

Année 2006

Mémoire du Diplôme d'Études Spécialisées de Biologie Médicale
Soutenu devant le jury interrégional

Le 17 mars 2006

Par M^{lle} Anne CADY

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 23/01/2003 tient lieu de
Thèse pour le diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

Étude génétique de la résistance
aux carbapénèmes
chez *Pseudomonas aeruginosa*

Président : M. le Professeur Alain REYNAUD

Membres du jury : M. le Professeur Gilles POTEL
M^{me} le Docteur Nathalie CAROFF
M. le Docteur Didier LEPELLETIER

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	4
Liste des figures.....	4
Liste des tableaux.....	6
LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES.....	7
RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE.....	8
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.1. Taxonomie, classification.....	10
1.2. Habitat.....	10
1.3. Caractères bactériologiques.....	11
1.3.1. Caractères morphologiques.....	11
1.3.2. Caractères culturels.....	12
1.3.3. Caractères biochimiques.....	12
1.3.4. Caractères antigéniques.....	12
1.3.5. Physiopathologie - Substances produites.....	13
1.3.5.1. Colonisation – Adhérence.....	13
1.3.5.2. Invasion.....	15
1.3.5.3. Dissémination.....	18
1.4. Pouvoir pathogène.....	18
1.5. Résistance aux antibiotiques.....	19
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et carbapénèmes.....	20
2.1. Mécanisme d'action des carbapénèmes.....	20
2.2. Mécanismes de résistance aux carbapénèmes.....	21
2.2.1. Perte ou réduction d'expression de la porine OprD.....	22
2.2.2. Efflux.....	23
2.2.3. Carbapénémases.....	27
2.2.3.1. Métallo- β -lactamases.....	27
2.2.3.2. β -lactamases de classe A.....	29
2.2.4. Hyperproduction de la céphalosporinase AmpC.....	30
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	31
1. Souches bactériennes étudiées.....	32
2. Sensibilité aux antibiotiques.....	33
2.1. Antibiogramme.....	33
2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices.....	33
2.3. Détection de métallo- β -lactamase.....	34
2.3.1. Test à l'EDTA.....	34
2.3.2. Recherche, par PCR, du gène codant pour l'enzyme VIM-2.....	35
3. Typage des souches par électrophorèse en champ pulsé.....	35
3.1. Principe.....	35
3.2. Lyse et extraction de l'ADN.....	36
3.3. Digestion enzymatique.....	37
3.4. Technique électrophorétique.....	37

4. Amplification par PCR et séquençage du gène codant pour la porine OprD	38
4.1. Extraction des ADN	38
4.2. PCR du gène <i>oprD</i>	38
4.3. Séquençage	39
4.3.1. Principe	39
4.3.2. Réalisation pratique	39
4.4. Analyse bio-informatique des séquences	39
5. PCR après transcription inverse (RT-PCR)	40
5.1. Extraction des ARN	40
5.2. Dosage des ARN	41
5.3. Traitement des ARN à la DNase	41
5.4. Transcription inverse	41
5.5. PCR	41
5.5.1. PCR conventionnelle	41
5.5.2. PCR en temps réel	42
6. PCR et séquençage du gène <i>mexR</i>	43
7. PCR et séquençage du gène codant pour la protéine senseur CzcS	43
8. Evaluation <i>in vitro</i> de la fréquence de mutation d'une souche bactérienne	44
RÉSULTATS	46
1. Etude de 40 souches cliniques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de sensibilité diminuée à l'imipénème	47
1.1. Dépistage et caractéristiques des souches non productrices de carbapénémase	47
1.2. Séquençage du gène <i>oprD</i>	49
2. Etude de 6 couples de souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> présentant une différence de sensibilité à l'imipénème.	51
2.1. Sensibilité aux antibiotiques	51
2.2. Electrophorèse en champ pulsé	55
2.3. PCR et séquençage du gène <i>oprD</i>	56
2.4. PCR après transcription inverse (RT-PCR) des gènes <i>oprD</i> , <i>ampC</i> , <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	58
2.4.1. RT-PCR conventionnelle	58
2.4.2. RT-PCR en temps réel	60
2.5. Séquençage du gène <i>mexR</i> chez les souches hyperexprimant le système d'efflux MexAB-OprM	61
2.6. Evaluation de la fréquence de mutation <i>in vitro</i>	63
3. Etude de souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées à partir d'urines sur sondes à demeure	65
3.1. Dépistage de souches résistantes aux carbapénèmes sans production de carbapénémase	65
3.2. Sensibilité aux antibiotiques	66
3.3. Electrophorèse en champ pulsé	67
3.4. Séquençage du gène <i>czcS</i>	67
3.5. Séquençage du gène <i>oprD</i>	67
DISCUSSION	71
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	77

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénique du genre <i>Pseudomonas</i> , établi à partir des séquences d'ARNr 16S, en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (Anzai <i>et al.</i> , 2000)	11
Figure 2 : Chronologie de la formation d'un biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et facteurs de virulence impliqués à chaque étape.....	14
Figure 3 : Système de sécrétion de type III chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
Figure 4 : Schéma récapitulatif des différents systèmes impliqués dans le quorum sensing chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Figure 5 : AntibioGramme d'une souche sauvage de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Figure 6 : Mécanismes de la résistance aux carbapénèmes chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Figure 7: Structure schématique de la porine OprD de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
Figure 8 : AntibioGramme d'une souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ayant perdu la porine OprD.....	22
Figure 9 : AntibioGramme d'une souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> hyperexprimant le système d'efflux MexAB-OprM.	24
Figure 10 : Co-régulation du système d'efflux MexEF-OprN et de la porine OprD chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
Figure 11 : Co-régulation du système d'efflux CzcCBA et de la porine OprD chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
Figure 12 : Schéma de la protéine senseur CzcS.....	26
Figure 13 : Mécanisme de capture d'un gène cassette au sein d'un intégron.	28
Figure 14 : Détermination des concentrations minimales inhibitrices par dilution en milieu gélosé (10^4 bactéries/dépôt de 1 μ L).	33
Figure 15 : Tests à l'EDTA pour la recherche de métallo- β -lactamase	34
Figure 16 : Principe de l'électrophorèse en champ pulsé.....	36
Figure 17 : Position des amorces utilisées pour les PCR du gène <i>oprD</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
Figure 18 : Analyse des séquences du gène <i>oprD</i> avec le logiciel Sequence Navigator®	40

Figure 19 : Chronologie des isollements de souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , en cours d'hospitalisation et de traitement.	54
Figure 20 : Résultats d'électrophorèse en champ pulsé réalisée sur 10 souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
Figure 21 : Dendrogramme établi par le logiciel Gel Compar [®] , à partir des résultats de l'électrophorèse en champ pulsé des 12 souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> étudiées.	55
Figure 22 : Photographie du résultat de la PCR <i>oprD</i> FG, réalisée pour 3 couples de souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et mettant en évidence une délétion chez la souche CA501.	56
Figure 23 : Variation dans la boucle externe L7 observée chez 5 souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sensibles à l'imipénème par rapport à la souche de référence PAO1.	56
Figure 24 : Séquence partielle du gène <i>oprD</i> de la souche CA501, révélant une délétion de 262 pb.	58
Figure 25 : Photographies des résultats de la RT-PCR pour les gènes <i>oprD</i> , <i>mexA</i> , <i>ampC</i> et pour le gène de référence <i>rpsL</i>	59
Figure 26 : Exemples de courbes de fusion obtenues par RT-PCR en temps réel pour les amplicons <i>rpsL</i>	60
Figure 27 : Exemples de courbes de fusion obtenues par RT-PCR en temps réel pour les amplicons <i>oprD</i> PG.	60
Figure 28 : Exemples de courbes de fluorescence obtenues pour la RT-PCR <i>oprD</i> PG.	61
Figure 29 : Exemples de courbes de fluorescence obtenues pour la RT-PCR <i>rpsL</i>	61
Figure 30 : Fréquence de mutation pour la rifampicine de 2 souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et de la souche de référence PAO1.	63
Figure 31 : Fréquence de mutation pour l'imipénème de 2 souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et de la souche de référence PAO1.	63
Figure 32 : Schéma récapitulant la sélection des souches de <i>P. aeruginosa</i> pour l'année 2003...	65
Figure 33 : Schéma récapitulant la sélection des souches de <i>P. aeruginosa</i> pour l'année 2004...	66
Figure 34 : Dendrogramme établi avec le logiciel Gel Compar [®] à partir des pulsotypes des 16 souches étudiées.	67
Figure 35 : Schéma de la séquence d'insertion ISPa1328.	68

Liste des tableaux

Tableau I : Amorces et conditions utilisées pour la recherche du gène <i>VIM2</i> , par PCR, chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Tableau II : Amorces, programmes et tailles des amplicons obtenus lors de l'amplification du gène <i>oprD</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
Tableau III : Amorces et conditions de PCR après transcription inverse pour 4 gènes d'intérêt et un gène témoin, chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
Tableau IV : Amorces et conditions utilisées pour la PCR du gène <i>mexR</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
Tableau V : Amorces et conditions utilisées pour la PCR du gène <i>czcS</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Tableau VI : Résultats de l'antibiogramme et concentrations minimales inhibitrices (CMI - µg/mL) des 13 souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> étudiées.....	48
Tableau VII : Séquençage du gène <i>oprD</i> des 13 souches cliniques de <i>P. aeruginosa</i> de sensibilité diminuée à l'imipénème.....	49
Tableau VIII : Résultats de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé réalisé sur 6 couples de souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées de la flore digestive de patients hospitalisés.....	52
Tableau IX : Concentrations minimales inhibitrices (en µg/mL) pour 6 couples de souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées de la flore digestive de patients hospitalisés.....	53
Tableau X : Résultats du séquençage du gène <i>oprD</i> pour les 6 couples de souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> étudiés.....	57
Tableau XI : Récapitulatif des résultats de CMI, de séquençage des gènes <i>oprD</i> et <i>mexR</i> et de RT-PCR des gènes <i>oprD</i> , <i>mexA</i> et <i>ampC</i> pour les 6 couples de souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> étudiés.....	62
Tableau XII : CMI obtenues pour les 16 souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées à partir d'urines sur sondes à demeure.....	66
Tableau XIII : Résultats du séquençage du gène <i>oprD</i> pour les 16 souches de <i>P. aeruginosa</i> isolées d'urines sur sonde à demeure.....	69
Tableau XIV: Récapitulatif des modifications d' <i>oprD</i> et des données épidémiologiques pour 16 souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolées d'urines sur sonde à demeure.....	70

Liste des abréviations utilisées

ADN : acide désoxyribonucléique
AMX : amoxicilline
AMC : amoxicilline + acide clavulanique
AN : amikacine
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomal
ATM : aztréonam
CAZ : ceftazidime
cDNA : ADN complémentaire
CF : céfalotine
CHU : centre hospitalier universitaire
CIP : ciprofloxacine
CMI : concentration minimale inhibitrice
CS : colistine
CTX : céfotaxime
CXM : céfuroxime
ECP : électrophorèse en champ pulsé
EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique
FEP : céfépime
FOS : fosfomycine
FOX : céfoxitine
GM : gentamicine
HSL : homosérine-lactone
IPM : imipénème
kb : kilobase
LPS : lipopolysaccharide
MEC : mécilinam
min : minute
mL : millilitre
mM : millimolaire
MOX : moxalactam
MP : méropénème
pb : paire de bases
PCR : polymerase chain reaction
PHRC : projet hospitalier de recherche clinique
PIP : pipéracilline
PQS : *Pseudomonas* quinolone signal
RND : resistance nodulation and division
RT-PCR : PCR après transcription inverse
s : seconde
S : unité Svedberg
TM : tobramycine
tr : tour
TZP : pipéracilline + tazobactam
UV : ultra-violet
V : Volt

Rappel bibliographique



Pseudomonas aeruginosa est une des principales causes d'infections nosocomiales, particulièrement chez les patients immunodéprimés et des services de soins intensifs. Ce pathogène opportuniste, caractérisé par une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques, peut développer des résistances sous antibiothérapie. Pour ces raisons, les infections causées par cette bactérie, sont difficiles à traiter. Parmi les β -lactamines, les carbapénèmes présentent un spectre d'activité large et une très bonne stabilité aux β -lactamases. Ils occupent donc une place capitale dans la prise en charge de ces infections. Cependant, depuis quelques années, une résistance croissante à ces molécules est observée. En France, une étude récente révèle que 17% des souches isolées en pathologie humaine sont résistantes à l'imipénème (Roussel-Delvallez, 2004).

Cette émergence de résistance est particulièrement préoccupante et une meilleure compréhension des mécanismes en cause est nécessaire pour enrayer ce phénomène.

Deux grandes stratégies sont utilisées par *P. aeruginosa* pour résister aux carbapénèmes :

- l'acquisition de gènes codant pour des métallo- β -lactamases capables d'hydrolyser les carbapénèmes ;
- le développement de mutants résistants présentant une expression réduite de la porine OprD, porte d'entrée dans la bactérie de ces antibiotiques, ou bien l'hyperexpression de systèmes d'efflux.

Pour ce dernier point, le rôle de la pression de sélection antibiotique est particulièrement important.

P. aeruginosa est une bactérie reconnue pour ses capacités à former des biofilms et à coloniser les surfaces synthétiques (sondes, cathéters...) aussi bien que les épithéliums. C'est dans ces situations, pas nécessairement pathologiques, que peuvent être sélectionnés, en présence d'antibiotique, des mutants résistants. Ces souches de colonisation pouvant être secondairement à l'origine d'infections, parfois sévères : infections urinaires, pneumopathies acquises sous ventilation mécanique, septicémie secondaire à une translocation digestive...

Nous avons donc exploré les différents mécanismes de résistance aux carbapénèmes développés *in vivo* par *P. aeruginosa*, la connaissance de l'écologie locale hospitalière étant un préalable indispensable à une prise en charge optimale des infections causées par cette bactérie.

1. *Pseudomonas aeruginosa*

1.1. Taxonomie, classification

Décrit par Schroeter, en 1872, puis par Gessard, en 1882, *Pseudomonas aeruginosa* (du latin *aerugo* : vert de gris), encore appelé bacille pyocyanique (du grec *puon* : pus et du latin *cyaneus* : bleu foncé) appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*.

Dans les années 1960, une première classification de cette famille a été proposée sur la base de critères phénotypiques (Stanier *et al.*, 1966). Puis, dans les années 1970-80, à partir des résultats d'hybridation ARNr-ADN, cette famille a été subdivisée en 5 grands groupes (Palleroni *et al.*, 1973) dont le groupe I comprend le genre *Pseudomonas sensu stricto* qui compte à ce jour plus de 140 espèces. L'analyse phylogénique des séquences de l'ARN ribosomal 16S a ensuite permis la division de ce genre en 7 sous-groupes (Anzai *et al.*, 2000) (figure 1, page suivante).

P. aeruginosa représente 80% des *Pseudomonas* isolés en Bactériologie médicale. C'est un bacille à Gram négatif à ciliature monotriche, aérobic strict, de métabolisme oxydatif et caractérisé par la production d'un pigment phénazinique : la pyocyanine. Son génome de 6,3 millions de bases (le plus grand des génomes bactériens séquencés à ce jour) présente un pourcentage en GC élevé (66,6%) (Stover *et al.*, 2000).

1.2. Habitat

P. aeruginosa est une bactérie cosmopolite et ubiquitaire possédant une grande versatilité métabolique et une formidable capacité d'adaptation à son environnement (Spiers *et al.*, 2000), en liaison avec un nombre impressionnant de gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels et des systèmes à 2 composants (Stover *et al.*, 2000). Parmi les bactéries dont le génome a été entièrement séquencé, *P. aeruginosa* est celle qui possède la plus grande proportion de gènes de régulation (8,4%). Il est présent dans des environnements aussi variés que l'eau, le sol et les végétaux. A l'hôpital, cette bactérie opportuniste est présente dans l'environnement humide des malades (siphons, nébuliseurs, éviers, vases...).

Chez l'Homme, elle peut être retrouvée à l'état commensal, au niveau des tractus digestif et respiratoire. La fréquence du portage chez le sujet sain varie et augmente en cas d'hospitalisation. Ainsi, le portage oro-pharyngé de *P. aeruginosa*, rapporté dans une étude récente, passait de 6% à l'admission, à 13,2% après 3 mois dans un service de soins intensifs (Filius *et al.*, 2005). Au CHU de Nantes, une étude prospective, conduite entre 2000 et 2002, incluant 933 patients, a retrouvé une colonisation gastro-intestinale par *P. aeruginosa* chez 21% des patients. Il est intéressant de noter que ce taux était seulement de 4,7% à l'admission dans les

services et que la durée moyenne entre l'admission et la colonisation était de 9,6 jours (Lepelletier, article soumis).

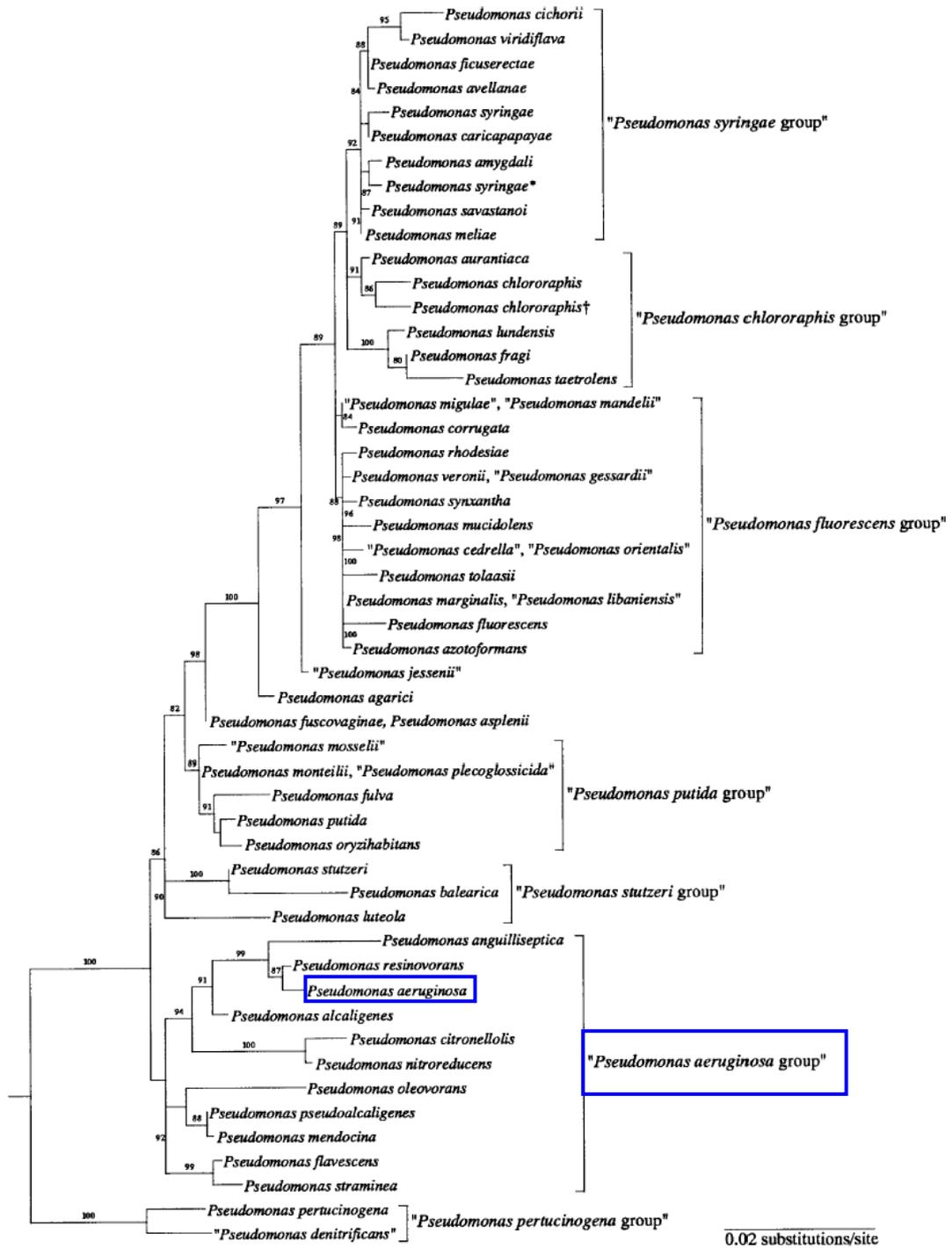


Figure 1 : Arbre phylogénique du genre *Pseudomonas*, établi à partir des séquences d'ARNr 16S, en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (Anzai *et al.*, 2000)

1.3. Caractères bactériologiques

1.3.1. Caractères morphologiques

C'est un bacille fin et droit, à Gram négatif, de 0,5 à 0,8 µm par 1,5 à 3 µm, asporulé et sans inclusion de polyhydroxybutyrate. Il présente une mobilité grâce à un flagelle polaire unique.

1.3.2. Caractères cultureux

Sa culture est facile sur milieu ordinaire ou sur milieu sélectif (gélose au cétrimide), avec un optimum thermique entre 30 et 37°C, mais cette bactérie est capable de croître de 15 à 42°C.

Outre la production de différents pigments (qui seront détaillés ultérieurement), les cultures de *P. aeruginosa* sont caractérisées par 2 propriétés :

- la production d'un voile à la surface des milieux liquides, dont la nature est controversée : polyoside muqueux ou ADN libéré lors de la lyse bactérienne ;
- une odeur caractéristique aromatique de seringa, due à la production d'ortho-amino-acétophénone, un intermédiaire dans le métabolisme du tryptophane.

Fréquemment, une dissociation spontanée des colonies sur milieu gélosé est observée. Trois grands types de colonies peuvent être rencontrés :

- de grandes colonies rugueuses avec un centre plus bombé et un bord irrégulier et des reflets irisés. On parle de colonies *la* (pour *large*) ou *FE* (pour *fried egg*). La plupart des souches isolées de prélèvements cliniques sont de ce type.

- de petites colonies lisses, mates avec un bord régulier, qui sont appelées *sm* (*small*). Il s'agit le plus souvent de souches environnementales.

- enfin, des colonies bombées, muqueuses, filantes parfois coulantes, désignées sous le terme de colonies *M* (*mucoïd*). Ce dernier aspect s'observe surtout dans les sécrétions bronchiques des patients atteints de mucoviscidose.

1.3.3. Caractères biochimiques

P. aeruginosa ne fermente pas les sucres, mais peut les utiliser par voie oxydative. Il présente des réactions de l'oxydase et de la catalase positive.

Il possède une nitrate-réductase, une gélatinase, une arginine-déshydrogénase (ADH) mais ni lysine-décarboxylase (LDC), ni ornithine-décarboxylase (ODC). Enfin, il ne produit pas d'indole.

Ces tests sont présents dans les systèmes d'identification parfois utilisés pour le diagnostic de cette bactérie (api 20NE, cartes IDGN Vitek bioMérieux...).

1.3.4. Caractères antigéniques

Il existe, chez *P. aeruginosa*, un antigène somatique O thermostable, responsable d'une antigénicité de type. La spécificité de cet antigène O est supportée par plusieurs polysaccharides correspondant aux chaînes latérales du lipopolysaccharide (LPS), dont la longueur et la composition varient. Le sérotypage des souches, grâce à des antisérums dirigés contre cet antigène, permet de distinguer 17 sérotypes différents selon la classification de l'IATS

(*International Antigenic Typing System*). Habituellement, 90 à 95% des souches peuvent être typées avec ce système. Les sérotypes les plus fréquemment observés en France sont les groupes 6 et 11.

Les souches M, en particulier celles qui proviennent de patients atteints de mucoviscidose, peuvent être difficiles à typer du fait d'un déficit plus ou moins prononcé en chaînes latérales du LPS de ces souches.

Il existe aussi un antigène flagellaire H, thermolabile, permettant un typage qui, en combinaison avec le typage O, permet de reconnaître au moins 25 sérovars.

1.3.5. Physiopathologie - Substances produites

P. aeruginosa est une bactérie opportuniste, peu virulente pour une personne en bonne santé, mais capable d'entraîner des infections sévères chez les sujets aux défenses altérées ou après inoculation agressive. Il dispose de tout un arsenal de facteurs de virulence qui vont favoriser les différentes étapes de la genèse de l'infection.

1.3.5.1. Colonisation – Adhérence

Le plus souvent, l'infection est secondaire à une phase de colonisation. Pour y parvenir, la bactérie, très mobile grâce à son flagelle, va profiter d'une diminution des défenses de l'hôte :

- modification de la barrière cutané-muqueuse (brûlure, traumatisme, chirurgie, diminution de la clairance muco-ciliaire chez les patients atteints de mucoviscidose, modification de la flore résidente consécutive à l'utilisation d'antibiotiques à large spectre...);
- immunodépression (neutropénie, chimiothérapie, infection à VIH...).

Les pili de type IV, ainsi que d'autres adhésines jouent un rôle clé dans l'adhérence aux épithéliums et dans la fixation aux mucines, notamment.

De plus, *P. aeruginosa* possède la propriété de former **des biofilms**, aussi bien sur des surfaces inertes (sondes urinaires ou d'intubation...) qu'au niveau des épithéliums. Ce mode de vie offre aux bactéries de nombreux avantages : l'architecture de la matrice polysaccharidique des biofilms limite, en effet, la diffusion des antibiotiques et augmente donc la résistance à ces derniers ; de la même façon, elle procure une protection efficace contre les défenses immunitaires de l'hôte, en particulier contre la phagocytose et l'action du complément.

L'étape initiale d'adhérence est caractérisée par le passage des bactéries de l'état libre (encore appelé planctonique) à l'état fixé, et le développement de microcolonies sur la

surface colonisée. La production de toxines, de protéases et de pyocyanine entraîne des lésions tissulaires. Avec le temps, il y a maturation du biofilm, caractérisée par la sécrétion d'un exopolysaccharide et la formation de structures tridimensionnelles comprenant des macrocolonies séparées par des canaux liquidiens et recouvertes d'une matrice composée de polysaccharides, d'ADN et de protéines. Pour les souches mucoïdes, cet exopolysaccharide est l'alginate, un polymère d'acide mannuronique et d'acide guluronique. La synthèse de l'alginate est sous la dépendance de nombreuses enzymes, elles-mêmes soumises à une régulation fine (Ramsey and Wozniak, 2005), impliquant en particulier le facteur sigma AlgT et les protéines Muc A et B. Progressivement, les bactéries perdent leur flagelle et leurs pili de type IV, les cellules de l'inflammation sont recrutées sur le site de l'infection et génèrent des radicaux oxygénés. Ce stress oxydatif entraîne des mutations dans le gène *mucA* et la dérégulation de *algT* aboutissant à la conversion en un phénotype mucoïde stable (figure 2).

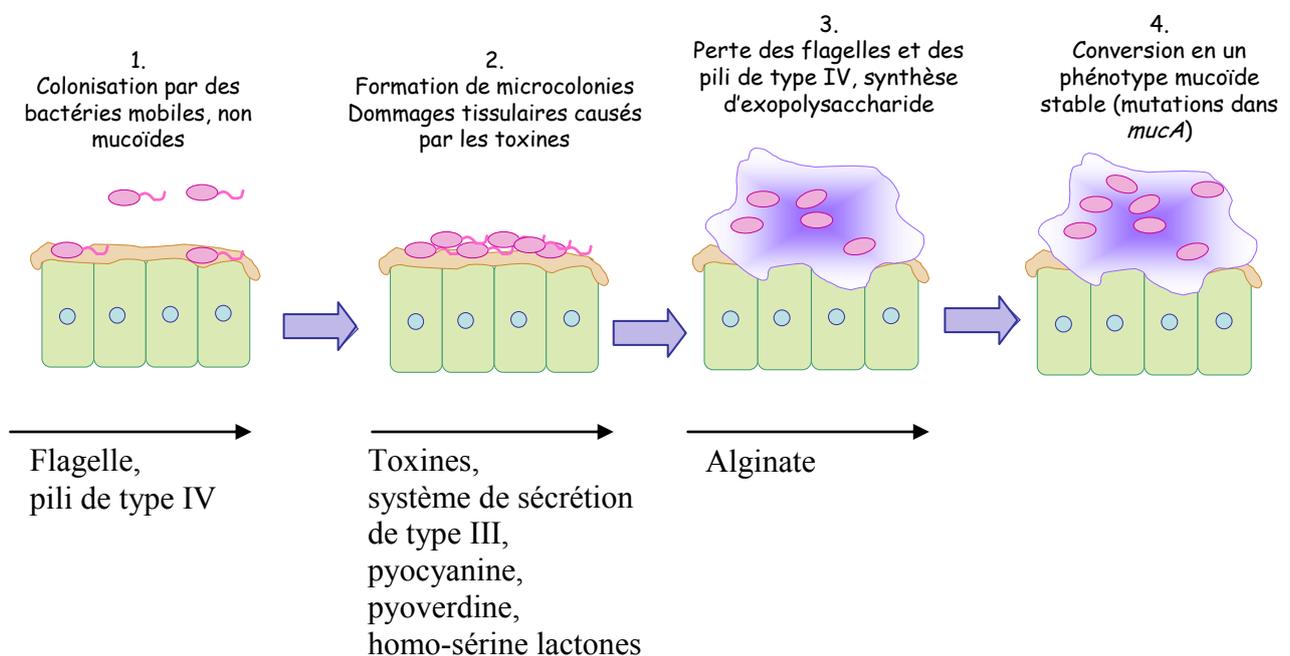


Figure 2 : Chronologie de la formation d'un biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et facteurs de virulence impliqués à chaque étape.

La formation de ces biofilms est complexe et chaque phase est étroitement régulée. L'étape initiale d'adhérence bactérienne fait ainsi intervenir les pili de type IV sous le contrôle du régulateur GacA (Parkins *et al.*, 2001). La transition de la forme planctonique à une forme fixée est sous le contrôle de signaux environnementaux, tels que la disponibilité en oxygène, en fer et en nutriments. Ainsi, Crc, une protéine intervenant dans la répression du catabolisme des glucides, joue un rôle à ce niveau (O'Toole *et al.*, 2000).

Le quorum sensing contrôle la production de la matrice extracellulaire *via* les systèmes Las et Rhl (Shih and Huang, 2002). Récemment, le système de régulation à 3 composants SadARS a aussi été identifié comme un acteur important dans la maturation des biofilms, de

même que la protéine AlgR (Kuchma *et al.*, 2005; Stapper *et al.*, 2004). L'alginate a longtemps été considéré comme le principal composant de la matrice extracellulaire des biofilms mais, depuis peu, il a été démontré que, s'il joue effectivement un rôle clé pour les souches mucoïdes, il n'en va pas de même pour les souches non mucoïdes. Pour ces dernières, la formation de biofilm est indépendante de l'alginate et fait probablement intervenir les acides nucléiques et les sucres du LPS (Wozniak *et al.*, 2003).

1.3.5.2. Invasion

P. aeruginosa produit plusieurs substances qui, après la colonisation, vont entraîner des dommages tissulaires et favoriser ainsi sa dissémination.

Il dispose d'un **système de sécrétion de type III** qui, agissant comme une seringue, va délivrer un certain nombre de toxines directement dans le cytoplasme de la cellule-hôte ; c'est le cas des exoenzymes S, U et T (figure 3). Grâce à leurs propriétés ADP-ribosylantes, les exoenzymes T et S vont respectivement perturber le cytosquelette cellulaire, en inactivant des protéines impliquées dans le maintien du réseau d'actine, et exercer leur activité de lipase.

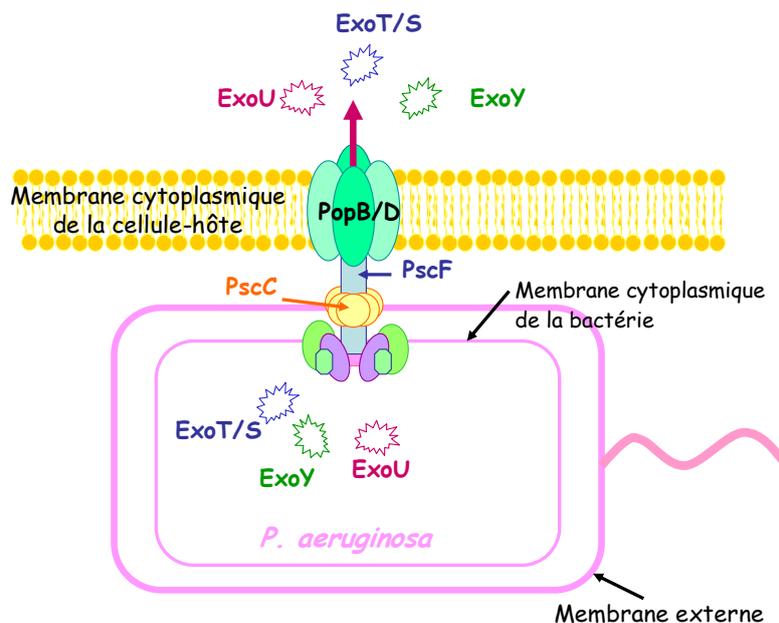


Figure 3 : Système de sécrétion de type III chez *Pseudomonas aeruginosa*.

(PopB et PopD sont impliqués dans la formation des pores de translocation. La protéine PscF polymérise et forme le lien entre les membranes de la bactérie et de la cellule-hôte.

Une vingtaine de protéines sont impliquées dans l'assemblage et la régulation de ce système).

P. aeruginosa produit plusieurs protéases. Les principales sont l'**élastase LasB**, la **protéase LasA** et la **protéase alcaline**. Ces enzymes, en dégradant le collagène et les protéines non collagéniques, vont rompre l'intégrité de la membrane basale. Elles vont aussi perturber les

défenses immunitaires en inhibant, en particulier, le chimiotactisme des monocytes et en inactivant certaines immunoglobulines et composants du complément.

L'exotoxine A est aussi reconnue comme un des principaux facteurs de virulence du bacille pyocyanique, en inactivant le facteur d'élongation 2, conduisant alors à un arrêt des synthèses protéiques et à la mort cellulaire.

Les 2 hémolysines (phospholipase C et rhamnolipide) exercent leur activité cytotoxique et hémolytique de façon synergique, en détruisant lipides et lécithines. La phospholipase C dégrade le surfactant pulmonaire.

Les pigments que peut produire *P. aeruginosa* participent aussi activement à sa virulence :

- **la pyoverdine**, un pigment vert fluorescent et hydrosoluble et la pyochéline, un dérivé de la thiazoline, sont des sidérophores permettant aux bactéries de capter les ions ferriques présents dans le milieu et indispensables à leur croissance. Chez la souris, les souches déficientes en ces facteurs apparaissent moins virulentes (Takase *et al.*, 2000).

- **la pyocyanine**, un pigment bleu phénazinique, spécifique de *P. aeruginosa*, est capable d'inhiber la respiration cellulaire, de perturber les fonctions ciliaires et les systèmes de détoxification cellulaires (catalase, voie du glutathion), grâce à son pouvoir oxydoréducteur (O'Malley *et al.*, 2003; O'Malley *et al.*, 2004). Elle est aussi capable d'induire l'apoptose des polynucléaires neutrophiles, favorisant ainsi l'installation d'une infection chronique (Usher *et al.*, 2002)

Environ 5% des souches sont apigmentées.

Plusieurs systèmes de régulation contrôlent l'expression des différents facteurs de virulence.

Les **systèmes à 2 composants**, constitués d'une protéine senseur membranaire et d'une protéine régulatrice, interviennent notamment dans la synthèse de l'alginate, des pili et des phospholipases.

Le **quorum sensing** joue aussi un rôle très important dans cette régulation. En découvrant le quorum sensing, les Microbiologistes se sont rendu compte que les bactéries étaient capables de percevoir les autres bactéries, de communiquer entre elles, d'intégrer ces signaux et de produire une réponse adaptée, en ajustant leur densité cellulaire et la production de facteurs de virulence. Ce système de communication permet aux bactéries de se comporter comme une population et non plus comme des bactéries individualisées et de produire ainsi une réaction coordonnée et unifiée, leur permettant d'accomplir des tâches impossibles à réaliser à l'échelle individuelle.

Le quorum sensing comprend 2 systèmes étroitement liés.

Le premier décrit chez *P. aeruginosa* est le système Las (nommé ainsi car il régle notamment l'expression de l'élastase LasB).

Il est composé :

- du gène *lasI* qui code pour la protéine synthétisant l'autoinducteur, le 3-oxo-C12-HSL (pour N-[3-oxododécanoyl]-L-homosérine lactone) qui traverse la membrane cellulaire ;
- du gène *lasR* qui code pour l'activateur transcriptionnel.

Avec l'augmentation de la densité cellulaire, la concentration de l'autoinducteur augmente jusqu'à atteindre un seuil et permettre son interaction avec l'activateur transcriptionnel. Le complexe autoinducteur-activateur transcriptionnel peut alors activer les gènes de l'élastase LasB, mais aussi d'autres facteurs extracellulaires comme l'exotoxine A et la protéase LasA.

Un second système a été mis en évidence. Il est appelé Rhl car il contrôle la production du rhamnolipide. Il comporte lui aussi un régulateur transcriptionnel (RhlR) et une protéine qui synthétise l'homosérine lactone (RhlI). Ce système est nécessaire pour une production optimale de nombreux facteurs de virulence tels que la pyocyanine, les élastases LasA et LasB et la protéase alcaline.

Une troisième molécule, le PQS (pour *Pseudomonas* quinolone signal) ajoute un niveau de complexité supplémentaire à ce réseau du quorum sensing. En effet, les systèmes Las et Rhl contrôlent la synthèse de cette molécule, mais PQS contrôle également l'expression de RhlI et RhlR (figure 4).

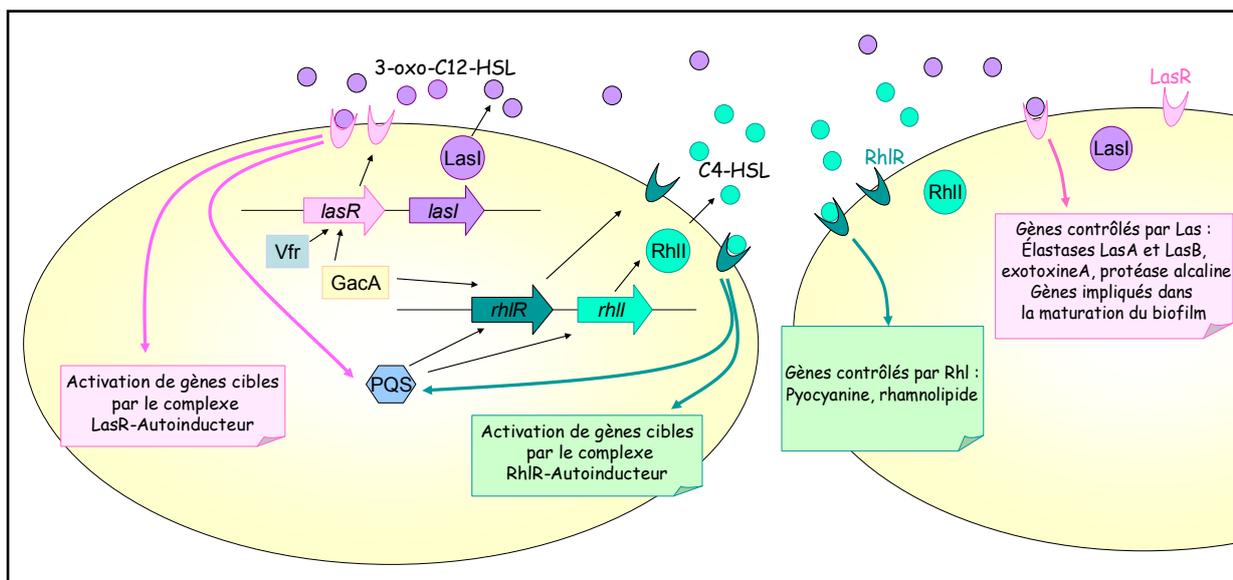


Figure 4 : Schéma récapitulant les différents systèmes impliqués dans le quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Enfin, cette cascade du quorum sensing est sous la dépendance de nombreux facteurs de régulation. Grâce à ces nombreux niveaux de régulation et aux boucles de rétrocontrôle existant dans le réseau du quorum sensing, *P. aeruginosa* peut contrôler de manière très fine son arsenal de facteurs de virulence, ainsi que de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme.

1.3.5.3. Dissémination

La bactérie peut ensuite envahir d'autres sites, après passage dans la circulation sanguine, notamment. Lors de la phase de dissémination, l'exotoxine A et le LPS peuvent être responsables d'un état de choc.

1.4. Pouvoir pathogène

P. aeruginosa ne présente pas de tropisme spécifique pour un organe. Il peut ainsi être la cause d'infections pulmonaires, urinaires, de suppurations, mais aussi de septicémies. Cette bactérie représente un des principaux agents d'infections nosocomiales. D'après le réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN), *P. aeruginosa* était le premier agent en cause dans les infections acquises dans les services de réanimation médicale, en 2004 (RAISIN, 2005). Il est isolé dans 22,3% des infections pulmonaires, ce qui fait également de lui l'agent étiologique le plus fréquemment rencontré dans les pneumopathies nosocomiales des services de soins intensifs. A Nantes, une enquête de surveillance continue, réalisée dans le service de réanimation chirurgicale de l'Hôpital Laennec, entre 2000 et 2004, l'a retrouvé comme 2^{ème} agent d'infections nosocomiales (derrière les entérobactéries) (Lepelletier *et al.*, 2005).

P. aeruginosa est aussi, après *Escherichia coli*, la deuxième cause d'infections urinaires dans les services de réanimation, en particulier chez les patients porteurs de sonde urinaire. En effet, il peut former des biofilms sur les cathéters urinaires. Le biofilm favorise à son tour l'adhérence des microorganismes aux corps étrangers, et constitue un sanctuaire les protégeant des mécanismes de défense de l'hôte et des agents antimicrobiens. Le biofilm peut se développer à la fois en intraluminal et en extraluminal de la sonde. L'acquisition, par voie extraluminaire (ou périurétrale), résulte d'une contamination par des bactéries de la flore digestive qui colonisent le méat puis migrent progressivement vers l'urètre et la vessie.

Les infections pulmonaires à *P. aeruginosa* sont aussi une cause importante de morbidité et de mortalité dans la mucoviscidose. De plus, chez les patients atteints de mucoviscidose, on a récemment mis en évidence des souches dites hypermutatrices, ayant la faculté de muter plus fréquemment, ce qui accroît leur capacité d'adaptation et de résistance (Oliver *et al.*, 2000). Cette propriété résulte le plus souvent d'une mutation dans un des gènes du système de réparation des mésappariements de l'ADN : *mutS*, *mutL* ou *uvrD* (Oliver *et al.*, 2002).

1.5. Résistance aux antibiotiques

La prise en charge des infections à *P. aeruginosa* pose de sérieux problèmes thérapeutiques. Cette bactérie présente notamment une résistance naturelle aux aminopénicillines (non récupérée par les inhibiteurs de pénicillinase) et aux céphalosporines de première et deuxième générations (figure 5). Celle-ci résulte de l'action synergique de plusieurs mécanismes : la production d'une céphalosporinase codée par un gène chromosomique, inductible, dénommée AmpC est associée à une faible perméabilité membranaire, renforcée par l'expression constitutive du système d'efflux MexAB-OprM (Li *et al.*, 1995).

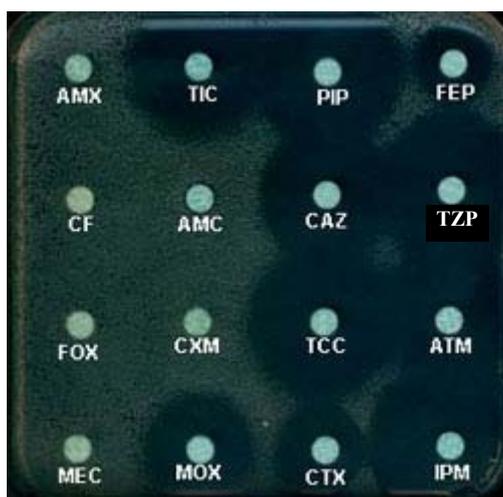


Figure 5 : Antibiogramme d'une souche sauvage de *Pseudomonas aeruginosa*

(AMX : amoxicilline, TIC : ticarcilline, PIP : pipéracilline, FEP : céfépime, CF : céfalotine, AMC : amoxicilline + acide clavulanique, CAZ : ceftazidime, TZP : pipéracilline + tazobactam, FOX : céfoxitine, CXM : céfuroxime, TCC : ticarcilline + acide clavulanique, ATM : aztréonam, MEC : mécilinam, MOX : moxalactam, CTX : céfotaxime, IPM : imipénème)

A cette résistance intrinsèque vis-à-vis de nombreux antibiotiques et antiseptiques, s'ajoute le développement rapide de résistance en cours de traitement. Plusieurs études ont clairement établi le rôle de l'administration d'un antibiotique dans le risque de survenue d'une résistance à ce même antibiotique (Harris *et al.*, 2002; Zavascki *et al.*, 2005) ; ceci est particulièrement vrai pour l'imipénème.

2. *Pseudomonas aeruginosa* et carbapénèmes

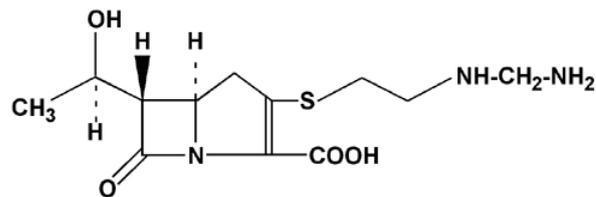
2.1. Mécanisme d'action des carbapénèmes

Parmi les β -lactamines, les carbapénèmes sont des molécules essentielles dans la prise en charge thérapeutique des infections à *P. aeruginosa*.

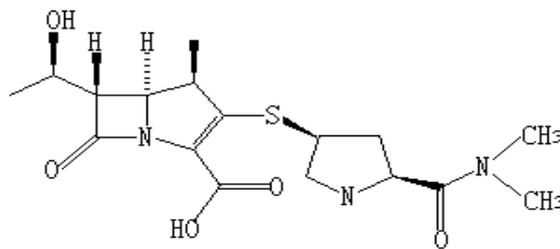
Ils dérivent de la thiénamycine. Leur cycle diffère de celui des pénicillines par la présence d'une double liaison et l'absence de soufre endocyclique.

Trois molécules sont commercialisées en France :

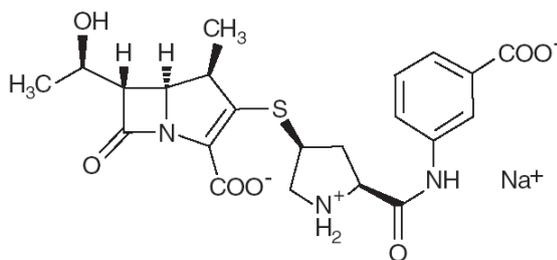
- l'imipénème sous le nom de Tienam[®] (MSD)



- le méropénème sous le nom de Meronem[®] (AstraZeneca)



- l'ertapénème sous le nom d'Invanz[®] (MSD)



Les carbapénèmes sont des antibiotiques dont le spectre d'activité est large incluant les cocci à Gram positif (sauf les Staphylocoques résistants à la méticilline et *Enterococcus faecium*), les cocci à Gram négatif, les bacilles à Gram positif et négatif à l'exception de *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia cepacia*). Ils sont également actifs sur les bactéries anaérobies. L'ertapénème présente un spectre plus étroit avec, en particulier, une activité moindre sur *P. aeruginosa* et *Acinetobacter sp.*

Ils exercent leur activité bactéricide, en inhibant la synthèse du peptidoglycane pariétal, après fixation sur les protéines liant les pénicillines (PLP). Pour cela, ils doivent pénétrer dans la

bactérie *via* une protéine de membrane externe spécifique : la porine OprD. Cette protéine représente l'unique porte d'entrée dans la cellule pour l'imipénème, alors que le méropénème peut emprunter d'autres voies, encore mal élucidées à ce jour, mais semblant impliquer les protéines OprE et OprF (Perez *et al.*, 1996).

Ces molécules sont stables en présence de la plupart des sérine- β -lactamases (pénicillines, céphalosporines) produites par les bactéries à Gram négatif et positif.

Un nouveau carbapénème, le doripénème est actuellement en cours de développement clinique aux Etats-Unis et au Japon. Les premières études mettent en évidence une activité supérieure à celle de l'imipénème, en particulier, sur les bactéries à Gram positif et sur *Pseudomonas aeruginosa* (Fritsche *et al.*, 2005).

2.2. Mécanismes de résistance aux carbapénèmes

En France, l'acquisition de résistance à ces molécules concerne 17% des souches isolées en pathologie humaine (Roussel-Delvallez, 2004). Le principal mécanisme en cause est l'absence ou la réduction d'expression de la porine OprD. Bien que moins fréquente, l'acquisition de métallo-enzymes aux propriétés de carbapénémases a été décrite, mais elle peut prendre des proportions importantes dans des situations épidémiques (Cornaglia *et al.*, 2000; Toleman *et al.*, 2005). L'efflux intervient aussi, à différents niveaux, notamment *via* les systèmes MexAB-OprM et MexEF-OprN (figure 6). Enfin, la céphalosporinase AmpC, lorsqu'elle est hyperproduite, peut venir potentialiser l'action des autres mécanismes.

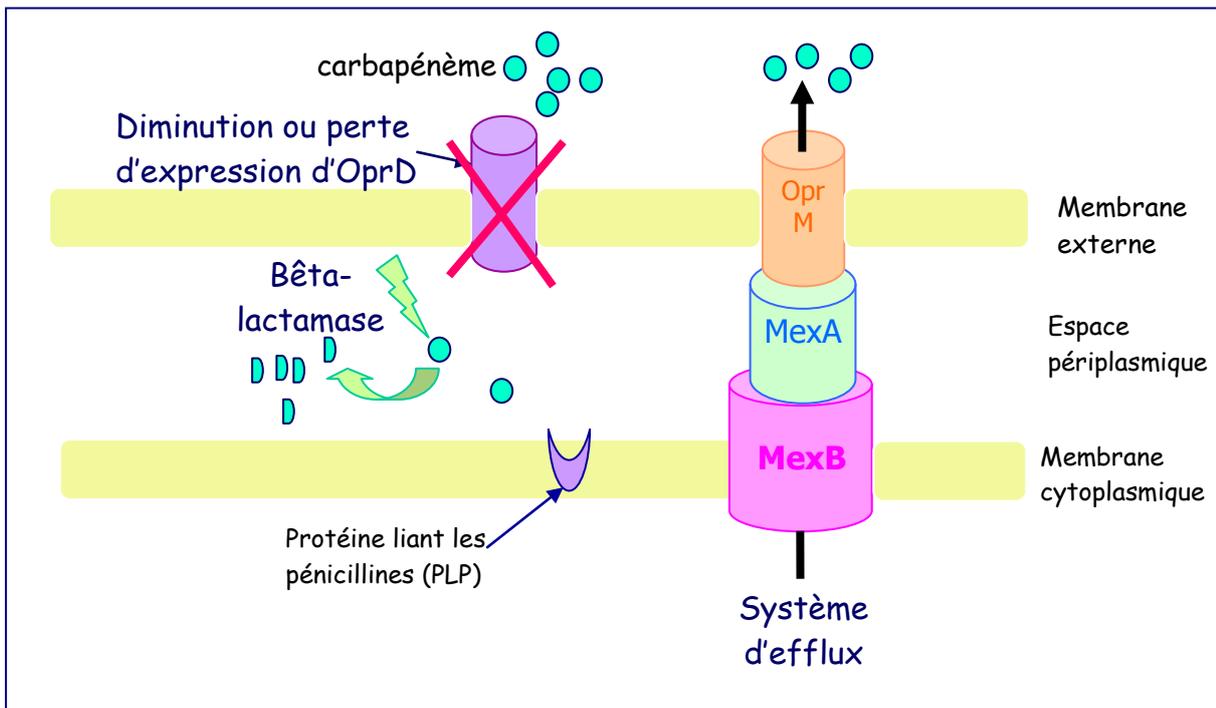


Figure 6 : Mécanismes de la résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1. Perte ou réduction d'expression de la porine OprD

La porine OprD est une protéine de 420 acides aminés, composée de 16 domaines transmembranaires reliés par 8 grandes boucles externes et 7 boucles internes (figure 7).

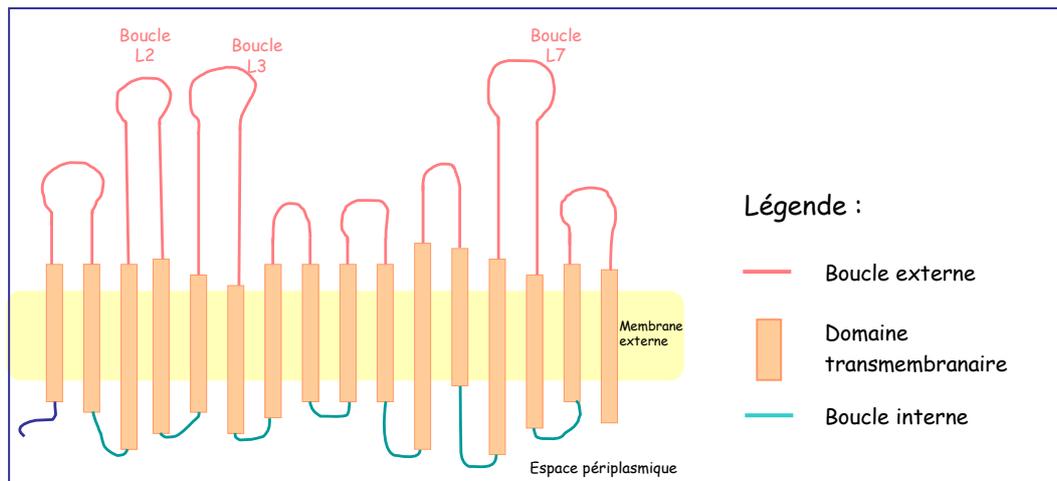


Figure 7: Structure schématique de la porine OprD de *Pseudomonas aeruginosa*.

Elle permet l'entrée dans la bactérie d'acides aminés basiques, de petits peptides et des carbapénèmes. Les boucles externes L2 et L3 sont responsables de la fixation de l'imipénème (Ochs *et al.*, 2000) et des acides aminés basiques ; elles sont donc essentielles pour la pénétration cellulaire de ces substances. La porine est synthétisée sous forme d'un précurseur qui comprend un peptide signal, permettant son positionnement dans la membrane externe.

La perte ou la réduction d'expression de cette porine OprD s'accompagne d'une résistance sélective à l'imipénème et, dans une moindre mesure, au méropénème (figure 8).

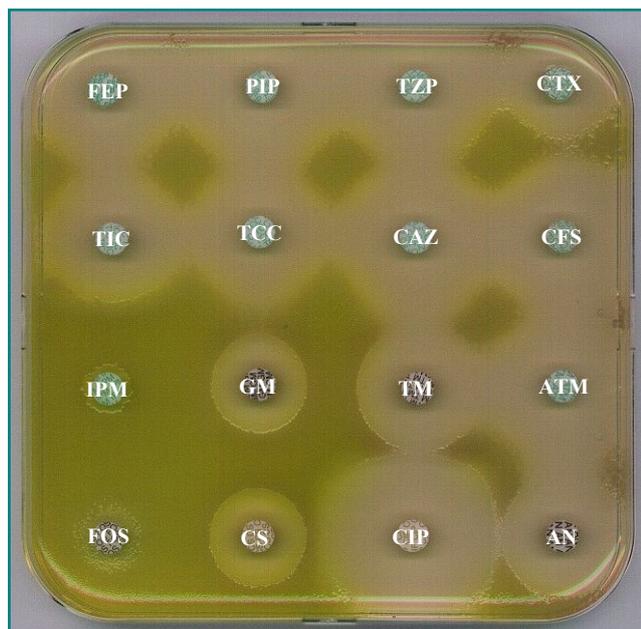


Figure 8 : Antibiogramme d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* ayant perdu la porine OprD.

(les abréviations utilisées pour les antibiotiques sont détaillées à la page 6)

Les évènements génétiques à l'origine de cette résistance sont variés : délétions, insertions ou substitutions de nucléotides, conduisant à une protéine modifiée ou tronquée (Amin *et al.*, 2005; Pirnay *et al.*, 2002) ou encore présence d'une séquence d'insertion dans le gène *oprD* (Wolter *et al.*, 2004).

De plus, le gène *oprD* est soumis à une régulation complexe, sous la dépendance de nombreux facteurs. Ainsi, il existe une co-régulation de certains systèmes d'efflux et de la porine OprD, qui sera détaillée ultérieurement dans le chapitre concernant l'efflux.

2.2.2. Efflux

Les systèmes d'efflux sont des structures tripartites, composées d'un transporteur enchâssé dans la membrane cytoplasmique, d'une protéine de membrane externe et d'une protéine périplasmique, appelée « protéine de fusion membranaire », qui met en communication les deux éléments précédents. Au sein de cette structure, c'est le transporteur, le plus souvent un antiporteur de la famille RND (résistance-nodulation-division), qui éjecte la molécule de substrat, du cytoplasme ou de l'espace périplasmique vers le milieu extérieur, en utilisant la force protomotrice.

Le rôle de ces systèmes est multiple. Ils préviennent l'accumulation intracellulaire de substances toxiques, comme les métaux lourds ou les solvants organiques, mais participent aussi à la virulence (Linares *et al.*, 2005) et à l'homéostasie cellulaire. Ainsi, certaines homosérines-lactones, médiatrices du quorum sensing, sont excrétées dans le milieu extérieur *via* MexAB-OprM.

Le séquençage complet du génome de la souche sauvage PAO1 de *P. aeruginosa* a révélé l'existence de 12 systèmes d'efflux RND potentiels (Stover *et al.*, 2000). Parmi eux, 6 ont été expérimentalement confirmés, mais seul MexAB-OprM s'exprime constitutivement, les autres étant soumis à une régulation plus ou moins complexe.

Plusieurs structures d'efflux interviennent dans la résistance aux carbapénèmes.

Le système **MexAB-OprM**, lorsqu'il est hyperexprimé, entraîne une résistance au méropénème, à la ticarcilline et à l'aztréonam, mais n'affecte pas la sensibilité à l'imipénème (figure 9, page suivante), qui n'est pas un substrat de cette pompe (Kohler *et al.*, 1999b).

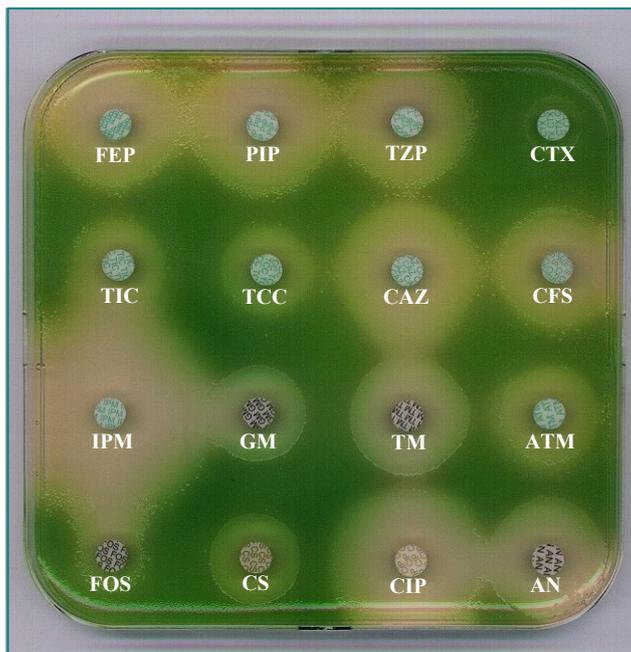


Figure 9 : Antibiogramme d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* hyperexprimant le système d'efflux MexAB-OprM.

(noter les sensibilités réduites à la ticarcilline (TIC) et à l'aztréonam (ATM))

Les abréviations utilisées pour les autres antibiotiques sont détaillées à la page 6.

L'hyperexpression de MexAB-OprM peut résulter d'une mutation ou d'une séquence d'insertion dans le gène codant pour le répresseur MexR (phénotype *nalB*) (Boutoille *et al.*, 2004; Poole *et al.*, 1996) ou bien d'une mutation dans le gène *PA3721* codant pour un répresseur de l'opéron *PA3720-PA3719* (phénotype *nalC*) (Cao *et al.*, 2004). Enfin, plus récemment, des mutations dans le gène *nalD* (*PA3574*) codant pour un probable répresseur ont été retrouvées, chez des souches hyperexprimant MexAB-OprM et ne possédant aucune mutation dans *mexR* et *PA3721* (Sobel *et al.*, 2005a).

MexEF-OprN est aussi associé, de manière indirecte, à la résistance aux carbapénèmes. L'opéron *mexEF-oprN* est positivement régulé par MexT, un activateur transcriptionnel de la famille LysR. La présence de mutations dans *mexT* entraîne une résistance aux fluoroquinolones, au chloramphénicol, au triméthoprime et à l'imipénème, bien que la résistance à ce dernier antibiotique ne soit pas due à l'hyperexpression de MexEF-OprN, mais à la diminution concomitante d'OprD, observée chez ces mutants *nfxC* (Kohler *et al.*, 1999a). MexT est donc capable d'activer *mexEF-oprN* et, simultanément, de réguler négativement *oprD* aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel (figure 10, page suivante).

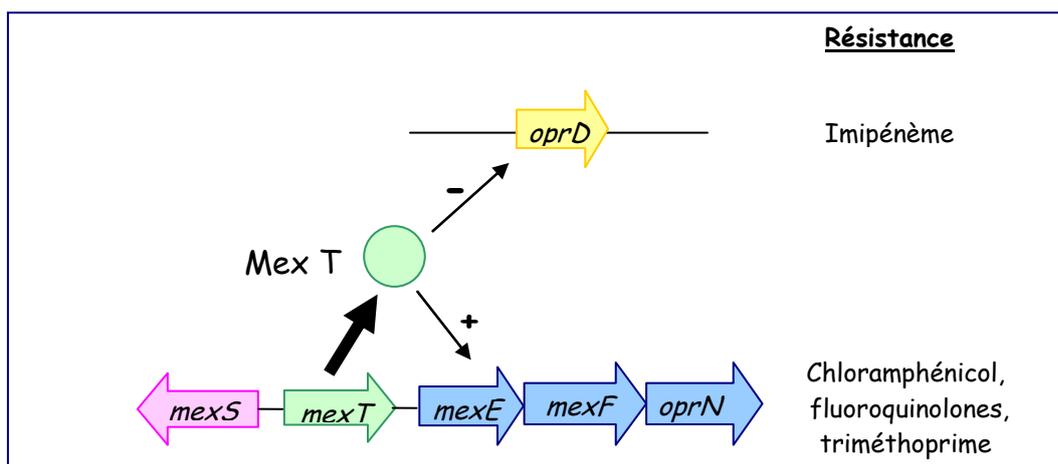


Figure 10 : Co-régulation du système d'efflux MexEF-OprN et de la porine OprD chez *Pseudomonas aeruginosa*

Récemment, il a également été mis en évidence, chez des souches présentant un phénotype *nfxC*, en l'absence de mutation dans *mexT*, des mutations dans le gène *mexS* (*PA2491*) codant pour une oxydoréductase/déshydrogénase intervenant dans la détoxification de métabolites cellulaires. (Sobel *et al.*, 2005b). Chez ces mutants, on observe aussi une diminution d'expression de la porine OprD. Il existe donc des interactions complexes entre les voies d'entrée (porines) et de sortie (systèmes d'efflux) des métabolites et les mécanismes de détoxification ; ceci, essentiellement en vue de prévenir efficacement l'accumulation de composés néfastes à la survie de la bactérie.

En 2004, un autre système d'efflux a été reconnu comme impliqué indirectement dans la résistance aux carbapénèmes *in vitro*. Il s'agit du système **CzcCBA** qui est responsable de la résistance au cadmium, au zinc et au cobalt. L'expression du système CzcCBA est sous la dépendance du système à 2 composants CzcR-CzcS, dont le régulateur transcriptionnel CzcR est capable de réguler simultanément *oprD* de façon négative et l'opéron *czcCBA* de façon positive, entraînant respectivement une résistance aux carbapénèmes et aux métaux lourds (figure 11, page suivante).

C'est en cherchant à élucider pourquoi les CMI de méropénème de souches de *P. aeruginosa* étaient augmentées d'un facteur 16 en présence de sondes urinaires en latex siliconé (Pascual *et al.*, 1993), qu'il a été démontré que c'était en fait le zinc, relargué de ces sondes, qui était responsable de la diminution d'expression d'OprD (Conejo *et al.*, 2003).

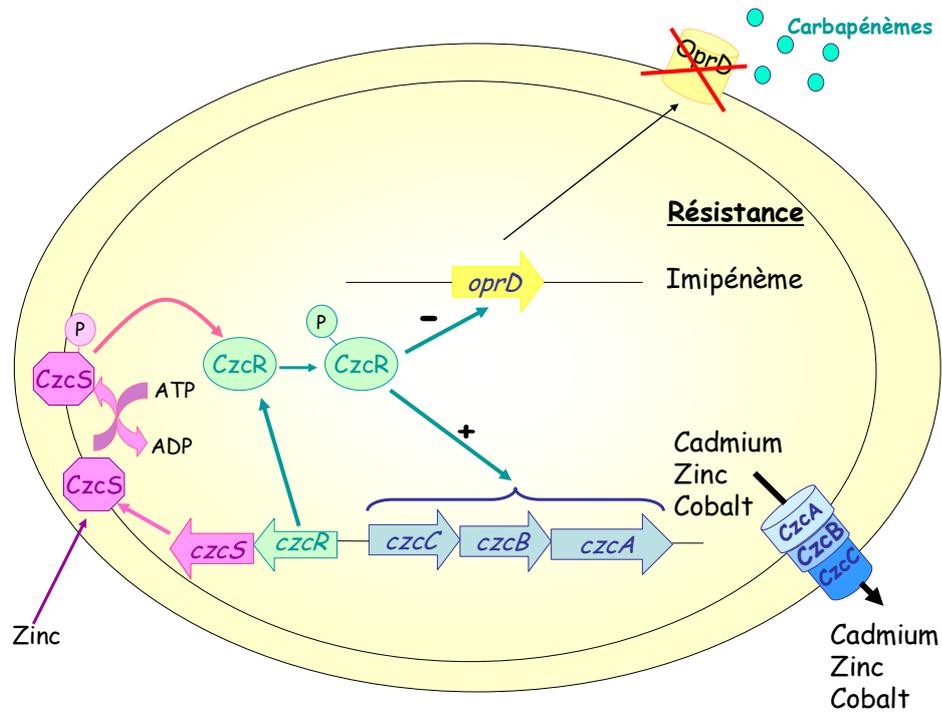


Figure 11 : Co-régulation du système d'efflux CzcCBA et de la porine OprD chez *Pseudomonas aeruginosa*.

In vitro, l'exposition de souches de *P. aeruginosa* à de fortes concentrations de zinc (20-25 mM) permet de sélectionner des mutants simultanément résistants au zinc et aux carbapénèmes. De la même façon, en présence d'imipénème, il est possible d'obtenir des mutants résistants à l'imipénème et au zinc. Ces observations suggèrent un mécanisme de régulation commun. L'analyse de ces mutants résistants aux carbapénèmes et aux métaux lourds a révélé qu'ils présentaient une expression augmentée des gènes codant pour le système d'efflux CzcCBA, mais aussi de ceux codant pour le système à 2 composants CzcS-CzcR. Chez 7 de ces mutants exprimant constitutivement le système CzcCBA, la mutation V194L a été mise en évidence dans la protéine senseur CzcS (Perron *et al.*, 2004) (figure 12).

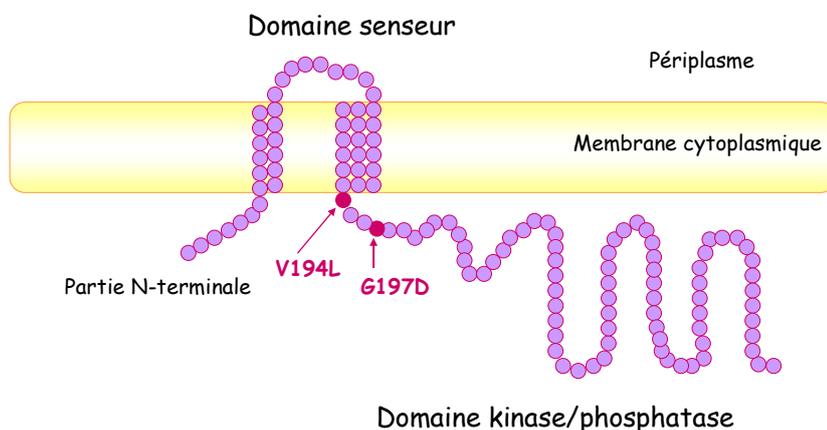


Figure 12 : Schéma de la protéine senseur CzcS

2.2.3. Carbapénémases

Les carbapénèmes sont stables vis-à-vis de la plupart des β -lactamases. Cependant, ils peuvent être hydrolysés par certaines enzymes, en particulier les métallo- β -lactamases dont les plus répandues sont les enzymes de type IMP et VIM.

2.2.3.1. Métallo- β -lactamases

Les métallo- β -lactamases appartiennent à la classe B de Ambler ; elles possèdent le plus large spectre d'hydrolyse des β -lactamases retrouvées chez *P. aeruginosa*, incluant les amino- et uréido-pénicillines, les céphalosporines de 3^{ème} génération et les carbapénèmes, mais pas les monobactams. Par ailleurs, elles sont insensibles à l'action des inhibiteurs de β -lactamases. Leur activité est zinc-dépendante et inhibée par l'EDTA. Le principal motif de fixation de l'ion zinc est le motif histidine-X-histidine-X-acide aspartique (HXHXD) qui est commun à la plupart des métallo- β -lactamases.

A ce jour, ces enzymes sont classées en 4 catégories :

- la première description d'une métallo- β -lactamase transférable a été la découverte d'une souche de *P. aeruginosa* productrice d'une enzyme de type **IMP**, au Japon, en 1988 (Watanabe *et al.*, 1991). Le gène de résistance était porté par un plasmide conjugatif. Par la suite, il a été retrouvé chez 16 espèces bactériennes différentes, sur des intégrons de classe 3, essentiellement au Japon. De nombreux variants dérivant de l'enzyme IMP ont successivement été recensés en Asie, mais aussi sur les continents européen et américain, le rapport le plus récent concerne IMP-18 aux USA (Toleman *et al.*, 2005).

Un intégron est une structure génétique capable de capturer des gènes cassettes. Il comporte 3 parties : 2 régions conservées (5'CS et 3'CS) situées de part et d'autre des gènes intégrés qui constituent la région variable (figure 13, page suivante).

La région 5' est composée du gène de l'intégrase (*intI*), de son site de recombinaison adjacent (*attI*) et d'un promoteur qui facilite l'expression des gènes cassettes de la région variable.

La région 3' est souvent la résultante de la fusion du gène *qac*, partiellement délété, avec le gène *sul*, ces gènes conférant respectivement la résistance aux ammoniums quaternaires et aux sulfamides.

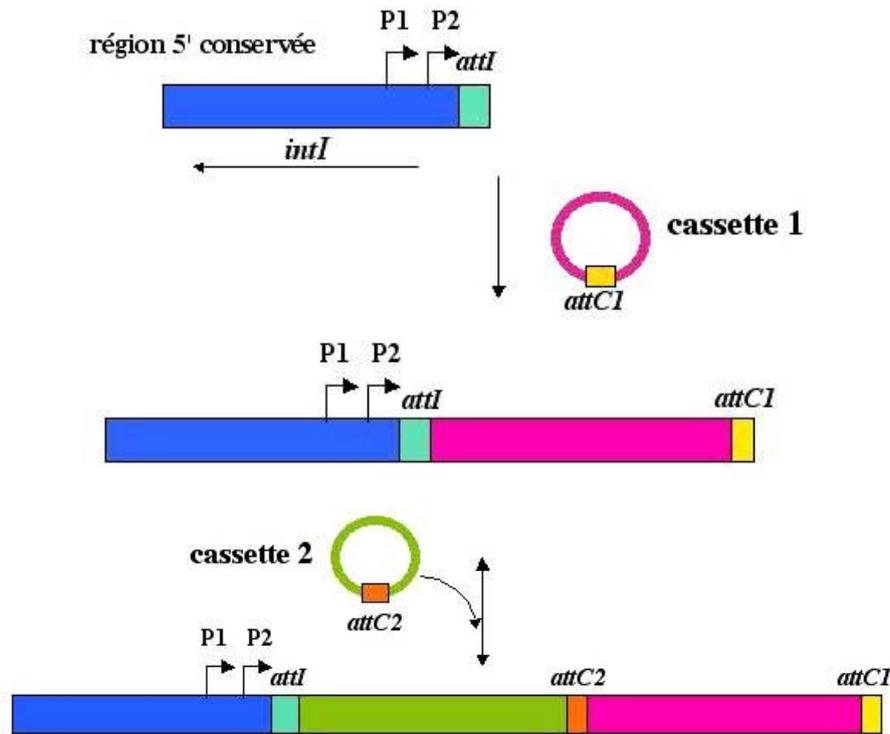


Figure 13 : Mécanisme de capture d'un gène cassette au sein d'un intégron.

Les gènes cassettes sont de petits fragments d'ADN circulaires, mobiles, comportant un gène (codant souvent pour la résistance aux antibiotiques) et un site de recombinaison *attC* qui est 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.

- La deuxième classe de métallo-enzymes est celle de type **VIM** (pour **Imipénémase Véronaise**) dont la première description a eu lieu à Vérone, en Italie (Lauretti *et al.*, 1999). Le spectre de substrats de cette dernière est typiquement celui d'une enzyme de classe B, capable d'hydrolyser la plupart des β -lactamines sauf l'aztréonam (la résistance à cette molécule observée chez la souche de *P. aeruginosa* productrice de VIM-1, étant probablement due à un mécanisme d'efflux ou à l'hyperproduction de la céphalosporinase AmpC). Le gène *bla_{vim-1}* est intégré comme un gène cassette dans un intégron de classe 1 qui contient également le gène *aacA4* codant pour la résistance aux aminosides. VIM-1 a également été retrouvée chez des entérobactéries et d'autres bacilles à Gram négatif, mais toujours en Europe. L'enzyme VIM-2 partage 90% de la séquence protéique de VIM-1 et le même spectre de substrats, même si elle est codée par un gène porté par un type d'intégron différent (Poirel *et al.*, 2000).

- En 2001, la β -lactamase **SPM** a été caractérisée à Sao Paulo, au Brésil (Toleman *et al.*, 2002). Elle est codée par un gène présent sur un fragment d'ADN de GC% différent de celui de *P. aeruginosa*, suggérant qu'il appartenait à l'origine à une bactérie d'un autre genre.

- Enfin, la dernière classe de métallo- β -lactamases est celle de type **GIM**, identifiée en 2002, en Allemagne (Castanheira *et al.*, 2004).

La plupart des gènes codant pour ces enzymes sont portés par des cassettes de résistance, insérées au sein d'intégrons, le plus souvent de classe 1 ou 3. Ces structures mobiles facilitent leur diffusion rapide entre bactéries de la même espèce, mais aussi entre bactéries de genres différents. Ces enzymes ont ainsi été retrouvées chez diverses entérobactéries et chez *Acinetobacter baumannii* (Yum *et al.*, 2002). Le caractère transférable de ces enzymes, ainsi que leur association à des résistances à d'autres classes d'antibiotiques, expliquent l'implication fréquente de souches productrices de métallo- β -lactamases dans des épidémies (Cornaglia *et al.*, 2000; Crespo *et al.*, 2004)

2.2.3.2. β -lactamases de classe A

Les carbapénèmes ne sont pas des substrats habituels des β -lactamases appartenant à la classe A de Ambler, à l'exception de certaines enzymes qui possèdent un spectre d'hydrolyse incluant l'imipénème. C'est notamment le cas de l'enzyme **GES-2** (pour Guiana Extended Spectrum). Le gène *bla_{GES-2}* codant pour cette dernière a été décrit pour la première fois au sein d'un intégron de classe I, sur un plasmide, chez une souche de *P. aeruginosa*, en Afrique du Sud, en 2000 (Poirel *et al.*, 2001).

GES-2 est une β -lactamase à spectre étendu qui dérive de l'enzyme GES-1, retrouvée chez des souches de *Klebsiella pneumoniae* en Guyane puis au Portugal (Duarte *et al.*, 2003; Poirel *et al.*, 2000), et une souche de *P. aeruginosa* en Afrique du Sud, par la substitution, au niveau du site catalytique, d'un résidu glycine par une asparagine. Cette mutation conduit à l'extension du spectre enzymatique à l'imipénème.

La résistance acquise aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa* peut donc être le fait de carbapénémases plasmidiques, même si leur présence reste exceptionnelle et isolée en de rares régions du globe. Cependant, leur incidence réelle est certainement sous-estimée, du fait de leur mise en évidence difficile par les tests de synergie conventionnels.

2.2.4. Hyperproduction de la céphalosporinase AmpC

AmpC est une sérine β -lactamase de la classe C de Ambler, capable d'hydrolyser les aminopénicillines et les céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} générations. La production de cette céphalosporinase d'origine chromosomique est induite par le régulateur transcriptionnel AmpR (activé en présence de certaines substances telles que l'acide clavulanique, l'imipénème et la céfoxitine) et réprimée *via* AmpD. Plusieurs événements génétiques peuvent conduire à l'expression constitutive et de haut niveau de cette céphalosporinase, s'accompagnant alors d'une résistance aux carboxy- et uréido-pénicillines, ainsi qu'aux céphalosporines de 3^{ème} génération. Bien que l'inactivation du gène *ampD* (secondaire à des délétions, insertions ou substitutions nucléotidiques) soit le mécanisme le plus fréquemment responsable de l'hyperproduction de AmpC, il semble que la protéine transductrice AmpE puisse jouer un rôle indirect dans ce mécanisme (Juan *et al.*, 2005b).

Le rôle de la céphalosporinase AmpC dans la résistance à l'imipénème semble mineur. L'inactivation de cette céphalosporinase ne s'accompagne que d'un accroissement limité de la sensibilité à l'imipénème. En revanche, si cette inactivation est réalisée chez une souche présentant, en plus, une expression réduite de la porine OprD, on constate une diminution notable des CMI d'imipénème (Masuda *et al.*, 1999), la dérégulation de AmpC venant potentialiser le mécanisme de résistance existant.

Récemment cependant, il a été démontré qu'une modification d'un seul acide aminé dans la céphalosporinase AmpC était capable de lui conférer la capacité d'hydrolyser les carbapénèmes (Ishii *et al.*, 2005).

Matériels et Méthodes



1. Souches bactériennes étudiées

Compte tenu des données précédemment rapportées, l'objectif de nos travaux a été d'évaluer le rôle des différents mécanismes développés par *P. aeruginosa* pour résister aux carbapénèmes et, notamment, l'impact des modifications de la porine OprD et de l'hyperexpression des systèmes d'efflux, dans un contexte hospitalier déterminé.

Notre étude a porté successivement sur 3 séries de souches de *P. aeruginosa* :

- d'une part, 40 souches cliniques présentant une résistance à l'imipénème (CMI > 8 µg/mL) détectée à l'aide de l'automate Vitek-2® (bioMérieux). Ces bactéries ont été isolées au CHU de Nantes dans le courant de l'année 2003. Les souches productrices de métallo-β-lactamases et celles provenant de patients atteints de mucoviscidose ont été écartées (la formation de biofilm et le caractère mucoïde de ces dernières pouvant influencer sur leur sensibilité).

- d'autre part, 12 souches de colonisation digestive, issues d'une étude prospective (Programme Hospitalier de Recherche Clinique : PHRC) conduite d'avril 2000 à avril 2002, dans 5 services du CHU de Nantes (urologie, médecine interne, réanimation médicale, réanimation chirurgicale, rééducation fonctionnelle). Elles correspondaient à 6 couples de souches de *P. aeruginosa* isolées chez un même patient et présentant une différence de sensibilité à l'imipénème. Ce PHRC avait pour but d'évaluer la flore de colonisation digestive des patients hospitalisés et l'impact de l'administration d'antibiotiques sur l'apparition de bactéries résistantes. Pour chacun des 933 patients inclus dans cette étude, un écouvillon rectal avait été réalisé à son admission dans le service, puis une fois par semaine et le jour de sa sortie du service. Pour les 12 souches retenues dans ce contexte, nous avons pu disposer d'un certain nombre de renseignements épidémiologiques (notamment les traitements antibiotiques reçus) que nous avons analysés, grâce au logiciel Epi Info®.

- enfin, nous avons souhaité savoir si les données concernant la contribution du zinc dans la résistance au carbapénèmes, *in vitro*, pouvaient avoir un réel impact *in vivo*. Nous avons donc sélectionné les 6 souches de *P. aeruginosa* de sensibilité diminuée à l'imipénème, isolées à partir d'urines prélevées sur des sondes à demeure en 2003. Afin de disposer d'un effectif de souches suffisant, nous avons élargi l'étude à 14 souches de l'année 2004, présentant ces mêmes caractéristiques. Pour toutes, nous avons recherché, par séquençage, la mutation V194L dans le gène codant pour la protéine senseur CzcS.

2. Sensibilité aux antibiotiques

2.1. Antibiogramme

L'antibiogramme a été réalisé par diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton (MH, bioMérieux), en présence de disques d'antibiotiques (Biorad), avec un inoculum standardisé à 10^6 bactéries/mL.

L'interprétation des diamètres d'inhibition obtenus, après 24h d'incubation à 37°C, a été réalisée selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (disponibles sur www.sfm.asso.fr).

2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Nous avons utilisé la technique par dilution en gélose MH (bioMérieux), avec un inoculum standardisé à 10^4 bactéries par dépôt de 1 μ L (inoculateur à sites multiples de type Steers, figure 14).

La cloxacilline (inhibiteur de céphalosporinase) a été ajoutée, à raison de 500 μ g/mL, pour évaluer l'impact de la céphalosporinase AmpC sur les CMI de ceftazidime et d'imipénème.

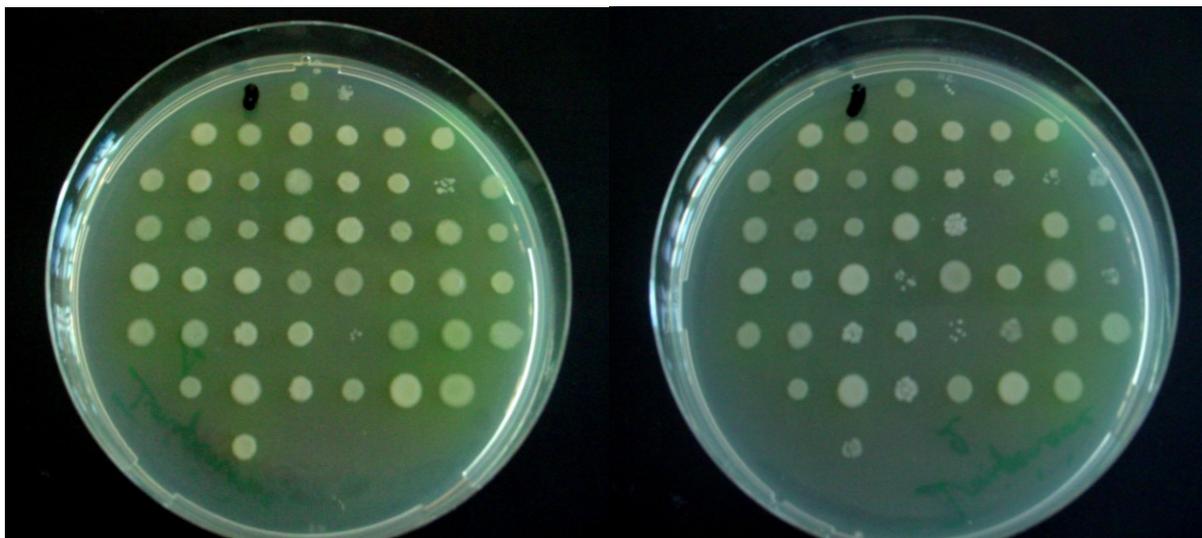


Figure 14 : Détermination des concentrations minimales inhibitrices par dilution en milieu gélosé (10^4 bactéries/dépôt de 1 μ L).

Les concentrations d'antibiotiques étaient les suivantes :

- Imipénème (+/- cloxacilline Sigma 500 μ g/mL)	Tiénam [®] MSD	1 à 512 μ g/mL
- Méropénème	Méronem [®] AstraZéneca	0.5 à 512 μ g/mL
- Ticarcilline	Ticarpen [®] Glaxo-Smithkline	1 à 512 μ g/mL
- Ceftazidime (+/- cloxacilline Sigma 500 μ g/mL)	Fortum [®] Glaxowellcome	1 à 512 μ g/mL
- Céfépime	Axépim [®] Bristol-Myers-Squibb	1 à 512 μ g/mL
- Ciprofloxacine	Ciflox [®] Bayer	0.25 à 64 μ g/mL

Les souches de référence de *P. aeruginosa* PAO1 et ATCC 27853 ont été utilisées comme témoins.

L'interprétation des CMI et la classification des souches en sensibles, intermédiaires ou résistantes ont été réalisées selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

2.3. Détection de métallo- β -lactamase

Notre étude ayant pour thème la résistance non enzymatique aux carbapénèmes, nous avons d'abord recherché la présence éventuelle de métallo-enzymes, afin de ne retenir que les souches qui en étaient dépourvues.

2.3.1. Test à l'EDTA

L'EDTA, en chélatant le zinc indispensable à l'activité des métallo- β -lactamases, empêche l'hydrolyse des antibiotiques substrats.

Nous avons utilisé la méthode de diffusion en gélose MH (bioMérieux), avec un inoculum standardisé à 10^6 bactéries/mL. Deux disques imprégnés d'imipénème (10 μ g) et 2 disques imprégnés de ceftazidime (30 μ g) ont alors été déposés et 5 μ L d'EDTA 0,1M ont été ajoutés sur l'un des 2 disques de chaque antibiotique.

Après 18 à 24 heures à 37°C, la recherche de métallo-enzyme était considérée comme positive si la différence entre les diamètres des zones d'inhibition observées autour des disques avec et sans EDTA était supérieure à 5 mm (figure 15).

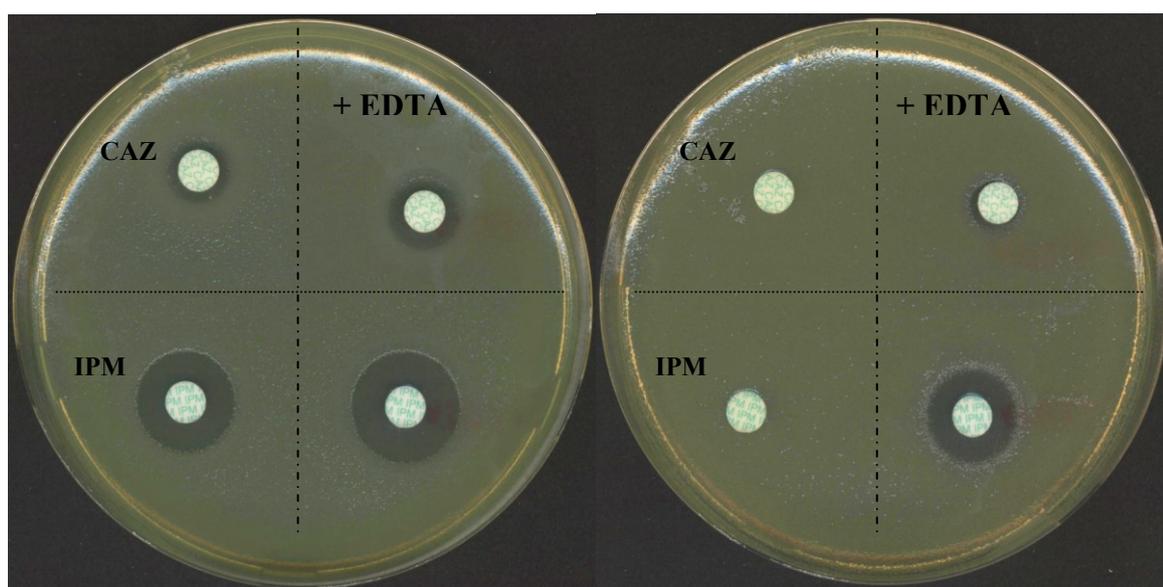


Figure 15 : Tests à l'EDTA pour la recherche de métallo- β -lactamase
(négatif à gauche, positif à droite)

2.3.2. Recherche, par PCR, du gène codant pour l'enzyme VIM-2

Pour les bactéries présentant un test à l'EDTA positif, la métallo-enzyme VIM-2 a été recherchée par PCR. La réaction a été réalisée sur un thermocycleur Perkin-Elmer 480® (Perkin-Elmer Applied Biosystems), dans un volume final de 50 µL contenant 10 mM de Tris-HCl pH 9, 50 mM de KCl, 0,1% de Triton X-100, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de chaque amorce, 1,25 U de Taq DNA polymérase (Promega) et 200 µM de chacun des nucléotides. Les amorces et conditions de PCR utilisées sont présentées dans le tableau I.

Gène	Amorces	Programme	Taille de l'amplicon
<i>VIM2</i>	Carba 1 : 5'CAGTCTACCCGTCCAATGGT 3' Carba 2 : 5'CCATAGAGCACACTCGCAGA 3'	94°C, 5 min. 94°C, 1 min. 55°C, 1 min. } 35 cycles 72°C, 2 min. 72°C, 7 min.	394 paires de bases

Tableau I : Amorces et conditions utilisées pour la recherche du gène *VIM2*, par PCR, chez *Pseudomonas aeruginosa*.

La visualisation des produits d'amplification a été réalisée avec du bromure d'éthidium, après migration électrophorétique en gel d'agarose à 2%, pendant une heure à 120V, en tampon TBE 1X.

3. Typage des souches par électrophorèse en champ pulsé

L'étude du polymorphisme de restriction de l'ADN total a été réalisée par électrophorèse en champ pulsé (ECP), sur les 6 couples de souches présentant un phénotype de résistance différent vis-à-vis des carbapénèmes, successivement isolées chez un même patient. Cette technique a permis de s'assurer que les souches d'un même couple présentaient effectivement le même pulsotype.

3.1. Principe

Le principe de l'ECP est le suivant : l'ADN bactérien est soumis à l'action d'une enzyme (endonucléase de restriction), pour donner une série de fragments dont la taille et le nombre sont caractéristiques de l'isolat étudié.

L'ECP est basée sur l'utilisation d'enzymes reconnaissant des sites de coupure rares, générant ainsi un nombre restreint de fragments d'ADN, de très grande taille, qui sont ensuite séparés par une électrophorèse utilisant un champ électrique dont l'orientation varie périodiquement. Ces changements de sens du courant électrique entraînent des variations

répétées dans la conformation des fragments d'ADN, permettant une progression plus facile de ces gros fragments à travers les mailles du gel d'agarose. Cette technique permet ainsi la séparation de fragments d'ADN dont la taille est comprise entre 50 et 1000 kb (figure 16).

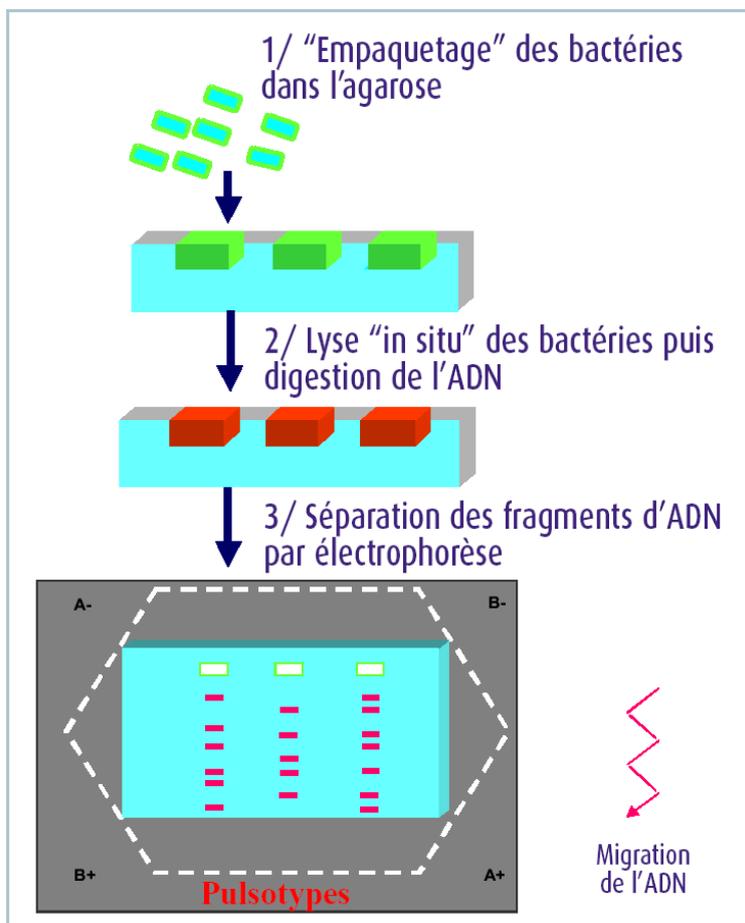


Figure 16 : Principe de l'électrophorèse en champ pulsé

En raison de son pouvoir discriminant et de sa bonne reproductibilité, l'ECP constitue une technique de référence pour le typage des souches bactériennes d'origine clinique. En revanche, elle est délicate à réaliser, du fait de la fragilité des molécules d'ADN génomique. C'est pourquoi la lyse des bactéries se fait après leur inclusion au sein d'une matrice semi-solide d'agarose (plug).

3.2. Lyse et extraction de l'ADN

Une suspension bactérienne de densité optique ajustée à 0,3 à 600 nm a été réalisée, à partir d'une culture bactérienne en bouillon cœur-cerveille (BCC, bioMérieux), obtenue après 18 à 24h, sous agitation, à 37°C.

Un millilitre de cette suspension a été centrifugé 5 min à 10000 trs.min⁻¹, puis le surnageant éliminé.

Le culot a été remis en suspension dans 1 mL de TEN (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,150 M, EDTA 0,1 M) et centrifugé 5 min à 10000 trs.min⁻¹.

Après élimination du surnageant, le culot a été remis en suspension, dans 300 µL de EC (Tris-HCl 6 mM, NaCl 1M, EDTA 0,1 M, Brij 58 0,5%, désoxycholate de Na 0,2%, N-laurylsarcosine 0,5%).

Les blocs d'agarose ont été préparés par mélange, volume à volume, de cette suspension avec de l'agarose SeaPlaque (FMC Corp.) à 1% dans du EC.

Après solidification, les plugs ont été incubés dans une solution de lyse bactérienne ESP (EDTA 0,5M, SDS 1%, protéinase K 50 µg/mL), pendant 18 à 24 h, à 55°C.

Les plugs ont ensuite été lavés 6 fois, avec 10 mL de TE 10⁻¹ (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM), pendant 1 h, à température ambiante, sous agitation douce. Après le sixième lavage, les plugs ont été conservés dans du TE 10⁻¹ à 4°C jusqu'à leur analyse.

3.3. Digestion enzymatique

Pour les souches de *P. aeruginosa*, la digestion enzymatique de l'ADN total a été effectuée par l'enzyme *Spe* I, pendant 18 à 24 h, à 37°C.

Le marqueur de poids moléculaire utilisé était la souche NCTC 8325 (*S. aureus* méticillino-sensible), après digestion par l'enzyme *Sma* I, pendant 18 à 24h, à 25°C.

3.4. Technique électrophorétique

Les plugs digérés ont été insérés dans un gel d'agarose Seakem à 1% en TBE à 0,5X (5mM Tris-HCl (pH 8), 5mM borate, 1mM EDTA) et les puits scellés par de l'agarose Seaplaque à 1% en TBE 0,5X.

La migration a été effectuée sur un appareil CHEF DR III (Biorad), dans du tampon TBE à 0,5X, selon les conditions suivantes :

1ère phase :	2ème phase :	
Pulse initial : 2 s.	Pulse initial : 30 s.	Voltage : 6V/cm
Pulse final : 60 s.	Pulse final : 25 s.	Température 14°C
Temps 20 h	Temps 3 h	Angle 120°

Les fragments d'ADN ont été visualisés avec du bromure d'éthidium au moyen d'un transilluminateur UV et photographiés. La corrélation entre les bandes des pulsotypes a été étudiée à l'aide du logiciel Gel Compar[®], en utilisant le coefficient de Dice et la technique de regroupement des profils UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*).

4. Amplification par PCR et séquençage du gène codant pour la porine

OprD

4.1. Extraction des ADN

L'ADN bactérien a été extrait par une méthode rapide : 1 à 2 colonies bactériennes ont été ajoutées à 70 µL d'eau distillée stérile et portées 5 minutes à ébullition. Après centrifugation de cette suspension, pendant 10 minutes à 10000 trs.min⁻¹, le surnageant récupéré contenait l'ADN extrait.

4.2. PCR du gène *oprD*

Afin de pouvoir séquencer l'intégralité de la partie codante du gène *oprD*, 2 couples d'amorces ont été définis (figure 17).

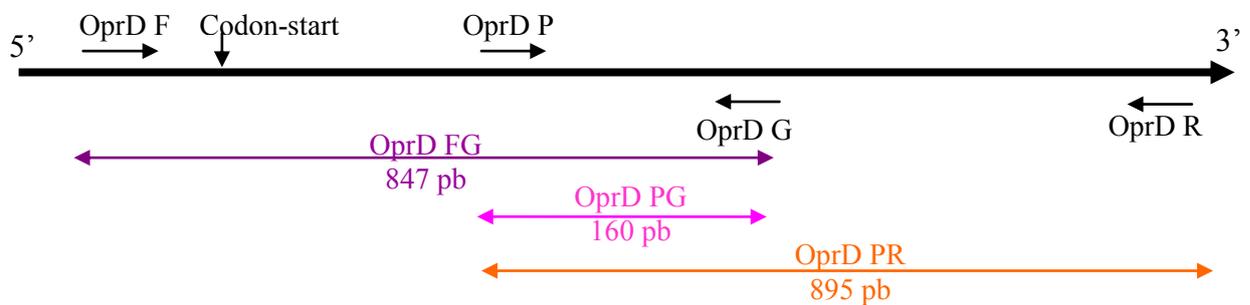


Figure 17 : Position des amorces utilisées pour les PCR du gène *oprD* de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les réactions de PCR ont été réalisées avec un thermocycleur Perkin-Elmer 480® (Perkin-Elmer Applied Biosystems), dans un volume final de 50 µL contenant 10 mM de Tris-HCl pH 9, 50 mM de KCl, 0,1% de Triton X-100, 1,5 mM de MgCl₂, 0,75 µM de chaque amorce, 1,25 unité de Taq DNA polymérase (Promega) et 200 µM de chacun des nucléotides.

Les conditions de PCR utilisées sont présentées dans le tableau II.

Amplicon	Amorces	Programme	Taille de l'amplicon
<i>oprD</i> FG	oprD F (sens) 5'CTACGCAGATGCGACATGC 3' oprD G (antisens) 5'GCGCTGAGGTTATCGGTGA 3'	94°C, 5 min. 94°C, 30 s. 60°C, 30 s. } 30 cycles 72°C, 1 min.30 s. 72°C, 7 min.	847 paires de bases
<i>oprD</i> PR	oprD P (sens) 5'AATTCGAAGGGCTCGACCTC 3' oprD R (antisens) 5'CCTTTATAGGCGCGTTGCC 3'	94°C, 5 min. 94°C, 30 s. 61°C, 30 s. } 26 cycles 72°C, 1 min 30 s. 72°C, 7 min.	895 paires de bases

Tableau II : Amorces, programmes et tailles des amplicons obtenus lors de l'amplification du gène *oprD* de *Pseudomonas aeruginosa*.

La visualisation des produits d'amplification a été réalisée avec du bromure d'éthidium, après migration électrophorétique en gel d'acrylamide à 6%, pendant 30 minutes à 150V, en tampon TBE 1X.

4.3. Séquençage

4.3.1. Principe

Le séquençage repose sur une technique dérivant de celle mise au point par Sanger en 1977. Elle utilise un mélange réactionnel contenant des désoxynucléotides (dNTP) en grand nombre et une faible proportion de didésoxynucléotides (ddNTP). Ces derniers, marqués avec des fluorophores différents pour chaque base, sont incorporés au cours de la synthèse de l'ADN, et entraînent alors la terminaison prématurée du produit amplifié. A la fin de la réaction, des fragments d'ADN de tailles variables sont obtenus, en fonction de l'endroit où les ddNTP ont été insérés. Le séquenceur analyse alors la fluorescence à la sortie des colonnes d'électrophorèse, permettant ainsi de déterminer la taille des fragments et d'en déduire la séquence nucléotidique.

4.3.2. Réalisation pratique

Les produits de PCR ont été purifiés sur Bio-Gel P100 Fine[®] (Biorad), puis séquencés avec le kit ABI PRISM Big Dye terminator[®]. Après purification sur la résine Bio-gel G50 fine[®], les produits de séquençage ont été analysés par électrophorèse capillaire sur ABI PRISM 3100[®] (Applied Biosystems).

4.4. Analyse bio-informatique des séquences

L'interprétation des séquences a été réalisée avec le logiciel Sequence Navigator[®] (Applied Biosystems, figure 18, page suivante).

Nous avons recherché d'éventuelles mutations dans le gène *oprD* à l'aide du logiciel d'alignement multiple ClustalW[®] (Thompson, 1994), en comparant les séquences obtenues, entre elles, ainsi qu'à celle de la souche sauvage de *P. aeruginosa* PAO1 (disponible sur www.pseudomonas.com). Les répercussions de ces mutations sur la protéine ont été identifiées grâce aux logiciels Traduc[®] (http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/traduc_in.pl) et ClustalW[®].

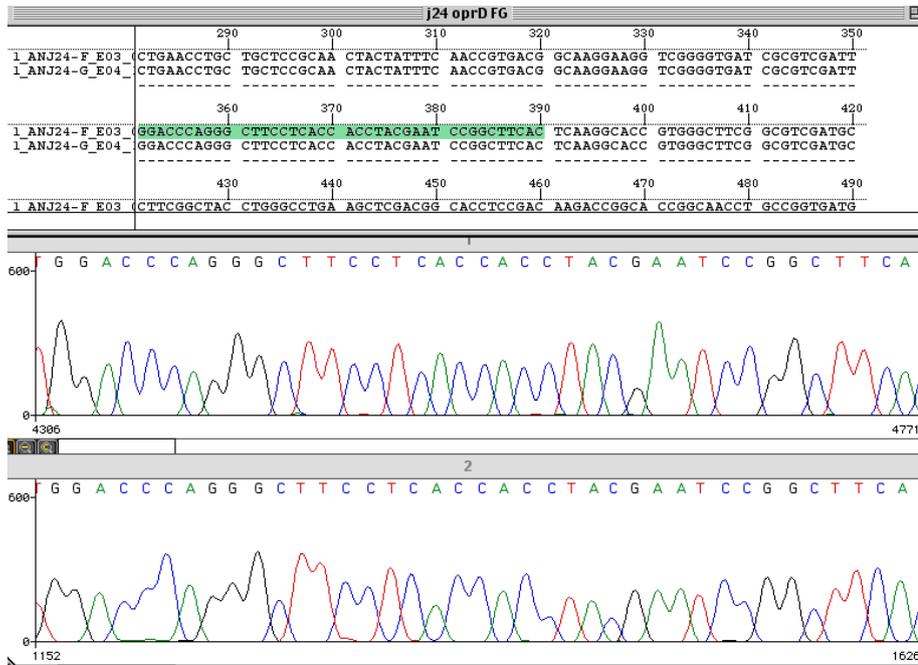


Figure 18 : Analyse des séquences du gène *oprD* avec le logiciel Sequence Navigator®

5. PCR après transcription inverse (RT-PCR)

Par PCR après transcription inverse (RT-PCR), nous avons également recherché s'il existait des différences importantes dans la quantité d'ARNm spécifique de *oprD* entre les souches sensibles et les souches résistantes, attestant d'une modification de régulation transcriptionnelle de ce gène. Nous avons aussi voulu savoir quelle était la contribution éventuelle des systèmes d'efflux MexAB-OprM et MexEF-OprN et de la céphalosporinase AmpC à la résistance observée vis-à-vis des carbapénèmes.

Nous avons donc recherché, par RT-PCR, quel était le niveau de transcription des gènes *mexA*, *mexE* et *ampC*.

5.1. Extraction des ARN

Dix microlitres d'une suspension bactérienne standardisée à 10^8 bactéries/mL ont été ensemencés dans 10 mL de bouillon Luria-Bertani (LB, Becton Dickinson) et incubés à 37°C, sous agitation, jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance (correspondant à une densité optique de 0,25 environ, à 600 nm).

Le culot bactérien obtenu après centrifugation 5 min à 5000 trs/min, à 4°C, a permis l'extraction des ARN totaux avec le RNeasy mini kit® (Qiagen), selon le protocole recommandé par le fabricant.

Les extraits d'ARN ont ensuite été stockés à -80°C, jusqu'à leur utilisation.

5.2. Dosage des ARN

Les ARN ont été dosés en mesurant l'absorbance à 260 nm, à l'aide d'un minispectrophotomètre Nanodrop[®].

5.3. Traitement des ARN à la DNase

Les échantillons ont été chauffés pendant 10 minutes à 65°C, pour détruire les structures secondaires. Puis un traitement des échantillons à la DNase a été réalisé, afin d'éliminer les éventuels ADN résiduels. Pour un volume final de 16 µL, 400 ng d'ARN ont été incubés 15 minutes, à 25°C, avec 2 U de DNase (Proméga) et 80 U d'inhibiteur de RNase. Après ajout de 2 µL d'EDTA 25 mM, la DNase a été inactivée par incubation 10 minutes à 65°C.

5.4. Transcription inverse

La transcription inverse a été réalisée dans un volume final de 25 µL, contenant 5 µL de l'ARN pré-traité à la DNase, 200 U de transcriptase inverse de M-MLV (Proméga), 2 µM de chaque amorce antisens, 400 µM de chaque nucléotide, 50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de dithiothreitol.

La transcription inverse a été réalisée pendant 1 h à 42°C, puis la transcriptase inverse a été inactivée par chauffage, 5 minutes, à 95°C.

5.5. PCR

5.5.1. PCR conventionnelle

Dans un premier temps, nous avons utilisé une technique de PCR classique.

Comme témoin du niveau de transcription, nous avons utilisé le gène *rpsL*, codant pour une protéine de la sous-unité 30S du ribosome.

Les amorces et programmes utilisés pour les réactions de PCR sont détaillés dans le tableau III, page suivante.

Les conditions de PCR étaient identiques à celles utilisées pour les PCR du gène *oprD*.

Pour s'assurer de l'efficacité du traitement des échantillons par la DNase, une PCR du gène *rpsL* a été réalisée sur les échantillons traités par la DNase mais n'ayant pas subi de transcription inverse.

La révélation des amplicons obtenus a été réalisée par migration électrophorétique en gel d'agarose à 2 %, dans du tampon TBE 1X, à 120 V, pendant 70 minutes.

Gène	Amorces	Programme	Taille de l'amplicon
<i>oprD</i>	oprD P : 5'AATTCGAAGGGCTCGACCTC 3' oprD G : 5'GCGCTGAGGTTATCGGTGA 3'	94°C, 5 min. 94°C, 30 s. 65°C, 30 s. } 30 cycles 72°C, 1 min. 72°C, 10 min.	160 paires de bases
<i>ampC</i>	ampC 1 : 5'AGACCCTGTTTCGAGATCGG 3' ampC 2 : 5'CGAGATAGCCGAACAGGC 3'	94°C, 5 min. 94°C, 30 s. 60°C, 30 s. } 38 cycles 72°C, 1 min. 72°C, 10 min.	318 paires de bases
<i>rpsL</i>	rpsL1 5'GCAACTATCAACCAGCTGGTG3' rpsL2 5'CACAACCTGCAAGAGCACAGC3'	94°C, 5 min. 94°C, 30 s. 60°C, 30 s. } 22 cycles 72°C, 1 min. 72°C, 10 min.	231 paires de bases
<i>mexA</i>	LA19 5'GACCTTATCAACCTTGTTTCAGG3' K14 5'CGTCGCTGCCTTCCTGAACA3'	94°C, 5 min. 94°C, 30 s. 60°C, 30 s. } 38 cycles 72°C, 1 min. 72°C, 10 min.	460 paires de bases
<i>mexE</i>	mexE 1 5'CTGAACCTGAGCTTCACCCG3' mexE 2 5'GCTTCGTCCTTGATCAGG3'	94°C, 5 min. 94°C, 30 s. 60°C, 30 s. } 38 cycles 72°C, 1 min. 72°C, 10 min.	425 paires de bases

Tableau III : Amorces et conditions de PCR après transcription inverse pour 4 gènes d'intérêt et un gène témoin, chez *Pseudomonas aeruginosa*.

5.5.2. PCR en temps réel

Dans un second temps, nous avons souhaité réaliser ces réactions en temps réel, afin de pouvoir quantifier, de façon précise, les ARNm spécifiques de chaque gène.

Nous avons travaillé sur un appareil Rotor-Gene 3000® (Corbett Research), en utilisant du SYBR Green pour la détection des amplicons. Le SYBR Green est un agent intercalant qui ne se lie qu'à l'ADN double brin. En solution, le SYBR Green n'est pas fluorescent, alors qu'il est très fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN. Il est donc utilisé dans la PCR en temps réel, pour mesurer la quantité d'amplicon produite au cours de la réaction. Un des inconvénients majeurs de son utilisation est son manque de spécificité. C'est pourquoi, il est indispensable de s'assurer de la spécificité de l'amplification en contrôlant, sur les courbes de fusion, que tous les produits de PCR ont bien une unique et même température de fusion pour un couple d'amorces donné.

Le gène *rpsL* a été utilisé comme témoin du niveau de transcription.

La réaction a été réalisée dans un volume final de 20 µL contenant 10 µL de Prémix Ex Taq (Takara), 0.3 µM de chaque amorce et 5 µL de cDNA.

Un microspectrofluorimètre a permis de détecter, en temps réel, les produits de PCR formés. Le calcul de la quantité d'amplicon a été réalisé en rapportant la valeur de cycle seuil (Ct), pour le gène d'intérêt, à celle obtenue pour le gène de référence *rpsL*.

6. PCR et séquençage du gène *mexR*

Pour les souches hyperexprimant le système d'efflux MexAB-OprM, nous avons recherché, par séquençage, une mutation dans le gène codant pour le régulateur transcriptionnel MexR.

L'ADN bactérien a été extrait par une méthode rapide, selon la technique précédemment décrite pour la PCR du gène *oprD*.

La PCR a été réalisée sur un thermocycleur Perkin-Elmer 480® (Perkin-Elmer Applied Biosystems), dans un volume final de 50 µL contenant 10 mM de Tris-HCl pH 9, 50 mM de KCl, 0,1% de Triton X-100, 1,5 mM de MgCl₂, 0,75 µM de chaque amorce, 1,25 unité de Taq DNA polymérase (Promega) et 200 µM de chacun des nucléotides.

Les conditions de PCR utilisées sont présentées dans le tableau IV.

Gène	Amorces	Programme	Taille de l'amplicon
<i>mexR</i>	<p>mexR 1 : 5'CATGGCCCATATTCAGAACC 3'</p> <p>mexR 2 : 5'CGAAAAGAATGTTCTTAAATACCTCG 3'</p>	<p>94°C, 5 min. 94°C, 30 sec. 55°C, 30 sec. } 30cycles 72°C, 2 min. 72°C, 7 min.</p>	564 paires de bases

Tableau IV : Amorces et conditions utilisées pour la PCR du gène *mexR* de *Pseudomonas aeruginosa*.

La purification des produits de PCR, le séquençage et l'analyse des séquences ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles décrites pour le gène *oprD*.

7. PCR et séquençage du gène codant pour la protéine senseur CzcS

Pour évaluer si les données obtenues *in vitro* sur le rôle du zinc dans la résistance aux carbapénèmes pouvaient avoir un impact *in vivo*, nous avons séquencé la portion du gène *czcS* où la mutation responsable de la substitution V194L a été mise en évidence.

L'ADN bactérien a été extrait par une méthode rapide, selon la technique précédemment décrite pour la PCR du gène *oprD*.

La PCR a été réalisée sur un thermocycleur Perkin-Elmer 480® (Perkin-Elmer Applied Biosystems), dans un volume final de 50 µL contenant 10 mM de Tris-HCl pH 9, 50 mM de KCl, 0,1% de Triton X-100, 1,5 mM de MgCl₂, 0,75 µM de chaque amorce, 1,25 unité de Taq DNA polymérase (Promega) et 200 µM de chacun des nucléotides.

Les conditions de PCR utilisées sont présentées dans le tableau V.

Gène	Amorces (Perron <i>et al.</i> , 2004)	Programme	Taille de l'amplicon
<i>czcS</i>	<p><i>czcS</i> 2F : 5'GCCTGCTCGACGGTTTCCT 3'</p> <p><i>czcS</i> 1R : 5'GGGATGCGGTAGGAGAGATCCTG 3'</p>	<p>94°C, 5 min. 94°C, 30 sec. 55°C, 30 sec. 72°C, 90 sec. 72°C, 7 min.</p> <p>} 30cycles</p>	166 paires de bases

Tableau V : Amorces et conditions utilisées pour la PCR du gène *czcS* de *Pseudomonas aeruginosa*.

La purification des produits de PCR, le séquençage et l'analyse des séquences ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles décrites pour le gène *oprD*.

8. Evaluation *in vitro* de la fréquence de mutation d'une souche bactérienne

Nous avons enfin recherché la présence de souches hypermutatrices, susceptible d'expliquer l'émergence des souches résistantes étudiées, en évaluant la fréquence de mutation des bactéries sur géloses MH additionnées d'antibiotiques, selon la technique décrite par Oliver *et al.* en 2000.

Une à 2 colonies bactériennes ont été ensemencées dans 20 mL de bouillon MH (bioMérieux) et incubées une nuit à 37°C, sous agitation.

La suspension bactérienne a ensuite été centrifugée 8 minutes à 6000 trs.min⁻¹ et le culot repris par 1 mL de bouillon MH. Des dilutions de 10 en 10 ont alors été réalisées. Cent microlitres de chaque dilution ont été ensemencés sur gélose MH sans antibiotique ou bien additionnée de 300 µg/mL de rifampicine et 8 µg/mL d'imipénème. Les géloses ont été incubées 36 heures à 37°C et le dénombrement des bactéries a été effectué sur les boîtes contenant entre 50 et 500 colonies.

La souche de *P. aeruginosa* PAO1 a été utilisée comme témoin.

Le taux de mutation a été calculé en rapportant le nombre de bactéries sur milieu avec antibiotique au nombre de bactéries viables, c'est-à-dire au nombre de bactéries sur milieu sans antibiotique.

Les expériences ont été répétées 3 fois et la valeur moyenne a été retenue.

Résultats



1. Etude de 40 souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* de sensibilité diminuée à l'imipénème

1.1. Dépistage et caractéristiques des souches non productrices de carbapénémase.

En 2003, 14% des souches de *P. aeruginosa* isolées au CHU de Nantes, étaient résistantes ou intermédiaires à l'imipénème. Parmi les 40 souches initiales correspondantes, 7 provenaient de patients atteints de mucoviscidose et 19 possédaient un test à l'EDTA positif. Pour ces dernières, la recherche de la métallo- β -lactamase VIM-2 par PCR s'est révélée positive. Il s'agissait d'un clone épidémique bien identifié qui circulait, à cette époque, essentiellement dans le service d'Hématologie clinique.

Nos travaux ont ensuite concerné les 13 souches de *P. aeruginosa* restantes, dépourvues de métallo- β -lactamases (une des souches n'ayant pu être remise en culture à partir de la gélose conservation).

Les résultats des antibiogrammes et des CMI par dilution en milieu gélosé, pour ces 13 souches, sont présentés dans le tableau VI, page suivante.

Les résultats obtenus pour la souche sauvage PAO1 étaient en accord avec ceux habituellement rapportés dans la littérature.

Toutes les souches présentaient une sensibilité diminuée à l'imipénème à l'exception de la souche 2 qui était cependant de sensibilité intermédiaire au méropénème et qui a donc été conservée pour la suite de l'étude. Cette résistance à l'imipénème était accompagnée, pour certaines souches, d'une résistance aux autres β -lactamines habituellement actives à l'égard de *P. aeruginosa*.

Tableau VI : Résultats de l'antibiogramme et concentrations minimales inhibitrices (CMI - µg/mL) des 13 souches de *Pseudomonas aeruginosa* étudiées.

Référence souche	Imipénème (IPM)		IPM+ cloxacilline*	Méropénème		Ceftazidime (CAZ)		CAZ+ cloxacilline*	Céfépime		Ticarcilline	
	Résultat automate Vitek2®	Dilution milieu gélosé	Dilution milieu gélosé	Résultat automate Vitek2®	Dilution milieu gélosé	Résultat automate Vitek2®	Dilution milieu gélosé	Dilution milieu gélosé	Résultat automate Vitek2®	Dilution milieu gélosé	Résultat automate Vitek2®	Dilution milieu gélosé
1	>16	32	8	>16	64	16	16	8	>64	128	>128	512
2	R	4	1	NT	8	I	8	4	I	16	R	128
3	R	8	1	NT	4	S	4	1	S	16	S	16
4	>16	32	4	>16	32	16	4	4	>64	64	>128	256
5	>16	32	4	8	16	4	4	2	8	16	64	32
6	>16	32	4	>16	32	S	4	2	8	16	>128	64
8	>16	32	4	NT	16	S	8	4	1	32	R	64
9	>16	64	8	>16	64	>64	128	16	>64	128	>128	512
10	>16	32	4	4	16	2	4	2	2	16	32	32
11	>16	16	4	I	16	S	4	2	I	16	I	64
12	>16	64	8	8	8	4	4	2	4	16	32	16
13	>16	32	8	>16	32	4	4	4	8	32	>128	128
14	>16	32	8	>16	32	>64	64	8	>64	128	>128	>512
PAO1		2	0.5		2		4	1		4		16

NT : non testé

* concentration de 500 µg/mL



Souche sensible à l'antibiotique testé



Souche de sensibilité intermédiaire à l'antibiotique testé



Souche résistante à l'antibiotique testé

1.2. Séquençage du gène *oprD*

Les produits de PCR obtenus pour la première partie du gène (*oprD* FG) présentaient tous la taille attendue. En revanche, pour 3 souches (6, 9 et 13), aucun amplicon n'a été obtenu sur la seconde moitié du gène (*oprD* PR), le séquençage de cette portion du gène n'a donc pas pu être effectué pour ces isolats.

En comparant les séquences du gène *oprD* des souches cliniques à celle de la souche sauvage PAO1, nous avons relevé une grande quantité de mutations (tableau VII). La majorité étaient des mutations silencieuses, mais certaines conduisaient à la substitution d'acides aminés, principalement hors des boucles L2 et L3.

Positions et substitutions des acides aminés

	← L2 →										← L3 →				← L7 →									
	43	57	59	103	104	115	127	135	170	202	210	230	240	262	267	281	296	301	310	340	359	372	402	Événement génétique
PAO1	D	S	S	T	G	K	V	M	L	E	I	E	S	N	A	A	K	Q	R	Q	V	M	Q	
1	N	E	R							Q	A	K	T	T	S	G	Q	E	G		L	V*	H ¹	Insertion d'1 pb
2	N	E	R							Q	A	K	T	T	S	G	Q	E	G		L	V*		
3	N	E	R							Q	A	K	T	T	S	G	Q	E	G		L	V*		
4	N	E	R							Q	A	K	T	T	S	G	Q	E	G		L	V*	H ¹	Insertion d'1 pb
5	N	E	R							Q	A	K	T	T	S	G	Q	E	G		L	V*	H ¹	Insertion d'1 pb
6				S		T			L															
8	N	E	R							Q	A	K	T	T	S	G	Q	E	G		L	V*		
9				S		T			L															
10	N	E	R		A ²																			Délétion d'1 pb
11	N	E	R							Q	A	K	T	T	S	G	Q	E	G		L	V*		
12	N	E	R							Q	A	K	T	T	S	G	Q	E	G		X			Substitution C→T
13				S		T			L															
14							L	H ³																Insertion d'1 pb

L2, L3 et L7 correspondent à la localisation des boucles de mêmes noms dans la protéine OprD

V* Variation dans la boucle L7 de 33 nucléotides consécutifs, entraînant la délétion de 2 acides aminés et la substitution de 9 autres

X codon-stop

H¹ Décalage du cadre de lecture à partir de l'acide aminé 402

A² Décalage du cadre de lecture à partir de l'acide aminé 104, conduisant à l'apparition d'un codon-stop à l'acide aminé 110

H³ Décalage du cadre de lecture à partir de l'acide aminé 135, conduisant à l'apparition d'un codon-stop à l'acide aminé 162

Séquençage de la seconde partie du gène non réalisé

Tableau VII : Séquençage du gène *oprD* des 13 souches cliniques de *P. aeruginosa* de sensibilité diminuée à l'imipénème

Trois « trames génétiques » ont pu être distinguées :

- 9 souches présentaient les mêmes substitutions d'acides aminés, même si des événements génétiques supplémentaires pouvaient se surajouter. La séquence du gène *oprD* des souches 2, 3, 8 et 11 s'est avérée exactement la même. Sur cette base

génétiq ue, l'insertion de 1 pb. chez les souches 1, 4 et 5 conduit à un décalage du cadre de lecture à partir de l'acide aminé 402. Pour la souche 10, c'est la délétion de 1 pb. qui est à l'origine du décalage du cadre de lecture. Enfin, pour l'isolat 12, la substitution d'un nucléotide entraîne l'apparition prématurée d'un codon-stop.

- La souche 14, présentait une porine OprD tronquée, du fait de l'insertion de 1 pb. et de l'apparition prématurée d'un codon-stop en position 162.
- Les souches 6, 9 et 13 présentaient diverses substitutions d'acides aminés, autres que pour les souches précédentes.

Si la présence d'une porine OprD tronquée (souches 10, 12 et 14) ou très modifiée (souches 1, 4 et 5) permet vraisemblablement d'expliquer leur résistance à l'imipénème, le rôle réel des autres mutations retrouvées est d'interprétation beaucoup plus délicate.

C'est pourquoi nous avons poursuivi notre étude sur des souches résistantes ayant émergé *in vivo*, à partir de souches sensibles dont nous pourrions disposer comme élément de comparaison.

2. Etude de 6 couples de souches de *Pseudomonas aeruginosa* présentant une différence de sensibilité à l'imipénème.

Sur les 933 patients inclus dans l'étude prospective dont sont issues les couples de souches étudiées, une colonisation gastro-intestinale par *P. aeruginosa* avait été détectée chez 20,6 % d'entre eux (192 patients). En revanche, seuls 44 patients (4,7%) étaient colonisés à leur admission dans les services concernés.

Parmi les patients colonisés à *P. aeruginosa*, 44 (22,9%) l'étaient avec une souche de sensibilité diminuée à l'imipénème.

2.1. Sensibilité aux antibiotiques

Dans le tableau VIII (page suivante), sont présentés les résultats des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé des souches, qui ont été retenues pour notre étude. Il s'agissait de couples de souches présentant une différence de sensibilité à l'imipénème, isolées successivement chez un même patient identifié par son initiale (ex : souches B112 et B131 du patient B).

Les valeurs de CMI par dilution en milieu gélosé (tableau IX, page 52) étaient en corrélation avec les antibiotypes obtenus par diffusion en milieu gélosé.

Les CMI retrouvées pour les souches témoins PAO1 et ATCC 27853 correspondaient aux valeurs habituellement rapportées.

Tableau VIII : Résultats de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé réalisé sur 6 couples de souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de la flore digestive de patients hospitalisés.

	Imipénème		Méropénème		Ceftazidime		Céfépime		Ticarcline		Amikacine		Ciprofloxacine	
	diamètre d'inhibition (mm)	interprétation												
B112*	16	I	11	R	20	I	25	S	21	I	24	S	22	S
B131 [◇]	30	S	27	S	20	I	25	S	21	I	25	S	22	S
CA483*	34	S	9	R	12	R	16	I	10	R	23	S	32	S
CA501 [◇]	17	I	contact	R	12	R	15	I	contact	R	24	S	35	S
C545*	25	S	21	S	20	I	26	S	17	R	24	S	38	S
C727 [◇]	18	I	contact	R	12	R	22	S	contact	R	23	S	32	S
F758*	27	S	26	S	13	R	20	I	contact	R	15	I	13	R
F912 [◇]	10	R	contact	R	13	R	21	S	contact	R	16	I	13	R
G803*	22	S	8	R	22	S	30	S	14	R	31	S	14	R
G836 [◇]	16	R	contact	R	contact	R	17	I	contact	R	27	S	18	R
J3*	18	I	12	R	20	I	24	S	21	I	25	S	22	S
J24 [◇]	29	S	22	S	20	I	23	S	20	I	25	S	23	S

* Souche initiale

[◇] Souche isolée secondairement

 Souche sensible à l'antibiotique testé : S

 Souche de sensibilité intermédiaire à l'antibiotique testé : I

 Souche résistante à l'antibiotique testé : R

Tableau IX : Concentrations minimales inhibitrices (en µg/mL) pour 6 couples de souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de la flore digestive de patients hospitalisés.

	Imipénème	Imipénème +cloxacilline*	Méropénème	Ceftazidime	Ceftazidime +cloxacilline*	Céfépime	Ticarcilline	Ciprofloxacine
B112	32	16	8	2	1	16	16	2
B131	4	1	2	1	1	16	16	2
CA483	4	1	8	4	4	32	32	0,5
CA501	32	4	16	4	4	32	64	0,5
C545	4	2	4	4	2	16	32	<0,25
C727	64	16	64	8	4	16	512	0,5
F758	4	1	1	16	4	64	>512	8
F912	32	4	32	16	4	16	>512	8
G803	4	2	16	16	1	8	64	8
G836	32	16	32	64	16	64	256	4
J3	32	16	8	2	1	16	16	2
J24	4	1	2	1	1	16	16	2
PAO1	2	0,5	2	1	1	2	16	0,25
ATCC27853	4	0,5	1	1	1	2	8	0,25

* concentration de 500 µg/mL.

- Souche sensible
- Souche intermédiaire
- Souche résistante

Toutes les souches ont chronologiquement évolué de la sensibilité vers la résistance à l'imipénème, à l'exception des patients B et J, pour lesquels la souche résistante a été isolée avant la souche sensible. Cette modification de sensibilité s'accompagnait ou non d'une variation de la sensibilité aux autres antibiotiques testés.

L'analyse des antibiotiques reçus par les patients, grâce au logiciel Epi Info®, a montré que tous les patients chez lesquels des mutants résistants avaient émergé *in vivo* avaient été traités par de l'imipénème dans l'intervalle de temps compris entre l'isolement de la souche sensible et celui de la souche résistante. En revanche, les patients B et J, pour lesquels la souche résistante a été isolée avant la souche sensible, n'avaient pas reçu d'imipénème durant leur hospitalisation (figure 19).

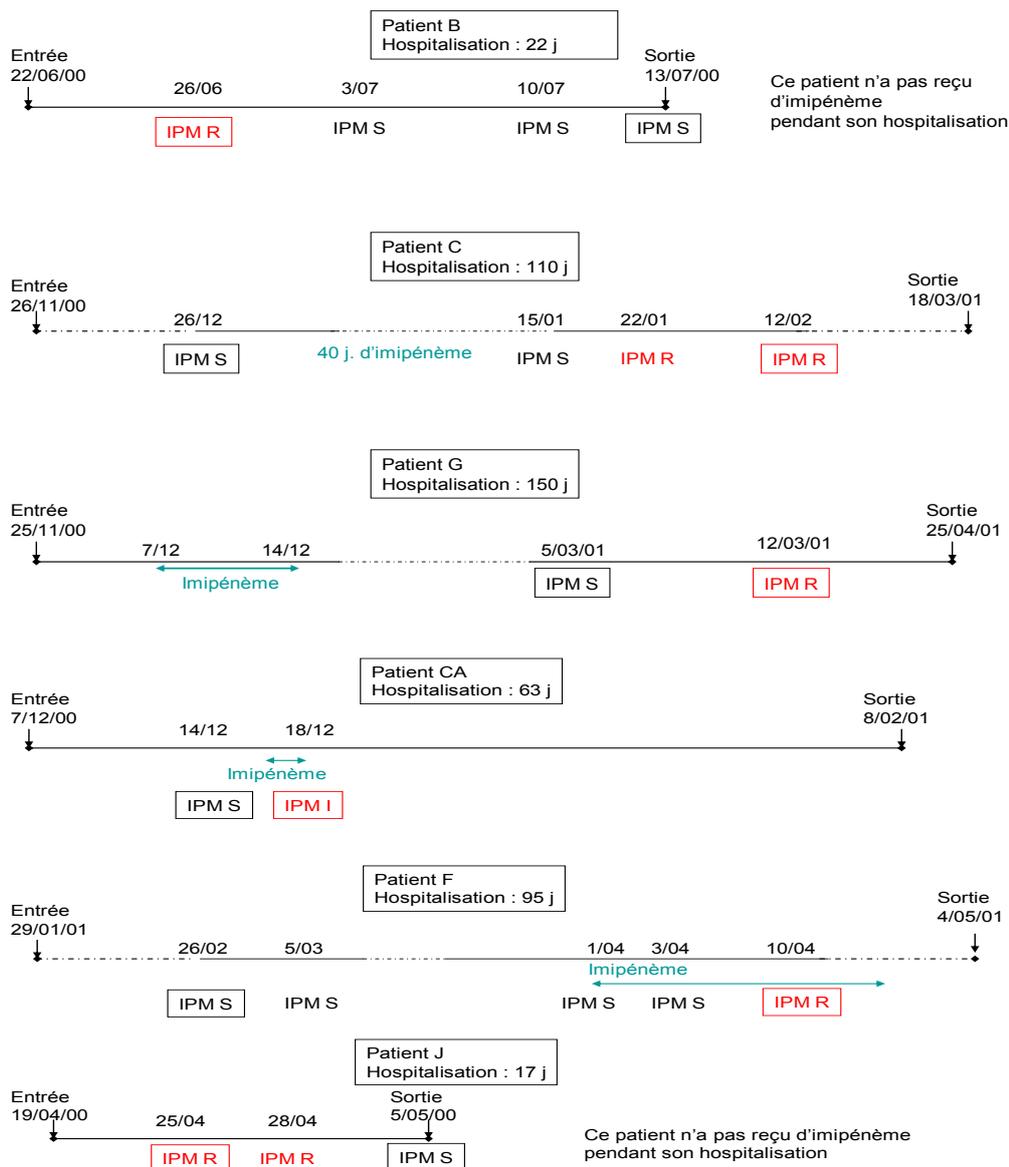


Figure 19 : Chronologie des isolations de souches de *Pseudomonas aeruginosa*, en cours d'hospitalisation et de traitement.

IPM S : Isolement d'une souche sensible à l'imipénème

IPM R : Isolement d'une souche résistante à l'imipénème

Le test à l'EDTA n'a détecté aucune souche productrice de métallo-enzyme, parmi les souches de sensibilité diminuée à l'imipénème.

2.2. Electrophorèse en champ pulsé

Les figures 20 et 21 représentent respectivement le gel d'électrophorèse en champ pulsé et le dendrogramme obtenu à l'aide du logiciel Gel Compar[®].

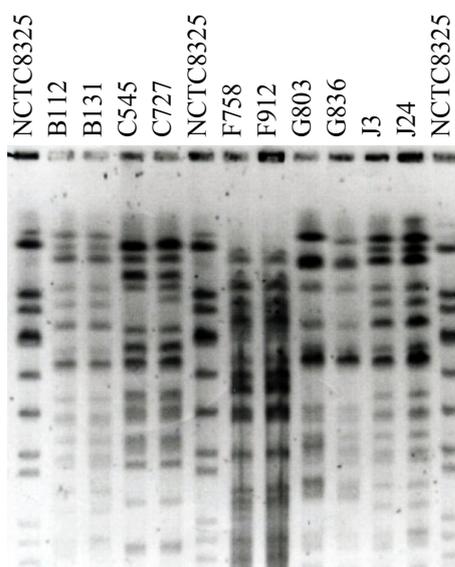


Figure 20 : Résultats d'électrophorèse en champ pulsé réalisée sur 10 souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

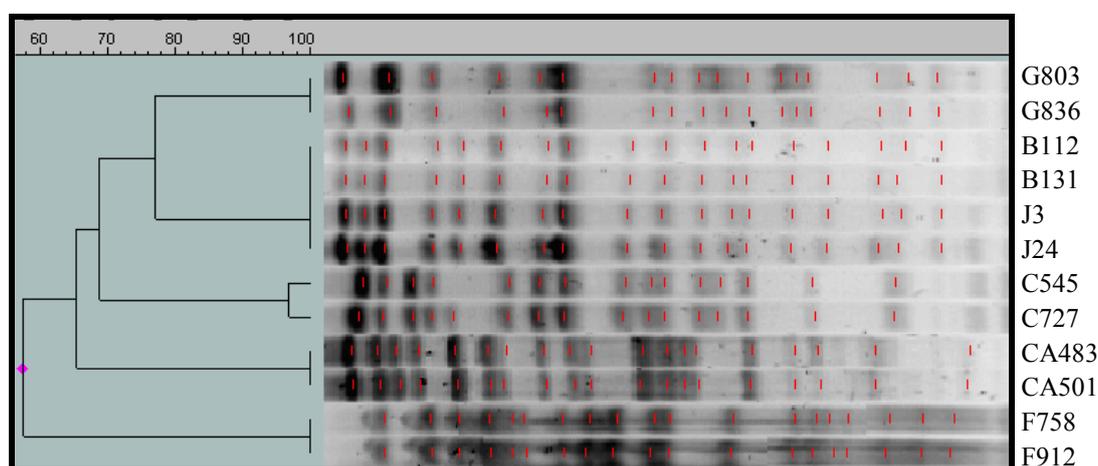


Figure 21 : Dendrogramme établi par le logiciel Gel Compar[®], à partir des résultats de l'électrophorèse en champ pulsé des 12 souches de *Pseudomonas aeruginosa* étudiées.

Les profils de restriction de l'ADN total, obtenus par électrophorèse en champ pulsé, étaient identiques pour les 2 souches d'un même couple, sauf pour le patient C. En effet, la souche C727 présentait un événement génétique supplémentaire, par rapport à la souche C545

initiale. Cependant, il existait plus de 97 % d'homologie entre les 2 profils ce qui, compte tenu des données épidémiologiques (ces 2 bactéries ont été isolées à 2 mois d'intervalle, chez le même patient), nous a cependant permis de considérer ces souches comme étroitement liées génétiquement, d'après les critères de Tenover (Tenover *et al.*, 1995).

Les souches de patients différents présentaient des pulsotypes différents entre eux, à l'exception des isolats des patients B et J.

2.3. PCR et séquençage du gène *oprD*

Tous les produits de PCR présentaient la taille attendue, à l'exception de l'amplicon de la première partie du gène de la souche CA501, qui s'est avéré plus petit d'environ 250 pb (figure 22).

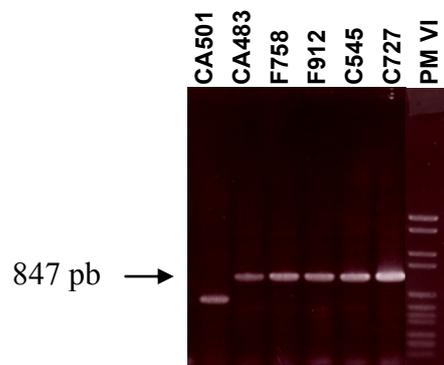


Figure 22 : Photographie du résultat de la PCR *oprD* FG, réalisée pour 3 couples de souches de *Pseudomonas aeruginosa* et mettant en évidence une délétion chez la souche CA501.

La comparaison des séquences du gène *oprD* des souches étudiées avec celle de la souche sauvage PAO1 a révélé le grand polymorphisme de ce gène. Les substitutions de nucléotides étaient nombreuses ; seule une souche possédait exactement la même séquence que celle de la souche PAO1. Là encore, la plupart des mutations retrouvées correspondaient à des mutations silencieuses (elles portaient le plus souvent sur le dernier nucléotide du codon) ; d'autres, au contraire, entraînaient un changement de l'acide aminé codé. En particulier, nous avons retrouvé, chez certaines souches, une variation de 33 nucléotides consécutifs, conduisant à la délétion de 2 acides aminés et à la substitution de 9 autres (figure 23)

C545	YINGKIDIDGTKVDSSSS-YAGL	YGEDGKHHETNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRA	418
G803	YINGKIDIDGTKVDSSSS-YAGL	YGEDGKHHETNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRA	418
B131	YINGKIDIDGTKVDSSSS-YAGL	YGEDGKHHETNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRA	418
J24	YINGKIDIDGTKVDSSSS-YAGL	YGEDGKHHETNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRA	418
F758	YINGKIDIDGTKVDSSSS-YAGL	YGEDGKHHETNLEAKYVVQAGPAKDLSFRIRQAWHRA	418
PAO1	YINGKIDIDGTKMSDNNVGYKNYGYGEDGKHHETNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRA		420
Ca483	YINGKIDIDGTKMSDNNVGYKNYGYGEDGKHHETNLEAKYVVQSGPAKDLSFRIRQAWHRA		420

Figure 23 : Variation dans la boucle externe L7 observée chez 5 souches de *Pseudomonas aeruginosa* sensibles à l'imipénème par rapport à la souche de référence PAO1.

Nous avons considéré que les variations génétiques retrouvées aussi bien chez les souches sensibles à l'imipénème que chez les souches résistantes n'intervenaient pas dans la résistance. Grâce au logiciel d'alignement multiple ClustalW, nous avons donc comparé les séquences du gène *oprD*, entre les souches d'un même couple.

Pour chaque patient, nous avons pu mettre en évidence un événement génétique présent chez la souche résistante et absent chez la souche sensible, entraînant l'apparition d'une protéine tronquée ou modifiée ou bien l'absence complète de protéine (tableau X) :

Souches IPM S / IPM R	Mutations du gène <i>oprD</i> chez les souches IPM R	Modifications de OprD chez les souches IPM R
B131 ² / B112*	Substitution G-A au nucléotide 830	Terminaison prématurée à l'acide aminé 277
CA483*/ CA501 ²	Délétion de 262 pb. 115 pb. en amont du codon start	Absence de OprD
C545*/ C727 ²	Substitution C-T au nucléotide 55	Terminaison prématurée à l'acide aminé 19
F758*/ F912 ²	Insertion de 2 pb.	Décalage du cadre de lecture à partir de l'acide aminé 290
G803*/ G836 ²	Délétion de 1 pb. au nucléotide 435	Décalage du cadre de lecture à partir de l'acide aminé 146
J24 ² /J3*	Substitution G-A au nucléotide 830	Terminaison prématurée à l'acide aminé 277

* souche initiale

² seconde souche

IPM : imipénème

Tableau X : Résultats du séquençage du gène *oprD* pour les 6 couples de souches de *Pseudomonas aeruginosa* étudiés.

- pour 3 patients, une substitution d'un nucléotide entraînait l'apparition prématurée d'un codon-stop (substitution Q19X pour le patient C et W277X pour les patients B et J) et conduisait donc à une protéine tronquée ;

- pour le patient CA, une délétion de 262 pb (figure 24, page suivante) a été retrouvée, ce qui explique la plus petite taille du fragment de PCR obtenu sur la première partie du gène ; cette délétion couvrait la région promotrice du gène.

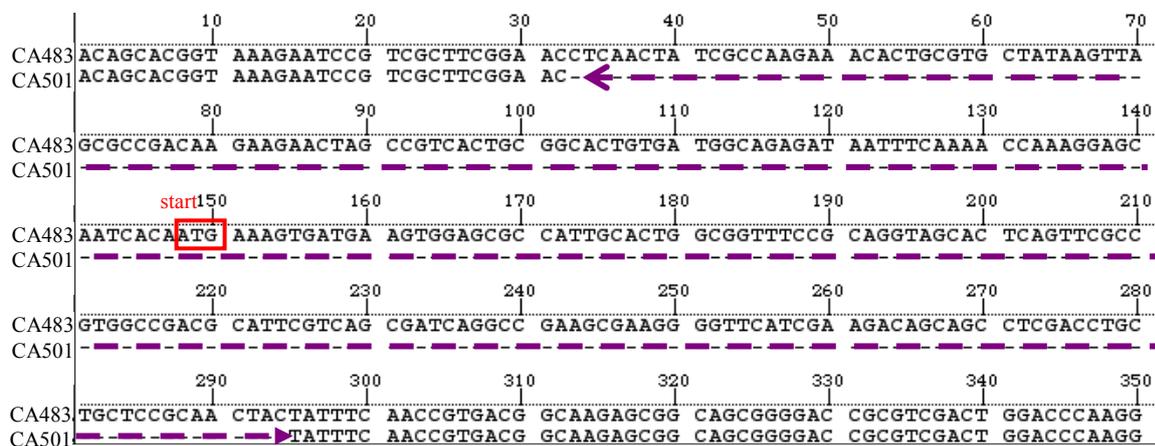


Figure 24 : Séquence partielle du gène *oprD* de la souche CA501, révélant une délétion de 262 pb.

- pour le patient G, la délétion d'un nucléotide conduisait à un décalage du cadre de lecture, à partir de l'acide aminé 146 ; la protéine codée se trouve ainsi profondément modifiée ;

- enfin, pour le patient F, l'insertion de 2 pb. était responsable du décalage du cadre de lecture, à partir de l'acide aminé 290.

Une modification dans le gène *oprD*, expliquant la résistance aux carbapénèmes, a donc été trouvée pour chaque couple de souches étudié. Toutefois, nous avons souhaité savoir si d'autres mécanismes étaient également impliqués, notamment au niveau de la transcription de *oprD* et de l'hyperexpression de systèmes d'efflux.

2.4. PCR après transcription inverse (RT-PCR) des gènes *oprD*, *ampC*, *mexA*, *mexE*

2.4.1. RT-PCR conventionnelle

L'efficacité du traitement des ARN à la DNase a été confirmée par l'absence d'amplicon, après PCR du gène *rpsL*, sur les échantillons n'ayant pas subi de transcription inverse.

Pour toutes les souches, dont la souche témoin PAO1, l'amplicon obtenu pour le gène *rpsL* présentait la même intensité, assurant que nous avons effectivement travaillé sur la même quantité d'ARN initiale. Ainsi, nous avons pu comparer la quantité d'amplicon obtenu par RT-PCR, entre les souches sensibles et les souches résistantes d'un même couple, mais aussi entre les souches étudiées et la souche de référence PAO1.

Pour le gène *oprD*, la RT-PCR conventionnelle n'a pas montré de différence du niveau de transcription du gène, entre les souches sensibles et les souches résistantes d'un même couple, à l'exception du patient CA, pour lequel aucun amplicon n'était détectable pour la souche résistante CA501 (figure 25a, page suivante). Ceci était attendu, du fait de la large délétion

englobant le promoteur et le codon-start du gène. De la même façon, il ne semble pas y avoir de variation dans la quantité d'ARNm spécifique du gène *oprD*, entre les souches étudiées et la souche PAO1.

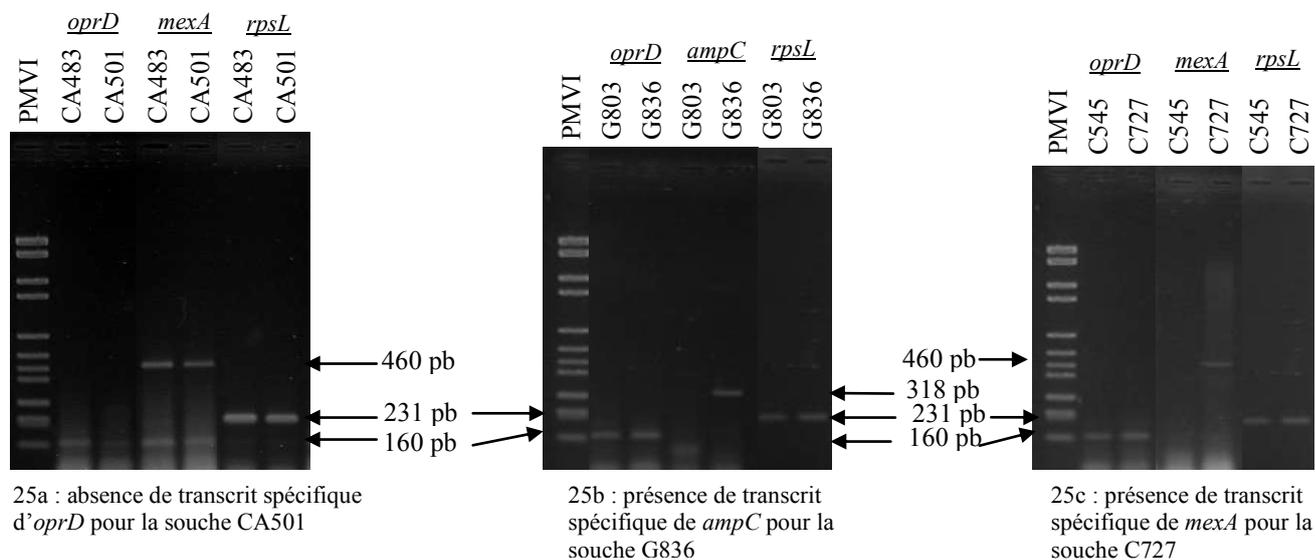


Figure 25 : Photographies des résultats de la RT-PCR pour les gènes *oprD*, *mexA*, *ampC* et pour le gène de référence *rpsL*

Pour les gènes codant pour les protéines de fusion membranaires MexA et MexE, éléments respectifs des systèmes d'efflux MexAB-OprM et MexEF-OprN, la RT-PCR, dans les conditions utilisées, n'a pas permis la mise en évidence de transcrits chez la souche témoin PAO1. Il faut signaler que nous avons volontairement travaillé dans des conditions de stringence élevée, afin d'éviter la présence de bandes parasites et de pouvoir ensuite adapter la technique en temps réel, en utilisant du SYBR Green. Cependant, nous avons pu mettre en évidence des ARNm de *mexA* chez les 2 souches des patients CA (figure 25a) et F, ainsi que chez la souche C727 (figure 25c). Chez ces souches, le niveau de transcription de *mexA* étant supérieur à celui de PAO1, et concordant avec des CMI de ticarcilline élevées, nous en avons déduit qu'elles hyperexprimaient le système d'efflux MexAB-OprM.

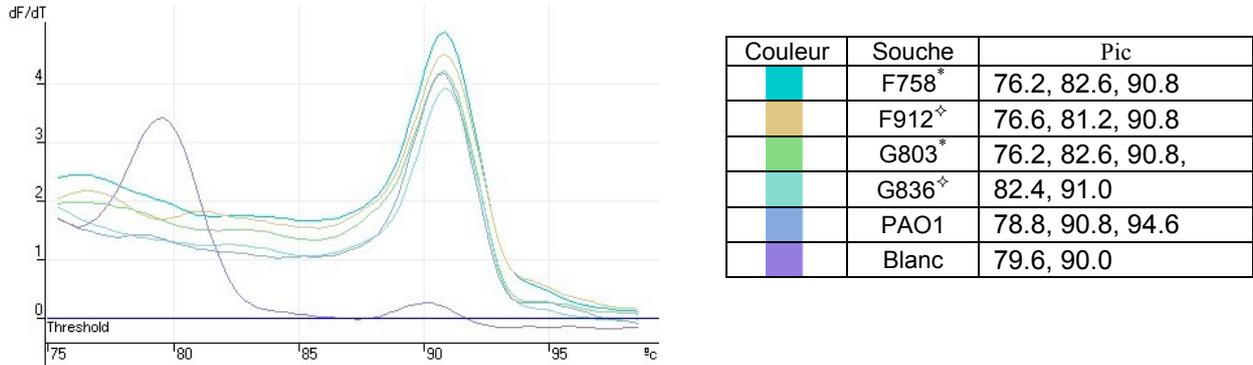
Pour *mexE*, en revanche, nous ne sommes pas parvenus à mettre au point la RT-PCR : les fragments obtenus pour certaines souches n'avaient pas la taille attendue et, comme nous ne disposons pas de souche témoin positif hyperexprimant ce système, nous avons considéré qu'il s'agissait de bandes parasites.

Pour le gène *ampC*, il n'a pas été possible de détecter de transcrits chez la souche PAO1, mais nous en avons mis en évidence chez la souche G836 (figure 25b). Ceci est cohérent avec une augmentation de la CMI de ceftazidime chez cet isolat.

2.4.2. RT-PCR en temps réel

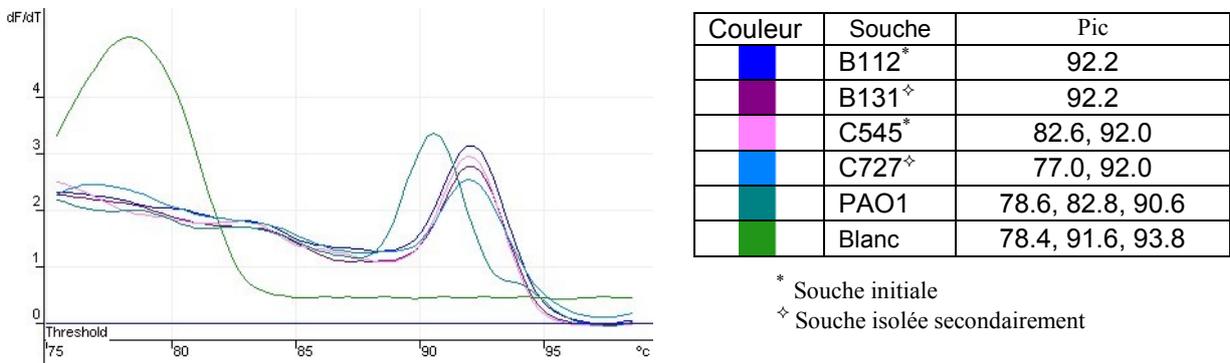
Pour le gène de référence *rpsL*, les courbes de fusion ont montré que les amplicons présentaient bien une unique température de fusion, différente de celle des dimères d'amorces (figure 26).

Figure 26 : Exemples de courbes de fusion obtenues par RT-PCR en temps réel pour les amplicons *rpsL*.



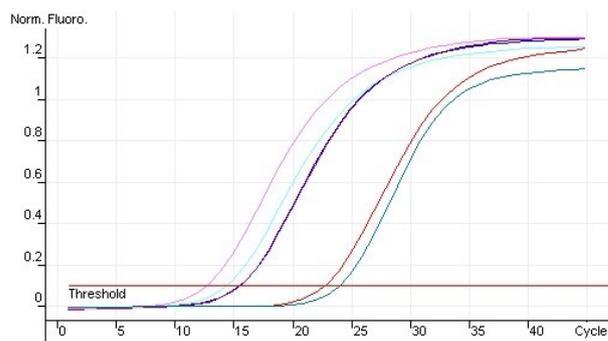
Pour le gène *oprD*, les produits de PCR avaient des températures de fusion variant de quelques degrés (figure 27), probablement en rapport avec le polymorphisme de ce gène.

Figure 27 : Exemples de courbes de fusion obtenues par RT-PCR en temps réel pour les amplicons *oprD* PG.



En rapportant le niveau d'expression du gène *oprD* (figure 28, page suivante) à celui du gène de référence *rpsL* (figure 29, page suivante), nous n'avons pas mis en évidence de différence de la quantité d'ARNm spécifiques de *oprD* produits, entre les souches sensibles et les souches résistantes de chacun des 3 couples étudiés. Ces données ont donc confirmé les résultats obtenus en RT-PCR conventionnelle. D'autres essais seraient nécessaires pour optimiser cette technique et confirmer les premiers résultats.

Figure 28 : Exemples de courbes de fluorescence obtenues pour la RT-PCR *oprD* PG.

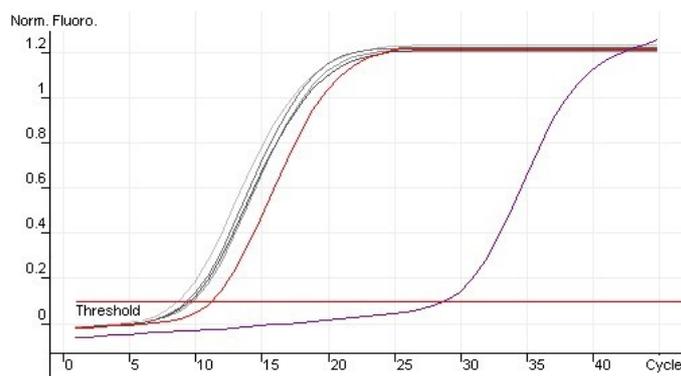


Couleur	Souche	Ct (cycle seuil)
	CA483 *	14.58
	CA501 \diamond	22.91
	J3 \diamond	15.69
	J24 *	15.64
	PAO1	12.88
	Blanc	24.17

* Souche initiale

\diamond Souche isolée secondairement

Figure 29 : Exemples de courbes de fluorescence obtenues pour la RT-PCR *rpsL*.



Couleur	Souche	Ct
	F758 *	8.89
	F912 \diamond	9.94
	G803 *	9.56
	G836 \diamond	9.75
	PAO1	11.38
	B	29.02

* Souche initiale

\diamond Souche isolée secondairement

2.5. Séquençage du gène *mexR* chez les souches hyperexprimant le système d'efflux MexAB-OprM

La RT-PCR a mis en évidence 5 souches hyperexprimant le système d'efflux MexAB-OprM.

Pour 3 d'entre elles, l'analyse par séquençage du gène *mexR* n'a décelé aucune mutation dans ce gène, par rapport à la séquence de la souche PAO1.

En revanche, pour les 2 souches du patient F, nous avons pu mettre en évidence une substitution de 1 nucléotide (T→A), conduisant au remplacement de la valine en position 126 par un résidu glutamate.

Le tableau XI, page suivante, récapitule l'ensemble des résultats de séquençage et de RT-PCR.

Tableau XI : Récapitulatif des résultats de CMI, de séquençage des gènes *oprD* et *mexR* et de RT-PCR des gènes *oprD*, *mexA* et *ampC* pour les 6 couples de souches de *Pseudomonas aeruginosa* étudiés.

	CMI (µg/mL)					Mutation dans le gène <i>oprD</i>	Hyperexpression de MexAB-OprM	Hyperexpression de AmpC	Mutation dans le gène <i>mexR</i>
	Imipénème	Méropénème	Ticarcilline	Ceftazidime	Ciprofloxacine				
B112*	32	8	16	2	2	substitution	non	non	
B131 [◇]	4	2	16	1	2		non	non	
CA483*	4	8	32	4	0,5		oui	non	non
CA501 [◇]	32	16	64	4	0,5	délétion	oui	non	non
C545*	4	4	32	4	<0,25		non	non	
C727 [◇]	64	64	512	8	0,5	substitution	oui	non	non
F758*	4	1	>512	16	8		oui	non	V126E
F912 [◇]	32	32	>512	16	8	insertion	oui	non	V126E
G803*	4	16	64	16	8		non	non	
G836 [◇]	32	32	256	64	4	délétion	non	oui	
J3*	32	8	16	2	2	substitution	non	non	
J24 [◇]	4	2	16	1	2		non	non	

* Souche initiale

[◇] Souche isolée secondairement

2.6. Evaluation de la fréquence de mutation *in vitro*

Nous avons enfin évalué la fréquence de mutation *in vitro* pour la rifampicine (300 µg/mL) et l'imipénème (8 µg/mL), des souches B et J qui présentaient la même mutation du gène *oprD* que celle décrite par Oliver *et al.*, en 2000. Parallèlement, nous avons aussi testé la souche C, par comparaison.

Les figures 30 et 31 présentent les résultats obtenus lors de 3 expériences successives.

Selon les données de la littérature, une souche doit être considérée comme hypermutatrice si son taux de mutation est 20 fois supérieur à celui de la souche témoin PAO1.

Concernant les fréquences de mutations pour la rifampicine, les valeurs obtenues pour les souches B et C étaient peu différentes de celles retrouvées pour PAO1 ($\sim 10^{-8}$) ; nous ne sommes donc pas en présence de souches hypermutatrices.

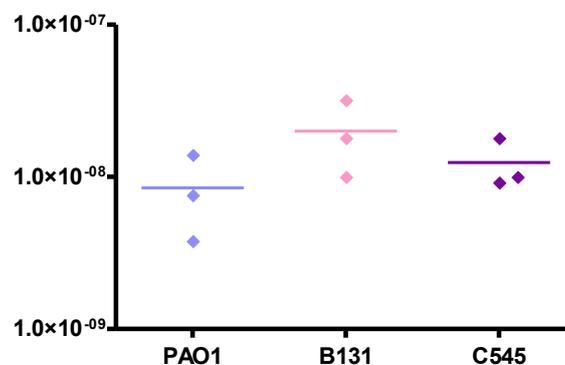


Figure 30 : Fréquence de mutation pour la rifampicine de 2 souches de *Pseudomonas aeruginosa* et de la souche de référence PAO1

En revanche, si l'on s'intéresse aux taux de mutation pour l'imipénème, les chiffres retrouvés pour les souches B et C étaient nettement plus élevés que ceux de PAO1 (augmentation d'un facteur 24 pour la souche B, d'un facteur 42 pour la souche C).

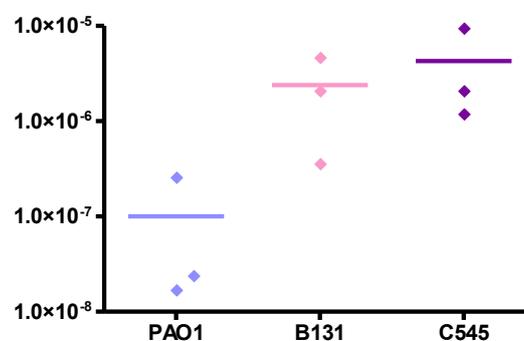


Figure 31 : Fréquence de mutation pour l'imipénème de 2 souches de *Pseudomonas aeruginosa* et de la souche de référence PAO1

Si nous ne pouvons pas considérer les souches B et C comme des souches hypermutatrices, il est cependant intéressant de noter la facilité avec laquelle elles sont capables de muter, pour augmenter leur résistance à l'imipénème. Certes, ces expériences sont assez délicates à interpréter, mais l'écart observé entre les 2 antibiotiques est tel qu'il peut difficilement être remis en question et ce d'autant plus que, sur 3 expériences indépendantes, nous avons retrouvé le même ratio entre les fréquences de mutation des souches B et C et celles de la souche de référence PAO1.

3. Etude de souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées à partir d'urines sur sondes à demeure

3.1. Dépistage de souches résistantes aux carbapénèmes sans production de carbapénémase.

En 2003, 2003 prélèvements d'urines sur sonde à demeure, correspondant à 1466 patients différents ont été traités au laboratoire de Bactériologie du CHU de Nantes. Pour 68 de ces patients (4,6%), une souche de *P. aeruginosa* a été isolée, dont 8 (11,7%) de sensibilité diminuée aux carbapénèmes.

Parmi ces 8 souches, 2 n'ont pu être remises en culture à partir de la souche collection et 2 étaient productrices de la métallo-enzyme VIM-2. Il restait donc seulement 4 souches remplissant les critères de sélection (figure 32). C'est pourquoi nous avons étendu notre investigation aux souches isolées en 2004.

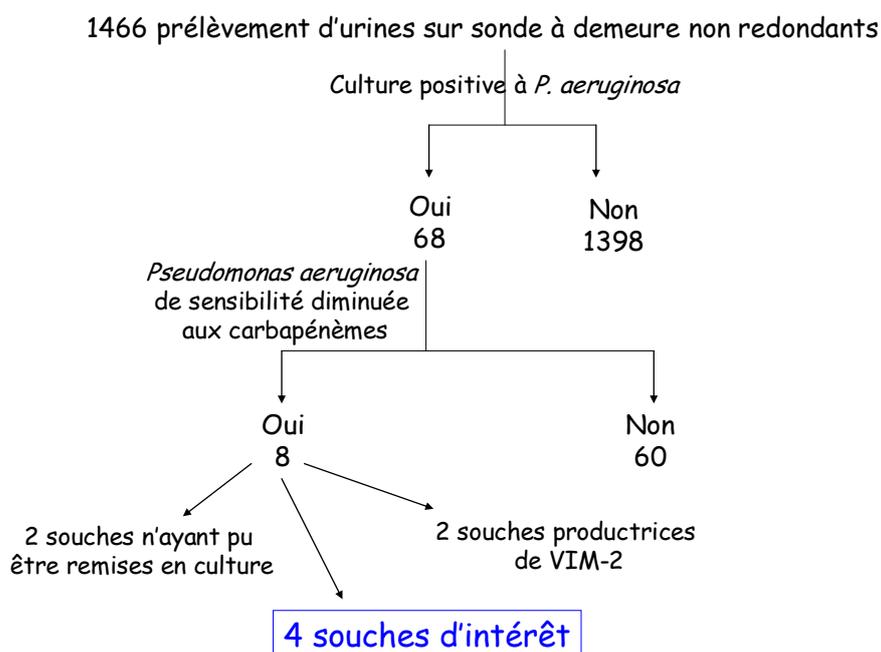


Figure 32 : Schéma récapitulant la sélection des souches de *P. aeruginosa* pour l'année 2003.

En 2004, sur les 1625 prélèvements d'urines sur sonde à demeure (non redondants), 64 étaient positifs à *P. aeruginosa*, dont 14 avec des souches résistantes à l'imipénème (figure 33, page suivante). Parmi ces 14 souches, 2 présentaient un test à l'EDTA positif, du fait de la production de la métallo- β -lactamase VIM-2.

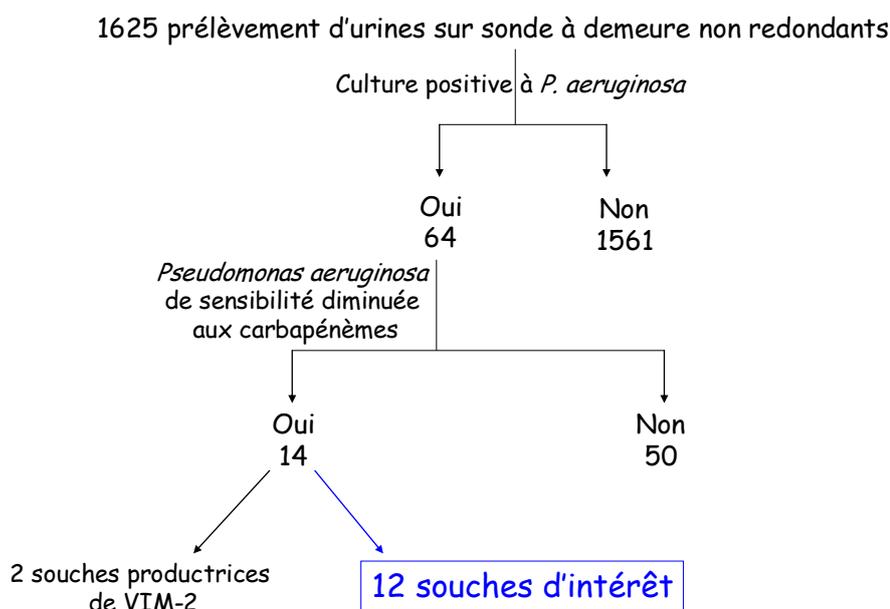


Figure 33 : Schéma récapitulant la sélection des souches de *P. aeruginosa* pour l'année 2004.

C'est donc à partir des 16 souches de 2003 et 2004 que nous avons cherché à évaluer l'impact du zinc *in vivo* dans la résistance aux carbapénèmes.

3.2. Sensibilité aux antibiotiques

Les concentrations minimales inhibitrices déterminées par dilution en milieu gélosé sont présentées dans le tableau XII.

Tableau XII : CMI obtenues pour les 16 souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées à partir d'urines sur sondes à demeure.

	CMI en µg/mL	
	Imipénème	Méropénème
U1	16	8
U2	32	32
U3	64	8
U4	64	64
U5	16	8
U6	32	16
U7	32	32
U8	64	64
U9	32	64
U10	64	64
U11	8	8
U12	64	64
U13	32	64
U14	32	32
U15	32	16
U16	64	64
PAO1	4	2

Toutes les souches sélectionnées présentaient effectivement une sensibilité réduite aux carbapénèmes.

3.3. Electrophorèse en champ pulsé

Plusieurs souches présentaient des pulsotypes identiques ou ne différant que par un à 3 segments et donc génétiquement liées selon les critères de Tenover (figure 34) :

- les souches U2, U4, U8, U10, U12, U14 et U15
- les souches U7, U9, U11

La souche U1 était bien distincte des autres souches analysées.

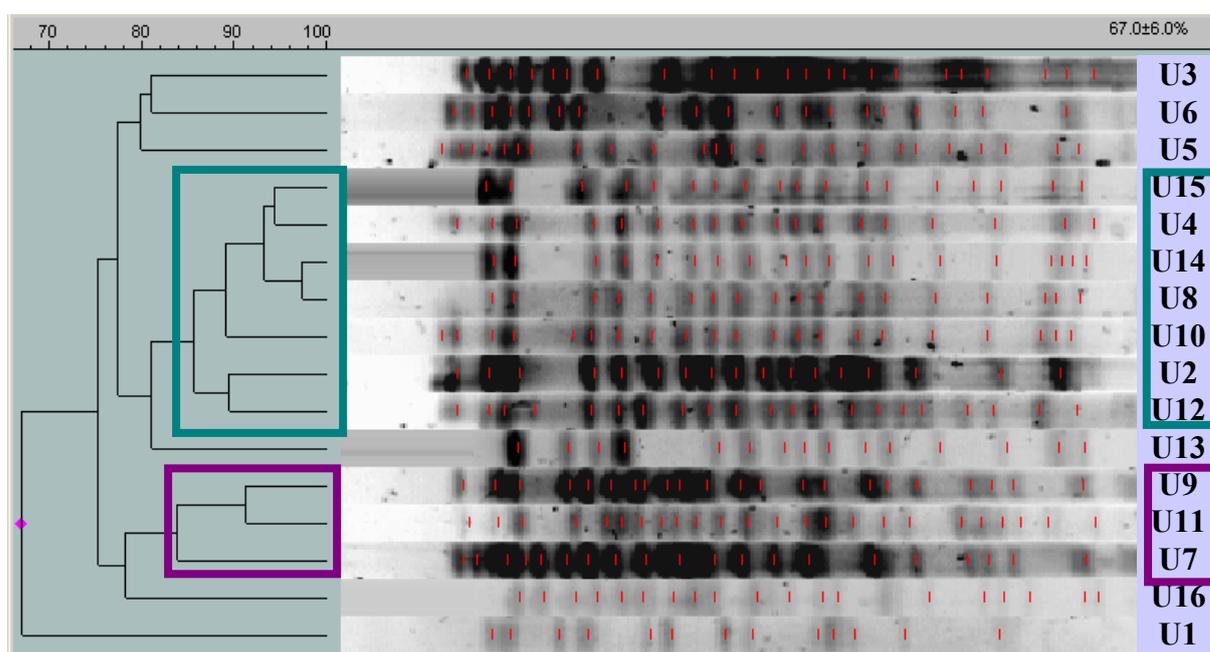


Figure 34 : Dendrogramme établi avec le logiciel Gel Compar® à partir des pulsotypes des 16 souches étudiées.

3.4. Séquençage du gène *czcS*

Le séquençage d'une portion du gène codant pour la protéine senseur du système à 2 composants CzcS/R n'a retrouvé la mutation V194L chez aucune des 16 souches étudiées. En revanche, pour la souche U3, la substitution d'une cytosine par une thymidine conduit à la substitution d'une proline par une leucine, en position 184.

3.5. Séquençage du gène *oprD*

L'amplification, par PCR, du gène *oprD* a conduit à des amplicons de la taille attendue, à l'exception de la souche U3, pour laquelle le fragment obtenu pour la première partie du gène présentait une taille d'environ 1400 pb. supplémentaires.

Pour les souches U7, U9 et U16, nous ne sommes pas parvenus à amplifier la seconde partie du gène. Le séquençage n'a donc pu être réalisé pour cette portion du gène.

Les résultats du séquençage pour les 16 souches étudiées sont présentés dans le tableau XIII, page suivante.

Comme pour les souches précédemment séquencées, un grand nombre de polymorphismes ont été mis en évidence. Pour la plupart des souches, des mutations conduisant à de profondes modifications de la porine OprD ont été décelées.

- Pour les souches U4, U8, U10, U13, U14 et U15, l'insertion d'une paire de bases conduit au **décalage du cadre de lecture** à partir de l'acide aminé 402.
- Pour les souches U2 et U12, la délétion d'une pb. conduit au **décalage du cadre de lecture** et à l'apparition d'un codon-stop prématuré, en position 109.
- Pour la souche U1, la délétion d'une pb. entraîne le **décalage du cadre de lecture** et l'apparition prématurée d'un codon stop, en position 184.
- Pour la souche U3, nous avons mis en évidence une **séquence d'insertion** de 1328 pb. au niveau du nucléotide 464. Cette séquence d'insertion est identique à ISPa1328, déjà décrite dans le gène *oprD* de *P. aeruginosa*. Elle présente la même orientation ; cependant sa position dans le gène est différente. ISPa1328 possède des séquences inversées répétées de 28 pb. à ses extrémités et code pour une protéine de 408 acides aminés, qui présente une homologie forte avec la transposase de *Pseudomonas resinovorans* (Wolter *et al.*, 2004). Au site de son insertion, il y a eu duplication de 2 séquences répétées directes (figure 35).



Figure 35 : Schéma de la séquence d'insertion ISPa1328

(la séquence d'insertion est représentée en **bleu** avec les séquences inversées répétées **soulignées**. Les séquences répétées directes sont figurées en **violet**).

- Pour la souche U5, une substitution d'une guanine par une thymine est responsable de l'**apparition d'un codon stop**, en position 182.
- Pour les souches U7, U9 et U16, le séquençage de la première partie du gène a mis en évidence 3 substitutions d'acides aminés.

Tableau XIII : Résultats du séquençage du gène *oprD* pour les 16 souches de *P. aeruginosa* isolées d'urines sur sonde à demeure

Positions et substitutions des acides aminés

	43	57	59	103	104	115	127	155	170	182	184	185	186	189	202	210	230	240	262	267	276	281	296	301	310	312	315	347	356	359	372	402	403	424	Evénement génétique												
PAO1	D	S	S	T	G	K	V	L	F	E	K	E	P	V	E	I	E	S	N	A	T	A	K	Q	R	G	A	L	T	V	M	Q	S	Q													
U1	N	E	R								R																								Délétion												
U2	N	E	R		A																														Délétion												
U3				S		T		IS																											Séquence d'insertion												
U4	N	E	R												Q	A	K	T	T	S			G	Q	E	G			L	V*	H'				Insertion												
U5	N	E	R								X																								Substitution												
U6	N	E	R												Q	A	K	T	T	S			G	Q	E	G			P	L	V*																
U7				S		T		L																																							
U8	N	E	R												Q	A	K	T	T	S			G	Q	E	G			L	V*	H'					Insertion											
U9				S		T		L																																							
U10	N	E	R												Q	A	K	T	T	S			G	Q	E	G			L	V*	H'					Insertion											
U11							L					Q	G	T	Q	A	K	T	T			A	G	Q	E	E	R	G	M		V*		A	E													
U12	N	E	R		A																															Délétion											
U13	N	E	R												Q	A	K	T	T	S			G	Q	E	G			L	V*	H'					Insertion											
U14	N	E	R												Q	A	K	T	T	S			G	Q	E	G			L	V*	H'					Insertion											
U15	N	E	R												Q	A	K	T	T	S			G	Q	E	G			L	V*	H'					Insertion											
U16				S		T		L																																							

R : Décalage du cadre de lecture à partir de l'acide aminé 184 conduisant à l'apparition prématurée d'un codon stop en position 229.
A : Décalage du cadre de lecture à partir de l'acide aminé 104 conduisant à l'apparition prématurée d'un codon stop en position 109.
IS : Séquence d'insertion ISpa1328
H' : Décalage du cadre de lecture à partir de l'acide aminé 402.
X : Codon-stop.
V* : Variation dans la boucle L7 de 33 nucléotides consécutifs, entraînant la délétion de 2 acides aminés et la substitution de 9 autres.
█ : Séquençage de la seconde partie du gène non réalisé.

Pour toutes ces souches, on peut vraisemblablement expliquer la résistance observée aux carbapénèmes par la présence d'une porine OprD très modifiée, voire absente (pour U3). Cependant, pour 2 souches (U6 et U11), aucun évènement génétique majeur n'était présent dans le gène *oprD*. Pour U6, on notait seulement (en plus des polymorphismes habituellement rencontrés) une substitution d'une thréonine (hydrophile) par une proline (hydrophobe), en position 356.

En confrontant les données épidémiologiques et moléculaires, pour ces 16 souches isolées de sonde à demeure (tableau XIV), on constate que celles qui présentent les mêmes altérations de la porine OprD, possédaient le plus souvent des pulsotypes voisins. C'est notamment le cas des souches U4, U8 et U10 qui possèdent toutes la même insertion dans le gène *oprD*, mais également des profils de restriction proches et qui ont été isolées dans le même service au cours d'une période de 5 mois. De la même façon, les souches U9 et U7 qui étaient proches en champ pulsé, ont été isolées dans le même service et possèdent vraisemblablement la même anomalie du gène *oprD*, empêchant l'amplification de la seconde partie de ce gène.

Souche	Modification du gène <i>oprD</i>	Service	Date de prélèvement
U3	Séquence d'insertion	Neuro-traumatologie	22/03/2004
U6	Substitution T356P	Réanimation médicale	04/06/2004
U5	Substitution E182X	Soins intensifs de Néonatalogie	12/05/2004
U15	Insertion conduisant à un décalage du cadre de lecture à partir de l'acide aminé 402	Clinique chirurgicale A	22/03/2003
U4			24/04/2004
U10		Médecine Interne	03/09/2004
U8			16/06/2004
U14		Urologie	05/02/2003
U2	Délétion conduisant à un codon-stop en position 109	Orthopédie	05/03/2004
U12		Brûlés	24/09/2004
U13	Insertion	Rhumatologie	03/01/2003
U11	Aucune	Clinique chirurgicale A	13/10/2004
U9	Pas d'amplification sur la 2 ^{ème} partie du gène		09/08/2004
U7		Brûlés	04/06/2004
U16			11/08/2003
U1	Délétion	Neuro-traumatologie	30/01/2004

Tableau XIV: Récapitulatif des modifications d'*oprD* et des données épidémiologiques pour 16 souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées d'urines sur sonde à demeure.

Discussion



Nous avons débuté notre étude par une analyse de 40 souches cliniques de *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes, isolées au CHU de Nantes en 2003. Dix-neuf d'entre elles provenaient du service d'hématologie clinique et produisaient une enzyme de type VIM-2, ayant fait l'objet d'études antérieures. Le principal mécanisme de résistance non enzymatique à l'imipénème chez *P. aeruginosa* étant la perte ou la réduction d'expression de la porine OprD, nous nous sommes alors intéressés, chez les autres souches, au gène codant pour cette protéine. Le séquençage de ce gène a montré un nombre important de mutations dont le véritable rôle dans la résistance aux carbapénèmes s'est ainsi avéré délicat à préciser.

Nous avons donc préféré poursuivre notre étude sur des souches de *P. aeruginosa* de colonisation digestive, issues d'un protocole réalisé entre avril 2000 et avril 2002. Cela nous a permis d'étudier une souche résistante et une souche sensible à l'imipénème pour 6 patients, après nous être assurés, par électrophorèse en champ pulsé, que les souches d'un même patient présentaient bien le même pulsotype. Il devenait alors plus aisé d'évaluer l'impact des variations du gène *oprD*, en comparant les mutations entre les souches d'un même couple. Outre l'avantage de travailler dans un environnement génétique défini, un des intérêts non négligeable de cette deuxième série de souches a été de disposer, pour chaque patient, des traitements antibiotiques reçus pendant l'hospitalisation et de pouvoir ainsi apprécier leur incidence éventuelle dans l'émergence de mutants résistants.

Le séquençage du gène *oprD* a détecté de nombreuses substitutions nucléotidiques, par rapport à la séquence de la souche de référence PAO1 (disponible sur www.pseudomonas.com), aussi bien chez les souches sensibles que chez les souches résistantes, attestant du grand polymorphisme de ce gène, déjà souligné par Pirnay *et al.*, lors de l'analyse du gène *oprD* de 55 isolats cliniques et environnementaux. La plupart des changements d'acides aminés constatés étaient positionnés hors des boucles externes L2 et L3, considérées comme responsables de la fixation et donc de la pénétration intracellulaire de l'imipénème *via* OprD. Ceci permet d'expliquer pourquoi ces modifications ne semblaient pas affecter la sensibilité aux carbapénèmes. La boucle externe L7 présentait, chez certaines souches, une structure de type mosaïque, témoin d'une probable recombinaison entre des souches de *P. aeruginosa*, de *P. fluorescens* et de *P. syringae* (Pirnay *et al.*, 2002). Cette structure particulière, entraînant la délétion de 2 acides aminés et la substitution de 9 autres, a été rattachée à une sensibilité accrue au méropénème (Epp *et al.*, 2001). Pour ce qui nous concerne, nous n'avons pas constaté de différence de sensibilité au méropénème, entre les souches possédant la boucle L7 native et celles comportant une structure modifiée.

Pour toutes les souches résistantes ayant émergé *in vivo*, nous avons détecté, dans le gène *oprD*, des mutations conduisant à la formation d'une porine OprD tronquée ou modifiée, ou bien à l'absence de la protéine. Là encore, la variété des mutations retrouvées est apparue

remarquable, tant par la nature des événements génétiques en cause (délétion, insertion, substitution), que par la localisation des sites mutés. D'autres études l'ont également rapporté (Amin *et al.*, 2005; Pirnay *et al.*, 2002) et certaines des modifications génétiques que nous avons retrouvées ont été précédemment décrites notamment la mutation W277X.

Toutes les mutations observées, aussi bien dans notre étude que dans la littérature, entraînent des modifications majeures de la porine OprD

Les mutations relevées au niveau du gène *oprD* entraînaient une augmentation d'un facteur 8 des CMI d'imipénème et d'un facteur 4 et pour les CMI de méropénème, par rapport à la souche sensible dépourvue de la mutation, mais il ne semble pas exister de relation entre le type de mutation observée et le niveau de résistance.

Après avoir apprécié l'impact des modifications structurales de OprD, nous avons souhaité déterminer si des mécanismes de régulation transcriptionnelle du gène *oprD* étaient également impliqués. Nous avons donc développé une technique de PCR après transcription inverse (RT-PCR), pour étudier la quantité de transcrits spécifiques du gène *oprD* produits. Afin d'assurer la qualité des résultats, il a été nécessaire de respecter un certain nombre de précautions. L'extraction des ARN devait se faire dans des conditions parfaitement standardisées (milieu de culture, densité de l'inoculum, phase exponentielle de croissance). En raison de la durée de vie courte des ARNm bactériens ($T_{1/2} < 1 \text{ min}30$) et de leur sensibilité aux RNases, l'extraction a dû être effectuée rapidement et les étapes ultérieures de manipulation réalisées dans de la glace et en présence d'inhibiteur de RNase. Enfin, le traitement des échantillons par la DNase a permis d'éliminer tout ADN résiduel qui viendrait fausser l'interprétation des résultats. De nombreux essais ont été nécessaires, afin d'optimiser les différentes conditions utilisées.

L'analyse, par RT-PCR conventionnelle, du niveau d'expression du gène *oprD* n'a pas montré de différence importante de la quantité d'ARNm spécifiques de ce gène entre les souches sensibles et les souches résistantes, contrairement à ce qui avait été décrit par Pirnay *et al.* et El Amin *et al.* Cependant, dans la mesure où la porine codée est déjà non fonctionnelle, du fait de sa structure, il n'est pas fondamentalement surprenant de constater l'absence de phénomène de régulation complémentaire au niveau de la transcription du gène concerné, qui ne pourrait qu'avoir un effet limité. Les résultats obtenus secondairement, après mise au point de la RT-PCR en temps réel, ont confirmé ces données. Il semble cependant exister une différence limitée du niveau de transcription du gène *oprD*, entre les souches cliniques et la souche de référence PAO1, mais elle concerne autant les souches sensibles que celles résistantes aux carbapénèmes.

Les antibiogrammes observés évoquant la présence de mécanismes de résistance supplémentaires, notamment à l'égard d'autres β -lactamines, nous avons ensuite recherché

leur impact sur la sensibilité aux carbapénèmes. Compte tenu de la co-régulation de l'opéron *mexEF-oprN* et de *oprD*, ainsi que de l'implication de MexAB-OprM dans la résistance au méropénème, nous avons recherché, par RT-PCR, les souches hyperexprimant ces systèmes.

L'hyperexpression du système MexAB-OprM a été retrouvée chez 3 des souches résistantes, en concordance avec des CMI ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ pour la ticarcilline. Ce mécanisme s'accompagnait d'une augmentation des CMI de méropénème d'un facteur 2 à 8, sans modification des CMI d'imipénème, qui n'est pas un substrat de cette pompe d'efflux. Ces résultats confirment ceux retrouvés par Pai *et al.*

Pour ces souches, nous avons recherché, par séquençage, une mutation dans le gène *mexR*, pour expliquer le phénotype observé. Les séquences de *mexR* retrouvées étaient identiques à celles de PAO1, à l'exception des souches du patient F, qui présentaient la mutation V126E. Cette mutation n'est cependant pas considérée comme responsable de l'hyperexpression de MexAB-OprM, puisqu'elle a aussi été détectée chez des souches présentant un niveau d'expression normal de ce système d'efflux (Ziha-Zarifi *et al.*, 1999). Les isolats étudiés qui hyperexprimaient MexAB-OprM ne présentant pas de mutation significative dans *mexR*, il faudrait donc rechercher une autre explication, telles que des mutations dans les gènes *PA3721* et *PA3574*, afin de déterminer s'il s'agit respectivement de mutants *nalC* ou *nalD*.

Nous avons aussi étudié l'effet de la dépression de la céphalosporinase AmpC, un des mécanismes de résistance le plus fréquemment développé par *P. aeruginosa*. Une seule de nos souches hyperproduisait AmpC ; elle se caractérisait par sa résistance à la ceftazidime (CMI = 64 $\mu\text{g/mL}$). En revanche, nous n'avons pas noté de modification des CMI d'imipénème contrairement à ce qui avait été précédemment décrit (Pai *et al.*, 2001). Il est toutefois difficile d'interpréter le rôle réel de la dépression de AmpC, à partir d'une unique souche.

La description récente de l'implication du zinc dans la résistance *in vitro* à l'imipénème, et le fait que les sondes urinaires en latex siliconé soient capables de relarguer cet élément (Conejo *et al.*, 2003), nous ont incité à explorer l'impact réel de ce mécanisme *in vivo*. Le séquençage d'une partie du gène codant pour la protéine senseur du système à 2 composants CzcS/R a donc été réalisé, pour 16 souches isolées d'urines sur sonde à demeure. Chez aucune de ces souches, nous n'avons mis en évidence les mutations V194L et G197D qui avaient été précédemment décrites (Perron *et al.*, 2004). Il semble donc, qu'*in vivo*, le rôle du zinc et du système CzcS/R soit pour le moins limité voire inexistant. Ils serait néanmoins intéressant d'étendre cette investigation à un panel de souches plus large et de réaliser le séquençage de l'intégralité du gène *czcS*, pour s'en assurer. Pour ces 16 dernières souches, le séquençage du gène *oprD* a retrouvé, pour 14 d'entre elles, des événements génétiques variés

conduisant à une modification importante de la porine codée. Nous avons notamment mis en évidence, chez une des souches, la présence de la séquence d'insertion ISPa1328 qui avait déjà été décrite (Amin *et al.*, 2005; Wolter *et al.*, 2004), mais jamais à cet emplacement dans le gène. La participation des séquences d'insertion dans la résistance aux carbapénèmes semble donc moindre que ce que rapportaient Wolter *et al.* qui retrouvaient ce mécanisme chez 5 des 7 souches qu'ils avaient étudiées.

Nos travaux ont donc montré que le principal mécanisme de résistance non enzymatique aux carbapénèmes développé par *P. aeruginosa* est la modification structurale de la porine OprD, porte d'entrée de ces antibiotiques dans la bactérie, l'hyperexpression du système d'efflux MexAB-OprM pouvant ensuite venir potentialiser la résistance au méropénème.

Une des mutations retrouvées lors de notre étude ayant antérieurement été décrite chez une souche hypermutable, nous avons évalué la fréquence de mutation de la souche porteuse de cette mutation et d'une autre souche, utilisée en parallèle, à titre de comparaison. Nous avons réalisé des manipulations délicates du point de vue technique (fabrication d'un grand nombre de géloses additionnées d'antibiotiques, dilutions successives des cultures bactériennes, dénombrement des mutants...) comme du point de vue de l'interprétation (problème de répétabilité des expériences).

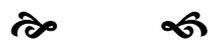
Les taux de mutation retrouvés pour la rifampicine, voisins de ceux de la souche de référence PAO1, ont conduit à considérer que nous n'étions pas en présence de bactéries hypermutatrices. On peut d'ailleurs remarquer que les 2 souches testées ne provenaient pas de patients atteints de mucoviscidose, alors qu'il a clairement été établi que les bactéries hypermutables sont très rarement retrouvées en dehors de ce contexte (Oliver *et al.*, 2000). Ainsi, en 2004, une étude portant sur 103 souches isolées en réanimation médicale a retrouvé une seule souche hypermutatrice (Gutierrez *et al.*, 2004). En revanche, nous avons été étonnés par les taux de mutation très élevés, relevés pour l'imipénème : de 24 à 42 fois ceux de la souche PAO1 ! Les 2 souches testées présentaient le même polymorphisme du gène *oprD*, que nous avons également retrouvé chez la grande majorité des souches sensibles de notre étude. On peut envisager un biais lié à l'épidémiologie des souches qui ont toutes été isolées pendant une période de temps limitée, chez des patients hospitalisés dans des services définis. Cependant, on ne peut exclure que ces souches présentent une capacité plus grande à évoluer vers la résistance à l'imipénème, quand elles sont soumises à la pression de l'antibiotique.

Ces données méritent des investigations complémentaires. Il semble en effet judicieux d'évaluer la fréquence de mutation de l'ensemble de nos souches, afin de comparer les valeurs obtenues, en fonction des séquences initiales du gène *oprD* et de voir si les mutants

sélectionnés *in vitro* présentent les mêmes mutations que ceux ayant émergé *in vivo*. Le fait que tous les patients pour lesquels un mutant résistant a émergé *in vivo* aient reçu de l'imipénème, dans l'intervalle de temps compris entre l'isolement de la souche sensible et celui du mutant résistant, est en faveur de cette investigation, tout comme le fait que les 2 patients pour lesquels les souches ont évolué, au contraire, de la résistance vers la sensibilité à l'imipénème, n'ont pas été traités par de l'imipénème. Ces constatations corroborent les études montrant le rôle de l'imipénème dans la survenue de la résistance à cet antibiotique (Harris *et al.*, 2002; Zavascki *et al.*, 2005). L'analyse des antibiotiques reçus par les 933 patients de l'étude dont sont issus les 6 couples de souches confirme également ces données. En effet, parmi les facteurs de risque de colonisation gastro-intestinale avec une souche résistante à l'imipénème, on retrouve l'administration d'imipénème avant ou durant l'hospitalisation.

A ce phénomène de sélection de bactéries résistantes sous la pression antibiotique, se surajoute, dans un second temps, la dissémination de ces souches. Des bactéries avec les mêmes mutations du gène *oprD* et des pulsotypes proches sont ainsi retrouvées, pendant plusieurs mois, chez des patients différents, au sein d'un même service clinique. Le rôle de la transmission croisée dans l'épidémiologie des infections à *P. aeruginosa* est désormais bien établi (Bertrand *et al.*, 2003; Juan *et al.*, 2005a). C'est donc en associant la prescription raisonnée d'antibiotiques à des mesures de désinfection strictes qu'on pourra espérer limiter la circulation des souches de *P. aeruginosa* résistantes et réduire ainsi le nombre d'infections qu'elles entraînent.

Références bibliographiques



- Amin, N.E., Giske, C.G., Jalal, S., Keijser, B., Kronvall, G., and Wretling, B. (2005) Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *Apmis* **113**: 187-196.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H., and Oyaizu, H. (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 4**: 1563-1589.
- Bertrand, X., Blasco, G., Belle, E., Boillot, A., Capellier, G., and Talon, D. (2003) *Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units: importance of cross-transmission. *Ann Fr Anesth Reanim* **22**: 505-509.
- Boutoille, D., Corvec, S., Caroff, N., Giraudeau, C., Espaze, E., Caillon, J., Plesiat, P., and Reynaud, A. (2004) Detection of an IS21 insertion sequence in the *mexR* gene of *Pseudomonas aeruginosa* increasing beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Lett* **230**: 143-146.
- Cao, L., Srikumar, R., and Poole, K. (2004) MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* : identification and characterization of the *nalC* gene encoding a repressor of *PA3720-PA3719*. *Mol Microbiol* **53**: 1423-1436.
- Castanheira, M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Schmidt, F.J., and Walsh, T.R. (2004) Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *blaGIM-1*, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4654-4661.
- Conejo, M.C., Garcia, I., Martinez-Martinez, L., Picabea, L., and Pascual, A. (2003) Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2313-2315.
- Cornaglia, G., Mazzariol, A., Lauretti, L., Rossolini, G.M., and Fontana, R. (2000) Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis* **31**: 1119-1125.
- Crespo, M.P., Woodford, N., Sinclair, A., Kaufmann, M.E., Turton, J., Glover, J., Velez, J.D., Castaneda, C.R., Recalde, M., and Livermore, D.M. (2004) Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol* **42**: 5094-5101.
- Duarte, A., Boavida, F., Grosso, F., Correia, M., Lito, L.M., Cristino, J.M., and Salgado, M.J. (2003) Outbreak of GES-1 beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1481-1482.
- Epp, S.F., Kohler, T., Plesiat, P., Michea-Hamzhepour, M., Frey, J., and Pechere, J.C. (2001) C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1780-1787.
- Filius, P.M., Gyssens, I.C., Kershof, I.M., Roovers, P.J., Ott, A., Vulto, A.G., Verbrugh, H.A., and Endtz, H.P. (2005) Colonization and resistance dynamics of Gram-negative bacteria in patients during and after hospitalization. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2879-2886.
- Gutierrez, O., Juan, C., Perez, J.L., and Oliver, A. (2004) Lack of association between hypermutation and antibiotic resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3573-3575.
- Harris, A.D., Smith, D., Johnson, J.A., Bradham, D.D., and Roghmann, M.C. (2002) Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* **34**: 340-345.

- Ishii, Y., Kimura, S., Alba, J., Kadono, M., and Yamaguchi, K. (2005) Carbapenem hydrolyzing AmpC from imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*. In *ICAAC (Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy)* Washington.
- Juan, C., Gutierrez, O., Oliver, A., Ayestaran, J.I., Borrell, N., and Perez, J.L. (2005a) Contribution of clonal dissemination and selection of mutants during therapy to *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance in an intensive care unit setting. *Clin Microbiol Infect* **11**: 887-892.
- Juan, C., Macia, M.D., Gutierrez, O., Vidal, C., Perez, J.L., and Oliver, A. (2005b) Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 4733-4738.
- Kohler, T., Epp, S.F., Curty, L.K., and Pechere, J.C. (1999a) Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 6300-6305.
- Kohler, T., Michea-Hamzehpour, M., Epp, S.F., and Pechere, J.C. (1999b) Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa* : respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 424-427.
- Kuchma, S.L., Connolly, J.P., and O'Toole, G.A. (2005) A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 1441-1454.
- Lauretti, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., and Rossolini, G.M. (1999) Cloning and characterization of *blaVIM*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1584-1590.
- Lepelletier, D., Geneste, A., Mahé, P., Demeure, D., Champin, P., Naux, E., Corvec, S., Bémer, P., Drugeon, H., and Pinaud, M. (2005) Impact de la surveillance et de la prévention sur l'incidence des infections acquises dans les réanimations chirurgicales au CHU de Nantes entre 2000 et 2004 In *Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Antiinfectieuse (RICAI)* Paris.
- Lepelletier, D., Caroff, N., Riochet, D., Pinaud, M., Potel, G., and Richet, H. (article soumis) *Pseudomonas aeruginosa* gastro-intestinal colonization : risk factor according to the patient characteristics, hospital stay and fluoroquinolone use.
- Li, X.Z., Nikaido, H., and Poole, K. (1995) Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1948-1953.
- Linares, J.F., Lopez, J.A., Camafeita, E., Albar, J.P., Rojo, F., and Martinez, J.L. (2005) Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 1384-1391.
- Masuda, N., Gotoh, N., Ishii, C., Sakagawa, E., Ohya, S., and Nishino, T. (1999) Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 400-402.
- O'Malley, Y.Q., Reszka, K.J., Rasmussen, G.T., Abdalla, M.Y., Denning, G.M., and Britigan, B.E. (2003) The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**: L1077-1086.
- O'Malley, Y.Q., Reszka, K.J., Spitz, D.R., Denning, G.M., and Britigan, B.E. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**: L94-103.
- O'Toole, G.A., Gibbs, K.A., Hager, P.W., Phibbs, P.V., Jr., and Kolter, R. (2000) The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 425-431.

- Ochs, M.M., Bains, M., and Hancock, R.E. (2000) Role of putative loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 1983-1985.
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F., and Blazquez, J. (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**: 1251-1254.
- Oliver, A., Baquero, F., and Blazquez, J. (2002) The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa* : molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol Microbiol* **43**: 1641-1650.
- Pai, H., Kim, J., Kim, J., Lee, J.H., Choe, K.W., and Gotoh, N. (2001) Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 480-484.
- Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopolou, P., and Doudoroff, M. (1973) Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**: 333-339.
- Parkins, M.D., Ceri, H., and Storey, D.G. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol* **40**: 1215-1226.
- Pascual, A., Martinez-Martinez, L., Ramirez de Arellano, E., and Perea, E.J. (1993) Susceptibility to antimicrobial agents of *Pseudomonas aeruginosa* attached to siliconized latex urinary catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **12**: 761-765.
- Perez, F.J., Gimeno, C., Navarro, D., and Garcia-de-Lomas, J. (1996) Meropenem permeation through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* can involve pathways other than the OprD porin channel. *Chemotherapy* **42**: 210-214.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J.L., and Kohler, T. (2004) CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **279**: 8761-8768.
- Pirnay, J.P., De Vos, D., Mossialos, D., Vanderkelen, A., Cornelis, P., and Zizi, M. (2002) Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environ Microbiol* **4**: 872-882.
- Poirel, L., Le Thomas, I., Naas, T., Karim, A., and Nordmann, P. (2000) Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 622-632.
- Poirel, L., Weldhagen, G.F., Naas, T., De Champs, C., Dove, M.G., and Nordmann, P. (2001) GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2598-2603.
- Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D.E., and Bianco, N. (1996) Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa* : *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2021-2028.
- RAISIN (2005) Surveillance des infections nosocomiales en réanimation, résultats 2004. INVS (Institut National de Veille Sanitaire).
- Ramsey, D.M., and Wozniak, D.J. (2005) Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* **56**: 309-322.
- Roussel-Delvallez, M. (2004) Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials : a 2004 french multicenter hospital study. In *RICAI (Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse)* Paris.
- Shih, P.C., and Huang, C.T. (2002) Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* **49**: 309-314.

- Sobel, M.L., Hocquet, D., Cao, L., Plesiat, P., and Poole, K. (2005a) Mutations in *PA3574 (nalD)* lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 1782-1786.
- Sobel, M.L., Neshat, S., and Poole, K. (2005b) Mutations in *PA2491 (mexS)* promote MexT-dependent mexEF-oprN expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 1246-1253.
- Spiers, A.J., Buckling, A., and Rainey, P.B. (2000) The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* **146**: 2345-2350.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., and Doudoroff, M. (1966) The aerobic pseudomonads : a taxonomic study. *J Gen Microbiol* **43**: 159-271.
- Stapper, A.P., Narasimhan, G., Ohman, D.E., Barakat, J., Hentzer, M., Molin, S., Kharazmi, A., Hoiby, N., and Mathee, K. (2004) Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J Med Microbiol* **53**: 679-690.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., and Olson, M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Takase, H., Nitanai, H., Hoshino, K., and Otani, T. (2000) Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun* **68**: 1834-1839.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., and Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**: 2233-2239.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Toleman, M.A., Simm, A.M., Murphy, T.A., Gales, A.C., Biedenbach, D.J., Jones, R.N., and Walsh, T.R. (2002) Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* **50**: 673-679.
- Toleman, M.A., Biedenbach, D., Bennett, D.M., Jones, R.N., and Walsh, T.R. (2005) Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* **55**: 61-70.
- Usher, L.R., Lawson, R.A., Geary, I., Taylor, C.J., Bingle, C.D., Taylor, G.W., and Whyte, M.K. (2002) Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin : a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol* **168**: 1861-1868.
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., and Mitsuhashi, S. (1991) Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 147-151.
- Wolter, D.J., Hanson, N.D., and Lister, P.D. (2004) Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol Lett* **236**: 137-143.
- Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G.A., and Parsek, M.R. (2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7907-7912.

- Yum, J.H., Yi, K., Lee, H., Yong, D., Lee, K., Kim, J.M., Rossolini, G.M., and Chong, Y. (2002) Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter genomospecies 3* from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla(VIM-2)* gene cassettes. *J Antimicrob Chemother* **49**: 837-840.
- Zavascki, A.P., Cruz, R.P., and Goldani, L.Z. (2005) Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies in hospitalized patients. *J Hosp Infect* **59**: 96-101.
- Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Kohler, T., Pechere, J.C., and Plesiat, P. (1999) *In vivo* emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 287-291.

Université de Nantes
Faculté de Pharmacie

Année de soutenance
2006

CADY Anne

Titre de la thèse : Étude génétique de la résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Résumé :

Nous avons étudié les mécanismes de résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa*. Le séquençage du gène *oprD* de 13 souches cliniques résistantes à l'imipénème a révélé le polymorphisme de ce gène et la difficulté d'interprétation des mutations observées dans ce contexte. Nous avons alors travaillé sur 6 couples de souches de colonisation digestive présentant une différence de sensibilité à l'imipénème. Pour 4 patients sur 6, la souche résistante a été isolée après administration d'imipénème. Les souches d'un même couple présentaient le même pulsotype. Par séquençage du gène *oprD*, nous avons détecté, pour chaque souche résistante, un événement génétique absent chez la souche sensible et conduisant à une porine OprD très modifiée ou absente. La RT-PCR n'a pas décelé de différence de transcription d'*oprD* entre souches sensibles et résistantes. En plus de la modification structurale de OprD, nous avons mis en évidence par RT-PCR, 5 souches hyperexprimant le système d'efflux MexAB-OprM et une souche hyperproductrice de la céphalosporinase AmpC. Enfin, nous avons souhaité savoir si les données concernant la contribution du zinc dans la résistance aux carbapénèmes, *in vitro*, pouvaient avoir un réel impact *in vivo*. Nous avons donc sélectionné 16 souches de *P. aeruginosa* de sensibilité diminuée à l'imipénème, isolées à partir d'urines sur sondes à demeure. Pour ces dernières, nous avons recherché, par séquençage, la mutation V194L dans le gène codant pour la protéine senseur CzcS. Nous n'avons retrouvé cette mutation chez aucune des souches.

Mots-clés :

PSEUDOMONAS AERUGINOSA
RÉSISTANCE
CARBAPÉNÈMES
PORINE OPRD
IMIPÉNÈME

Jury

Président : M. le Pr Alain REYNAUD, Faculté de Pharmacie de Nantes

Membres : M. le Pr Gilles POTEL, Faculté de Médecine de Nantes

M. le Dr Didier LEPELLETIER, CHU de Nantes

M^{me} le Dr Nathalie CAROFF, Faculté de pharmacie de Nantes (directrice de thèse)

Adresse de l'auteur : La Millaudière 44522 MÉSANGER