV-2, dérivait de l'enzyme chromosomique SHV-1 (Photo 8).

Photo 8 : Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* présentant une résistance acquise par production de bêta-lactamase à spectre étendu (voir légende photo 6, p. 39).



Le nombre et la variété de ces BLSE, initialement rencontrées en Europe (Philippon A. *et al.*, 1994, Livermore D. M. *et al.*, 1996) puis décrites dans le monde entier, ont rapidement augmenté, de même que les mécanismes régulant leur production et leur dissémination. La diffusion des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE d'un patient à un autre, d'un service hospitalier à un autre, voire entre plusieurs hôpitaux (Gniadkowski M. *et al.*, 1998, Fiett J. *et al.*, 2000) et même, plus rarement, entre différents pays (Shannon K. *et al.*, 1998), a pu être démontrée.

Ainsi, les phénotypes de résistance acquise les plus fréquemment mis en évidence chez *K. pneumoniae* sont les phénotypes « pénicillinasés à haut niveau » et « bêta-lactamase à spectre étendu ». Le premier, qui représentait 25 à 30 % des souches de *Klebsiella* au début des années 1980, n'en représentait plus que 10 % dix ans plus tard (Thabaut A. *et al.*, 1990). A l'inverse, le phénotype « bêta-lactamase à spectre étendu », apparu en 1984, n'a cessé d'augmenter depuis.

A- Activité des BLSE :

Le phénotype de résistance acquise, lié à la production de BLSE, se caractérise par une forte diminution de l'activité des pénicillines, des céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} générations, ainsi que de l'aztréonam, mais une activité inchangée des céphamycines et des carbapénèmes. Une forte synergie est observée entre les bêta-lactamines inactivées et les inhibiteurs de bêta-lactamases tels que l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam. Parmi ces 3 inhibiteurs, l'acide clavulanique est le plus efficace (Dubois S. K. *et al.*, 1995) et cette synergie est à la base du test de détection des souches présentant ce phénotype. Les BLSE sont le plus souvent codées par des gènes TEM-1, TEM-2 et SHV-1 ayant subi des mutations ponctuelles (Emery C. L. *et al.*, 1997, Bradford P. A. *et al.*, 2001), à l'origine de la substitution de 1 à 4 acides aminés, situés à proximité du site actif de l'enzyme. Essentiellement localisées aux positions 104, 164, 237, 238 et 240 (Tableaux II et III, p. 43 et 44), ces substitutions augmentent l'affinité de ces enzymes pour les bêta-lactamines, permettant ainsi l'hydrolyse d'une plus grande variété de substrats, ainsi que pour les inhibiteurs de bêta-lactamases. Les gènes des BLSE sont généralement portés par des plasmides, capables de se transmettre entre bactéries et qui codent souvent pour la résistance à d'autres familles d'antibiotiques. Selon la localisation des substitutions, par rapport au site actif de l'enzyme, et la structure tridimensionnelle de celle-ci, certaines céphalosporines sont préférentiellement hydrolysées.

B- Principales BLSE rencontrées chez *K. pneumoniae* :

Une très grande diversité de BLSE dérivées des enzymes de type TEM-1 et TEM-2 ont été décrites chez *K. pneumoniae* : TEM-3, TEM-10, TEM-12, TEM-24, TEM-26, TEM-47, TEM-52... (Tableau II, p. 43). Lors de la première épidémie décrite en France, en 1985, les souches isolées produisaient l'enzyme TEM-3 (Sirot D. *et al.*, 1987, Sougakoff W. *et al.*, 1988). Un certain nombre de substitutions semblent indispensables à l'apparition d'un phénotype BLSE : substitution d'un acide glutamique par une lysine en position 104, d'une arginine par une sérine ou une histidine en position 238 et d'un acide glutamique par une lysine en position 240.

De nombreux variants de type SHV sont également connus : SHV-4, SHV-5, SHV-6 ou SHV-8 (Barthélémy M. *et al.*, 1988, Arlet G. *et al.*, 1995, Arlet G. *et al.*, 1997) (Tableau III, p. 44), l'enzyme SHV-4, produite par une souche de *K. pneumoniae* de sérotype K25, ayant été détectée dans au moins 14 hôpitaux français (Arlet G. *et al.*, 1994). La majorité de ces enzymes sont caractérisées par la substitution d'une glycine par une sérine en position 238 et un certain nombre d'entre elles présentent également une substitution d'un acide glutamique par une lysine en position 240. Le résidu sérine en position 238 joue un rôle important dans l'hydrolyse de la ceftazidime, tandis que le résidu lysine en position 240 intervient dans l'hydrolyse du céfotaxime (Huletsky A. *et al.*, 1993).

Le niveau de résistance conféré vis-à-vis du céfotaxime (CTX), de la ceftazidime (CAZ) et de l'aztréonam (ATM), considérés comme les antibiotiques principaux pour détecter et déterminer le phénotype de la BLSE, varie considérablement selon le type d'enzyme produit. Ainsi, les termes de « ceftazidimase » ou « céfotaximase » ont pu être utilisés.

On peut distinguer plusieurs variantes du phénotype « bêta-lactamase à spectre étendu » :

- **phénotype « CTX »**, caractérisé par un niveau de résistance similaire aux trois antibiotiques : TEM-3, SHV-2, SHV-3.
- **phénotype « CAZ a »**, caractérisé par un niveau de résistance plus élevé à la ceftazidime (CMI \geq 128 $\mu\text{g/mL}$) qu'aux deux autres antibiotiques (CMI de 0,5 à 4 $\mu\text{g/mL}$) : TEM-7, TEM-10, TEM-26. L'enzyme TEM-12 confère des CMI encore plus faibles avec, pour la ceftazidime, une CMI entre 4 et 8 $\mu\text{g/mL}$ et, pour le céfotaxime, une CMI de 0,06 à 0,25 $\mu\text{g/mL}$.
- **phénotype « CAZ b »**, caractérisé par un niveau de résistance plus élevé à la ceftazidime et à l'aztréonam qu'au céfotaxime : TEM-5, SHV-4, SHV-5, SHV-7
- **phénotype « ATM »**, caractérisé par un niveau de résistance plus élevé à l'aztréonam qu'aux deux autres antibiotiques.

Cependant, certaines BLSE ne dérivent ni de TEM ni de SHV. Décrites plus tardivement, ces enzymes de type CTX-M hydrolysent très fortement le céfotaxime et plus faiblement la ceftazidime ou l'aztréonam. D'autres BLSE non TEM non SHV ont été rapportées : PER-1/-2 (Nordman P. *et al.*, 1993), BES-1, GES-1/-2 (Poirel L. *et al.*, 2000), VEB-1 (Poirel L. *et al.*, 1999), TLA-1 (Silva J. *et al.*, 2000). Ces enzymes présentent peu d'homologie avec les BLSE dérivées de TEM ou SHV, mais leur spectre d'hydrolyse, variable, est superposable à celui décrit pour ces enzymes. Elles confèrent une résistance aux oxyimino-céphalosporines, particulièrement à la ceftazidime et à l'aztréonam. L'origine géographique des patients chez lesquels des souches produisant ces nouvelles enzymes ont été isolées, en France ou à l'étranger, est très variable : Asie du Sud-Est, Amérique du Sud, Turquie, Japon... Ces nouvelles BLSE, inhibées par l'acide clavulanique, sont codées par des gènes plasmidiques, ce qui facilite leur transmission inter-espèce.

Tableau II : Principales bêta-lactamases à spectre étendu de type TEM rencontrées chez *Klebsiella pneumoniae*.

β-lactamases	Positions (Numérotation de Ambler)											pI	
	39	69	104	164	237	238	240	244	265				
TEM-1	Glu	Met	AcGlu	Arg	Ala	Gly	AcGlu	Arg	Thr				5,4
TEM-2	Lys												5,6
TEM-3	Lys		Lys			Ser							6,3
TEM-4			Lys			Ser			Met				5,9
TEM-5				Ser	Thr		Lys						5,55
TEM-6			Ser	His									5,9
TEM-7	Lys			Ser									5,4
TEM-8	Lys		Lys	Ser		Ser							5,9
TEM-10				Ser			Lys						5,6
TEM-12				Ser									5,25
TEM-26			Lys	Ser									5,6
TEM-46	Lys		Lys	Ser			Lys						6,5
TEM-47						Ser	Lys		Met				6,0
TEM-52			Lys			Ser							6,0

Tableau III : Principales bêta-lactamases à spectre étendu de type SHV rencontrées chez *Klebsiella pneumoniae*.

β-lactamases	Positions (Numérotation de Ambler)											pI
	8	35	43	122	140	179	192	193	205	238	240	
SHV-1	Ile	Leu	Arg	Leu	Thr	Asp	Lys	Leu	Arg	Gly	Glu	7,6
SHV-2										Ser		7,6
SHV-3								Leu		Ser		7,0
SHV-4								Leu		Ser	Lys	7,8
SHV-5										Ser	Lys	8,2
SHV-6						Ala						7,6
SHV-7	Phe		Ser							Ser	Lys	7,6

pI : point isoélectrique.

C- Epidémiologie des BLSE :

L'incidence des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE a été estimée à 14-16 % (Sirot D. 1995) en France (Sirot D. *et al.*, 1992) et en Angleterre (Liu P. Y. F. *et al.*, 1992), taux probablement sous-estimé, compte tenu des difficultés de détection de ces enzymes. Leur distribution varie d'un pays à l'autre : en général, les enzymes de type TEM prédominent aux Etats-Unis, tandis que les enzymes de type SHV sont plus fréquemment observées en Europe.

Les premières épidémies observées aux Etats-Unis impliquaient les enzymes TEM-10, TEM-12 et TEM-26 (Jacoby G. A. 1994), également retrouvées en Angleterre. Depuis, de nombreuses autres enzymes ont été décrites dans ces pays (Rice L. B. *et al.*, 1996). En Europe, les souches résistantes à la ceftazidime produisent essentiellement des enzymes de type SHV-5 (Venezia R. A. *et al.*, 1995). En France, on note cependant une prévalence élevée des enzymes de type TEM, particulièrement TEM-3 (CTX-1) et, à un moindre degré, des enzymes de type SHV (Philippon A. *et al.*, 1994), notamment SHV-4 et SHV-5. L'enzyme TEM-26 a été décrite pour la première fois en France, en 1996 (Soilleux M. J. *et al.*, 1996). En Allemagne, les enzymes SHV-2 et SHV-5 semblent être les plus fréquentes.

Certaines BLSE paraissent limitées à des pays ou des régions spécifiques. Ainsi, l'enzyme TEM-10, responsable de nombreuses épidémies aux Etats-Unis, pendant de nombreuses années (Rice L. B. *et al.*, 1990, Bradford P. A. *et al.*, 1994), n'a été rapportée que récemment en Europe (Barroso H. A. *et al.*, 2000). Au contraire, TEM-3, fréquente en France, n'a encore jamais été détectée aux Etats-Unis (Soilleux M. J. *et al.*, 1996, Nordmann P. *et al.*, 1998). En Pologne, plusieurs épidémies impliquant TEM-47 ont été décrites (Gniadkowski M. *et al.*, 1998), tandis que TEM-52 n'a jusqu'ici été rencontrée qu'en Corée (Pai H. *et al.*, 1999), où une autre enquête récente a révélé que SHV-12 et SHV-2a étaient les BLSE les plus fréquentes (Pai H. *et al.*, 1998). Par contre, SHV-5 est décrite dans le monde entier (Vatopoulos A. C. *et al.*, 1990, Gaillot O. *et al.*, 1998, Gniadkowski M. *et al.*, 1998, Szabo D. *et al.*, 1999).

La plupart des souches productrices de BLSE sont isolées chez des patients hospitalisés, notamment dans le cadre d'épidémies (Chanal C. M. *et al.*, 1989, Nouvellon M. *et al.*, 1994, Lucet J. C. *et al.*, 1996). Malgré l'identification de gènes de résistance identiques chez des souches différentes et la connaissance des possibilités de transfert de plasmides d'une souche à une autre, la transmission d'une souche épidémique reste la principale cause de dissémination des BLSE (Yuan M. *et al.*, 1998). Elles sont le plus souvent codées par des plasmides de grande taille, présentant souvent une grande stabilité. Ainsi, des années après l'arrêt de la prescription de ceftazidime ou d'autres céphalosporines à large spectre, on a pu observer, chez certains patients, une persistance de la colonisation par des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE (Hibbertogers L. C. F. *et al.*, 1995).

La transmission croisée joue un rôle important dans la dissémination clonale de souches productrices de BLSE, facilitée par la plus longue survie des *Klebsiella* sur la peau que la plupart des autres bacilles à Gram négatif.

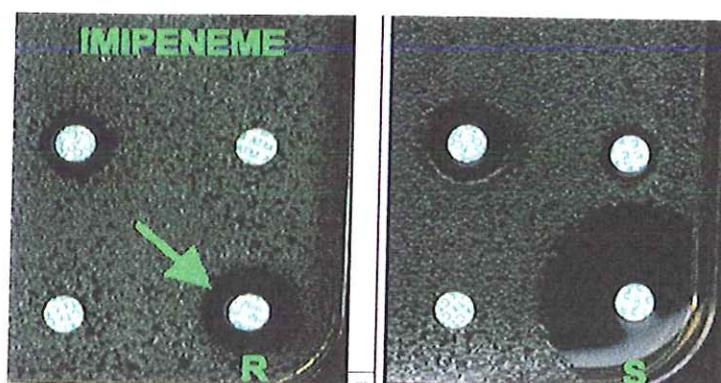
En France, l'émergence de la première souche de *K. pneumoniae* productrice de BLSE (CTX-1) était liée à la pression de sélection exercée par l'utilisation croissante du céfotaxime. De même, aux Etats-Unis, les épidémies à *K. pneumoniae* résistantes à la ceftazidime étaient corrélées à l'utilisation accrue de cet antibiotique. Une réduction de la prescription des bêta-lactamines constituerait donc un moyen de contrôler une telle résistance, diminuant l'incidence et la prévalence de ces souches. Cependant, l'émergence et la dissémination des BLSE ne sont pas liées seulement à la pression de sélection des céphalosporines de 3^{ème}

clavulanique et les autres inhibiteurs de bêta-lactamases et rendent donc les souches qui les possèdent résistantes à toutes les combinaisons bêta-lactamines - inhibiteur de bêta-lactamases, telles que amoxicilline - acide clavulanique (Augmentin[®]), ticarcilline - acide clavulanique (Claventin[®]) et ampicilline - sulbactam (Unacim[®]). En revanche, elles restent sensibles à l'inhibition par le tazobactam et, par conséquent, à l'association pipéracilline - tazobactam (Tazocilline[®]), ainsi qu'aux céphalosporines. Les substitutions d'acides aminés conduisant à ce phénotype sont distinctes de celles responsables du phénotype BLSE : les mutations ponctuelles concernent les résidus Met-69, Arg-244, Arg-275 et Asn-276 du gène TEM.

Des souches de *K. pneumoniae* de sensibilité diminuée ou résistantes aux céphamycines sont assez fréquemment isolées en milieu hospitalier. Ces souches sont également de sensibilité réduite ou résistantes aux céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} générations et, dans une moindre mesure aux uréidopénicillines et céphalosporines de 3^{ème} génération. Elles y associent une moindre sensibilité ou une résistance à plusieurs autres familles d'antibiotiques : quinolones, choramphénicol, cyclines et triméthoprime, liée à une diminution de l'expression d'une ou de plusieurs protéines de la membrane externe (défaut de perméabilité).

Enfin, une résistance à l'imipénème a été décrite chez de très rares souches de *K. pneumoniae* (Photo 10). Elle peut résulter de l'association d'une modification des porines diminuant la perméabilité de la membrane externe et de la production d'une céphalosporinase plasmidique (ACT-1) (Bradford P. A. *et al.*, 1997) ou d'une BLSE (Ardanuy C. *et al.*, 1998).

Photo 10 : Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* présentant une résistance acquise à l'imipénème.



R : résistant.
S : sensible.

2.7- Epidémiologie :

En plus d'une identification précise et d'un antibiogramme détaillé, le Clinicien a souvent besoin de savoir si une souche bactérienne isolée chez un patient provient de la même source que d'autres souches, apparemment identiques, isolées chez d'autres patients ou dans l'environnement.

Pour différencier, au sein d'une espèce bactérienne, des souches appartenant à des clones bactériens distincts, on utilise des marqueurs épidémiologiques, phénotypiques et génotypiques (Peña C. *et al.*, 1998, Struelens M. *et al.*, 2000).

Ces outils épidémiologiques permettent de confirmer la transmission endémique ou épidémique d'un pathogène au sein d'une population humaine, de déceler l'origine de la contamination et le mode de transmission (inter-humaine ou par contact avec un vecteur contaminé), de suivre l'évolution du réservoir du pathogène au sein d'une population, de mesurer l'efficacité des stratégies de maîtrise des infections épidémiques et de prévention des infections endémiques.

2.7.1- Notions générales :

L'espèce constitue l'unité de base de la classification bactérienne. Elle se définit actuellement comme un ensemble de souches ayant des homologies ADN-ADN se traduisant par des pourcentages d'hybridation supérieurs ou égaux à 70 %.

Un clone est un groupe de cellules dans lesquelles les séquences d'ADN sont toutes issues d'un ancêtre unique, sans recombinaison. Dans son application à l'épidémiologie des maladies infectieuses, le terme de clone peut être défini comme un groupe d'isolats issus d'un ancêtre commun, constituant les maillons d'une chaîne directe de réplication et de transmission, d'hôte à hôte ou de l'environnement à l'hôte. La relation clonale entre isolats peut être déduite de leur niveau de similitude géno- et phénotypique, le degré de similitude considéré comme significatif d'une lignée clonale en épidémiologie dépendant de l'espèce étudiée, des marqueurs utilisés et du cadre spatio-temporel de l'étude.

Deux types de mécanismes sont responsables de l'évolution observée chez les bactéries :

- *des mécanismes verticaux* : le chromosome et les plasmides sont transférés verticalement, par suite de la duplication et de la répartition entre les cellules filles ; leur diversification résulte de mutations au hasard et de réarrangements d'ADN tels que duplications, délétions ou transpositions.
- *des mécanismes horizontaux* : les transferts horizontaux de gènes entre les bactéries sont liés aux phénomènes de conjugaison, transposition, transduction et transformation, précédemment évoqués.

2.7.2- Méthodes de typage :

Les systèmes de typage peuvent être classés en 2 grandes catégories : les techniques phénotypiques qui détectent des caractères exprimés par les bactéries et les techniques génotypiques basées sur l'analyse de l'ADN bactérien, chromosomique ou extra-chromosomique.

1) Techniques phénotypiques :

Les marqueurs phénotypiques ont pour avantage d'être, pour la plupart, faciles à analyser (biotype, antibiotype) et leur étude standardisée au niveau international pour diverses bactéries, ce qui permet une comparaison directe des résultats provenant de différents laboratoires (sérotypage, lysotypage, bactériocinotypage). Prenant en compte l'expression de caractères qui peuvent être altérés de manière imprévisible chez la bactérie, ces méthodes ont cependant une mauvaise reproductibilité et, le plus souvent, un faible pouvoir discriminant.

Largement utilisées dans le passé, elles ont actuellement une utilité limitée, car elles requièrent des réactifs parfois indisponibles dans le commerce, ce qui constitue un obstacle à la réalisation d'études comparatives.

A- Biotypage :

Il correspond à l'étude des propriétés métaboliques (dégradation de sucres, activités enzymatiques, auxanogrammes...), de l'aspect morphologique et des caractéristiques vis-à-vis de l'environnement (croissance à des pH ou des températures extrêmes), pour différencier des souches d'une même espèce. Grâce aux systèmes d'identification disponibles dans le commerce, on obtient facilement le profil biochimique ou biotype de la bactérie étudiée. Cependant, ce biotype n'est pas une propriété stable et peut être influencé par des facteurs techniques et environnementaux, comme par le gain ou la perte d'un plasmide par la bactérie.

B- Antibiogramme :

Son utilisation en épidémiologie est basée sur la détermination de la sensibilité ou de la résistance d'une bactérie à un nombre important d'antibiotiques. Facilement réalisable, il a cependant comme désavantage majeur un faible pouvoir discriminant et dépend également de la variabilité génétique de la résistance aux antibiotiques, souvent déterminée par la présence ou l'absence, chez la bactérie, de plasmides portant des marqueurs de résistance. Des souches hospitalières différentes, mais ayant subi la pression de sélection exercée par les antibiotiques usuellement prescrits, peuvent développer des profils de résistance très similaires. Cependant, l'émergence d'un nouveau phénotype multirésistant constitue fréquemment un signal d'alerte, suggérant la dissémination épidémique d'un clone.

C- Sérotypie :

La sérotypie des bactéries est basée sur la présence ou l'absence de déterminants antigéniques somatiques, flagellaires ou capsulaires et leur réaction avec des antisérums spécifiques, souvent coûteux et pas toujours commercialisés. Pour les espèces qui ont un grand nombre de variants antigéniques, ces méthodes présentent un faible pouvoir de

discrimination. Le sérotypage de *K. pneumoniae* est basé sur la détermination des antigènes capsulaires dont on distingue plus de 80 types. Ce typage capsulaire présente une bonne reproductibilité, son inconvénient étant le grand nombre de réactions croisées observées entre les différents types capsulaires.

D- Autres méthodes phénotypiques :

D'autres méthodes, plus complexes, peu reproductibles, présentant un pouvoir discriminant limité et un certain manque de standardisation, ne sont réalisées que dans des laboratoires de références : lysotypie, bactériocinotypie.

2) Techniques génotypiques (Figure 10, p. 53) :

En raison des limites des méthodes phénotypiques, de nouveaux systèmes génotypiques, basés sur la détection du polymorphisme au niveau de l'ADN et utilisant des techniques de biologie moléculaire, ont été développés (Gori A. *et al.*, 1996). Ces méthodes sont applicables à la plupart des espèces bactériennes et possèdent un pouvoir de discrimination généralement très élevé.

A- Analyse plasmidique :

Ce fut l'une des premières méthodes de biologie moléculaire appliquée en épidémiologie (Tenover F. C., 1985), dans le but d'affirmer l'identité de souches épidémiologiquement liées.

Reposant sur l'assertion selon laquelle deux souches identiques possèdent le même profil plasmidique, elle est basée sur l'analyse du nombre et de la taille des plasmides hébergés par une bactérie, grâce à l'étude de leur mobilité électrophorétique. Deux types de profils peuvent être considérés :

- *le profil plasmidique brut* : il présente l'inconvénient de ne pas séparer les plasmides de séquences différentes mais de même taille et de produire des bandes différentes pour chacune des trois formes moléculaires sous laquelle peut se présenter un plasmide (formes surenroulée, relâchée ou linéaire).
- *le profil plasmidique après digestion par des enzymes de restriction* : la digestion à l'aide d'endonucléases de restriction améliore le pouvoir discriminant et la lisibilité des résultats. En effet, l'utilisation de ces enzymes permet d'uniformiser les fragments obtenus à partir des différentes formes moléculaires d'un même plasmide. De plus, ces enzymes permettent de différencier des plasmides de taille identique mais présentant des séquences différentes.

Un problème d'instabilité interfère pour les plasmides de résistance (plasmides R) qui peuvent très facilement être perdus ou acquis sous la pression de sélection des antibiotiques et qui peuvent s'échanger entre souches d'une même espèce, mais parfois aussi entre souches d'espèces différentes. Par ailleurs, ces plasmides R peuvent acquérir ou déléter des séquences d'ADN, changeant ainsi leur apparence physique sur le gel de migration.

L'analyse des profils de restriction plasmidique constitue donc un outil épidémiologique utile pour des investigations limitées dans le temps et l'espace.

B- Profil de restriction génomique (Restriction Endonuclease Analysis) :

Après extraction et purification, l'ADN génomique de la bactérie (chromosome) est coupé par des endonucléases de restriction reconnaissant des sites de coupure fréquents sur le chromosome bactérien. Après migration électrophorétique en gel d'agarose, on observe un grand nombre de fragments qui sont visualisés par immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium. Le nombre élevé de fragments de tailles différentes, engendrés lors de la digestion, rend cette technique peu résolutive et peu discriminante. La présence de plasmides, qu'ils soient ou non coupés par l'enzyme, peut perturber le profil de restriction.

C- Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN chromosomique :

Après électrophorèse, en gel d'agarose, de l'ADN bactérien préalablement clivé par diverses enzymes de restriction, un transfert est effectué sur un filtre de nitrocellulose ou de nylon, par la méthode de Southern. Ainsi fixé, l'ADN est alors hybridé par des sondes nucléiques (chaudes ou froides), la plus utilisée à l'heure actuelle étant l'ARN ribosomal 16S ou 23S de *E. coli*, capable d'hybrider avec l'ADN de tous les genres bactériens, de manière variable selon le ou les fragments de cet ADN avec lesquels elle présente des homologies : on obtient ainsi un ribotype.

D- Electrophorèse en champ pulsé : ECP (Gouby A. et al., 1994) :

L'ECP implique l'incorporation des cellules bactériennes dans une matrice d'agarose (plug), leur lyse *in situ* et la digestion de l'ADN chromosomique à l'aide d'endonucléases de restriction reconnaissant de rares sites de coupure sur le chromosome bactérien, permettant l'obtention de profils de 5 à 20 fragments dont la taille varie de 10 à 800 Kb. Les plugs sont alors introduits dans les puits d'un gel d'agarose, puis soumis à une migration électrophorétique, au cours de laquelle la direction du champ électrique est régulièrement modifiée. Les profils obtenus sont appelés pulsotypes.

Des problèmes d'interprétation peuvent se poser lorsque les pulsotypes sont susceptibles de subir des variations, suite à des mutations ou des réarrangements modifiant les sites de reconnaissance des endonucléases ou la taille des fragments chromosomiques.

E- Polymerase Chain Reaction (PCR) (Van Belkum A. 1994) :

Diverses techniques de PCR sont utilisées depuis quelques années pour le typage épidémiologique :

- Analyse du polymorphisme de restriction ou de conformation intragénique : PCR-RFLP, PCR-SSCP.

La PCR-RFLP repose sur l'amplification, par PCR classique, d'un fragment intragénique de 1 à 2 Kb, à l'aide d'une paire d'amorces spécifiques de séquences conservées, encadrant une région variable. Après digestion du fragment d'ADN amplifié, par diverses enzymes de restriction, l'analyse du profil obtenu par électrophorèse classique en gel d'agarose ou d'acrylamide non dénaturant permet d'étudier le polymorphisme de séquence.

La PCR-SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) est utilisée pour l'analyse de produits amplifiés par PCR. Lorsqu'un fragment d'ADN double brin est dénaturé par chauffage à 95°C puis rapidement refroidi, les molécules simple brin n'ont pas le temps de se réassocier entre elles, mais forment une structure secondaire stable, par des réassociations intramoléculaires au niveau de zones de séquences complémentaires. Les différences de séquences peuvent entraîner des différences de conformation, qui sont décelées par une migration en conditions non dénaturantes, dans un gel d'acrylamide.

- Techniques d'amplification aléatoire :

Différentes méthodes utilisant des amorces de séquences arbitraires ont été décrites : AP-PCR (« Arbitrarily Primed PCR »), DAF (« DNA Amplification Fingerprinting ») et surtout RAPD (« Random Amplified Polymorphic DNA »), la plus largement utilisée.

Cette dernière méthode consiste à amplifier des fragments d'ADN par PCR, en utilisant une seule amorce courte, de 10 nucléotides généralement, de séquence arbitraire, qui va s'hybrider chaque fois que l'ADN renfermera une séquence qui lui est complémentaire (ou comportant un nombre limité de mésappariements) et qui servira de point de départ pour la polymérase. Si deux sites d'hybridation sont proches l'un de l'autre (à moins de 3 000 pb) et en direction opposée, c'est-à-dire dans une configuration permettant la PCR, l'amplification aura lieu. Plusieurs produits d'amplification, d'intensité et de longueur variables, sont ainsi synthétisés et, après séparation par électrophorèse en gel d'agarose, donnent des profils de bandes caractéristiques de l'ADN cible.

- PCR-Ribotypage :

Cette technique est basée sur l'amplification, par PCR, de séquences de tailles variables, situées entre des amorces choisies pour s'hybrider avec les ARN ribosomiaux 16S et 23S. Les profils obtenus sont relativement stables et reproductibles.

- Etude de la dispersion aléatoire de séquences répétées : ERIC-PCR

Les amorces utilisées sont des séquences complémentaires de séquences d'ADN non codantes, présentes en un très grand nombre de copies et réparties de manière aléatoire sur le chromosome bactérien. Ces motifs, génétiquement stables, sont différenciés, à l'intérieur d'une même espèce, par le nombre de copies et leur localisation sur le chromosome. L'ERIC-PCR a pour cible les séquences ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence), de 124 à 127 pb, réparties sur le chromosome bactérien qui en possède 30 à 150 copies. Une seule amorce est utilisée pour l'amplification par PCR, qui se produit entre deux sites de fixation de celle-ci, pas trop éloignés l'un de l'autre.

Seconde partie :

MATÉRIEL

ET

MÉTHODES

1- Souches bactériennes :

Notre étude a porté sur 32 souches de *K. pneumoniae* productrices de bêta-lactamase à spectre étendu, sur les 42 souches isolées de prélèvements réalisés chez des patients hospitalisés dans différents services du CHU et de l'hôpital Saint-Jacques, à Nantes, de 1990 à 2001, les autres souches étant indisponibles ou représentant des isolements répétés à partir de divers prélèvements réalisés chez un même patient.

Leur origine est indiquée dans le tableau IV.

Tableau IV : Origine des souches de *Klebsiella pneumoniae* étudiées.

N° identification	N° de collection	Prélèvement	Service d'origine
1	90000398	Urines	Rééducation fonctionnelle
2	90000414	Urines	Urgences médicales
3	90000544	Hémoculture	Urgences médicales
4	90000545	Urines	Réanimation médicale
5	91000247	Urines	Urologie
6	91000433	Hémoculture	Urgences médicales
7	91000583	Urines	Traumatologie
8	91000643	Urines	Urologie
9	91000816	Hémoculture	Urologie
10	91001298	Urines	Rhumatologie
11	91001401	Urines	Gériatrie
12	91001679	Urines	Urgences médicales
13	91002708	Urines	Urgences médicales
14	92000207	Urines	Rééducation fonctionnelle
15	92000572	Urines	Rééducation fonctionnelle
16	92002072	Urines	Rééducation fonctionnelle
17	92002571	Urines	Neuro-traumatologie
18	93000493	Urines	Rééducation fonctionnelle
19	93002576	Urines	Rééducation fonctionnelle
20	93002778	Urines	Rééducation fonctionnelle
21	93003956	Urines	Rééducation fonctionnelle
22	93008196	Hémoculture	Rééducation fonctionnelle
23	94000667	Hémoculture	Rééducation fonctionnelle
24	96004178	Hémoculture	Urgences médicales
25	98011015	Urines	Urgences pédiatriques
26	99000019	Pus cutané	Stomatologie
27	20006391	Urines	Oncologie pédiatrique
28	20005244	Urines	Rééducation fonctionnelle
29	20000229	Urines	Rééducation fonctionnelle
30	1003824	Urines	Cardiologie pédiatrique
31	1006355	Urines	Rééducation fonctionnelle
32	1006267	Selles	Cardiologie pédiatrique

2- Etude de la sensibilité aux antibiotiques :

La production de BLSE par les souches étudiées a été initialement suspectée sur leur phénotype de résistance aux bêta-lactamines, déterminé par l'automate Vitek2® (bioMérieux) et par technique de diffusion en milieu gélosé (méthode des disques) pour les antibiotiques non testés par celui-ci : céfépime (FEP), cefpirome (CPO), aztréonam (ATM), ainsi que tétracycline (TE) et chloramphénicol (C), selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM : <http://www.sfm.asso.fr>).

3- Etude du transfert de résistance par conjugaison bactérienne :

Pour déterminer si les BLSE étaient transférables d'une bactérie à une autre et si leur transfert était associé à celui d'autres gènes de résistance, des expériences de conjugaison ont été réalisées entre les 32 souches de *K. pneumoniae* productrices de ces enzymes et une souche réceptrice : *E. coli* J53-2, sensible à tous les antibiotiques, à l'exception de la rifampicine (caractère d'origine chromosomique, considéré comme non transférable).

Les bactéries donatrices et réceptrices ont été initialement cultivées séparément en bouillon-cœur-cerveau (BCC), à 37°C, pendant une nuit. Leur mélange, à volume égal, a alors été réalisé sur gélose Trypticase-Soja enrichie de 5 % de sang de cheval (GSg), à raison d'une goutte de chaque bouillon, déposée au centre du milieu gélosé. Après un contact de 8 heures à 37°C, les transconjugants (Tc) obtenus ont été sélectionnés sur leur mobilité (caractéristique spécifique de la bactérie réceptrice : *E. coli*, par rapport à la bactérie donatrice : *K. pneumoniae*) et l'acquisition de la résistance à l'amoxicilline. Nous avons pour cela utilisé le milieu TIMM, gélose semi-molle favorisant la mobilité bactérienne, additionné d'amoxicilline (100µg/mL), ensemencé par piqûre centrale. Après plusieurs jours d'incubation à température ambiante, les Tc mobiles et résistants à l'amoxicilline ont été récupérés à la périphérie de ce milieu et purifiés sur gélose Mueller-Hinton (MH), supplémentée en amoxicilline (100µg/mL).

4- Mise en évidence de la production de bêta-lactamase à spectre étendu :

Certaines BLSE n'entraînent qu'une élévation modérée des CMI des céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} générations, ce qui peut compromettre leur détection par les méthodes phénotypiques d'antibiogramme.

D'autres méthodes phénotypiques et génotypiques peuvent alors être mises en oeuvre (Katsanis G. P. *et al.*, 1994, Jacoby G. A. *et al.*, 1996).

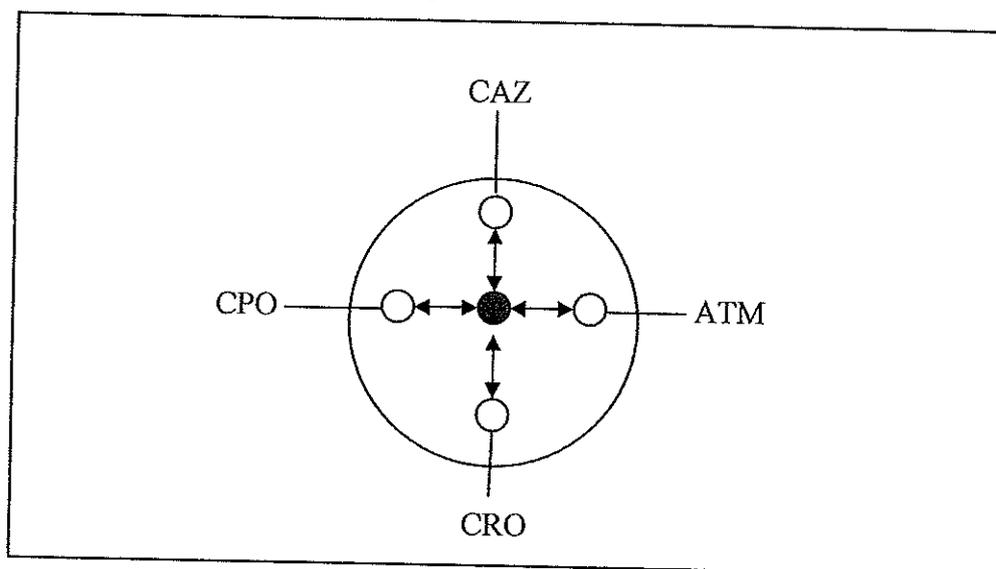
4.1- Méthodes phénotypiques :

Pour confirmer la production de BLSE par les souches étudiées et vérifier leur acquisition par les transconjugants obtenus, deux tests, basés sur la sensibilité des BLSE aux inhibiteurs de bêta-lactamases tel que l'acide clavulanique, ont été utilisés : le test de synergie en croix et un test commercialisé par la firme OXOID (Combination disk method-OXOID).

4.1.1- Test de synergie en croix :

Ce test consiste à déposer, sur une gélose MH préalablement ensemencée avec une suspension standardisée de la bactérie à étudier, des disques de ceftriaxone (CRO), ceftazidime (CAZ), cefpodoxime (CPO) et aztréonam (ATM), disposés en croix autour d'un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC), en respectant une distance de 2 cm bord à bord (Figure 11).

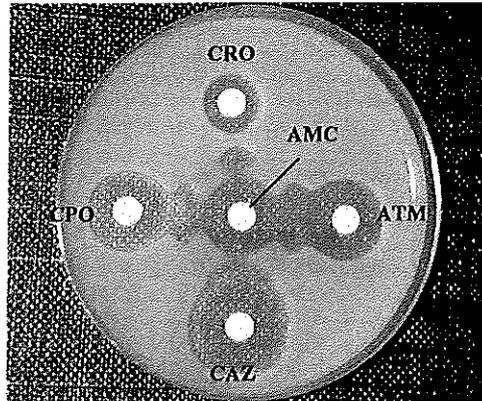
Figure 11 : Schéma du test de synergie en croix utilisé pour la détection des bêta-lactamases à spectre étendu.



- amoxicilline + acide clavulanique (AMC)
- ATM : aztréonam
- CRO : ceftriaxone
- CPO : cefpodoxime
- CAZ : ceftazidime
- ↔ 2 cm bord-à-bord

Après 18 heures d'incubation à 37°C, la présence d'une BLSE est visualisée par un net élargissement de la zone d'inhibition autour du disque de céphalosporine de 3^{ème} génération ou d'aztréonam, en regard du disque contenant l'acide clavulanique (AMC), traduisant une synergie entre inhibiteur de bêta-lactamases et bêta-lactamines, liée à l'inhibition de la BLSE par l'acide clavulanique (Photo 11, p.58) : image typique dite en " bouchon de champagne ".

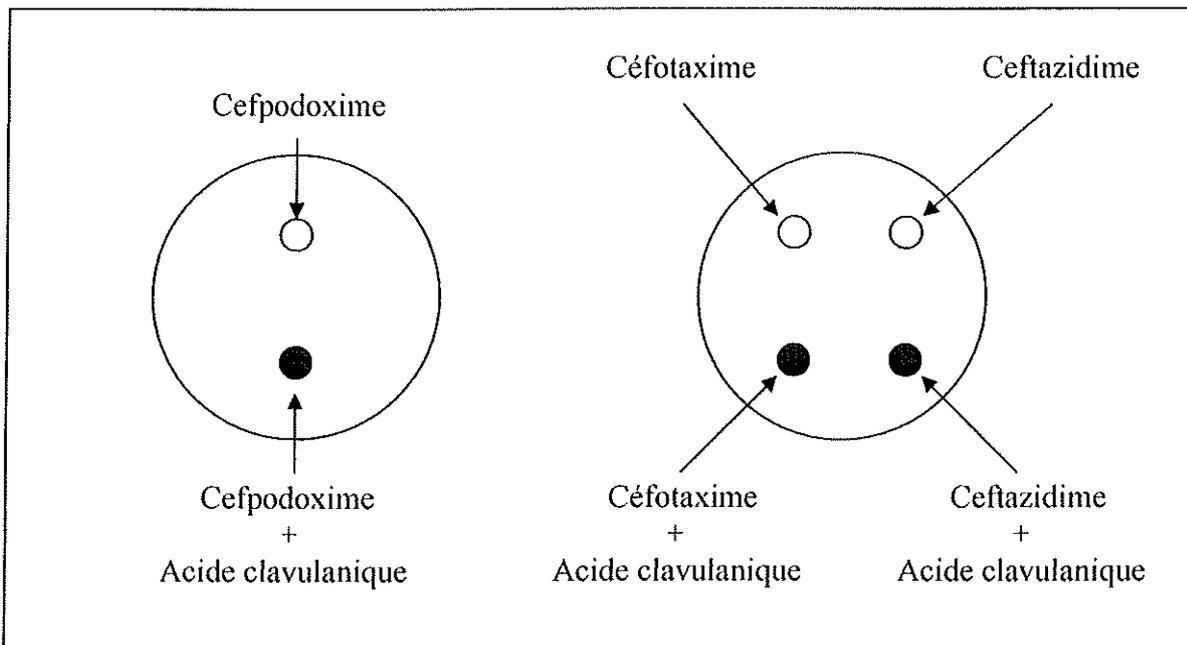
Photo 11 : Image de synergie en « bouchon de champagne » révélant l'inhibition d'une bêta-lactamase à spectre étendu par l'acide clavulanique.



4.1.2- Test OXOID :

Deux disques imprégnés, l'un d'une céphalosporine de 3^{ème} génération et l'autre de ce même antibiotique associé à un inhibiteur de bêta-lactamases (acide clavulanique - AcC), sont déposés à la surface d'une gélose MH préalablementensemencée avec une suspension standardisée de la souche bactérienne à étudier (Figure 12). Trois couples d'antibiotiques sont testés : céfotaxime (CTX) et CTX + AcC, ceftazidime (CAZ) et CAZ + AcC, cefpodoxime (CPD) et CPD + AcC. Une différence supérieure ou égale à 5 mm entre les diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'un même couple, traduit la présence d'une BLSE (Carter M. W. *et al.*, 2000).

Figure 12 : Schéma du test "Combinaison Disk Method" (OXOID) permettant la détection des bêta-lactamases à spectre étendu.



4.2- Méthodes génotypiques : amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) et séquençage du gène *bla*_{TEM}.

4.2.1- Principe :

La PCR permet d'amplifier des séquences d'ADN, de manière spécifique, à l'aide d'un couple d'amorces constitué d'oligonucléotides complémentaires des extrémités du fragment d'ADN à amplifier, qu'elles vont délimiter, et à l'aide d'une ADN-polymérase thermostable : la Taq-polymérase, qui permet de synthétiser un brin complémentaire de la zone cible, grâce à l'élongation de ces amorces. Amorces et Taq-polymérase sont ajoutées au mélange d'ADN contenant la séquence à amplifier, en présence de désoxynucléotides, éléments de base utilisés par l'enzyme pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires. Ce mélange est alors soumis à des modifications itératives de températures qui sont à l'origine de la succession de 3 phases constituant un cycle au cours duquel la quantité d'ADN cible est doublée. L'amplification est donc exponentielle et permet d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement, facilitant ainsi sa détection et son analyse.

4.2.2- Réalisation pratique :

L'extraction rapide de l'ADN a été réalisée en portant à ébullition, pendant 5 minutes, 4 à 5 colonies bactériennes en suspension dans un volume final de 100 µL d'eau distillée stérile. Après centrifugation pendant 10 minutes à 13000 tours/minute, 10 µL de surnageant ont été utilisés pour l'amplification par PCR.

Celle-ci a été réalisée dans un thermocycleur PERKIN ELMER-DNA thermal Cycleur 480, à partir d'un mélange de 50 µL contenant :

- 27,1 µL d'eau distillée stérile
- 5 µL de tampon TRIS-HCl 10X
- 3 µL de MgCl₂ 25 mM
- 1 µL de chaque nucléotide A, T, G, C (10 mM chacun)
- 0,33 µL de chacune des 2 amorces TEM_A et TEM_B à 150 pmol/µL
- 0,25 µL de Taq polymérase (5 unités/µL)
- 10 µL d'extrait d'ADN brut

soumis à une dénaturation de 30 secondes à 94°C, une phase d'hybridation de 30 secondes à 55°C puis une phase d'extension de 1 minute à 72°C, température maintenue 7 minutes pour permettre l'extension finale.

Pour chaque PCR, un témoin négatif (blanc), ne contenant pas d'ADN, a été inclus.

Pour amplifier le gène *bla*_{TEM} des souches de *K. pneumoniae* étudiées, les amorces suivantes ont été utilisées :

TEM_A : 5'- GACTGGATGGAGGCGGAT-3'
TEM_B : 5'- CAATGCTTAATCAGTGAG -3'

Pour réaliser le séquençage de ce gène, les 2 autres couples d'amorces suivants ont été nécessaires :

TEM_C : 5'- TGATAACACTGCGGCCAA-3'

TEM_D : 5'- ATAAACCAGCCAGCCGGA-3'

TEM_E : 5'- GTATCCGCTCATGAGACA-3'

TEM_F : 5'- GATCAAGGCGAGTTACAT-3'

4.2.3- Détection des produits d'amplification :

Afin de s'assurer que l'ADN cible a été correctement amplifié, les produits de PCR ont été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose, permettant de vérifier que le fragment d'ADN amplifié avait bien la taille prévue, par comparaison à un marqueur de poids moléculaire (Marqueur VI/ Boehringer Mannheim).

Dix microlitres de chaque amplicon, ainsi que 6 µL du marqueur de poids moléculaire, ont ainsi été déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 1,5 %, après addition de 2 µL d'un colorant densifiant (blue orange 6X, Proméga) qui permet de suivre la migration (1 heure, sous une tension de 100 Volts, en tampon Tris-Borate-EDTA 1X, pH 8,3).

A l'issue de la migration, les fragments d'ADN ont été détectés sur le gel, préalablement immergé 30 minutes dans une solution de bromure d'éthidium, par exposition aux rayons UV.

4.2.4- Séquençage des produits de PCR :

Afin d'identifier précisément la BLSE majoritairement détectée chez les transconjugants, nous avons procédé, pour l'un d'entre eux, au séquençage du gène *bla*_{TEM} codant pour cette enzyme, par la méthode de Sanger (Sanger F. *et al.*, 1977). Après amplification par PCR des différents fragments du gène, le séquençage a été réalisé à l'aide du kit Big Dye Terminator-Applied Biosystem, en séquenceur ABI Prism 377.

Les copies d'ADN obtenues, de tailles variables et complémentaires de la matrice d'ADN à séquencer, ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'analyse des différents fragments marqués a alors été réalisée à l'aide de logiciels informatiques (séquence navigator et séquence analysis - Applied Biosystem).

5- Typage des souches par électrophorèse en champ pulsé (ECP) :

Pour définir le degré de relation clonale existant entre les différents isolats de *K. pneumoniae* étudiés, chacun d'entre eux a été soumis à une électrophorèse en champ pulsé, basée sur la technique CHEF (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field), représentée schématiquement sur la figure 13.

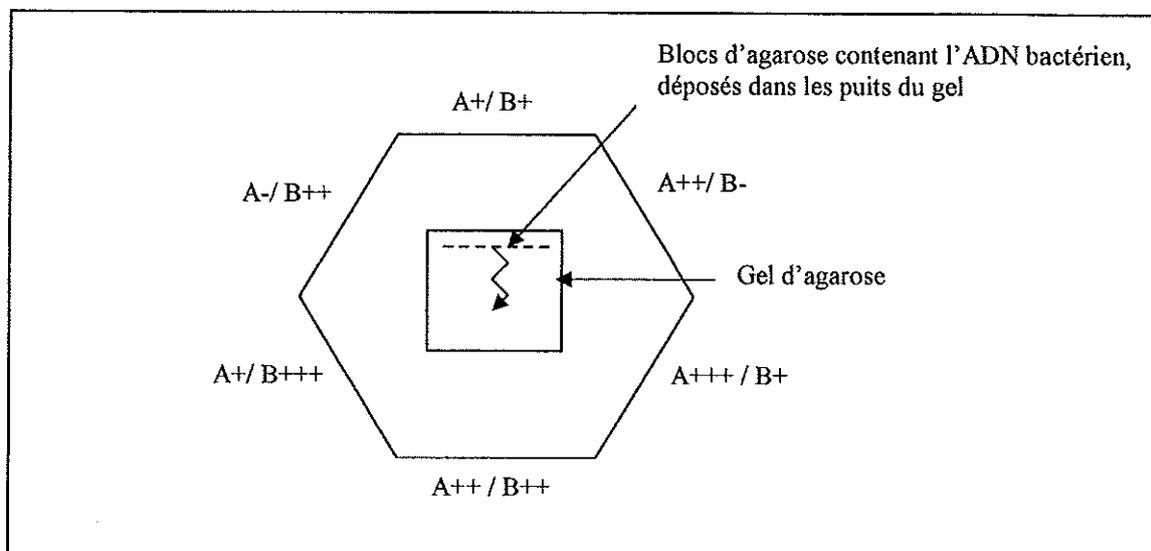
5.1- Principe :

A la différence de l'électrophorèse classique qui n'utilise qu'un seul champ électrique constant, l'ECP expose l'ADN à des champs qui changent régulièrement d'orientation au cours de l'électrophorèse, alternance qui permet la séparation de fragments d'ADN de grande taille par un phénomène de " reptation " à travers les mailles du gel d'agarose.

Elle nécessite l'extraction de l'ADN total à partir des souches à analyser. Cet ADN doit être purifié, indemne de toute coupure physique ou enzymatique, c'est pourquoi toutes les manipulations doivent être effectuées après inclusion des cellules bactériennes dans une matrice semi-solide d'agarose (plug). Les enzymes nécessaires à l'extraction de l'ADN total, ainsi que les endonucléases de restriction permettant sa digestion, diffusent dans les mailles du gel d'agarose. Ces dernières enzymes, qui coupent de manière spécifique et reproductible l'ADN double-brin, sont choisies de telle sorte qu'elles reconnaissent des sites de restriction rares sur le chromosome bactérien, le clivant ainsi en un nombre réduit de fragments de grandes tailles qui seront séparés au cours de l'ECP, permettant la comparaison des souches bactériennes, en fonction du polymorphisme des fragments de restriction de leur génome (profil de " macrorestriction ").

Lors de l'électrophorèse, l'ADN migre directement du plug dans l'agarose du gel de migration.

Figure 13 : Représentation schématique du système d'électrophorèse en champ pulsé CHEF. Ce système utilise des électrodes (A et B), placées de façon hexagonale, alternativement activées. Tout le long de ce réseau d'électrodes, existe un gradient de potentiel, les signes - et + indiquant l'importance de la charge au niveau de chacune d'entre elles.



5.2- Réalisation pratique (Birren B. *et al.*, 1993, Fair M. A. , 2002) :

5.2.1- Lyse et extraction de l'ADN :

A partir d'une culture de 8 heures sur pente Trypticase-Soja (TS), les bactéries ont été cultivées dans 10 mL de BCC, à 37°C, sous agitation, pendant une nuit.

La densité optique des suspensions bactériennes a alors été mesurée à 600 nm et ajustée à 0,6, avant centrifugation 5 minutes à 8000 tours/minute. Le culot obtenu a été remis en suspension dans 1 mL de Pet IV (NaCl 1M ; Tris-HCl 10 mM), puis une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 8000 tours/minute a été réalisée. Le culot final a été remis en suspension dans 300 µL de EC (Tris-HCl 6 mM).

Chaque suspension bactérienne a été mélangée à 300 µL d'agarose Sea Plaque à 1 % dans du EC, puis 600 µL de ce mélange ont été rapidement répartis dans 5 moules d'agarose préalablement préparés, avant de laisser solidifier 10 minutes à température ambiante puis 30 minutes à 4°C. Les plugs ainsi formés ont ensuite été placés dans des tubes contenant 10 mL de tampon EC additionné de lysozyme (1 mg/mL), destiné à détruire la paroi bactérienne, pendant 1 heure, à 37°C, sous agitation douce. Le tampon EC a alors été éliminé et remplacé par 10 mL de tampon ESP (EDTA 0,5 M ; N-lauryl sarcosine 1 % ; Protéinase K 50 µg/mL, protéase destinée à digérer les protéines associées à l'ADN, sans altération des acides nucléiques), avant incubation, une nuit, à 55°C.

Après élimination du tampon ESP, remplacé par 10 mL de TE 10-1, les tubes ont été placés 1 heure à température ambiante, sous agitation douce. Cette étape de lavage a été répétée 6 fois. Après le 6^{ème} lavage, les plugs ont été stockés en TE 10-1, à + 4°C, jusqu'à analyse.

Afin de pouvoir interpréter les profils, la migration a été effectuée parallèlement à celle d'un marqueur de taille, fragment chromosomique digéré par l'enzyme de restriction *SmaI* de *Staphylococcus aureus* NCTC 8325.

5.2.2- Restriction et électrophorèse :

2,5 µL d'enzyme de restriction *SpeI* ont été dilués dans 120 µL de tampon spécifique, dilué au 1/10, puis répartis en microtubes dans lesquels ont alors été introduits des fragments de plugs de 5 x 5 mm, pour une incubation d'une nuit, à 37°C.

Le marqueur de taille a été traité de façon similaire, mais en utilisant une enzyme de restriction différente : *SmaI*, en tampon spécifiquement adapté, à la température de 25°C.

Après « digestion », les plugs ont été inclus dans les puits d'un gel d'agarose Sea Kem 1 % en TBE 0,5X, qui ont ensuite été scellés par du Sea plaque agarose 1 % en TBE 0,5X.

Enfin, gel et support ont été introduits dans la cuve d'électrophorèse de l'appareil CHEF-DRIII Bio-Rad, en présence de tampon TBE 0,5X.

Les conditions de l'électrophorèse étaient les suivantes :

- Pulse initial : 2 sec
- Pulse final : 20 sec
- Temps : 20 heures
- Voltage : 200 ou 6V/cm
- Température : 14°C
- Included Angle : 120°.

5.2.3- Révélation des profils de macrorestriction :

Après migration, le gel a été immergé pendant 30 minutes dans une solution de bromure d'éthidium, puis photographié.

5.2.4- Interprétation des profils de restriction :

L'analyse des pulsotypes de chacune des souches de *K. pneumoniae*, basée sur la comparaison du nombre et de la taille des fragments d'ADN séparés, a été réalisée à l'aide du logiciel informatique GelCompar[®]. La relation existant entre les souches étudiées a été estimée par le coefficient de similitude de Dice (Coefficient de Dice = $2 n_{AB} / (n_A + n_B)$; n_{AB} : nombre de bandes communes entre A et B, n_A : nombre total de bandes dans la piste A, n_B : nombre total de bandes dans la piste B). Après comparaison deux à deux de tous les profils par ce coefficient, une représentation graphique sous la forme d'un dendrogramme a pu être réalisée. Ces profils ont alors été interprétés selon les recommandations de Tenover *et al.* (Tenover F. C *et al.*, 1995, Grimont P. A. D., 1998) : les souches présentant des pourcentages de similitude de plus de 80 % mais inférieurs à 100 % ont été considérées comme similaires et regroupées en sous-types. Ces profils différaient généralement par 1 à 3 bandes. Les souches pour lesquelles le pourcentage de similitude était inférieur à 80 % du fait d'une différence de profil portant sur plus de 3 bandes ont été considérées comme appartenant à des clusters différents.

Des mutations génétiques aléatoires peuvent affecter individuellement une souche bactérienne et générer des variations ponctuelles sur les profils de ces souches, par comparaison au profil de référence des autres souches (Tableau V, p. 64).

Tableau V : Conséquences des évènements génétiques sur les profils de restriction obtenus par électrophorèse en champ pulsé :

Evènement génétique	Modification du profil de restriction
Mutation ponctuelle entraînant la création d'un nouveau site de restriction	Perte d'un fragment présent dans le profil initial et apparition de 2 nouveaux petits fragments ; la somme des tailles de ces 2 petits fragments correspond approximativement à la taille du grand fragment disparu. Il en résulte une différence portant sur 3 fragments par rapport au profil de la souche native.
Mutation ponctuelle entraînant la perte d'un site de restriction	Perte de 2 petits fragments présents dans le profil de la souche native et apparition d'un nouveau fragment de grande taille. Il en résulte une différence portant sur 3 fragments par rapport au profil de référence.
Insertion d'ADN dans un fragment possédant un site de restriction	Même nombre de fragments mais perte d'un petit fragment remplacé par un nouveau fragment de plus grande taille.
Délétion d'ADN au niveau d'un fragment portant un site de restriction.	Perte d'un fragment de grande taille et apparition d'un nouveau fragment de taille plus petite.

6- Isolement et étude des plasmides extraits des transconjugants :

Pour confirmer la présence de plasmides chez les transconjugants, étudier leur taille et comparer leur profil de restriction, leur ADN plasmidique a été extrait puis soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 0,8 % et à une électrophorèse en champ pulsé, sous forme native et après digestion par diverses enzymes de restriction.

6.1- Extraction de l'ADN plasmidique :

6.1.1- Principe :

L'extraction plasmidique a été réalisée à l'aide de 2 méthodes : le kit Nucleobond et la méthode d'Ish-Horowicz, basées sur une lyse alcaline ménagée de la bactérie, par action combinée d'un détergent : le sodium dodécylsulfate (SDS) qui solubilise les composants phospholipidiques et les protéines de la membrane cellulaire, et de la soude qui dénature les ADN chromosomique et plasmidique (Birboim H. C. *et al.*, 1979). Cette lyse est suivie d'une extraction des plasmides suivant un degré croissant de salinité. Peu fragile du fait de sa petite taille, l'ADN plasmidique résiste bien à ce traitement et reste majoritairement constitué de molécules d'ADN circulaires fermées. L'ADN chromosomique est, au contraire, totalement cisailé au cours de l'extraction et libère de multiples fragments linéaires.

6.1.2- Réalisation pratique :

1) Extraction à l'aide du kit Nucleobond :

A- Culture et récupération des bactéries :

Une pré-culture a été réalisée à partir de 5 colonies bactériennes isolées sur gélose lactosée, mises en suspension dans 5 mL de bouillon Luria-broth (LB), additionné d'amoxicilline (100 µg/mL). L'ensemble a été incubé 8 heures à 37°C, sous agitation, puis 250 µL de cette culture ont été ajoutés à 250 mL de bouillon LB supplémenté avec de l'amoxicilline (100 µg/mL), avant incubation d'une nuit, à 37°C, sous agitation. Les cellules bactériennes ont ensuite été récupérées par centrifugation à 6000 g, pendant 15 minutes, à 4°C.

B- Lyse bactérienne :

Le culot bactérien a été délicatement remis en suspension dans 24 mL de tampon S1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH8), additionné de RNase A à la concentration finale de 100 µg/mL.

Puis, 24 mL de tampon S2 (200 mM NaOH, 1% SDS) ont été ajoutés à la suspension et mélangés doucement, avant d'incuber 3 minutes, à température ambiante.

24 mL de tampon S3 (acétate de potassium 80 mM, pH 5,1), préalablement refroidi dans la glace, ont alors été ajoutés, mélangés immédiatement jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène contenant un flocculat blanc, avant d'incuber 5 minutes dans la glace.

C- Equilibrage de la colonne de résine anionique :

La colonne Nucleobond® AX 500 a été équilibrée à l'aide de 6 mL d'un tampon N2 (100 mM Tris/ H₃PO₄, 15 % éthanol, 900 mM KCl, pH 6,3, 15 % Triton X-100).

D- Clarification du lysat :

Cette étape très importante permet l'élimination des débris cellulaires, des protéines et de l'ADN génomique. Elle peut être effectuée par filtration ou par centrifugation, l'association des 2 procédés permettant l'obtention d'un lysat parfaitement clair.

Le lysat à clarifier a donc été déposé sur un filtre Nucleobond Folder préalablement humidifié avec quelques gouttes de tampon N2. L'effluent de la colonne, correspondant au lysat clair, a alors été récupéré puis centrifugé à 12000 g, pendant 40 minutes, à 4°C.

E- Fixation à la résine échangeuse d'anions :

Le lysat clarifié a été chargé sur la colonne de résine échangeuse d'anions, sur laquelle la fixation et l'éluion des macromolécules dépendent de la force ionique et du pH. La colonne, préalablement équilibrée avec le tampon N2, ne permet pas la fixation des protéines, des nucléotides, des oligonucléotides et des ARNt ; la RNase ajoutée au tampon S1 permet l'élimination des ARN, tandis que l'étape de lyse alcaline ne laisse subsister que peu d'ADN génomique, ce qui permet à l'ADN plasmidique contenu dans le lysat clair de se fixer seul à la colonne.

F- Lavage de la colonne :

Afin d'éliminer les produits non fixés, la colonne a été lavée à deux reprises avec 18 mL de tampon N3 (100 mM Tris / H₃PO₄, 15 % éthanol, 1150 mM KCl, pH 6,3).

G- Elution :

L'ADN plasmidique a été élué à l'aide de 15 mL de tampon N5 (100 mM Tris/H₃PO₄, 15 % éthanol, 1000 mM KCl, pH 8,5), de force ionique et pH élevés, préalablement chauffé à 50°C.

H- Précipitation de l'éluat à l'isopropanol :

L'ADN plasmidique élué a été précipité par addition de 11 mL d'isopropanol (1 volume d'éluat pour 0,7 volume d'isopropanol), l'ensemble étant mélangé délicatement puis centrifugé à 15000g pendant 30 minutes, à 4°C, avant élimination du surnageant.

I- Lavage et séchage du culot d'ADN :

Après lavage du culot d'ADN avec 5 mL d'éthanol à 70 %, ramené à la température du laboratoire (20-25°C), le mélange a été brièvement vortexé puis centrifugé à 15000g, pendant 10 minutes, à température ambiante. Après retrait soigneux de l'éthanol, à la pipette, le culot a été mis à sécher à l'étuve.

J- Remise en suspension de l'ADN plasmidique :

Le culot d'ADN plasmidique a finalement été remis en suspension dans 1 mL de TE 10-5, puis conservé à + 4°C, jusqu'à analyse.

2) Méthode d'Ish-Horowicz et Burke :

Pour cette technique qui permet l'extraction de plasmides de tailles plus modestes que la technique précédente, nous avons suivi le protocole suivant :

- 1- Centrifuger 1,5 mL d'une culture bactérienne réalisée pendant une nuit, à 37 °C, sous agitation, dans 5 mL de LB additionné d'amoxicilline (100 µg/mL), pendant 3 minutes à 10000 tours/minute.
- 2- Remettre le culot en suspension dans 100 µL de tampon Tris-EDTA-Glucose (TEG).
- 3- Ajouter 200 µL de NaOH 0,2 N / SDS 1 %, puis mélanger doucement et mettre 3 minutes dans la glace.
- 4- Ajouter 150 µL d'acétate de potassium 5 M, pH 4,8 ; mélanger doucement et mettre dans la glace pendant 5 minutes.
- 5- Centrifuger pendant 5 minutes à 13000 tours/minute et récupérer 400 µL de surnageant dans un tube
- 6- Ajouter 1 volume d'isopropanol ; mélanger et laisser 2 minutes à la température du laboratoire.
- 7- Centrifuger 5 minutes à 13000 tours/minute, puis éliminer le surnageant.
- 8- Ajouter 200 µL d'éthanol 100 %, pour laver le culot.
- 9- Centrifuger 5 minutes à 13000 tours/minute ; éliminer l'alcool, puis sécher le culot à l'étuve.
- 10- Remettre le culot en suspension dans 25 µL de TE 10-1 additionné de RNase A (2 µg/mL).

6.2- Etude des plasmides extraits des transconjugants :

6.2.1- Principe :

Afin de déterminer le contenu plasmidique des transconjugants, l'ADN précédemment extrait a été soumis à une électrophorèse conventionnelle et une électrophorèse en champ pulsé, sous forme native et après coupure, par diverses enzymes de restriction, en multiples fragments linéaires dont la taille a pu être évaluée, de manière approximative, par comparaison de leur distance de migration à celle de fragments d'ADN de taille connue.

6.2.2- Réalisation pratique :

Pour déterminer les profils de restriction plasmidique, 5 μ L de chaque extrait ont été respectivement incubés, pendant 1 heure à 37°C, avec 1 μ L de chacune des enzymes de restriction *Pst*I, *Pvu*II et *Cla*I, 2 μ L de leur tampon respectif et 12 μ L d'eau pour préparation injectable.

Deux types d'électrophorèse ont alors été réalisés : électrophorèse conventionnelle et électrophorèse en champ pulsé. Pour l'électrophorèse conventionnelle, 10 μ L de chacun des échantillons, digérés et non digérés, ont été déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 0,8 % puis soumis à une migration de 2 heures sous une tension de 120 volts, en tampon TBE 0,1X. Nous avons procédé de la même façon pour l'électrophorèse en champ pulsé, mais la migration a été réalisée sur un gel Sea Kem à 1 %, pendant 6 heures, sous un champ électrique de 200 volts (6 volts/cm), avec des pulses de 30 secondes.

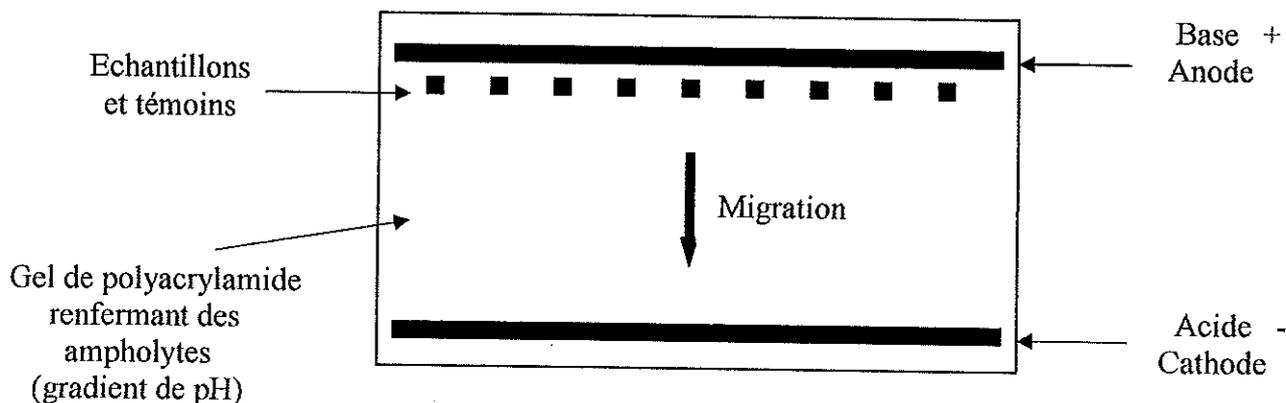
Afin de déterminer approximativement la taille des plasmides extraits, nous avons fait migrer 2 marqueurs de PM, le marqueur Raoul (Appligène) et le marqueur II (Boehringer Mannheim), dans les mêmes conditions.

7- Isoélectrofocalisation des bêta-lactamases des transconjugants :

7.1- Principe :

Le point isoélectrique (pI) des bêta-lactamases est un paramètre souvent recherché pour caractériser ces enzymes (Matthew M. *et al.*, 1975). Comme toutes les protéines, elles possèdent des groupements ionisables et migrent donc, sous l'influence d'un champ électrique, dans un gel de polyacrylamide dans lequel est créé un gradient stable de pH, grâce au mélange de diverses substances amphotères : les ampholytes, jusqu'au point où le pH est égal à leur point isoélectrique, où elles s'immobilisent, leur charge nette devenant nulle (Figure 14).

Figure 14 : Schéma de l'isoélectrofocalisation.



7.2- Réalisation pratique :

7.2.1- Extraction des bêta-lactamases :

Après 18 heures de culture en bouillon TS, les bactéries ont été récupérées par centrifugation à 10000 tours / minute, pendant 20 minutes, à 4°C, puis le culot bactérien a été remis en suspension dans 10 mL d'eau distillée stérile. Afin d'extraire les bêta-lactamases localisées, chez les bacilles à Gram négatif, dans l'espace périplasmique, il est nécessaire de casser la paroi de ces bactéries à l'aide d'ultrasons (Sonicateur Branson Sonifier 250). Chacun des échantillons obtenus à partir des transconjugants a ainsi été soumis à une sonication discontinue, pendant 3 minutes. Après centrifugation pendant 30 minutes à 10000 tours/minute, à 4°C, le surnageant contenant l'extrait brut de bêta-lactamase a été aliquoté et congelé à -20°C.

7.2.2- Détermination du point isoélectrique des bêta-lactamases :

Chaque extrait enzymatique a été déposé sur des petites bandelettes disposées à environ 1 cm de l'anode, à raison de 5 à 20 μ L selon le niveau d'activité enzymatique. Celui-ci a été apprécié par mesure des diamètres des zones de décoloration obtenues, sous l'action de la bêta-lactamase, 6 heures après le dépôt d'un même volume d'extrait dans les puits d'un gel à base d'iode et d'amidon, additionné de pénicilline G (Photo 12). Des bêta-lactamases de référence, de pI connus, ont également été utilisées (Tableau VI, p. 71). L'isoélectrofocalisation a alors été réalisée en gel de polyacrylamide renfermant des ampholytes permettant la création d'un gradient de pH de 3,5 à 10, avec une intensité de 45 mA, une puissance de 1 W et sous une tension de 220 Volts, pendant une nuit.

La migration des bêta-lactamases a alors été révélée par dépôt d'un gel d'iode, d'amidon et de benzylpénicilline, dans lequel est apparue, au bout d'un temps variable, une zone de décoloration, due à l'acidification liée à l'activité catalytique des enzymes vis-à-vis de l'antibiotique.

Photo 12 : Activité enzymatique des bêta-lactamases à spectre étendu extraites des 13 transconjugants, évaluée par décoloration d'un gel à base d'iode et d'amidon, additionné de benzylpénicilline.

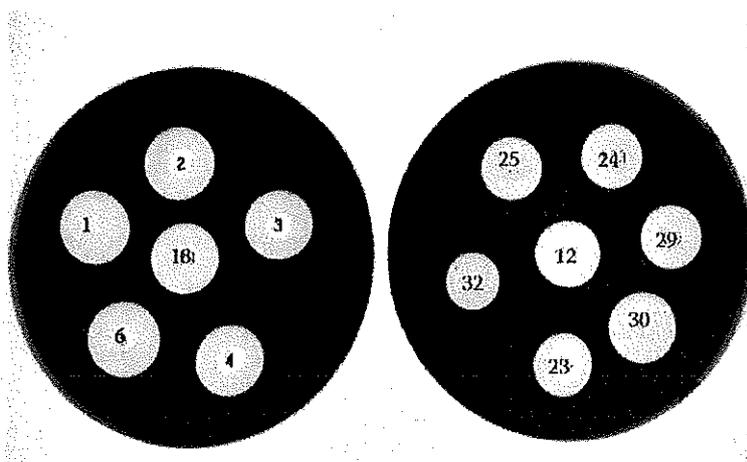


Tableau VI : Bêta-lactamases de référence utilisées pour la détermination du point iso-électrique des bêta-lactamases à spectre étendu par isoélectrofocalisation.

Référence	Origine	Type de bêta-lactamase	pI
K12 GUERLOT	<i>E. coli</i>	IRT 2	5,2
K12 PUD ₁₆	<i>E. coli</i>	TEM-4	5,9
C600 CTX-1	<i>E.coli</i>	TEM-3	6,3
P453	<i>E. coli</i>	SHV-1	7,6

Troisième partie :

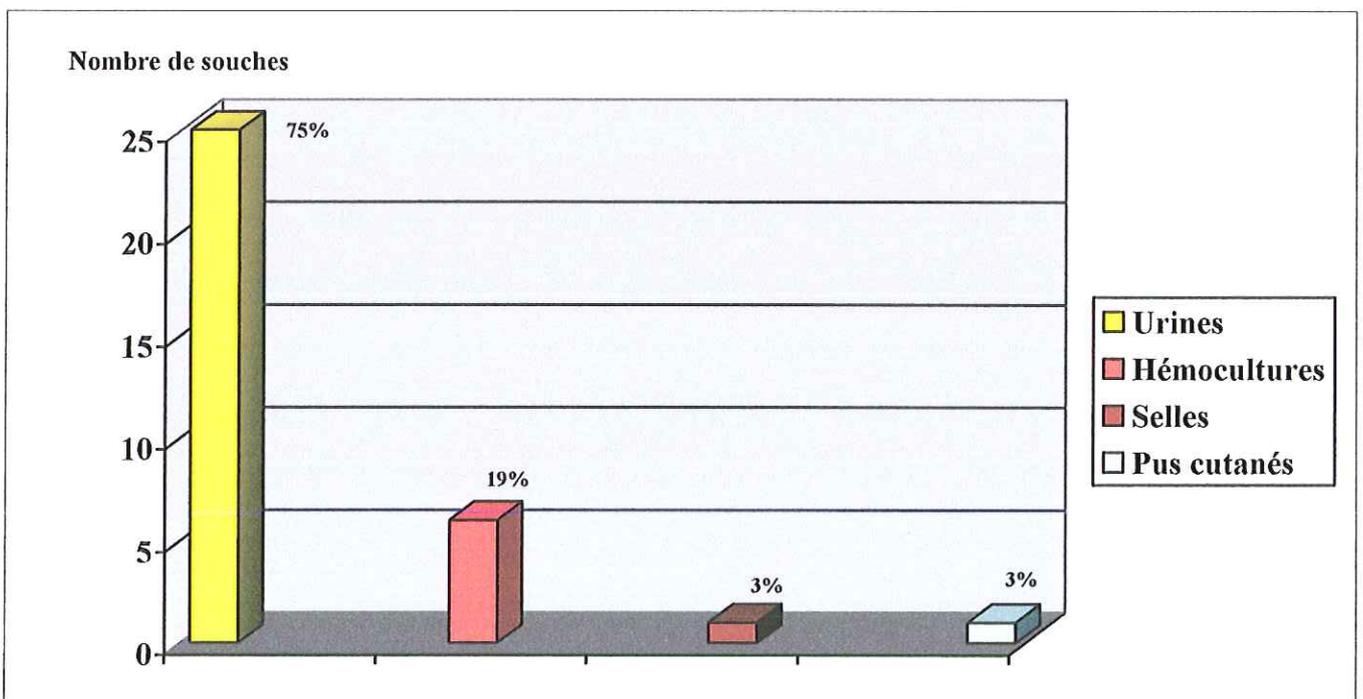
RÉSULTATS

1- Répartition des souches de *K. pneumoniae* étudiées, par prélèvements et par unités fonctionnelles :

1.1- Répartition par prélèvements :

Au cours de la période considérée, la majorité des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE (75 %) ont été isolées de prélèvements d'urines (Figure 15).

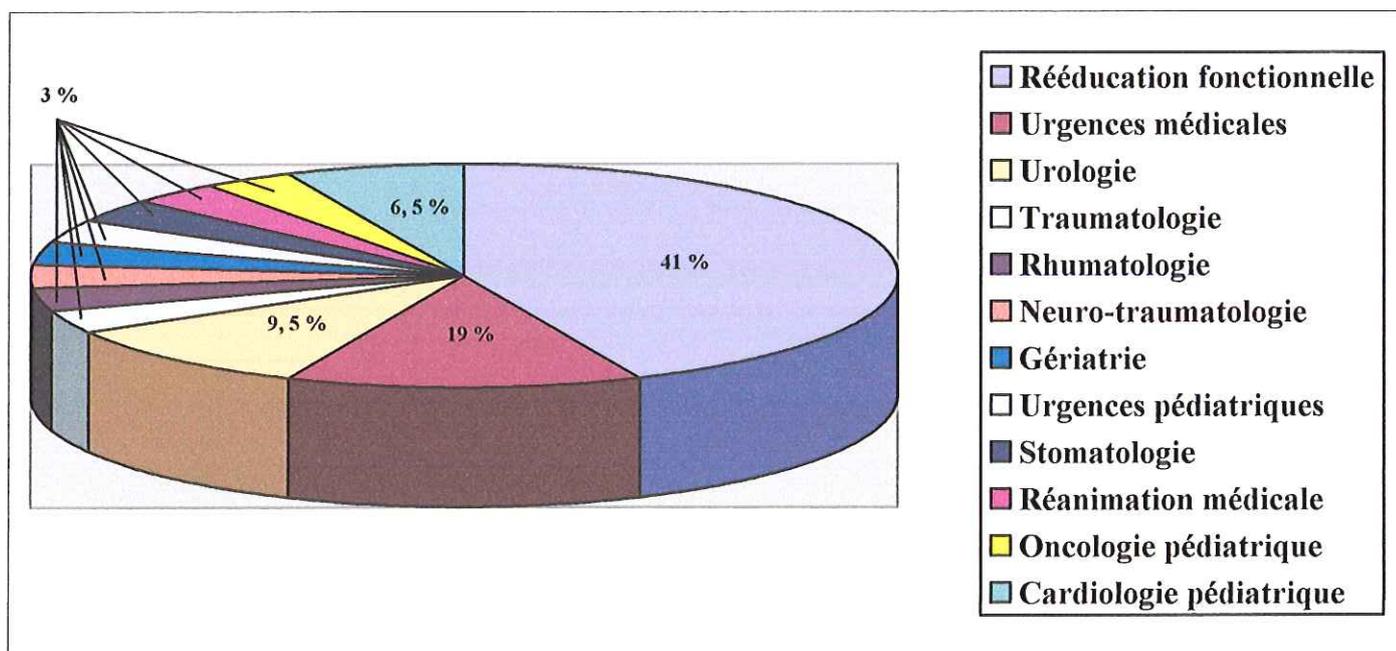
Figure 15 : Représentation des 32 souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, isolées de 1990 à 2001, en fonction du prélèvement d'origine.



1.2- Répartition par unités fonctionnelles :

Certains services hospitaliers sont apparus plus concernés par le problème de résistance liée à la production de BLSE, notamment la Rééducation fonctionnelle d'où provenaient plus de 41 % des souches (Figure 16, p. 74).

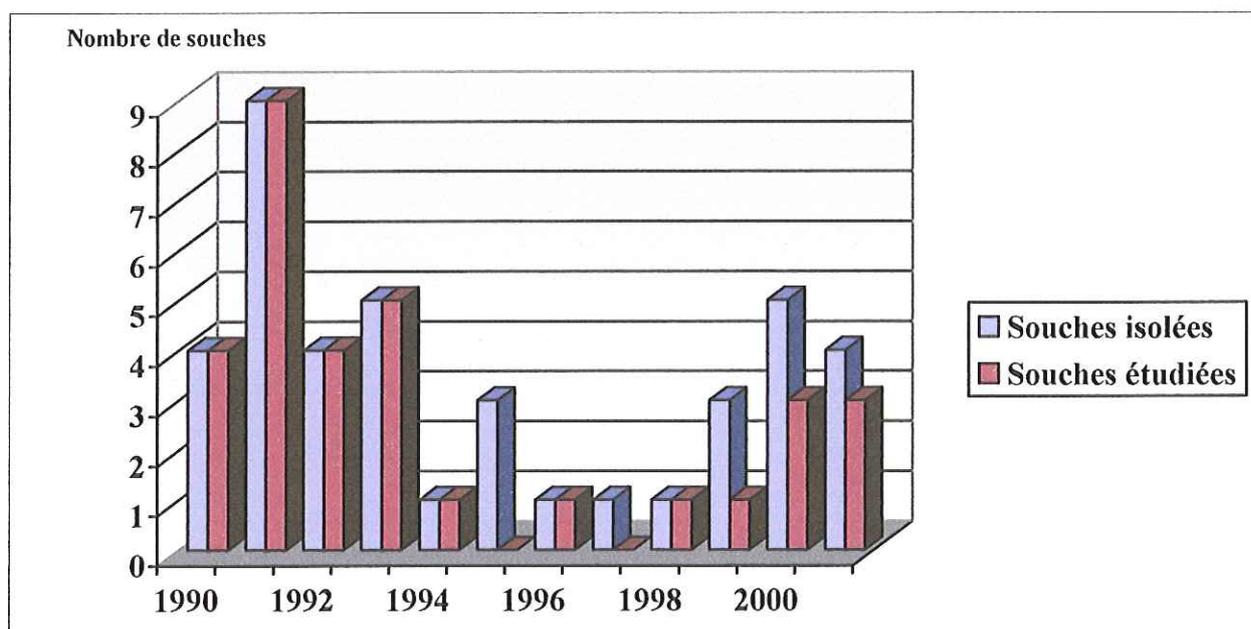
Figure 16 : Répartition des 32 souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, selon le service d'origine.



1.3- Répartition annuelle (Figure 17) :

Un grand nombre de souches ont été isolées au début des années 1990, en particulier en 1991. Une diminution significative a ensuite été observée jusqu'en 1999, où une augmentation s'est à nouveau amorcée.

Figure 17 : Répartition des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de bêta-lactamases à spectre étendu, par années.



2- Etude du comportement à l'égard des antibiotiques :

2.1- Sensibilité aux bêta-lactamines (Tableau VII, p. 76) :

Le phénotype de résistance aux bêta-lactamines des 32 souches de *K. pneumoniae* retenues était caractérisé par une résistance aux amino-, carboxy- et uréidopénicillines, ainsi qu'aux céphalosporines de 1^{ère} génération (céfalotine) et par une diminution plus ou moins marquée de l'activité des céphalosporines de 3^{ème} génération (céfotaxime, ceftazidime), des céphalosporines de 4^{ème} génération (céfépime, cefpirome) et de l'aztréonam. En revanche, céphamycines (céfoxitine) et carbapénèmes (imipénème) conservaient leur activité sur ces souches. De plus, une synergie a pu être observée entre les bêta-lactamines inactivées et les inhibiteurs de bêta-lactamases de type acide clavulanique, l'inhibiteur réduisant de 2 à 8 fois la valeur de la CMI de l'antibiotique auquel il était associé. Un tel phénotype nous a donc fait suspecter la production de bêta-lactamase à spectre étendu.

Plusieurs variantes du phénotype BLSE ont pu être distinguées, en fonction des valeurs de CMI de céfotaxime, de ceftazidime et d'aztréonam.

Nous avons ainsi pu faire les constatations suivantes :

- seules 3 des 32 souches testées : Kp2, Kp9 et Kp16, présentaient une résistance à la fois au céfotaxime et à la ceftazidime ;
- la majorité des souches produisaient une BLSE de type « ceftazidimase », hydrolysant de manière préférentielle la ceftazidime, à l'exception de la souche Kp7, dont l'activité était plus prononcée sur le céfotaxime que sur la ceftazidime ;
- 10 souches étaient de sensibilité intermédiaire vis-à-vis de ces 2 antibiotiques ;
- la souche Kp12 présentait une résistance à la ceftazidime mais restait sensible au céfotaxime.

La production de BLSE a été détectée par l'automate Vitek2[®] pour l'ensemble des souches testées, parfois en association à un mécanisme d'imperméabilité de la membrane.

Tableau VII : Concentrations minimales inhibitrices (CMI - mg/L) obtenues pour le céfotaxime et la ceftazidime, par le système Vitek2® (bioMérieux) et interprétation correspondante, pour les 32 souches de *Klebsiella pneumoniae* :

Référence souche	Céfotaxime		Ceftazidime	
	CMI	Catégorisation	CMI	Catégorisation
Kp2	>=64	R	>=64	R
Kp9	>=64	R	>=64	R
Kp16	>=64	R	>=64	R
Kp1	8	I	>=64	R
Kp3	32	I	>=64	R
Kp4	32	I	>=64	R
Kp5	8	I	>=64	R
Kp6	8	I	>=64	R
Kp8	16	I	>=64	R
Kp11	32	I	>=64	R
Kp13	8	I	>=64	R
Kp18	16	I	>=64	R
Kp19	8	I	>=64	R
Kp21	32	I	>=64	R
Kp26	8	I	>=64	R
Kp28	8	I	>=64	R
Kp10	4	S rendu I	>=64	R
Kp23	<=1	S rendu I	>=64	R
Kp29	<=1	S rendu I	>=64	R
Kp31	2	S rendu I	>=64	R
Kp14	2	S rendu I	16	I
Kp15	2	S rendu I	16	I
Kp17	4	S rendu I	32	I
Kp22	4	S rendu I	16	I
Kp24	<=1	S rendu I	16	I
Kp30	2	S rendu I	16	I
Kp20	2	S rendu I	4	S rendu I
Kp25	4	S rendu I	4	S rendu I
Kp32	2	S rendu I	4	S rendu I
Kp27	8	I	<=1	S rendu I
Kp7	>=64	R	16	I
Kp12	2	S	>=64	R

S : sensible ; R : résistant ; I : sensibilité intermédiaire.

2.2- Sensibilité aux aminosides :

Les différents phénotypes de résistance aux aminosides, observés chez les 32 souches de *K. pneumoniae*, sont présentés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Phénotypes de résistance aux aminosides des 32 souches de *Klebsiella pneumoniae*.

Phénotypes	Enzymes inactivatrices	G	T	Nt	A	Nombre de souches
Sauvage	aucune	S	S	S	S	2
GT	AAC(3)	R	R	S	S	2
GTNt	AAC(2') AAC(3)	R	R/I	R/I	S	3
KTANt	AAC(6')	S	R/I	R/I	R/I	23
KTGANt	Imperméabilité Plusieurs enzymes	R/I	R	R	R/I	2

G : gentamicine ; **T** : tobramycine ; **Nt** : nétilmicine ; **K** : kanamycine ; **A** : Amikacine.

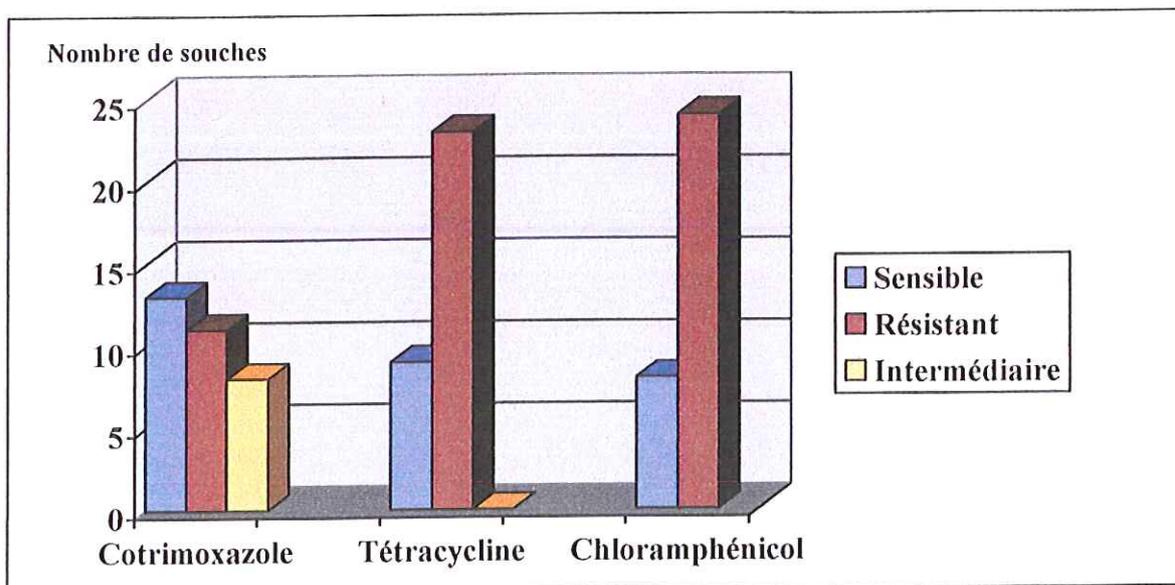
AAC : aminoside acétyl-transférase.

Nous avons notamment observé une prédominance du phénotype KTANt, compatible avec la synthèse d'une aminoside acétyltransférase AAC(6') dont le gène est fréquemment porté par un plasmide sur lequel il peut être associé à certains gènes codant pour des BLSE.

2.3- Sensibilité aux autres antibiotiques (Figure 18, p.78) :

La majorité des souches étaient résistantes à la tétracycline, ainsi qu'au chloramphénicol. Pour le cotrimoxazole, leur répartition entre les catégories « sensible », « intermédiaire » et « résistante » était plus dispersée.

Figure 18 : Comportement des 32 souches de *Klebsiella pneumoniae*, vis-à-vis du cotrimoxazole, de la tétracycline et du chloramphénicol.



Les résultats détaillés des antibiogrammes sont rassemblés dans le tableau IX, p.79 à 81.

Tableau IX : Comportement à l'égard des antibiotiques des 32 souches de *Klebsiella pneumoniae* (Kp) : résultat de l'antibiogramme automatisé Vitek2® (bioMérieux) ou de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.

Référence souche	Phénotype de résistance																	
	AMC	TCC	TZP	CF	CTX	CAZ	CPO	FEP	ATM	IMP	OFX	CIP	TM	GM	AN	C	TE	SXT
Kp1	8	64	<=4	>=64	8	>=64	/	/	/	<=0,5	2	I	>=16	<=1	8	/	/	<=20
	I	I	I	R	I	R	I	I	I	S	R	I	R	S	I	S	R	S
Kp2	8	>=128	8	>=64	>=64	>=64	/	/	/	<=0,5	>=8	2	8	<=1	8	/	/	40
	I	R	I	R	R	R	I	I	R	S	R	I	I	S	I	R	R	S
Kp3	4	64	8	>=64	32	>=64	/	/	/	<=0,5	>=8	2	8	<=1	4	/	/	40
	I	I	I	R	I	R	I	I	I	S	R	I	I	S	I	R	R	S
Kp4	4	>=128	<=4	>=64	32	>=64	/	/	/	<=0,5	2	0,5	>=16	<=1	16	/	/	<=20
	I	R	I	R	I	R	I	I	S	S	I	I	R	S	I	S	R	S
Kp5	4	32	<=4	>=64	8	>=64	/	/	/	<=0,5	2	0,5	>=16	<=1	16	/	/	>=320
	I	R	I	R	I	R	I	I	I	S	I	I	R	S	I	S	S	R
Kp6	4	32	<=4	>=64	8	>=64	/	/	/	<=0,5	2	0,5	>=16	<=1	8	/	/	<=20
	I	I	I	R	I	R	I	I	I	S	I	I	R	S	I	S	R	S
Kp7	4	16	<=4	>=64	>=64	16	/	/	/	<=0,5	2	I	>=16	<=1	16	/	/	<=20
	I	I	I	R	R	I	I	I	I	S	R	I	R	S	I	S	R	S
Kp8	8	64	8	>=64	16	>=64	/	/	/	<=0,5	>=8	>=4	>=16	<=1	8	/	/	40
	I	I	I	R	I	R	I	R	R	S	R	I	R	S	I	R	R	I
Kp9	4	>=128	8	>=64	>=64	>=64	/	/	/	<=0,5	>=8	>=4	>=16	2	16	/	/	40
	I	R	I	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	S	I	R	R	I
Kp10	8	16	8	>=64	4	>=64	/	/	/	<=0,5	>=8	>=4	8	2	8	/	/	<=20
	I	I	I	R	I	R	I	I	R	S	R	R	I	S	I	R	R	S
Kp11	4	>=128	8	>=64	32	>=64	/	/	/	<=0,5	>=8	>=4	8	<=1	4	/	/	40
	I	R	I	R	I	R	I	I	R	S	R	R	I	S	I	R	R	I
Kp12	16	64	>=128	>=64	2	>=64	/	/	/	<=0,5	>=8	>=4	8	<=1	16	/	/	>=320
	I	I	R	R	S	R	I	I	I	S	R	R	R	S	I	R	S	R
Kp13	8	>=128	8	>=64	8	>=64	/	/	/	<=0,5	>=8	2	8	<=1	4	/	/	40
	I	R	I	R	I	R	I	I	R	S	R	I	I	S	I	R	R	I
Kp14	4	16	8	>=64	2	16	/	/	/	<=0,5	>=8	2	8	<=1	8	/	/	40
	I	I	I	R	I	I	I	I	I	S	R	I	I	S	I	R	R	I

Référence souche	Phénotype de résistance																	
	AMC	TCC	TZP	CF	CTX	CAZ	CPO	FEP	ATM	IMP	OFX	CIP	TM	GM	AN	C	TE	SXT
Kp15	4	16	8	>=64	2	16				<=0,5	>=8	2	8	<=1	4			40
	I	I	I	R	I	I	I	I	I	S	R	I	I	S	I	R	R	I
Kp16	8	>=128	8	>=64	>=64	>=64				<=0,5	>=8	>=4	8	<=1	4			40
	I	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	I	R	R	R
Kp17	4	16	8	>=64	4	32				<=0,5	>=8	2	8	<=1	4			40
	I	I	I	R	I	I	I	I	I	S	R	I	I	S	I	R	R	I
Kp18	8	64	8	>=64	16	>=64				<=0,5	>=8	2	8	<=1	8			80
	I	I	I	R	I	R	R	R	R	S	R	I	I	S	I	R	R	I
Kp19	4	64	<=4	>=64	8	>=64				<=0,5	2	1	8	<=1	4			<=20
	I	I	I	R	I	R	I	I	S	S	I	S	I	S	I	S	R	S
Kp20	<=2	<=8	<=4	16	2	4				<=0,5	1	<=0,25	>=16	<=1	8			<=20
	I	I	I	R	I	I	I	I	S	S	S	S	R	S	I	S	R	S
Kp21	8	>=128	8	>=64	32	>=64				<=0,5	>=8	>=4	8	<=1	8			80
	I	R	I	R	I	R	R	R	R	S	R	R	I	S	I	R	R	R
Kp22	4	16	8	>=64	4	16				<=0,5	>=8	>=4	>=16	4	16			>=320
	I	I	I	R	I	I	I	I	S	S	R	R	R	I	I	S	S	R
Kp23	4	32	8	>=64	<=1	>=64				<=0,5	4	2	>=16	2	16			>=320
	I	I	I	R	I	R	I	I	R	S	R	I	R	S	I	R	R	R
Kp24	16	16	<=4	4	<=1	16				<=0,5	2	1	>=16	>=16	<=2			<=20
	I	I	I	R	I	I	I	I	S	S	R	I	R	R	S	R	R	S
Kp25	8	16	8	>=64	4	4				<=0,5	<=0,25	<=0,25	8	8	<=2			<=20
	I	I	I	R	I	I	I	I	I	S	S	S	I	I	S	R	S	S
Kp26	16	>=128	16	>=64	8	>=64				<=0,5	1	0,5	>=16	>=16	16			>=320
	I	R	I	R	I	R	I	I	R	S	I	I	R	R	I	R	S	R
Kp27	16	>=128	32	>=64	8	<=1				<=0,5	<=0,25	<=0,25	<=1	<=1	<=2			>=320
	I	R	I	R	I	I	I	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R
Kp28	4	32	8	>=64	8	>=64				<=0,5	4	2	>=16	>=16	<=2			>=320
	I	I	I	R	I	R	I	I	R	S	R	I	R	R	S	R	R	R
Kp29	4	32	<=4	>=64	<=1	>=64				<=0,5	2	1	>=16	<=1	16			>=320
	I	I	I	R	I	R	I	I	S	S	R	I	R	S	I	R	S	R

Référence souche	Phénotype de résistance																	
	AMC	TCC	TZP	CF	CTX	CAZ	CPO	FEP	ATM	IMP	OFX	CIP	TM	GM	AN	C	TE	SXT
Kp30	4	16	<=4	>=64	2	16				<=0,5	<=0,25	<=0,25	<=1	4	<=2			<=20
	I	I	I	R	I	I	I	I	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Kp31	>=32	>=128	64	>=64	2	>=64				<=0,5	2	1	8	>=16	<=2			>=320
	R	R	I	R	I	R	I	I	S	S	R	I	I	R	S	R	S	R
Kp32	4	<=8	<=4	>=64	2	4				<=0,5	0,5	<=0,25	>=16	>=16	<=2			<=20
	I	I	I	R	I	I	I	I	S	S	I	I	R	R	S	S	S	S

AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique ; TCC : Ticarcilline + Acide clavulanique ; TZP : Piperacilline + Tazobactam ; CF : Céfalotine ; CTX : Céfotaxime ;

CAZ : Ceftazidime ; CPO : Cefpirome ; FEP : Céfépime ; ATM : Aztréonam ; IMP : Imipénème ; OFX : Ofloxacin ; CIP : Ciprofloxacine ; TM : Tobramycine ;

GM : Gentamicine ; AN : Amikacine ; C : Chloramphénicol ; TE : Tétracycline ; SXT : Sulfaméthoxazole - triméthoprime (cotrimoxazole).

S : Sensible ; R : Résistant ; I : Intermédiaire.

3- Mise en évidence de la production de BLSE par techniques phénotypiques et génotypiques :

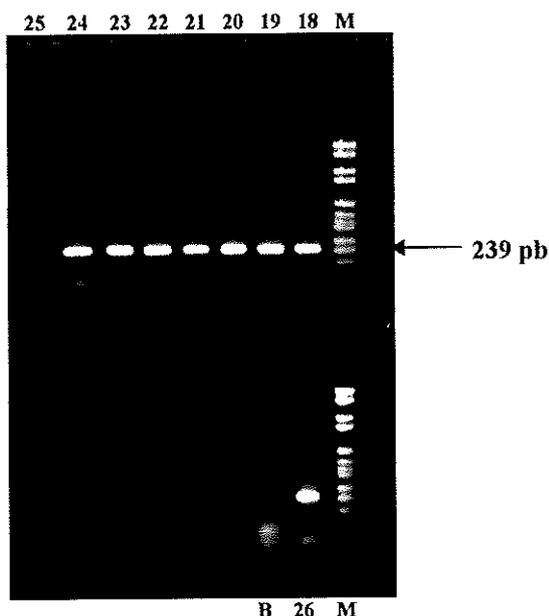
3.1- Détection phénotypique :

Les 32 souches dont l'antibiogramme permettait de suspecter la production de BLSE ont fourni des résultats en accord avec les critères précédemment indiqués, pour le test de synergie en croix, comme pour le test commercial OXOID, confirmant la production de ce type d'enzyme.

3.2- Détection génotypique :

Parmi les 32 souches étudiées, la PCR réalisée pour la détection du gène *bla*_{TEM} s'est révélée positive dans 29 cas (Figure 19), suggérant la production par ces souches d'une BLSE de type TEM, cette positivité n'excluant cependant pas la possible présence d'une pénicillinase de type TEM-1 ou TEM-2. Pour les souches Kp25, Kp28 et Kp31, pour lesquelles ce gène n'a pas pu être détecté, la production d'une BLSE d'un autre type, SHV par exemple, pouvait être envisagée.

Figure 19 : Exemples du résultat de la détection du gène *bla*_{TEM} par PCR, chez 10 souches de *Klebsiella pneumoniae* (les pistes notées M correspondent au marqueur de taille, celle notée B, au blanc).



4- Typage des souches par électrophorèse en champ pulsé (ECP) :

L'analyse des pulsotypes obtenus, à l'aide du logiciel informatique GelCompar[®], a mis en évidence 21 profils différents, constitués chacun de 20 à 30 bandes. Parmi les 32 souches de *K. pneumoniae*, certaines présentaient des profils identiques ou très proches, suggérant leur appartenance à un même clone. Nous avons notamment pu constater l'existence d'un clone prédominant, regroupant 18 de ces 32 souches, dont les profils partageaient plus de 92 % d'homologie. Ce clone, que nous avons nommé par la suite clone A, s'est propagé de 1990 à 1993, période au cours de laquelle les isollements ont été les plus nombreux. Durant ces années, 4 autres souches, de profils distincts : Kp10, Kp12, Kp19 et Kp22, ont également été isolées. Au sein du clone A, nous avons cependant pu distinguer 7 sous-types, composés chacun de 1 à 5 souches, différant les uns des autres par 1 à 2 bandes.

En revanche, parmi les souches détectées les années suivantes, seule la persistance d'un petit clone, appelé clone B, composé des 2 souches Kp19 et Kp31 (isolées respectivement en 1993 et 2000), a pu être observée. Les autres souches présentaient chacune, quant à elles, un profil spécifique.

Ainsi, les 32 souches de *K. pneumoniae* se répartissaient en 14 types clonaux : clone A, clone B, et 12 autres clones, représentés chacun par une seule souche, témoignant de la grande diversité génétique des souches isolées ces dernières années, les différents clones n'apparaissant chacun que sporadiquement.

Les différents profils obtenus sont représentés sur les figures 20, 21 et 22 p.84. La comparaison de ces profils, à l'aide du logiciel informatique GelCompar[®], nous a permis d'illustrer les relations génétiques existant entre ces souches, sous la forme d'un dendrogramme (Figure 23, p.85).

Figures 20 et 21 : Profil obtenu par électrophorèse en champ pulsé, à partir de l'ADN génomique de 22 souches de *Klebsiella pneumoniae*, après digestion par l'enzyme de restriction *SpeI* (Les lignes notées M correspondent au marqueur de taille ; la taille des fragments séparés, exprimée en kilobases, est indiquée entre les 2 profils).

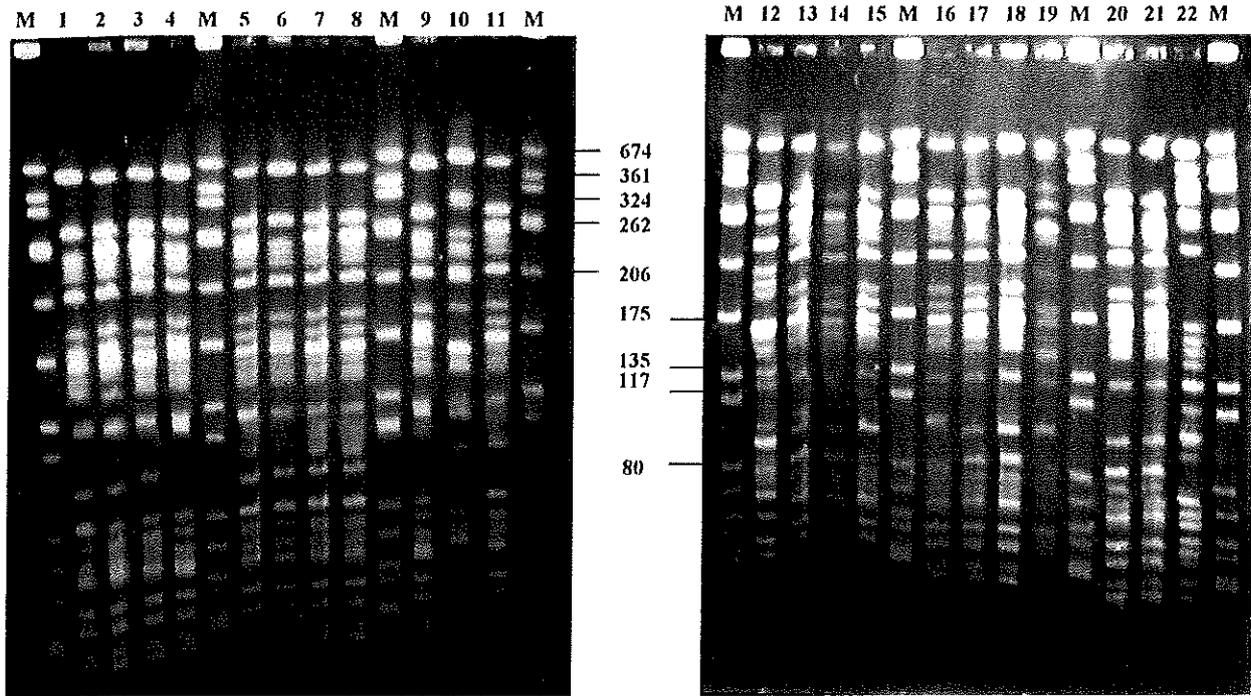


Figure 22 : Profil de 10 souches de *Klebsiella pneumoniae*, isolées de 1994 à 2001 (voir légende des figures 20 et 21).

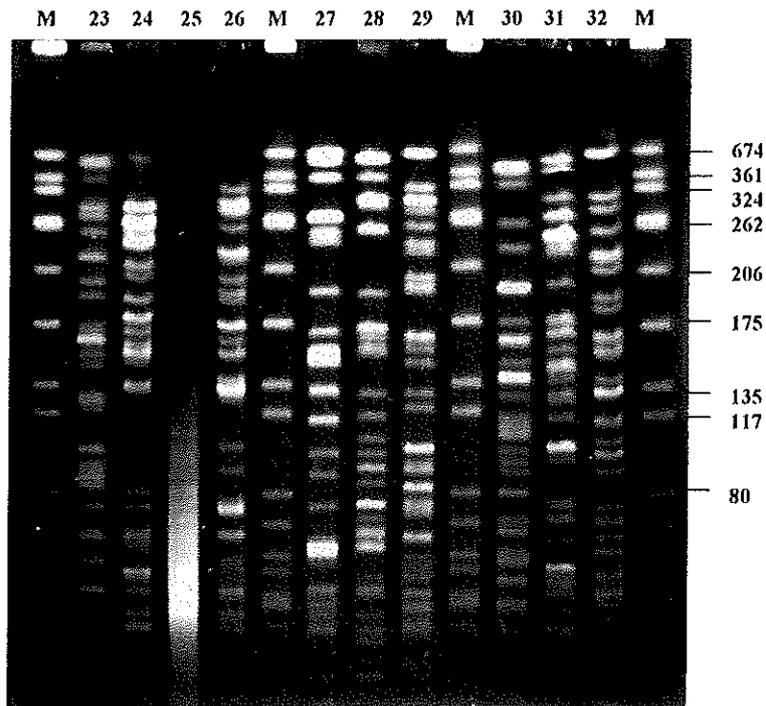


Figure 23 : Dendrogramme obtenu après analyse des pulsotypes de *Klebsiella pneumoniae* étudiées, à l'aide du logiciel informatique GelCompar[®] (pourcentages de similitude indiqués au-dessus du dendrogramme).

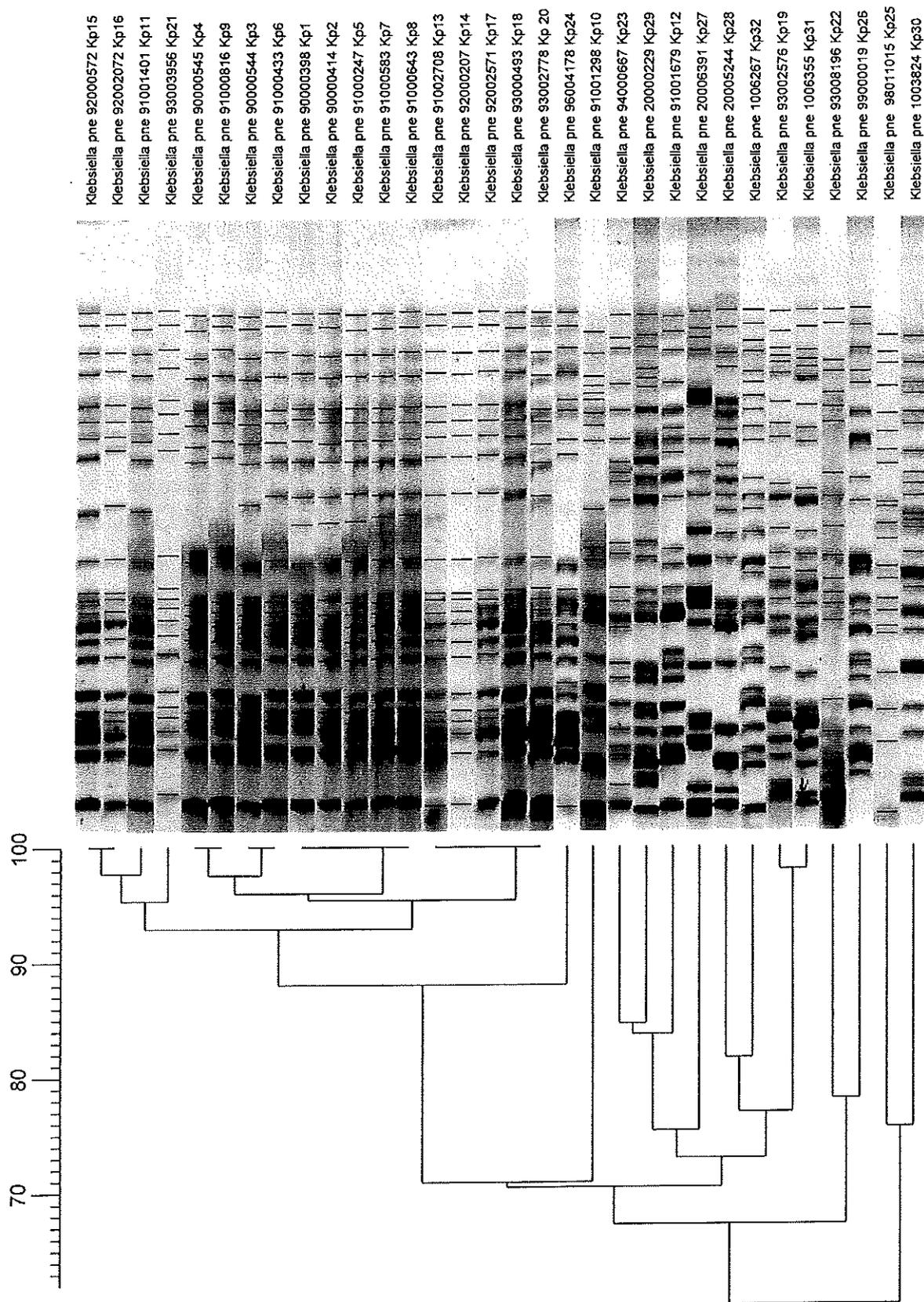


Tableau X : Résultats comparés du comportement à l'égard des bêta-lactamines des 13 transconjugants (Tc/Kp) et des souches de *Klebsiella pneumoniae* donatrices correspondantes ; valeur des concentrations minimales inhibitrices des différentes bêta- lactamines testées par l'automate Vitek2® (voir légende p.81).

Donatrice Transconjugant	AMC	TCC	TZP	CF	CTX	CAZ	CPO	FEP	ATM	IMP
Kp1 Tc/Kp1	8	I 64	I <=4	R >=64	8	R >=64	I	S	I	S
	4	I 16	I <=4	R >=64	>=64	I 16	I	S	R	S
Kp2 Tc/Kp2	8	R >=128	I 8	R >=64	R >=64	R >=64	I	I	R	S
	<=2	I 16	I <=4	R >=64	32	I 16	S	S	S	S
Kp3 Tc/Kp3	4	I 64	I 8	R >=64	32	R >=64	I	S	I	S
	4	I 16	I <=4	R >=64	>=64	I 16	I	S	I	S
Kp4 Tc/Kp4	4	R >=128	I <=4	R >=64	32	R >=64	S	S	S	S
	4	I 32	I <=4	R >=64	>=64	I 16	S	S	S	S
Kp6 Tc/Kp6	4	I 32	I <=4	R >=64	8	R >=64	I	I	I	S
	4	I 16	I <=4	R >=64	>=64	I 16	S	S	S	S
Kp12 Tc/Kp12	16	I 64	R >=128	R >=64	2	R >=64	I	S	I	S
	4	I <=8	I <=4	R >=64	4	I 4	I	I	I	S
Kp18 Tc/Kp18	8	I 64	I 8	R >=64	16	R >=64	R	I	R	S
	4	I 16	I <=4	R >=64	>=64	I 16	S	S	S	S
Kp23 Tc/Kp23	4	I 32	I 8	R >=64	<=1	R >=64	I	S	R	S
	4	I 16	I <=4	R >=64	32	R >=64	S	S	I	S
Kp24 Tc/Kp24	16	I 16	I <=4	R 4	<=1	I 16	I	S	S	S
	4	I <=8	I <=4	R 16	<=1	I 4	S	S	S	S
Kp25 Tc/Kp25	8	I 16	I 8	R >=64	4	R 4	I	S	I	S
	4	S <=8	S <=4	I 32	<=1	S <=1	S	S	S	S
Kp29 Tc/Kp29	4	I 32	I <=4	R >=64	<=1	R >=64	I	S	S	S
	4	I 16	I <=4	R 16	<=1	R >=64	S	S	S	S
Kp30 Tc/Kp30	4	I 16	I <=4	R >=64	2	I 16	I	S	R	S
	4	I <=8	I <=4	R >=64	<=1	I 8	S	S	S	S
Kp32 Tc/Kp32	4	I <=8	I <=4	R >=64	2	I 4	I	S	S	S
	4	I <=8	I <=4	R >=64	8	I 4	S	S	S	S

Tableau XI : Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI - mg/L) de céfotaxime et de ceftazidime et catégorisation clinique correspondante, fournies par l'automate Vitek2® (bioMérieux), pour les 13 transconjugants ; comparaison avec les résultats des souches donatrices de *Klebsiella pneumoniae* correspondantes.

Références : Donatrices Transconjugants	Céfotaxime		Ceftazidime	
	CMI	Catégorisation	CMI	Catégorisation
Kp1	8	I	>=64	R
Tc/Kp1	>=64	R	16	I
Kp2	>=64	R	>=64	R
Tc/Kp2	32	I	16	I
Kp3	32	I	>=64	R
Tc/Kp3	>=64	R	16	I
Kp4	32	I	>=64	R
Tc/Kp4	>=64	R	16	I
Kp6	8	I	>=64	R
Tc/Kp6	>=64	R	16	I
Kp12	2	S	>=64	R
Tc/Kp12	4	S rendu I	4	S rendu I
Kp18	16	I	>=64	R
Tc/Kp18	>=64	R	16	I
Kp23	<=1	S rendu I	>=64	R
Tc/Kp23	32	I	>=64	R
Kp24	<=1	S rendu I	16	I
Tc/Kp24	<=1	S rendu I	4	S rendu I
Kp25	4	S rendu I	4	S rendu I
Tc/Kp25	<=1	S	<=1	S
Kp29	<=1	S rendu I	>=64	R
Tc/Kp29	<=1	S rendu I	>=64	R
Kp30	2	S rendu I	16	I
Tc/Kp30	<=1	S rendu I	8	I
Kp32	2	S rendu I	4	S rendu I
Tc/Kp32	8	I	4	S rendu I

Il est surprenant de constater que les BLSE acquises par les transconjugants obtenus à partir des souches de *K. pneumoniae* issues du clone A (Tc/Kp1 à Tc/Kp4, Tc/Kp6 et Tc/Kp18) ont une activité plus marquée sur le céfotaxime que sur la ceftazidime, à l'inverse de ce qui était observé chez les souches donatrices.

5.1.2- Mise en évidence de la production de BLSE :

Pour l'ensemble des transconjugants, le système expert de l'automate Vitek2® indiquait la présence d'une BLSE, à l'exception de Tc/Kp25, pour lequel l'expertise concluait à la production d'une pénicillinase. Afin de confirmer l'acquisition de BLSE, nous avons eu recours aux méthodes phénotypiques de détection, précédemment évoquées et utilisées pour les souches donatrices.

1) Test de synergie en croix :

Pour la majorité des transconjugants, l'image typique de synergie en « bouchon de champagne » n'a pu être observée, lorsque les disques étaient éloignés de 20 mm l'un de l'autre, du fait de l'important diamètre des zones d'inhibition persistant autour des disques de céphalosporines ou d'aztréonam. Pour certains, elle a pu être obtenue grâce à un espacement plus important des disques.

2) Test OXOID :

Pour l'ensemble des transconjugants, ce test s'est avéré positif pour au moins un des trois couples d'antibiotiques utilisés (selon les critères précédemment indiqués), confirmant l'acquisition d'une bêta-lactamase à spectre étendu, lors du transfert.

5.1.3- Etude du pI des BLSE acquises par les transconjugants :

Les bêta-lactamases de type TEM présentant un point isoélectrique acide, alors que celui des bêta-lactamases de type SHV est basique, nous avons cherché à caractériser les enzymes acquises par les transconjugants, par isoélectrofocalisation.

Les résultats obtenus sont présentés figure 24 et tableau XII.

Figure 24 : Résultats de l'isoélectrofocalisation des bêta-lactamases à spectre étendu extraites des 13 transconjugants (l'identification des transconjugants, ainsi que la valeur des points isoélectriques des souches de référence utilisées, sont indiquées à la base de l'illustration).

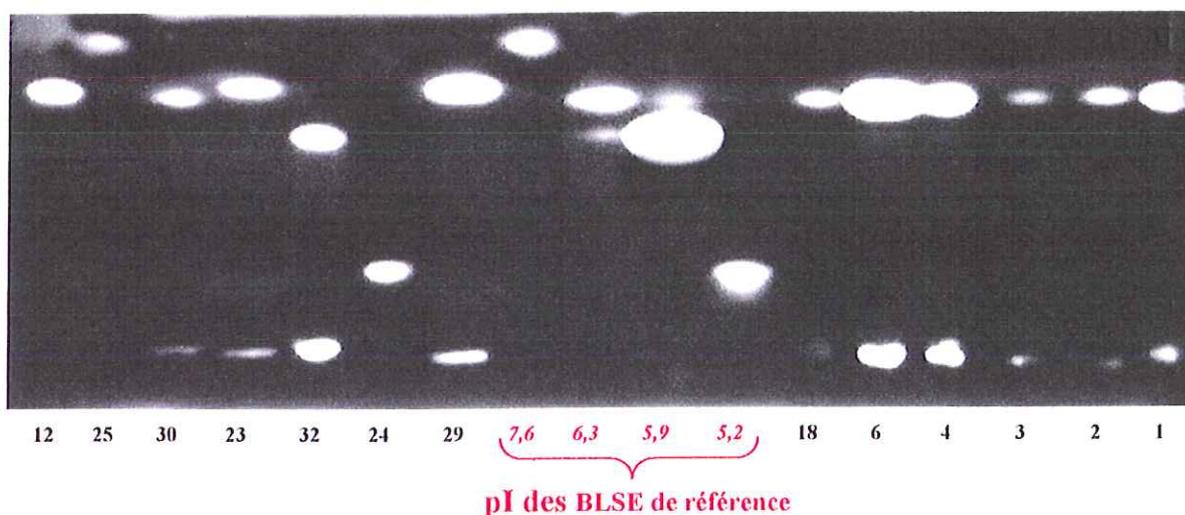


Tableau XII : Point isoélectrique des bêta-lactamases à spectre étendu extraites à partir des 13 transconjugants.

Transconjugant	Clone d'appartenance de la souche donatrice	pI de la BLSE (valeur approximative)
Tc/Kp1	A	6,3
Tc/Kp2	A	6,3
Tc/Kp3	A	6,3
Tc/Kp4	A	6,3
Tc/Kp6	A	6,3
Tc/Kp12	X	6,3
Tc/Kp18	A	6,3
Tc/Kp23	X	6,5
Tc/Kp24	X	6,5
Tc/Kp25	X	7,6
Tc/Kp29	X	5,2
Tc/Kp30	X	6,3
Tc/Kp32	X	5,9

On remarque que les transconjugants obtenus à partir des souches de *K. pneumoniae* appartenant au clone A ont acquis une BLSE de pI proche de 6,3, évoquant une enzyme de type TEM-3, première BLSE décrite au milieu des années 1980, en France. En revanche, les souches de *K. pneumoniae* isolées les années suivantes, dont nous avons précédemment souligné la très grande diversité génétique, ont transmis des BLSE de pI très divers.

5.1.4- Séquençage du gène bla_{TEM} codant pour la BLSE extraite du transconjugant Tc/Kp2 :

Afin d'identifier la BLSE acquise par les 6 transconjugants obtenus à partir des souches de *K. pneumoniae* du clone A, nous avons procédé, après amplification, au séquençage du gène bla_{TEM} de l'un d'entre eux : Tc/Kp2, à l'aide des primers TEM-A à TEM-F (Cf p.60). Nous avons pu constater que ce gène présentait 100 % de similitude avec le gène codant pour l'enzyme TEM-3, confirmant ainsi la production de cette enzyme par le transconjugant étudié, résultat par conséquent conforme à celui de l'isoélectrofocalisation. Pour les 5 autres transconjugants, dont la BLSE présentait le même pI que celle détectée chez Tc/Kp2, la production de cette même enzyme était vraisemblable.

5.2- Transfert de la résistance aux aminosides :

Au cours des expériences de conjugaison, parmi les 13 souches de *K. pneumoniae* ayant permis l'obtention de transconjugants, la résistance aux aminosides n'a été transférée que par 5 des 12 souches donatrices qui s'avéraient de sensibilité intermédiaire ou résistantes aux aminosides (Kp12, Kp23, Kp24, Kp29 et Kp32). Aucune des 6 souches résistantes issues du clone A n'a transmis cette résistance à la souche réceptrice.

5.3- Transfert de la résistance aux autres familles d'antibiotiques (Figure 25, p. 92 et Tableau XIII p. 93) :

Observée chez 9 des 13 souches donatrices, la résistance au chloramphénicol a toujours été transmise à la souche réceptrice, à l'exception de la souche Kp18.

En revanche, parmi les 8 souches donatrices résistantes à la tétracycline, seules les souches Kp4 et Kp24 ont transmis cette résistance à la réceptrice.

Les transconjugants Tc/Kp12, Tc/Kp23 et Tc/Kp29 ont également acquis la résistance au cotrimoxazole que présentaient les souches donatrices correspondantes, tandis que la souche Kp18, de sensibilité intermédiaire, n'a pas transmis cette résistance.

Figure 25 : Pourcentages de transfert de la résistance aux aminosides, au chloramphénicol, au cotrimoxazole et à la tétracycline, obtenus lors des expériences de conjugaison réalisées pour le transfert de la résistance par production de bêta-lactamase à spectre étendu.

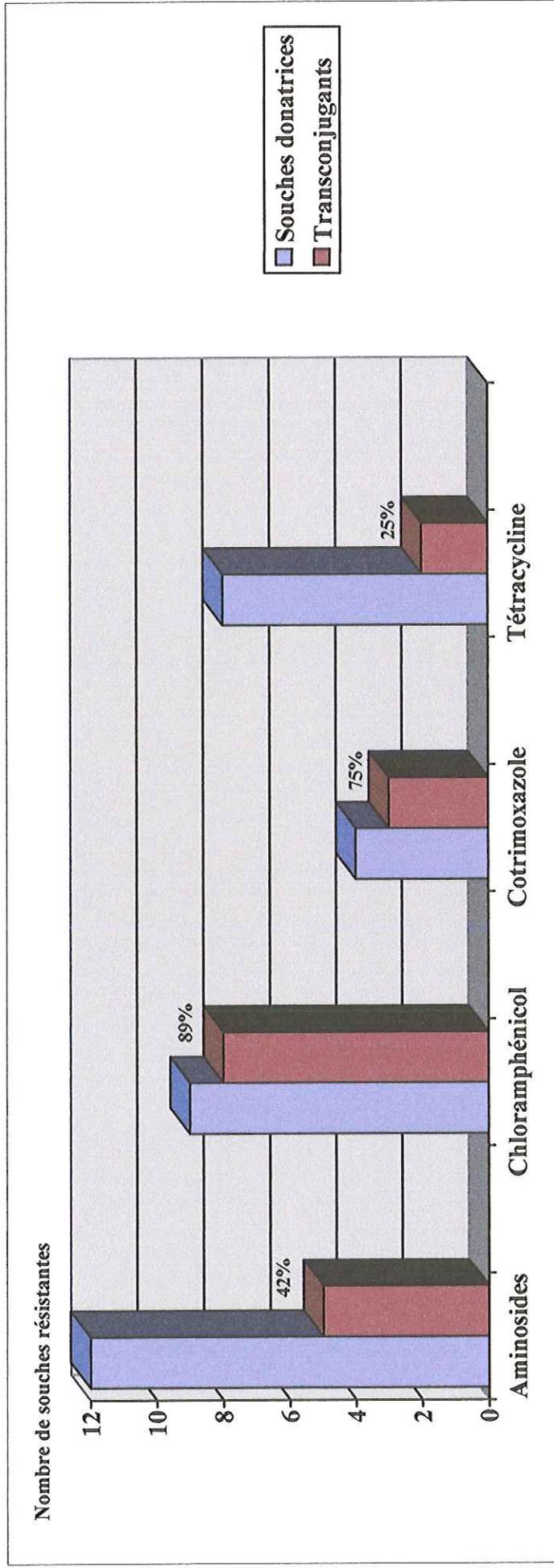


Tableau XIII : Résultats comparés concernant le transfert de la résistance aux aminosides, au chloramphénicol, à la tétracycline et au cotrimoxazole, lors des expériences de conjugaison réalisées pour le transfert de la résistance par production de bêta-lactamase à spectre étendu (voir légende p. 81).

Donatrice Transconjugant	TM	GM	AN	NET	C	TE	SXT		
Kp1	>=16	<=1	S	8	I	>=32	R	<=20	S
Tc/Kp1	<=1	<=1	S	<=2	S	<=1	S	<=20	S
Kp2	8	<=1	S	8	I	>=32	R	40	S
Tc/Kp2	<=1	<=1	S	<=2	S	<=1	S	<=20	S
Kp3	8	<=1	S	4	I	>=32	R	40	S
Tc/Kp3	<=1	<=1	S	>=2	S	<=1	S	<=20	S
Kp4	>=16	<=1	S	16	I	>=32	R	<=20	S
Tc/Kp4	<=1	<=1	S	>=2	S	<=1	S	<=20	S
Kp6	>=16	<=1	S	8	I	>=32	R	<=20	S
Tc/Kp6	<=1	<=1	S	>=2	S	<=1	S	<=20	S
Kp12	8	<=1	S	16	I	>=32	R	>=320	R
Tc/Kp12	8	<=1	S	4	I	16	R	>=320	R
Kp18	8	<=1	S	8	I	>=32	R	80	I
Tc/Kp18	<=1	<=1	S	>=2	S	<=1	S	<=20	S
Kp23	>=16	2	S	16	I	>=32	R	>=320	R
Tc/Kp23	4	<=1	S	8	I	>=32	R	>=320	R
Kp24	>=16	>=16	R	>=2	S	>=32	R	<=20	S
Tc/Kp24	2	>=16	R	>=2	S	8	I	<=20	S
Kp25	8	8	I	>=2	S	<=1	S	<=20	S
Tc/Kp25	<=1	<=1	S	>=2	S	<=1	S	<=20	S
Kp29	>=16	<=1	S	16	I	>=32	R	>=320	R
Tc/Kp29	8	<=1	S	<=2	S	8	I	>=320	R
Kp30	<=1	4	S	>=2	S	<=1	S	<=20	S
Tc/Kp30	<=1	<=1	S	>=2	S	<=1	S	<=20	S
Kp32	>=16	>=16	R	>=2	S	>=32	R	<=20	S
Tc/Kp32	<=1	>=16	R	>=2	S	4	S	<=20	S

6- Profils de restriction plasmidique :

L'extraction de l'ADN plasmidique des transconjugants, supposé de grande taille, a été initialement réalisée à l'aide du kit Nucleobond® BAC 100 (Macherey-Nagel, Germany), destiné à l'extraction de gros plasmides, de taille généralement supérieure à 150000 pb. Les résultats de la migration par électrophorèse en champ pulsé de ces plasmides, sous forme native et après digestion par les enzymes de restriction *EcoRI*, *PvuII*, *ClaI* et *PstI*, sont représentés sur les figures 26 et 27.

Figure 26 : Profils de restriction de l'ADN plasmidique extrait du transconjugant Tc/Kp1, après migration par électrophorèse en champ pulsé (Les pistes M₁ et M₂ correspondent respectivement aux marqueurs de taille λ/HindIII ou M₁₁ et Raoul. Les pistes 1 et 4 correspondent au plasmide non digéré, les pistes 2 et 6 au plasmide digéré par *EcoRI* et les pistes 3 et 5, au plasmide digéré par *PstI*).

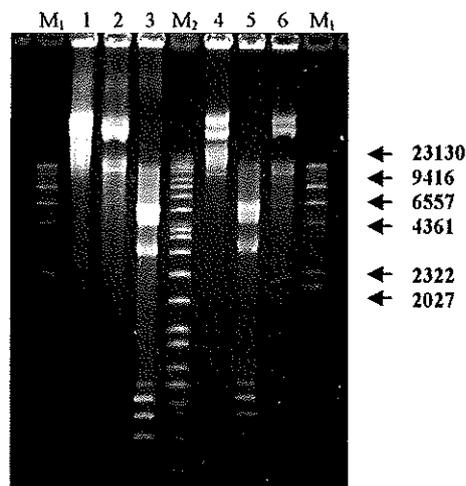
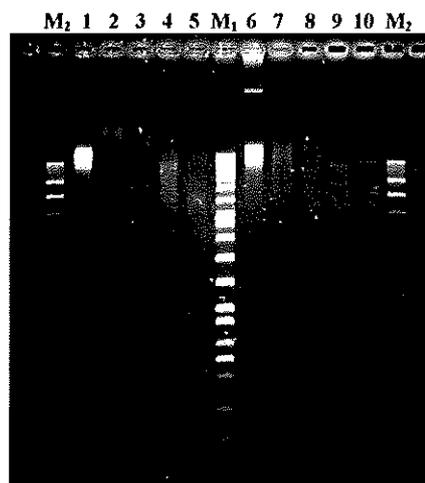


Figure 27 : Profils de restriction de l'ADN plasmidique extrait des transconjugants Tc/Kp12 (pistes 1, 2, 3, 4 et 5) et Tc/Kp32 (pistes 6, 7, 8, 9 et 10), digéré par les enzymes *EcoRI*, *PvuII*, *ClaI* et *PstI*, obtenus après migration par électrophorèse en champ pulsé.



Chez la majorité des transconjugants, en particulier l'ensemble des transconjugants issus des souches de *K. pneumoniae* appartenant au clone A, la taille des plasmides extraits à l'aide du kit Nucleobond[®], bien que non évaluée de manière précise, nous a semblé plus petite que celle des plasmides auxquels ce kit est destiné. Aussi, nous avons eu recours, pour ces transconjugants, à une autre méthode d'extraction, habituellement plus adaptée aux plasmides de petites tailles : la méthode d'Ish-Horowicz. Les plasmides extraits des transconjugants Tc/Kp12 et Tc/Kp32 (Figure 27, p. 94), qui avaient acquis, en plus de la résistance aux bêta-lactamines, une résistance à d'autres familles d'antibiotiques, présentaient, quant à eux, une taille plus élevée, nous ne les avons donc pas réextraits par cette dernière méthode. On observe notamment sur la piste 6 de la figure 27 p.94, correspondant à l'ADN plasmidique du transconjugant Tc/Kp32 non digéré, la présence d'une bande proche du puits de migration, évoquant un plasmide de grande taille.

L'extraction des plasmides acquis par les transconjugants obtenus à partir des souches de *K. pneumoniae* appartenant au clone A, par la méthode d'Ish-Horowicz, nous a effectivement permis d'obtenir de meilleurs résultats. Les fragments non digérés et digérés par les mêmes enzymes que précédemment, ont été comparés, après migration pendant deux heures, par électrophorèse conventionnelle en gel d'agarose à 0,8 %, sous une tension de 120 volts. Après révélation par une solution de bromure d'éthidium et lecture sous UV, nous avons pu observer la présence, chez l'ensemble de ces transconjugants, d'un plasmide de même taille, qui présentait, après coupure par les diverses enzymes de restriction, *PvuII*, *Clal* et *PstI*, les mêmes profils (Figures 28 et 29, p.96), confirmant l'acquisition par ces transconjugants d'un même plasmide. Par ailleurs, nous avons pu constater que, contrairement à ce que suggéraient les résultats précédemment obtenus avec le kit Nucleobond[®], la taille de ces plasmides était tout à fait comparable à celle des plasmides porteurs d'un gène codant pour une BLSE, habituellement décrits dans la littérature. En effet, les profils mettaient en évidence plusieurs bandes situées au dessus du marqueur II, dont la bande la plus élevée est à 23000 pb.

Figure 28 : Résultats de l'électrophorèse de l'ADN plasmidique des transconjugants obtenus à partir des souches de *Klebsiella pneumoniae* appartenant au clone A, sous forme native (pistes de gauche) et après digestion par l'enzyme de restriction *PvuII* (pistes de droite).

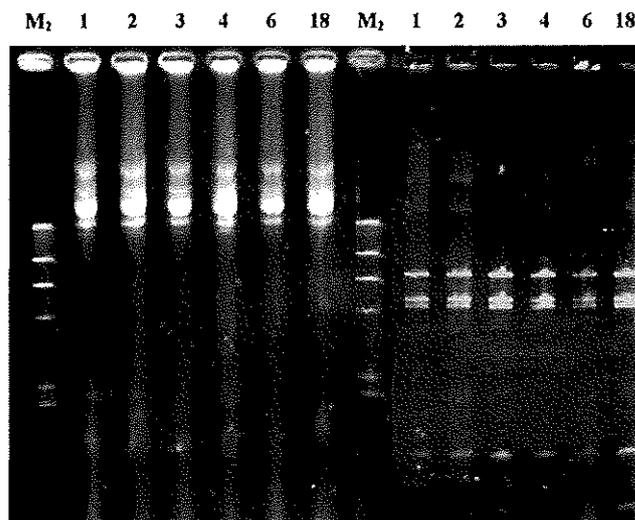
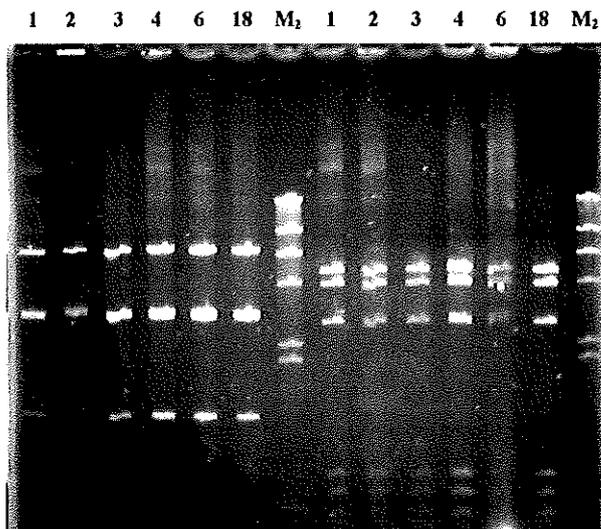


Figure 29 : Profils de restriction des plasmides extraits des transconjugants obtenus à partir des souches de *Klebsiella pneumoniae* appartenant au clone A, après digestion par les enzymes *ClaI* et *PstI*.



Quatrième partie :

DISCUSSION

La résistance transférable aux céphalosporines de troisième génération par production de bêta-lactamases à spectre étendu, constitue un problème largement répandu dans le monde entier. Ces enzymes, initialement décrites chez des souches de *K. pneumoniae* (Knothe G. P. *et al.*, 1983) ont ensuite été détectées chez de nombreuses autres espèces d'entérobactéries, en particulier *Enterobacter aerogenes* (Arpin C. *et al.*, 1996, Neuwirth C. *et al.*, 1996, Pitout J. D. D. *et al.*, 1998, Tzelepi E. *et al.*, 2000) et, actuellement, *Providencia stuartii*. De nombreuses souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE ont été associées à des épidémies d'infections nosocomiales, partout dans le monde (Brun-Buisson C. *et al.*, 1987, Meyer K. S. *et al.*, 1993, Lucet J. C. *et al.*, 1996, Peña C. *et al.*, 1998).

Leur dissémination peut impliquer l'association de plusieurs mécanismes : propagation de souches épidémiques (Gniadkowski M. *et al.*, 1998), de gènes plasmidiques (Rice L. B. *et al.*, 1990, Petit A. *et al.*, 1990) ou d'autres gènes de résistance (Essack S. Y. *et al.*, 2001). Les investigations concernant cette dissémination nécessitent donc de disposer de marqueurs permettant de différencier ces mécanismes et les risques potentiels qui s'y rapportent.

Afin de comparer les 32 souches de *K. pneumoniae* sélectionnées au cours de la période 1990-2001, au CHU de Nantes, et de déterminer le degré de relation clonale existant éventuellement entre elles, nous les avons soumises à un typage par électrophorèse en champ pulsé, technique largement utilisée pour de nombreuses espèces bactériennes (Goering R. V., 1993). Notre étude a confirmé l'intérêt de cette méthode, à la fois reproductible, discriminante et relativement facile à interpréter (Gouby A. *et al.*, 1994, Gori A. *et al.*, 1996), qui permet la mise en évidence de nombreuses épidémies bactériennes et participe à leur contrôle. Ce typage a révélé l'existence d'un clone bactérien, rassemblant 18 des 32 souches étudiées, qui a persisté de 1990 à 1993, pour disparaître ensuite. La comparaison des profils de macrorestriction de ces 18 souches a en effet montré des profils très proches les uns des autres, ne différant parfois que par une à deux bandes, en raison d'évènements génétiques aléatoires ayant modifié le nombre de sites de restriction présents sur l'ADN chromosomique bactérien (Tenover F. C. *et al.*, 1995, Tenover F. C. *et al.*, 1997). Au cours de cette période, on ne peut cependant pas évoquer de réelle épidémie d'infections à *K. pneumoniae* productrices de BLSE, les différentes souches n'ayant pas été isolées à des dates très rapprochées.

Cette dissémination clonale contraste avec la grande diversité génétique observée pour ces souches isolées les années suivantes. La grande hétérogénéité des profils obtenus témoigne de l'absence de dissémination d'une souche résistante parmi les patients hospitalisés à cette période et exclut la possibilité d'une source commune de contamination. Seuls les profils des souches Kp19 et Kp31, isolées respectivement en 1993 et en 2000, partageaient 98 % de similitude, démontrant la possibilité de persistance, sur plusieurs années, d'un petit clone à apparition sporadique.

Les raisons pour lesquelles ces clones ne sont pas parvenus à se maintenir ou à se disséminer dans l'environnement hospitalier demeurent inconnues, même si quelques hypothèses peuvent être envisagées.

D'une part, le renforcement des mesures d'hygiène mises en place, afin de lutter contre la dissémination des bactéries multirésistantes (Brun-Buisson C. *et al.*, 1992, Avril J. *et al.*, 1998), peut expliquer le fait que ces souches ne se transmettent plus que très rarement d'un patient à un autre et que les clones ne se maintiennent plus de manière épidémique dans l'environnement hospitalier. En effet, dans la majorité des cas, la transmission des bactéries multirésistantes à partir des patients porteurs est due au transport, par le personnel médical ou paramédical (Casewell M. W. *et al.*, 1977, McKee T. *et al.*, 1982), ou bien implique des supports inertes contaminés (stéthoscopes, brassards

à tension, thermomètres...) (Gaillot O. *et al.*, 1998). Le risque de transmission est donc directement lié à la fréquence des contacts avec les patients porteurs. Cela peut notamment expliquer que le plus grand nombre de souches ait été relevé en Rééducation fonctionnelle où les patients, particulièrement dépendants, nécessitent une charge élevée en soins, augmentant le risque de transmission croisée dans le service. En effet, il y est largement fait appel à des techniques médicales et paramédicales pour lesquelles le contact, la mobilisation directe sont quotidiennement utilisés, dans un but thérapeutique ou simplement de confort (kinésithérapie, ergothérapie, psycho-motricité, orthophonie...). Cela rend plus difficile que dans d'autres services l'application des mesures de protection, d'isolement et d'hygiène, nécessaires dans la lutte contre les infections nosocomiales (Collège de Bactériologie-Virologie-Hygiène du Centre Hospitalier Universitaire de Paris, 1998, Branger B. *et al.*, 2000). Par ailleurs, les patients qui y sont admis sont adressés par des unités, services ou établissements hospitaliers très divers (Réanimations, médicale ou chirurgicale, services de Chirurgie, Orthopédie, Traumatologie ou de Neurologie), d'où provenaient diverses autres souches de notre étude. De même, ils sont souvent amenés à se rendre à des consultations dans d'autres unités, notamment en Urologie, et à circuler dans le service où leur séjour est généralement de longue durée. Cela favorise aussi les échanges de micro-organismes d'un patient à un autre, dans la chambre d'un résidant infecté ou dans les locaux communs (salle à manger, plateau technique, piscines...) et d'un service à un autre. Ainsi, nous avons pu constater que les souches appartenant au clone mis en évidence de 1990 à 1993 avaient été isolées dans divers services entre lesquels les patients avaient pu transiter : Urgences médicales, Réanimation médicale, Traumatologie, Urologie, Rééducation fonctionnelle.

Compte tenu de la rareté d'isolement de souches productrices de BLSE en milieu communautaire, l'observation de plusieurs souches provenant des Urgences médicales ou pédiatriques nous a conduit à nous interroger sur une éventuelle hospitalisation antérieure des patients, au cours de laquelle de telles souches multirésistantes auraient pu être acquises. Plusieurs enquêtes nationales ont montré que 25 à 40 % des patients porteurs de bactéries multirésistantes dès leur admission avaient, en fait, été colonisés lors d'une hospitalisation antérieure (Cattoen C. *et al.*, 1994, Hôpital propre II, rapport d'études, 1997).

L'attention s'est portée, ces dernières années, sur l'intérêt de l'isolement technique des patients porteurs de bactéries multirésistantes afin d'éviter la dissémination de ces souches. Quelques mesures simples à mettre en oeuvre peuvent y contribuer : lavage antiseptique des mains, désinfection des mains non souillées avec une solution hydro-alcoolique, port de gants à usage unique, port de surblouse, masques, lunettes... Associé à cet isolement technique, l'isolement géographique des patients chez lesquels sont isolées des souches productrices de BLSE contribue également à en limiter la propagation. Il se fait en chambre individuelle ou, à défaut, en regroupant les patients porteurs d'une même souche résistante. Le respect de toutes ces mesures de précautions et d'hygiène a certainement contribué à la raréfaction des transmissions croisées que l'on pouvait observer, dans ces mêmes services, il y a une dizaine d'années. Cependant, ces règles ne sont pas toujours faciles à appliquer ; le principe même des établissements de soins de suite et de réadaptation, qui sont des lieux de circulation et d'échanges, est plutôt contradictoire des impératifs d'isolements.

Dans un autre domaine, des évolutions dans les politiques d'antibiothérapie mises en oeuvre au cours des dernières années ont également pu contribuer à modifier l'épidémiologie des BLSE. Ainsi, ce n'est que très peu de temps après la mise sur le marché des céphalosporines de 3^{ème} génération qu'ont été détectées les premières BLSE inactivant ces antibiotiques. Aujourd'hui, nombreux sont ceux qui plaident pour un usage plus rationnel des

antibiotiques, tant sur les plans qualitatif que quantitatif, afin de réduire la pression de sélection qu'ils exercent (Jarlier V. *et al.*, 1988).

Enfin, la plus ou moins grande aptitude de dissémination des souches de *K. pneumoniae* en fonction du clone auquel elles appartiennent, ou bien de transmission de leur BLSE en fonction du type d'enzyme qu'elles produisent, sont d'autres hypothèses envisageables. Des études ont souligné la responsabilité de certains clones ou de certains plasmides susceptibles de circuler entre différents clones, dans des épidémies d'infections à *K. pneumoniae* productrices de BLSE, rencontrées en milieu hospitalier (Arlet G. *et al.*, 1994, Bradford P. A. *et al.*, 1994, Barroso F. *et al.*, 2000, Fielt J. *et al.*, 2000), sans pouvoir réellement l'expliquer. Une situation plus complexe, impliquant à la fois plusieurs clones et différentes enzymes, a également été démontrée (Essack S. Y., 2001, Gniadkowski M. *et al.*, 1998). La pression de sélection exercée par les antibiotiques prescrits dans les différents établissements hospitaliers (en particulier les céphalosporines de 3^{ème} génération), ainsi que l'importance de leur prescription, contribuent peut-être à l'émergence et à la propagation de certains clones producteurs d'une BLSE hydrolysant de manière préférentielle l'antibiotique prescrit, qui se substituent progressivement aux flores sensibles, ainsi qu'à la stabilité des plasmides porteurs des gènes codant pour ces enzymes. De plus, l'association de plusieurs antibiotiques, en particulier d'une céphalosporine de 3^{ème} génération et d'un aminoside, fréquemment prescrite dans des infections sévères, pourrait favoriser la survie et la dissémination, dans l'environnement hospitalier, des bactéries hébergeant un plasmide conjugatif codant pour la résistance associée à ces antibiotiques. Ainsi, il semble que les souches clonales isolées à Nantes de 1990 à 1993 se soient facilement propagées au cours de cette période, puis ce clone aurait disparu pour laisser la place à d'autres clones d'apparition plus occasionnelle, peut-être moins transmissibles ou moins sélectionnés. Par ailleurs, nous avons constaté la réapparition, après plusieurs années, du clone B auquel appartenaient la souche Kp19, isolée en 1993, et la souche Kp31, isolée 7 ans plus tard.

Notre attention s'est surtout portée, dans la suite de cette étude, sur les 18 souches de *K. pneumoniae* issues du clone A, dont nous avons d'abord comparé les profils de résistance aux antibiotiques puis, dans un second temps, les capacités à transmettre la BLSE qu'elles produisaient, ainsi que d'éventuels autres gènes de résistance. Enfin, nous avons comparé les BLSE, ainsi que les plasmides acquis par les transconjugants obtenus.

Le résultat des antibiogrammes de ces 18 souches a révélé qu'elles partageaient le même phénotype de résistance vis-à-vis des bêta-lactamines, de type « ceftazidimase », ainsi que vis-à-vis des aminosides. En effet, elles présentaient chacune une résistance à la tobramycine et à l'amikacine, mais une sensibilité conservée à la gentamicine, phénotype compatible avec la production d'une aminoside acétyltransférase AAC(6'), fréquemment associée à la production d'une BLSE. De même, ces 18 souches étaient résistantes aux fluoroquinolones testées (ciprofloxacine et ofloxacine), ainsi qu'à la tétracycline (à l'exception de la souche Kp5).

De façon surprenante, nous avons constaté que seules 6 des 18 souches de ce clone, avaient transféré leur BLSE à la souche réceptrice. La caractérisation des BLSE acquises par les transconjugants issus de ces 6 souches, par technique d'isoélectrofocalisation, a révélé qu'elles présentaient toutes un pI proche de 6,3, suggérant le transfert d'une même enzyme. Cette valeur de pI correspond à celle de l'enzyme TEM-3, à laquelle nous avons pu identifier la BLSE en cause, après extraction à partir du transconjugant Tc/Kp2 choisi comme

représentant de l'ensemble des transconjugants obtenus à partir des souches de *Klebsiella pneumoniae* appartenant au clone A. L'enzyme TEM-3 est la première bêta-lactamase à spectre étendu décrite en France, au milieu des années 1980. Il n'est donc pas surprenant qu'elle ait été majoritairement détectée à Nantes, au début des années 1990. Isolée au CHU de Clermont-Ferrand, en 1984 (Sirot D. *et al.*, 1987), elle fut initialement dénommée CTX-1, du fait de sa grande activité hydrolytique sur le céfotaxime (ce que nous avons effectivement pu observer sur l'antibiogramme des transconjugants), puis renommée TEM-3, après avoir constaté qu'elle dérivait de l'enzyme TEM-2, par mutation (Sougakoff W. *et al.*, 1988). TEM-3 est codée par un plasmide transférable, ce qui a favorisé sa dissémination à plusieurs espèces et genres bactériens, d'où son implication dans de nombreuses épidémies d'infections nosocomiales (Brun-Buisson C. *et al.*, 1987, Kitzis M. D. *et al.*, 1988, Sirot J. *et al.*, 1988). Contrairement à ce que nous avons pu observer, plusieurs études dont celle réalisée par Petit *et al.* en 1990, ont mis en évidence le transfert de cette enzyme, par conjugaison bactérienne, pour l'ensemble des souches étudiées. Les raisons pour lesquelles les 18 souches de notre étude, pourtant génétiquement très proches, n'avaient pas toutes le même potentiel à transmettre leur BLSE n'ont pas été élucidées au cours de ce travail. Cependant, la confirmation de ces résultats à l'aide d'une autre méthode de conjugaison, notamment la conjugaison en milieu liquide, serait nécessaire afin de s'assurer de la réelle absence de transfert de la BLSE produite par les 12 autres souches de ce clone, d'autres conditions de contact entre les souches donatrice et réceptrice pouvant peut-être faciliter ce transfert.

Un autre fait surprenant était l'absence de résistance associée aux aminosides, chez les transconjugants obtenus à partir de ce clone, suggérant que celle-ci n'était pas codée par le même plasmide. Or, il est communément admis que les gènes codant pour les BLSE et les gènes codant pour l'inactivation enzymatique des aminosides, du chloramphénicol, de la tétracycline et du cotrimoxazole sont souvent localisés sur les mêmes plasmides de grande taille. Chez les souches donatrices de ce clone, les gènes codant pour les résistances observées aux bêta-lactamines et aux aminosides étaient peut-être portés par des plasmides distincts, dont seul celui codant pour la BLSE aurait été transmis, lors des expériences de conjugaison. En revanche, la cassure, au cours du transfert, d'un éventuel plasmide porteur du gène codant pour l'enzyme TEM-3 et d'autres gènes de résistance, responsable d'un transfert partiel de ceux-ci, est peu probable.

Ces constatations nous ont conduit à réaliser l'extraction des plasmides acquis par les transconjugants, afin d'estimer leur taille, de comparer leurs profils de restriction enzymatique, et de déterminer le lien entre ces plasmides et les enzymes de résistance pour lesquelles ils codaient.

L'extraction des plasmides est une technique d'autant plus délicate que leur taille est importante, rendant plus difficile leur séparation du chromosome bactérien. Des colonnes échangeuses d'anions NUCLEOBOND ont été utilisées, dans un premier temps. Afin d'éviter leur saturation par une densité bactérienne trop forte, une optimisation des conditions de culture s'est avérée nécessaire : l'utilisation d'une culture en phase stationnaire de croissance nous a semblé favorable à l'obtention de bons résultats. La lyse alcaline utilisée pour l'extraction a également nécessité une optimisation de plusieurs paramètres susceptibles de la perturber. Malgré cela, les difficultés de cette technique expliquent que nous n'ayons pas toujours obtenu des résultats très satisfaisants.

Après extraction, les plasmides ont été soumis à une digestion par diverses enzymes de restriction (*PvuII*, *ClaI* et *PstI*), puis à une migration, sous forme native et sous forme digérée, par électrophorèse en champ pulsé et électrophorèse conventionnelle. L'utilisation d'enzymes de restriction, qui permettent d'uniformiser les fragments obtenus à partir des trois différentes

formes moléculaires sous lesquelles peut se présenter un plasmide (formes surenroulée, relâchée ou linéaire), facilite l'interprétation des profils plasmidiques. De plus, ces enzymes permettent de différencier des plasmides de taille identique mais présentant des séquences différentes, en les coupant en fragments qui diffèrent par leur nombre et leur taille.

L'analyse des profils de restriction obtenus nous a alors permis de constater que l'ensemble des transconjugants obtenus à partir des souches du clone A avaient acquis un plasmide de même taille qui, après digestion par les enzymes *Pst*I, *Pvu*II et *Cla*I, présentait le même profil de restriction. Ces plasmides présentaient une taille comparable à celle des plasmides codant pour l'enzyme TEM-3 habituellement décrits dans la littérature. En effet, certaines études, au cours desquelles avait cependant pu être observé un transfert associé de la résistance à d'autres familles d'antibiotiques (Petit A. *et al.*, 1990), notamment aux aminosides, avaient mis en évidence la dissémination d'un plasmide de 85 kb, dénommé pCFF04, ce qui semble correspondre à l'ordre de taille des plasmides mis en évidence chez ces transconjugants, bien que celle-ci n'ait pas été évaluée de manière précise.

A côté des difficultés de la technique, l'interprétation de ces profils de restriction plasmidique se heurte à plusieurs difficultés : les plasmides ne constituant pas une partie stable du génome bactérien ne sont pas nécessairement de bons indicateurs de dissémination d'une souche. En effet, le contenu plasmidique d'une souche peut varier au cours du temps, par perte ou acquisition de plasmides. De plus, la structure d'un plasmide peut aussi varier au cours du temps, du fait de son organisation modulaire, comportant des éléments transposables qui peuvent être perdus ou acquis. Ainsi, des souches génétiquement liées peuvent perdre des plasmides instables et présenter des profils plasmidiques différents. A l'inverse, des souches non reliées génétiquement peuvent posséder les mêmes plasmides, acquis sous la pression de l'environnement.

Les méthodes phénotypiques et génotypiques mises en œuvre au cours de ce travail ont toutes confirmé l'existence, au début des années 90, d'un clone de *K. pneumoniae* producteur d'une BLSE de type TEM-3, ayant persisté dans l'environnement hospitalier pendant environ 3 ans, puis d'une très grande diversité des souches productrices de BLSE, isolées depuis l'extinction de ce clone.

La détection de ce type de souches par le laboratoire de Microbiologie, parfois délicate lorsque la résistance s'exprime à bas niveau, est absolument capitale, puisqu'elle permet la notification rapide de celle-ci à l'équipe soignante et la signalisation des patients porteurs de souches productrices de BLSE dans le service d'hospitalisation, afin que l'ensemble des acteurs de soins prennent les précautions nécessaires lors de la prise en charge de ces patients, afin d'éviter la transmission de ces bactéries.

CONCLUSION

Depuis la description initiale des bêta-lactamases à spectre étendu, au début des années 1980, peu de temps après l'introduction des céphalosporines de troisième génération, l'incidence des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE n'a cessé d'augmenter. Essentiellement rencontrées en milieu hospitalier, où elles peuvent être à l'origine d'infections nosocomiales, ces souches sont largement répandues dans le monde entier. La transmission potentielle des BLSE entre bactéries de même espèce ou d'espèces différentes, par divers mécanismes de transferts génétiques, en particulier la conjugaison bactérienne, possible du fait de leur support essentiellement plasmidique, ainsi que leur association sur ces plasmides à d'autres gènes de résistance, notamment aux aminosides, au chloramphénicol ou à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole, en font un réel sujet de préoccupation. En effet, leur dissémination entraîne l'émergence de bactéries multi-résistantes, limitant ainsi les possibilités thérapeutiques.

La compréhension des mécanismes de dissémination des souches productrices de BLSE n'est pas toujours aisée. Elle suppose la connaissance de quelques notions de génétique bactérienne, ainsi que la disponibilité de marqueurs épidémiologiques, phénotypiques et surtout génotypiques. L'électrophorèse en champ pulsé, associée à l'analyse des profils de restriction plasmidique, constitue un bon outil d'investigation de ces souches. Elle permet ainsi de déterminer les relations clonales existant entre des souches isolées au cours d'une période déterminée et, en cas d'épidémie, de savoir si celle-ci est liée à la dissémination d'une souche et /ou à la dissémination d'un gène mobile porté par un plasmide, un transposon ou un intégron, ainsi que de déterminer le réservoir et les voies de transmission.

Jusqu'à ces dernières années, *K. pneumoniae* représentait, parmi l'ensemble des entérobactéries, l'espèce productrice de BLSE la plus souvent rencontrée. Aujourd'hui, de nombreuses autres espèces d'entérobactéries sont susceptibles de produire ces enzymes, notamment *E. aerogenes* qui est devenue l'espèce productrice de BLSE prépondérante. Même si les staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM) constituent le principal problème, en terme de bactéries multirésistantes (BMR), dans la plupart des pays européens, le problème de la résistance des bacilles à Gram négatif aux céphalosporines de 3^{ème} génération est également commun à de nombreux pays européens et les BLSE font partie des programmes de maîtrise des BMR dans les hôpitaux français. La lutte efficace contre l'émergence et la dissémination de ces résistances passe par une prescription rationnelle des antibiotiques, par un dépistage des résistances de bas niveau, potentiellement redoutables, et par le respect des mesures de précautions et d'hygiène, permettant de limiter la dissémination de ces souches.

BIBLIOGRAPHIE

1. Agence Nationale pour le développement de l'Evaluation Médicale (ANDEM). **Le bon usage des antibiotiques à l'hôpital.** Août 1996.
2. Araque M., Nieves B., Lauretti L., and Rossolini G. M. **Molecular basis of extended-spectrum β -lactamase production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Mérida, Venezuela.** *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2000 ; 15 : 37-42.
3. Ardanuy C., Linares J., Dominguez M. A., Hernandez-Alles S., Benedi V. C., and Martinez-Martinez L. **Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1998 ; 42 : 1636-1640.
4. Arlet G., Rouveau M., Casin I., Bouvet P. J. M., Lagrange P. H. and Philippon A. **Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 β -lactamase and which were isolated in 14 French hospitals.** *Journal of Clinical Microbiology.* 1994 ; 32 : 2553-2558.
5. Arlet G., Rouveau M., Bengoufra D., Nicolas M. H. and Philippon A. **Novel transferable extended-spectrum β -lactamase (SHV-6) from *Klebsiella pneumoniae* conferring selective resistance to ceftazidime.** *FEMS Microbiology Letters.* 1995 ; 81 : 57-62.
6. Arlet G., Rousseau M., and Philippon A. **Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum β -lactamases.** *FEMS Microbiology Letters.* 1997 ; 152 : 163-167.
7. Arpin C., Coze C., Rogues A. M., Gachie J. P., Bebear C., and Quentin C. **Epidemiological study of an outbreak due to multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* in a medical intensive care unit.** *Journal of Clinical Microbiology.* 1996 ; 34 : 2163-2169.
8. Avril J. L., Carlet J. **Les infections nosocomiales et leur prévention.** *Édition Ellipses.* 1998.
9. Barroso H., Freitas-Vieira A., Lito L. M., Cristino J. M., Salgado M. J., Neto H. F., Sousa J. C., Soveral G., Moura T., and Duarte A. **Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases at a Portuguese hospital : TEM-10 as the endemic enzyme.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2000 ; 45 : 611-616.
10. Barthélémy M., Péduzzi J., Ben Yaglane H. and Labia R. **Single amino acid substitution between SHV-1 β -lactamase and cefotaxime-hydrolyzing SHV-2 enzyme.** *FEBS Letters.* 1988 ; 231 : 217-220.
11. Bauernfeind A., Chong Y., and Schweighart S. **Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins.** *Infection.* 1989 ; 17 : 316-321.
12. Bauernfeind A., Rosenthal E., Eberlein E., Holleys M., and Schweighart S. **Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized patients.** *Infection.* 1993 ; 21 : 18-22.
13. Bauernfeind A., Stemplinger I., Jungwirth R., and Giamarellou H. **Characterization of the plasmidic β -lactamase CMY-2 which is responsible for cephamycin resistance.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1996 ; 40 : 616-620.

14. Bennett P. M. **Integrans and gene cassettes : a genetic construction kit for bacteria.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1999 ; 43 : 1-4.
15. Bingen E. H., Desjardins P., Arlet G., Bourgeois F., Mariani-Kurkdjian P., Lambert-Zechovsky N. Y., Denamur E., Philippon A., and Elion J. **Molecular epidemiology of plasmid spread among extended broad-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital.** *Journal of Clinical Microbiology.* 1993 ; 31 : 179-184.
16. Birnboim H. C., and Doly J. A. **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** *Nucleic Acids Research.* 1979 ; 7 : 1513-1523.
17. Birren B., Lai E. **Pulsed-Field Gel Electrophoresis : a practical guide.** *Academic Press,* San Diego, CA. 1993.
18. Bradford P. A., Cherubin C. E., Idemyor V., Rasmussen B. A., and Bush K. **Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago hospitals : identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing β -lactamases in a single isolate.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1994 ; 38 : 761-766.
19. Bradford P. A., Urban C., Mariano N., Progan S. J., Rahal J. J and Bush K. **Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1997 ; 41 : 563-569.
20. Bradford P. **Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century : characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat.** *Clinical Microbiology Reviews.* 2001 ; 14 : 933-951.
21. Branger B., Ertzscheid M. A., Le Guyader A. **Hygiène dans les établissements de Rééducation Fonctionnelle (Soins de Suite et de Réadaptation).** *Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales (C. CLIN - Ouest).* Mars 2000.
22. Branger C., Lesimple A. L., Bruneau B., Berry P., and Lambert-Zechovsky N. **Long-term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases in a university hospital.** *Journal of Medical Microbiology.* 1998 ; 47 : 201-209.
23. Brun-Buisson C., Legrand P., Philippon A., Montravers F., Ansquer M., and Duval J. **Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during a nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*.** *Lancet.* 1987 ; ii : 302-306.
24. Brun-Buisson C., Gutmann L., Jarlier V., Nicolas M. H. et CLIN Central de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. **Contrôle des infections nosocomiales à germes multirésistants.** *Documentation du Service Central d'Hygiène et de la Prévention de l'AP-HP.* Paris 1992.
25. Bush K., Jacoby G. A., and Medeiros A. A. **A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1995 ; 39 : 1211-1233.

26. Carter M. W., Oakton K. J., Warner M., and Livermore D. M. **Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid Combination Disk Method.** *Journal of Clinical Microbiology*. 2000 ; 38 : 4228-4232.
27. Casewell M.W., and Phillips I. **Hands as a route of transmission for *Klebsiella* species.** *British Medical Journal*. 1977 ; 2 : 1315-1317.
28. Cattoen C., Martin E., Péan Y., Richard P., Nicolas M. H. et le groupe "Observatoire des Klebsielles". **« Observatoire des Klebsielles » : observation depuis 45 hôpitaux français de la circulation des malades porteurs de *Klebsiella pneumoniae* (KP) productrice de β -lactamase à spectre étendu.** 14^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie infectieuse. 1-2 décembre 1994. 15/C2.
29. Chanal C. M., Sirot D. L., Petit A., Labia R., Morand A., Sirot J. L., and Cluzel R. A. **Multiplicity of TEM-derived β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the same hospital and relationships between the responsible plasmids.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1989 ; 33 : 1915-1920.
30. Chetoui H., Delhalle E., Meli P., Sabri A., Thonart P., and De Mol P. **Epidemiological typing of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility patterns.** *Research in Microbiology*. 1999 ; 150 : 265-272.
31. Clegg S., and Gerlach G. F. **Enterobacterial fimbriae.** *Journal of Bacteriology*. 1987 ; 169 : 934-938.
32. Collège de Bactériologie-Virologie-Hygiène du Centre Hospitalier Universitaire de Paris. **Surveillance des Staphylocoques dorés et Klebsielles multirésistants à l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (1993-1996).** *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*. 1998 ; 10 : 41-43.
33. Collis C. M., Grammaticopoulos G., Briton J., Stokes H. W., and Hall R. M. **Site-specific insertion of gene cassettes into integrons.** *Molecular Microbiology*. 1993 ; 9 : 41-52.
34. Collis C. M. and Hall R. M. **Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995 ; 39 : 155-162.
35. Coovadia Y. M., Johnson A. P., Bhama R. H., Hutchinson G. R., George R. C., and Hafferjee I. E. **Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal nursery : the importance of maintenance of infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks.** *Journal of Hospital Infection*. 1992 ; 22 : 197-205.
36. Coque T. M., Oliver A., Pérez-Díaz J. C., Baquero F., and Cantón R. **Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000).** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002 ; 46 : 500-510.
37. Darfeuille-Michaud A., Jallat C., Aubel D., Sirot D., Rich C., Sirot J., and Joly. B. **R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections.** *Infection and Immunity*. 1992 ; 60 : 44-45.

38. Davis T. J., and Matsen J. M. Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species : relation to association with a hospital environment. *Journal of Infectious Diseases*. 1974 ; 130 : 402-405.
39. Di Martino P., Livreli V., Sirot D., Joly B., and Darfeuille-Michaud A. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4 producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infection and Immunity*. 1996 ; 64 : 2266-2273.
40. Donowitz L.G., Marsik F. J., Fisher K. A., and Wenzel R. P. Contaminated breast milk : a source of *Klebsiella* bacteremia in a newborn intensive care unit. *Reviews of Infectious Diseases*. 1981 ; 3 : 716-720.
41. Dubois S. K., Marriott M. S., and Amyes S. G. B. TEM and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases : relationships between selection, structure, and function. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1995 ; 35 : 7-32.
42. Emery C. L., and Weymouth L. A. Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases in a tertiary-care medical center. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997 ; 35 : 2061-2067.
43. Essack S. Y., Hall L. M. C., Pillay Devadas G., Mcfadyen M. L., and Livermore D. M. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001 ; 45 : 88-95.
44. Fair M. A. PulseNet PFGE Protocols and Methods. Pulsed Field Gel Electrophoresis and DNA Fingerprinting Workshop. *American Society for Microbiology*. May 2002, Salt Lake City, Utah.
45. Fielt J., Palucha A., Miaczynska B., Stankiewicz M., Przondo-Mordaska H., Hryniewicz W., and Gniadkowski M. A novel complex mutant β -lactamase, TEM-68 identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *klebsiellae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000 ; 44 : 1499-1505.
46. French G. L., Shannon K. P., and Simmons N. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 β -lactamase. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996 ; 34 : 358-363.
47. Gaillot O., Maruéjols C., Abachin É., Lecuru F., Arlet G., Simonet M., and Berche P. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase, originating from a contaminated ultrasonography Coupling gel. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998 ; 36 : 1357-1360.
48. Gniadkowski M., Schneider I., Jungwirth R., Hryniewicz W., and Bauernfeind A. Ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from three Polish hospitals : identification of three novel TEM- and SHV-5 type extended-spectrum β -lactamase - producing *klebsiellae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998 ; 42 : 514-520.

49. Gniadkowski M., Palucha A., Grzesioski P., and Hryniewicz W. **Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland : clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding gene.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998 ; 42 : 3079-3085.
50. Goering R. V. **Molecular epidemiology of nosocomial infection : analysis of chromosomal restriction patterns by pulsed-field gel electrophoresis.** *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1993 ; 14 : 595-600.
51. Gori A., Espinasse F., Deplano A., Nonhoff C., Nicolas M. H., and Struelens M. J. **Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified DNA polymorphism analysis for typing extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*.** *Journal of Clinical Microbiology*. 1996; 34 : 2448-2453.
52. Gorman L. J., Sanai L., Notman A. W., Grant I. S., and Masterton R. G. **Cross infection in an intensive care unit by *Klebsiella pneumoniae* from a ventilator condensate.** *Journal of Hospital Infection*. 1993 ; 23 : 27-34.
53. Gouby A., Neuwirth C., Bourg G., Bouziges N., Carles-Nurit M. J., Despaux E., and Ramuz M. **Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital.** *Journal of Clinical Microbiology*. 1994 ; 32 : 301-305.
54. Griffiths E., Chart H., and Stevenson P. **High-affinity iron uptake systems and bacterial virulence.** In J. A. Roth (ed.), *virulence mechanisms of bacterial pathogens.* American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1988 ; p. 121-137.
55. Grimont P. A. D. **Interprétation sur ordinateur des profils de typage moléculaire : principe et applications.** *Option / Bio*. 1998 ; 1998 : 47-51.
56. Hall R. M. and Collis C. M. **Mobile gene cassettes and integrons : capture and spread of genes by site-specific recombination.** *Molecular Microbiology*. 1995 ; 15 : 593-600.
57. Hanson N. D., Thomson K. S., Smith Moland E., Sanders C. C., Berthold G., and Penn R. G. **Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999 ; 44 : 377-380.
58. Hart C. A. ***Klebsiellae* and neonates.** *Journal of hospital infection*. 1993 ; 23 : 83-86.
59. Heritage J., Hawkey P. M., Todd N., and Lewis I. J. **Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum beta-lactamase.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992 ; 36 : 1981-1986.
60. Hibbert-Rogers L. C. F., Heritage J., Gascoyne-Binzi D. M., Hawkey P. M., Todd N., Lewis J., and Bailey C. **Molecular epidemiology of ceftazidime resistant Enterobacteriaceae from patients on a paediatric oncology ward.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1995 ; 36 : 65-82.

61. Holländer R., Ebke M., Barck H., and von Pritzbuier E. **Asymptomatic carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase by patients in a neurological early rehabilitation unit : management of an outbreak.** *Journal of Hospital Infection.* 2001 ; 48 : 207-213.
62. Holmberg S. D., Solomon S. L., and Blake P. A. **Health and economic impact of antimicrobial resistance.** *Reviews of Infectious Diseases.* 1987 ; 9 : 1065-1078.
63. Hôpital propre II. **Rapport d'études : stratégies pour la prévention des infections à bactéries multirésistantes.** Paris 1997.
64. Horii T., Arakawa Y., Ohta M., Ichiyama S., Wacharotayankun R., and Kato N. **Plasmid-mediated AmpC type β -lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum β -lactams, including moxalactam.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1993 ; 37 : 984-990.
65. Huletsky A., Knox J. R., and Levesque R. C. **Role of Ser-238 et Lys-240 in the hydrolysis of 3rd-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and 3-dimensional modeling.** *Journal of Biological Chemistry.* 1993 ; 268 : 3690- 3697.
66. Ish-Horowicz D. and Burke J. F. **Rapid and efficient cosmid cloning.** *Nucleic Acids Research.* 1981 ; 9/13 : 2989-2998.
67. Jacoby G. A., and Sutton L. **Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1991 ; 35 : 164-169.
68. Jacoby G. A., and Medeiros A. A. **More extended-spectrum β -lactamases.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1991 ; 35 : 1697-1704.
69. Jacoby G. A. **Genetics of extended-spectrum beta-lactamases.** *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 1994 ; 13 (suppl) : 2-11.
70. Jacoby G. A., and Han P. **Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*.** *Journal of Clinical Microbiology.* 1996 ; 34 : 908-911.
71. Jarlier V., Nicolas M. H., Fournier G., and Philippon A. **Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae : hospital prevalence and susceptibility patterns.** *Reviews of Infectious Diseases.* 1988 ; 10 : 867-878.
72. Johanson W. G., Pierce A. K., and Sanford J. P. **Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients. Emergence of gram-negative bacilli.** *New England Journal of Medicine.* 1969 ; 281: 1137-1140.
73. Kado C. I. and Liu S.-T. **Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids.** *Journal of Bacteriology.* 1981 ; 145 : 1365-1373.

74. Katsanis G. P., Spargo J., Ferraro M. J., Sutton L., and Jacoby G. A. **Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases.** *Journal of Clinical Microbiology.* 1994 ; 32 : 691-696.
75. Kim B.-N., Woo J.-H., Kim M.-N., Ryu J. and Kim Y. S. **Clinical implications of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia.** *Journal of Hospital Infection.* 2002 ; 52 : 99-106.
76. Kim J., Kwon Y., Pai H., Kim J.-W., and Cho D.-T. **Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β -lactamases : prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea.** *Journal of Clinical Microbiology.* 1998 ; 36 : 1446-1449.
77. Kim Y.-K., Pai H., Lee H.-J., Park S.-E., Choi E.-H., Kim J., Kim J.-H., and Kim E.-C. **Bloodstream infections by extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children : epidemiology and clinical outcome.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2002 ; 46 : 1481-1491.
78. Kitzis M. D., Billot-Klein D., Goldstein F. W., Williamson R., Tran Van Nhieu G., Carlet J., Acar J. F., and Gutmann L. **Dissemination of the novel plasmid-mediated β -lactamase CTX-1, which confers resistance to broad-spectrum cephalosporins, and its inhibition by β -lactamase inhibitors.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1988 ; 32 : 9-14.
79. Knothe G. P., Shah P., Kremery V., Antai M., and Misuhashi S. **Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*.** *Infection.* 1983 ; 11: 315-317.
80. Kühn I., Ayling-Smith B., Tullus K., and Burman L. G. **The use of colonization rate and epidemic index as tools to illustrate the epidemiology of faecal Enterobacteriaceae strains in Swedish neonatal wards.** *Journal of Hospital Infection.* 1993 ; 23 : 287-297.
81. Lebessi E., Dellagrammaticas H., Tassios P. T., Tzouveleakis L. S., Ioannidou S., Foustoukou M., and Legakis N. J. **Extended-Spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit in the high-prevalence area of Athens, Greece.** *Journal of Clinical Microbiology.* 2002 ; 40 : 799-804.
82. Legakis N. J., Tzouveleakis L. S., Hatzoudis G., Tzelepi E., Gourkou A., Pitt T. L., and Vatopoulos A. C. ***Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals. Dissemination of plasmids encoding an SHV-5 type beta-lactamase.** *Journal of Hospital Infection.* 1995 ; 31 : 177-187.
83. Leiza M. G., Perez-Diaz J. C., Ayala J., Casellas J. M., Martinez-Beltran J., Bush K., and Baquero F. **Gene sequences and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase with two molecular variants.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1994 ; 38 : 2150-2157.
84. Lemaître N., and Legrand P. **Dépistage des patients porteurs de Klebsielles productrices de bêta-lactamases à spectre étendu à l'entrée dans les unités de réanimation : problèmes techniques et rendements.** In : J. Grosset, M. Kitzis, N. Lambert, M. Sinègre. *Infections nosocomiales en chirurgie et prévention contre les germes multirésistants.* Paris. Arnette. 1995.

85. Lemozy J., Sirot D., Chanal C., Huc C., Labia R., Dabernat H. and Sirot J. First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995 ; 39 : 2580- 2582.
86. Leung M., Shannon K., and French G. Rarity of transferable β -lactamase production by *Klebsiella* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1997 ; 39 : 737-745.
87. Lin M.-F., Huang M.-L., and Lai S.-H. Risk factors in the acquisition of extended-spectrum β -lactamase *Klebsiella pneumoniae* in a district teaching hospital in Taiwan. *Journal of Hospital Infection*. 2003 ; 53 : 39-45.
88. Ling T. K., Tam P. C., Liu Z. K., and Cheng A. F. Evaluation of Vitek-2[®] Rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39 : 2964-2966.
89. Liu P. Y. F., Gur D., Hall L. M. C., and Livermore D. M. Survey of the prevalence of beta-lactamases amongst 1000 gram-negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1992 ; 30 : 429-447.
90. Livermore D. M. β -lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology reviews*. 1995 ; 8 : 557-584.
91. Livermore D. M., and Yuan M. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum β -lactamases amongst *Klebsiella* spp from intensive care units in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1996 ; 38 : 409-424.
92. Lucet J. C., Chevret S., Decre D., Vanjak D., Macrez A., Bedos J. P., Wolff M., and Regnier B. Outbreak of multiply resistant Enterobacteriaceae in an intensive care unit : epidemiology and risk factors for acquisition. *Clinical Infectious Diseases*. 1996 ; 22 : 430-436.
93. Mabilat C., Goussard S., Sougakoff W., Spencer R. C., and Courvalin P. Direct sequencing of the amplified structural gene and promoter for the extended-broad-spectrum β -lactamase TEM-9 (RHH-1) of *Klebsiella pneumoniae*. *Plasmid*. 1990 ; 23 : 1-8.
94. Macrae M. B., Shannon K. P., Rayner D. M, Kaiser A. M., Hoffman P. N. and French G. L. A simultaneous outbreak on a neonatal unit of two strains of multiply antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* controllable only by ward closure. *Journal of Hospital Infection*. 2001 ; 49 : 183-192.
95. McGowan J. E. Antimicrobial resistance in hospital organisms and its relation to antibiotic use. *Reviews of Infectious Diseases*. 1983 ; 5 : 1033-1048.
96. McKee K. T., Cotton R. B., Stratton C. W., et al. Nursery epidemic due to multiply-resistant *Klebsiella pneumoniae* : epidemiologic setting and impact on perinatal health care delivery. *Infection Control*. 1982 ; 3 : 150-156.
97. Medeiros A. A. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 1997 ; 24 (Suppl.1) : S19-S45.

98. Meyer K. S., Urban C., Eagan J. A., Berger B. J., and Rahal J. J. **Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to late-generation cephalosporins.** *Annals of Internal Medicine.* 1993 ; 119 : 353-358.
99. Ministère de l'Emploi et de la Solidarité, Secrétariat d'Etat à la Santé et à l'action sociale, Comité technique national des infections nosocomiales. **Maîtrise de la diffusion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques.** 1999.
100. Montgomerie J. Z. **Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections.** *Reviews of infectious diseases.* 1979 ; 1 : 736-753.
101. Montgomerie J. Z., and Ota J. K. ***Klebsiella* bacteremia.** *Archives of Internal Medicine.* 1980 ; 140 : 525-527.
102. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved standard M100-S10.** NCCLS, Wayne, PA 2000.
103. Neuwirth C., Siebor E., Pechinot A., Duez J.-M., Pruneaux M., Garel F., Kazmierczak A., and Labia R. **Evidence of in vivo transfer of a plasmid encoding the extended-spectrum β -lactamase TEM-24 and other resistance factors among different members of the family Enterobacteriaceae.** *Journal of Clinical Microbiology.* 2001 ; 39 : 1985-1988.
104. Nordmann P., Ronco E., Naas T., Duport C., Michel-Briand Y., and Labia R. **Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1993 ; 37 : 962-969.
105. Nordmann P. **Trends in β -lactam resistance among Enterobacteriaceae.** *Clinical Infectious Diseases.* 1998 ; 27 : S100-S106.
106. Nouvellon M., Pons J. L., Sirot D., Combe M. L., and Lemelamd J. F. **Clonal outbreaks of extended-spectrum β -lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* demonstrated by antibiotic susceptibility testing, β -lactamase typing and multilocus enzyme electrophoresis.** *Journal of Clinical Microbiology.* 1994 ; 32 : 2625-2627.
107. Orskov L., and Orskov F. **Serotyping of *Klebsiella*.** *Methods in Microbiology.* 1984 ; 14 : 143-164.
108. Pai H., Lyu S., Lee J. H., Kim J., Kwon Y., Kim J-W., and Choe K. W. **Survey of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* : prevalence of TEM-52 in Korea.** *Journal of Clinical Microbiology.* 1999 ; 37 : 1758-1763.
109. Papanicolaou G. A., Medeiros A. A. and Jacoby G. A. **Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino and a methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1990 ; 34 : 2200-2209.

110. Peña C., Pujol M., Ardanuy C., Ricart A., Pallares R., Linares J., Ariza J., and Gudiol F. **Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998 ; 42 : 53-58.
111. Peña C., Pujol M., Ardanuy C., Ricart A., Pallarés R., Linares J., Ariza J. and Gudiol F. **An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia, including strains producing extended-spectrum β -lactamase.** *Journal of Hospital Infection*. 2001 ; 47 : 53-59.
112. Petit A., Gerbaud G., Sirot D., Courvalin P., and Sirot J. **Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX-1) β -lactamase.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1990 ; 34 : 219-224.
113. Philippon A., Arlet G., and Lagrange P. H. **Origin and impact of plasmid-mediated of extended-spectrum β -lactamases.** *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1994 ; 13 (suppl. 1) : S17-S29.
114. Pitout J. D. D., Thomson K. S., Hanson N. D., Ehrhardt A. F., Coudron P., and Sanders C. C. **Plasmid-mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998 ; 42 : 596-600.
115. Podschun R., Heineken P., Ullmann U., and Sonntag H.G. **Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes.** *Microbial pathogenesis*. 1992 ; 13 : 371-379.
116. Podschun R. and Ullmann U. ***Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum.** *Journal of Medical Microbiology*. 1992 ; 36 : 250-254.
117. Podschun R. and Ullmann U. ***Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens : epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors.** *Clinical Microbiology reviews*. 1998 ; 11 : 589-603.
118. Poirel L., Naas T., Guibert M., Chaibi E. B., Labia R., and Nordmann P. **Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999 ; 43 : 573-581.
119. Poirel L., Thomas I. L., Naas T., Karim A., and Nordmann P. **Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron IN52 from *Klebsiella pneumoniae*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000 ; 44 : 622-632.
120. Pollack M., Niemann R. E., Reinhardt J. A., Charache P., Jett M. P., and Hardy P. H., Jr. **Factors influencing colonisation and antibiotic-resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients.** *Lancet*. 1972 ; ii : 668-671.
121. Quinn J. P. **Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases.** *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1994 ; 13 : 39-42.

122. Recchia G. D. and Hall R. M. **Gene cassettes : a new class of mobile element.** *Microbiology*. 1995 ; 141 : 3015-3027.
123. Reish O., Ashkenazi S., Naor N., Samra Z., and Merlob P. **An outbreak of multiresistant *Klebsiella* in a neonatal intensive care unit.** *Journal of Hospital Infection*. 1993 ; 25 : 287-291.
124. Rice L. B., Willey S. H., Papanicolaou G. A., and Medeiros A. A., Eliopoulos G. M., Moellering J. R. C., and Jacoby G. A. **Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum β -lactamases at a Massachusetts chronic-care facility.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1990 ; 34 : 2193-2199.
125. Rice L. B., Eckstein E. C., De Vente J., and Shlaes D. M. **Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered at the Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center.** *Clinical Infectious Diseases*. 1996 ; 23 : 118-124.
126. Rose H. D., and Schreier J. **The effect of hospitalization and antibiotic therapy on the gram-negative fecal flora.** *American Journal of Medical Sciences*. 1968 ; 255 : 228-236.
127. Rosenthal S., and Tager I. B. **Prevalence of gram-negative rods in the normal pharyngeal flora.** *Annals of Internal Medicine*. 1975 ; 83 : 355-357.
128. Royle J., Halasz S., Eagles G., Gilbert G., Dalton D., Jelfs P., and Isaacs D. **Outbreak of extended spectrum β -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit.** *Archives of Diseases in Childhood (in the Fetal and Neonatal Edition)*. 1999 ; 80 : F64-F68.
129. Sanger F., Nicklen S., and Coulson A. R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1977 ; 74 : 5463-5467.
130. Selden R., Lee S., Wang W. L., Bennett J. V., and Eickhoff T. C. **Nosocomial *Klebsiella* infections : intestinal colonization as a reservoir.** *Annals of Internal Medicine*. 1971 ; 74 : 657- 664.
131. Shannon K., Stapleton P., Xiang X., Johnson A., Beattie H., El Bakri F., Cookson B., and French G. **Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreaks of infection in the United Kingdom.** *Journal of Clinical Microbiology* 1998 ; 36 : 3105-3110.
132. Silva J., Aguilar C., Ayala G., Estrada M. A., Garza-Ramos U., Lara-Lemus R., and Ledezma L. **TLA-1 : a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000 ; 44 : 997-1003.
133. Silva J., Gatica R., Aguilar C., Becerra Z., Garza-Ramos U., Velázquez M., Miranda G., Leaños B., Solórzano F., and Echániz G. **Outbreak of infection with extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a mexican hospital.** *Journal of Clinical Microbiology*. 2001 ; 39 : 3193-3196.
134. Simoons-Smit A. M., Verweij-van Vught A. M. J. J., and MacLaren D. M. **The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*.** *Journal of Medical Microbiology*. 1986 ; 21 : 133-137.

135. Sirot D., Sirot J., Labia R., Morand A., Courvalin P., Darfeuille-Michaud A., Perroux R., and Cluzel R. **Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* : identification of CTX-1, a novel β -lactamase.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1987 ; 20 : 323-334.
136. Sirot D. L., Goldstein F. W., Soussy C. J., Courtieu A. L., Husson M. O., Lemozy J., Meyran M., Morel C., Perez R., and Quentin-Noury C. **Resistance to cefotaxime and seven other β -lactams in members of the family Enterobacteriaceae : a 3-year survey in France.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992 ; 36 : 1677-1681.
137. Sirot D. **Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamase.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1995 ; 36 Suppl A : 19-34.
138. Sirot J., Chanal C., Petit A., Sirot D., Labia R., and Gerbaud G. ***Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae producing novel plasmid-mediated β -lactamases markedly active against third-generation cephalosporins : epidemiologic studies.** *Reviews of Infectious Diseases*. 1988 ; 10 : 850-859.
139. Siu L. K., Lu P.-L., Hsueh P.-R., Lin F. M., Chang S.-C., Luh K. T., Ho M., and Lee C. Y. **Bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric oncology ward : clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes.** *Journal of Clinical Microbiology*. 1999 ; 37 : 4020-4027.
140. Soilleux M. J., Morand A. M., Arlet G. J., Scavizzi M. R., and Labia R. **Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases : prevalence of TEM-3 and first identification of TEM-26 in France.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996 ; 40 : 1027-1029.
141. Sougakoff W., Goussard S., Gerbaud G., and Courvalin P. **Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes.** *Reviews of Infectious Diseases*. 1988 ; 10 : 879-884.
142. Sougakoff W., Goussard S., and Courvalin P. **The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyses broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions.** *FEMS Microbiology Letters*. 1988 ; 56 : 343-348.
143. Stokes H. W. and Hall R. M. **A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions : integrons.** *Molecular Microbiology*. 1989 ; 3 : 1669-1683.
144. Struelens M. et Renaud François N. R. **Marqueurs épidémiologiques.** *ESKA 2000-Précis de bactériologie clinique* ; N°13 : 229-245.
145. Su L.-H., Leu H.-S., Chiu Y.-P., Chia J.-H., Kuo A.-J., Sun C. F., Lin T.-Y., Wu T.-L., and the infection control group. **Molecular investigation of two clusters of hospital-acquired bacteraemia caused by multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* using pulsed-field gel electrophoresis and infrequent restriction site PCR.** *Journal of Hospital Infection*. 2000 ; 46 : 110-117.

146. Szabo D., Filetoth Z., Szentandrassy J., Nenedi M., Toth E., Jeney C., Kispal G., and Rozgonyi F. **Molecular epidemiology of a cluster of cases due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamases in the premature intensive care unit of a Hungarian hospital.** *Journal of Clinical Microbiology*. 1999 ; 37 : 4167-4169.
147. Talon D. **The role of the hospital environment in the epidemiology of multi-resistant bacteria.** *Journal of Hospital Infection*. 1999 ; 43 : 13-17.
148. Taylor P. W. **Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria.** *Microbiology Reviews*. 1983 ; 47 : 46-83.
149. Tenover F. C. **Plasmid fingerprinting. A tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community-acquired infections.** *Clinical Laboratory Medicine*. 1985 ; 5 : 413-436.
150. Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H., and Swaminathan B. **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : criteria for bacterial strain typing.** *Journal of Clinical Microbiology*. 1995 ; 33 : 2233-2239.
151. Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., and the Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **How to select and interpret molecular typing methods for epidemiological studies of bacterial infections : a review for healthcare epidemiologists.** *Infection Control and Epidemiology*. 1997 ; 18 : 426-439.
152. Thabaut A. et al. **Fréquence et distribution des bêta-lactamases chez 1792 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées en France entre 1985 et 1988.** *Pathologie Biologie* 1990 ; 38 : 459-463.
153. Thom B.T. ***Klebsiella* in faeces.** *Lancet*. 1970 ; ii : 1033.
154. Tzelepi E., Giakkoupi P., Sofianou D., Loukova V., Kemeroglou A., and Tsakris A. **Detection of extended-spectrum β -lactamases in Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*.** *Journal of Clinical Microbiology*. 2000 ; 38 : 542-546.
155. Tzouvelakis L. S., Tzelepi E., Mentis A. F., and Tskaris A. **Identification of a novel plasmid-mediated β -lactamase with chromosomal cephalosporinase characteristics from *Klebsiella pneumoniae*.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1993 ; 32 : 645-654.
156. Tzouvelakis L. S., Tzelepi E., and Mentis A. F. **Nucleotide sequence of a plasmid-mediated cephalosporinase gene (blaLAT-1) found in *Klebsiella pneumoniae*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994 ; 38 : 2207-2209.
157. Urban C., and Rahal J. J. ***Klebsiella* and extended-spectrum β -lactamases.** *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1997 ; 8 : 37-43.
158. Van Belkum A. **DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR.** *Clinical Microbiology Reviews*. 1994 ; 7 : 174-184.

159. Vatopoulos A. C., Philippon A., Tzouveleakis L. S., Komninou Z., and Legakis N. J. Prevalence of a transferable SHV-5 type β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 1990 ; 26 : 635-648.
160. Venezia R. A., Scarano F. J., Preston K. E., Steele L. M., Root T. P., Limberger R., Archinal W., and Kacica M. A. Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in Enterobacteriaceae isolated from infants in neonatal intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases*. 1995 ; 21 : 915-923.
161. Wiedemann B., Kliebe C., and Kresken M. The epidemiology of β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1989 ; 24 : 1-22.
162. Williams P., Lambert P. A., Brown M. R. W., and Jones R. J. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *Journal of General Microbiology*. 1983 ; 129 : 2181-2191.
163. Williams P., and Tomas J. M. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Reviews of Medical Microbiology*. 1990 ; 1 : 196-204.
164. Yuan M., Aucken H., Hall L. M. C., Pitt T. L., and Livermore D. M. Epidemiological typing of *klebsiellae* with extended-spectrum β -lactamases from European intensive care units. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998 ; 41 : 527-539.
165. Yuk-Fong Liu P., Tung J.-C., Ke S.-C., and Chen S.-L. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a district hospital in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998 ; 36 : 2759-2762.

Nom- Prénom : RAUD Pascale.

Titre de la thèse : Etude de la diversité génétique des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE), isolées au C.H.U de Nantes, de 1990 à 2001.

Résumé de la thèse :

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de bêta-lactamase à spectre étendu sont fréquemment responsables d'infections nosocomiales. Dans le cadre d'une étude réalisée au CHU de Nantes, 32 souches, isolées entre 1990 et 2001, ont été analysées. Cette étude avait pour objectif d'étudier leur diversité génétique, le support de leur résistance, ainsi que les possibilités de transfert des BLSE, associé ou non à celui d'autres gènes de résistance. Au cours d'expériences de conjugaison bactérienne, 13 de ces souches ont transmis leur BLSE à une souche réceptrice : *E. coli* J53-2. La technique de typage moléculaire par électrophorèse en champ pulsé et les profils de restriction plasmidique ont mis en évidence l'existence d'une souche clonale, nettement prédominante au cours des années 1990-1993, contrastant avec la diversité génétique des souches isolées ultérieurement. La BLSE produite par ce clone a été identifiée, après séquençage du gène *bla*_{TEM}, comme étant l'enzyme TEM-3, résultat en parfaite corrélation avec le point isoélectrique de cette enzyme, déterminé par isoélectrofocalisation.

MOTS-CLÉS : *Klebsiella pneumoniae*, bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE), plasmides, conjugaison bactérienne, typage épidémiologique, clone.

JURY :

PRÉSIDENT :

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

ASSESEURS :

Mme CAROFF N. Maître de Conférences de Bactériologie,
Faculté de Pharmacie, Nantes.

M. LUSTENBERGER P. Professeur de Biochimie – Praticien des Hôpitaux,
Faculté de Médecine – CHU Nantes.

M. ESPAZE E. Maître de Conférences de Bactériologie – Praticien des Hôpitaux,
Faculté de Médecine – CHU Nantes.

M. BOUTOILLE D. Assistant - Chef de clinique, Médecine Interne B,
CHU Nantes.

Adresse de l'auteur : 25, boulevard des Iles, 56000 VANNES.