

MEMOIRE  
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le jury interrégional  
le 21 septembre 2010

par **Marina ILLIAQUER**

Conformément aux dispositions de l'arrêté  
du 6 mai 1987 tient lieu de :

**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Epidémiologie et caractérisation moléculaire de souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, hors BLSE, isolées entre 2007 et 2009, au C.H.U. de Nantes.**

**Président :** Madame le Pr. Berthe-Marie IMBERT, Professeur de Virologie  
Faculté de Pharmacie - Nantes

**Membres du jury :**

**Monsieur le Pr. Alain REYNAUD**, Professeur de Bactériologie  
Faculté de Pharmacie - Nantes

**Monsieur le Pr. François RAFFI**, Professeur de Maladies Infectieuses et Tropicales  
Faculté de Médecine - Nantes

**Monsieur le Pr. Daniel VILLERS**, Professeur de Réanimation Médicale  
Faculté de Médecine - Nantes

**Monsieur le Dr. Stéphane CORVEC**, Maître de Conférences de Bactériologie  
Faculté de Médecine - Nantes

<b>SOMMAIRE</b>
-----------------

<b>TABLE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>GENERALITES SUR <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>I Taxonomie et phylogénie.....</b>	<b>13</b>
<b>II Ecologie et épidémiologie.....</b>	<b>13</b>
<b>III Caractères bactériologiques.....</b>	<b>14</b>
III.1 Aspect microscopique .....	14
III.2 Caractères cultureux.....	15
III.3 Caractères biochimiques .....	16
<b>IV Facteurs de pathogénicité.....</b>	<b>18</b>
IV.1 La capsule .....	18
IV.1.1 Adhérence .....	18
IV.1.2 Protection contre la phagocytose, l'action du complément et le pouvoir bactéricide du sérum.....	19
IV.1.3 Protection contre les peptides anti-microbiens .....	19
IV.2 Les adhésines .....	20
IV.3 Les endotoxines .....	21
IV.4 Les sidérophores .....	21
<b>V Pouvoir pathogène.....</b>	<b>22</b>
V.1 Pneumonies communautaires .....	22
V.2 Abscess hépatique pyogène communautaire.....	22
V.3 Méningites.....	23
V.4 Pathologies spécifiques : ozène et rhinosclérome .....	23
V.5 Infections nosocomiales .....	23
<b>RESISTANCE AUX B-LACTAMINES ET AUX QUINOLONES CHEZ <i>K.</i> <i>PNEUMONIAE</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>I Résistance aux <math>\beta</math>-lactamines .....</b>	<b>26</b>
I.1 Généralités sur la résistance enzymatique aux $\beta$ -lactamines .....	27
I.2 Rappel sur la classification des $\beta$ -lactamases .....	28
I.2.1 Classification de Ambler.....	28
I.2.2 Classification de Bush-Jacoby-Medeiros.....	29
I.2 Résistance enzymatique chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	31
I.2.1 Résistance naturelle .....	31
I.2.1.1 Phénotype sauvage.....	31
I.2.1.2 Phénotype hyperproducteur .....	32
I.2.2 Résistance acquise .....	33
I.2.2.1 Résistance aux inhibiteurs de $\beta$ -lactamases .....	33
I.2.2.2 BLSE.....	34

I.2.2.3 Carbapénémases de classe A.....	36
I.2.2.4 Enzymes de classe B.....	37
I.2.2.5 Enzymes de classe D.....	38
I.2.2.6 Enzymes de classe C.....	38
I.2.2.6.1 Rappel sur les $\beta$ -lactamases de classe C chromosomiques.....	38
I.2.2.6.2 $\beta$ -lactamases de classe C plasmidiques (pAmpC).....	40
I.3 Résistance aux $\beta$ -lactamines par imperméabilité.....	51
I.3.1 Notions générales sur les porines de <i>K. pneumoniae</i> .....	51
I.3.2 Impact de la perte des porines chez <i>K. pneumoniae</i> .....	52
<b>II Résistance aux quinolones.....</b>	<b>54</b>
II.1 Résistance par modification des cibles.....	54
II.2 Résistance par défaut d'accumulation.....	55
II.3 Résistance plasmidique aux quinolones.....	56
II.3.1 Les déterminants Qnr.....	56
II.3.2 L'enzyme AAC(6')-Ib-cr.....	57
II.3.3 La pompe d'efflux : QepA.....	57
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>58</b>
<b>I Objectifs de l'étude.....</b>	<b>59</b>
<b>II Souches de <i>K. pneumoniae</i> sélectionnées pour notre étude.....</b>	<b>60</b>
<b>III Méthodes.....</b>	<b>62</b>
III.1 Extraction de l'ADN bactérien : méthode rapide par ébullition.....	62
III.2 PCR et séquençage : principes.....	62
III.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	62
III.2.2 Séquençage des produits d'amplification.....	63
III.3 Détection par PCR des gènes des $\beta$ -lactamases plasmidiques de type AmpC.....	63
III.4 Typage et caractérisation de l'environnement génétique des gènes <i>ampC</i> .....	64
III.5 Amplification et séquençage du gène <i>bla<sub>SHV-1</sub></i> chromosomique.....	65
III.6 Amplification et séquençage des gènes codant pour les porines OmpK35 et OmpK36.....	66
III.7 Détection des gènes de résistance plasmidique aux quinolones.....	67
III.8 Etude de transfert de résistance par conjugaison bactérienne.....	68
III.8.1 Principe.....	68
III.8.2 Réalisation pratique.....	68
III.9 Extraction de plasmide par technique de Kieser.....	69
III.10 Etude épidémiologique.....	69
III.11 Typage des souches par électrophorèse en champs pulsés.....	69
<b>RESULTATS.....</b>	<b>71</b>
<b>I Détection par PCR des gènes des <math>\beta</math>-lactamases plasmidiques de type AmpC.....</b>	<b>72</b>
<b>II Typage et caractérisation de l'environnement génétique des gènes <i>ampC</i>.....</b>	<b>72</b>
II.1 Environnement génétique des gènes <i>bla<sub>DHA</sub></i> .....	72
II.2 Environnement génétique du gène <i>bla<sub>CMY</sub></i> .....	73
<b>III Etude du promoteur du gène <i>bla<sub>SHV-1</sub></i> chromosomique.....</b>	<b>74</b>
<b>IV Etude des porines OmpK35 et OmpK36.....</b>	<b>75</b>
<b>V Détection des gènes de résistance plasmidique aux quinolones.....</b>	<b>79</b>

<b>VI Etude de transfert de résistance par conjugaison bactérienne.....</b>	<b>82</b>
VI.1 Conjugaison bactérienne .....	82
VI.2 Caractéristiques phénotypiques des transconjugants .....	82
<b>VII Extraction de plasmide par technique de Kieser.....</b>	<b>84</b>
<b>VIII Etude épidémiologique .....</b>	<b>86</b>
<b>IX Typage des souches par électrophorèse en champs pulsés.....</b>	<b>90</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>91</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>91</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>91</b>

**TABLE DES ABREVIATIONS**

AAC	Aminoglycosides acétyltransférase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BCC	Bouillon Cœur Cervele
BLSE	$\beta$ -lactamase à spectre étendu
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CCLIN	Centre de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CTP	Cytosine triphosphate
Da	Dalton
ECP	Electrophorèse en Champs Pulsés
GTP	Guanosine triphosphate
HGRL	Hôpital Nord Laënnec
In	Intégron
IS	Séquence d'insertion
Kb	Kilobase
LPS	Lipopolysaccharide
MH	Muller-Hinton
Omp	Outer membrane protein
Orf	Cadre de lecture ouvert
pAmpC	AmpC plasmidique
Pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLA	Pyogenic Liver Abces
PMQR	Plasmid-Mediated Quinolone Resistance
Qnr	Quinolone resistance
Qep	Quinolone efflux pump
QRDR	Quinolone-Resistance-Determining Region
TTP	Tyrosine triphosphate

▪ **Abréviations des antibiotiques utilisés :**

AMC	Amoxicilline + acide clavulanique
AMX	Amoxicilline
AN	Amikacine
CAZ	Ceftazidime
CF	Céfalotine
CIP	Ciprofloxacine
CTX	Céfotaxime
ETP	Ertapénème
FEP	Céfépime
FOX	Céfoxitine
FT	Nitrofurane
GM	Gentamicine
IMP	Imipénème
NA	Acide nalidixique
NET	Nétilmicine
NOR	Norfloxacine
OFX	Ofloxacine
PIP	Pipéracilline
SXT	Cotrimoxazole
TCC	Ticarcilline + acide clavulanique
TIC	Ticarcilline
TM	Tobramycine
TZP	Pipéracilline+tazobactam

▪ **Code international des acides aminés :**

A (Ala)	Alanine
C (Cys)	Cystéine
D (Asp)	Acide aspartique
E (Glu)	Acide glutamique
F (Phe)	Phénylalanine
G (Gly)	Glycine
H (His)	Histidine
I (Ile)	Isoleucine
K (Lys)	Lysine
L (Leu)	Leucine
M (Met)	Méthionine
N (Asn)	Asparagine
P (Pro)	Proline
Q (Gln)	Glutamine
R (Arg)	Arginine
S (Ser)	Sérine
T (Thr)	Thréonine
V (Val)	Valine
W (Trp)	Tryptophane
Y (Tyr)	Tyrosine

<b>LISTE DES FIGURES</b>
--------------------------

<b>Figure 1 :</b>	Examen microscopique de <i>K. pneumoniae</i> après coloration de Gram. ....	14
<b>Figure 2 :</b>	Culture de <i>K. pneumoniae</i> sur gélose chromogène UTI® .....	15
<b>Figure 3 :</b>	Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de <i>Klebsiella</i> sp (7). .....	18
<b>Figure 4 :</b>	Inactivation des $\beta$ -lactamines par une $\beta$ -lactamase ( <a href="http://www.antiinfectieux.org">http://www.antiinfectieux.org</a> ) .....	27
<b>Figure 5 :</b>	Phylogénie du gène chromosomique de la $\beta$ -lactamase de <i>K. pneumoniae</i> (51).....	31
<b>Figure 6 :</b>	Représentation des mutations impliquées dans l'hyperproduction de SHV-1 (56).....	32
<b>Figure 7 :</b>	Image de synergie dite « en bouchon de champagne » évocatrice d'une BLSE ( <a href="http://www.acnbh.org">http://www.acnbh.org</a> ) .....	34
<b>Figure 8 :</b>	Interconnexion entre induction de AmpC et recyclage de la muréine (110) .	39
<b>Figure 9 :</b>	Représentation de AmpC complexée avec la ceftazidime (153). .....	43
<b>Figure 10 :</b>	Représentation schématique de la ceftazidime avec la chaîne latérale. R1 en C7 et la chaîne latérale R2 en C3 (153).....	43
<b>Figure 11 :</b>	Dendrogramme présentant la relation entre les $\beta$ -lactamases AmpC chromosomiques et plasmidiques (120). .....	46
<b>Figure 12 :</b>	Environnement génétique des gènes <i>ampC</i> plasmidiques (153).....	47
<b>Figure 13 :</b>	Mise en évidence d'une pAmpC au laboratoire. ....	49
<b>Figure 14 :</b>	Représentation schématique de l'enveloppe d'une bactérie à Gram négatif. ( <a href="http://www.microbio.karbondesign.com">http://www.microbio.karbondesign.com</a> ) .....	51
<b>Figure 15 :</b>	Structure de la porine OmpF chez <i>E. coli</i> (184). .....	52
<b>Figure 16 :</b>	Organisation génétique de <i>bla</i> <sub>DHA-1</sub> d'après Verdet <i>et al</i> (127) .....	73
<b>Figure 17 :</b>	Mise en évidence d'une pAmpC de type DHA-1 chez une souche de <i>K. pneumoniae</i> .....	73
<b>Figure 18 :</b>	Organisation génétique de <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> d'après Kang <i>et al.</i> (226) .....	74
<b>Figure 19 :</b>	Comparaison de la région promotrice du gène <i>bla</i> <sub>SHV-1</sub> des souches 1 et 10 à celle de la souche de référence (ATCC 13833). .....	74

<b>Figure 20 :</b> Représentation des modifications génétiques identifiées dans le gène <i>ompK35</i> .....	75
<b>Figure 21 :</b> Représentation des modifications génétiques identifiées dans le gène <i>ompK36</i> .....	76
<b>Figure 22 :</b> Récapitulatif des événements génétiques identifiés pour la porine OmpK35 des souches 1, 2, 3, 8, 9, 10 et 11 (OmpK35 = 315 aa).....	77
<b>Figure 23 :</b> Récapitulatif des événements génétiques identifiés pour la porine OmpK36 des souches 1, 2, 3, 8, 9, 10 et 11 (OmpK36 = 363 aa).....	78
<b>Figure 24 :</b> Comparaison des séquences peptidiques des enzymes AAC(6')-Ib et AAC(6')-Ib-cr à celles obtenues pour les souches 3 et 6. Les séquences obtenues pour les souches 7, 8, 9, 11, 15 et 16 identiques à celle de la souche 3, ne sont pas représentées sur cette figure. ....	80
<b>Figure 25 :</b> Analyse du contenu plasmidique des isolats de <i>K. pneumoniae</i> de notre étude. Le témoin utilisé est la souche <i>E. coli</i> 50192 (M).....	84
<b>Figure 26 :</b> Représentation synoptique du parcours hospitalier emprunté par les patients infectés ou colonisés par une souche de <i>K. pneumoniae</i> DHA-1-positive. ....	89
<b>Figure 27 :</b> Gel de l'électrophorèse en champs pulsés obtenu après digestion par <i>Spe</i> I pour les souches de <i>K. pneumoniae</i> de notre étude.....	91
<b>Figure 28 :</b> Gel de l'électrophorèse en champs pulsés obtenu après digestion par <i>Xba</i> I pour les souches de <i>K. pneumoniae</i> de notre étude. ....	91

<b>LISTE DES TABLEAUX</b>
---------------------------

<b>Tableau 1 :</b>	Diagnostic différentiel des espèces des genres <i>Klebsiella</i> et <i>Raoultella</i> (10).....	17
<b>Tableau 2 :</b>	Infections nosocomiales dues à <i>Klebsiella</i> sp (7).....	24
<b>Tableau 3 :</b>	Classification des $\beta$ -lactamines. ....	26
<b>Tableau 4 :</b>	Classification des $\beta$ -lactamases selon Ambler et Bush-Jacoby et Medeiros (48) .....	30
<b>Tableau 5 :</b>	Chronologie de la découverte des $\beta$ -lactamases plasmidiques de classe C (120) .....	41
<b>Tableau 6 :</b>	CMI observées chez des transconjugants de <i>E. coli</i> produisant une pAmpC (120).....	45
<b>Tableau 7 :</b>	Caractéristiques des isolats de <i>K. pneumoniae</i> sélectionnés pour notre étude.....	61
<b>Tableau 8 :</b>	Amorces utilisées pour l'amplification des gènes plasmidiques de type AmpC (174).....	64
<b>Tableau 9 :</b>	Amorces utilisées pour l'étude de l'environnement génétique de DHA et de CMY (225, 227) .....	65
<b>Tableau 10 :</b>	Amorces utilisées pour l'amplification du promoteur du gène <i>bla<sub>SHV-1</sub></i> (56) .....	66
<b>Tableau 11 :</b>	Amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant pour les porines OmpK35 et OmpK36 .....	66
<b>Tableau 12 :</b>	Amorces utilisées pour l'amplification des gènes <i>qnr</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> et <i>qepA</i> (223, 227, 228) .....	67
<b>Tableau 13 :</b>	Détection par PCR, des gènes codant pour <i>bla<sub>CMY</sub></i> , <i>bla<sub>DHA</sub></i> , <i>bla<sub>ACC</sub></i> , <i>bla<sub>FOX</sub></i> , <i>bla<sub>MOX</sub></i> , <i>bla<sub>MIR/ACT</sub></i> , chez les souches sélectionnées. ....	72
<b>Tableau 14 :</b>	Détection par PCR, des gènes codant pour <i>qnr</i> , <i>aac(6')-Ib</i> et <i>qepA</i> .....	79
<b>Tableau 15 :</b>	Tableau récapitulatif des mécanismes de résistance identifiés chez les souches de <i>K. pneumoniae</i> de notre étude.....	81
<b>Tableau 16 :</b>	Comparaison des CMI de la souche de référence de <i>E. coli</i> J53-2 à celles des transconjugants obtenus .....	83
<b>Tableau 17 :</b>	Résultats de l'investigation clinique concernant les patients infectés ou colonisés par une souche de <i>K. pneumoniae</i> sélectionnée pour notre étude.....	87

***INTRODUCTION***

*Klebsiella pneumoniae* est un pathogène opportuniste fréquemment rencontré en Bactériologie médicale, jouant un rôle majeur dans les infections nosocomiales.

Cette bactérie requière une attention particulière lors de la prise en charge d'infections sévères en raison de l'émergence constante de résistances aux antibiotiques chez cette espèce. La pression de sélection exercée par l'utilisation (trop) importante de l'antibiothérapie et le fort potentiel épidémique de cette espèce constituent deux facteurs principaux conditionnant l'évolution vers la résistance.

Les infections à *K. pneumoniae* sont particulièrement redoutées à l'hôpital car les souches épidémiques sont souvent multi-résistantes aux antibiotiques. Ainsi, des souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, produisant une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE), sont apparues dès 1983. Leur fréquence est en augmentation depuis les années 2000. A l'échelle mondiale, la diffusion de ces gènes de  $\beta$ -lactamases soulève des inquiétudes en thérapeutique en raison de leur fréquente association à d'autres déterminants de résistance au sein de mêmes plasmides conjugatifs. Alors que jusqu'à présent, ces souches étaient l'apanage quasi exclusif de la médecine hospitalière, leur diffusion dans la communauté constitue un réel problème de Santé publique.

Chez *K. pneumoniae*, la résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération est le plus souvent liée à l'acquisition d'une BLSE de classe A. Cependant, dans le cadre de nos activités de diagnostic bactériologique, au cours des trois dernières années, entre 2007 et 2009, notre attention a été attirée par l'émergence au C.H.U. de Nantes, de souches de *K. pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, sans production de BLSE. De nombreux mécanismes impliqués dans la résistance aux  $\beta$ -lactamines ont été décrits chez *K. pneumoniae*. Cette résistance peut être due à la production de  $\beta$ -lactamases plasmidiques telles que des céphalosporinases ou des carbapénémases. Un autre mécanisme, l'hyperproduction de la pénicillinase chromosomique SHV-1, a également été rapporté, associé à une altération de la perméabilité membranaire.

L'objectif de cette étude était d'identifier le(s) mécanisme(s) de résistance aux  $\beta$ -lactamines impliqué(s) chez ces souches. Le mécanisme le plus fréquemment incriminé dans la résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, après la production de BLSE, étant la production d'une  $\beta$ -lactamase de type AmpC, nous avons recherché, dans un premier temps, des gènes codant pour ces enzymes (*bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>MIR/ACT</sub>). Dans un second temps, nous avons étudié le promoteur du gène *bla*<sub>SHV-1</sub>, afin de détecter d'éventuelles mutations responsables d'une hyperproduction de cette pénicillinase ainsi que

d'éventuelles modifications des gènes codant pour les porines OmpK35 et OmpK36, à l'origine d'une imperméabilité membranaire.

Par ailleurs, les souches sélectionnées étaient pour la plupart résistantes aux fluoroquinolones. De nombreuses études ont montré que les gènes plasmidiques de  $\beta$ -lactamases sont souvent associés à des gènes de résistance aux quinolones. Nous nous sommes donc attachés à rechercher la présence de mécanismes de résistance plasmidique aux fluoroquinolones (Qnr, AAC(6')-Ib-cr et QepA) et d'en effectuer la caractérisation moléculaire.

Enfin, nous avons réalisé une étude épidémiologique moléculaire et clinique afin de détecter un éventuel lien entre ces isolats cliniques.

***GENERALITES SUR KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

## **I Taxonomie et phylogénie**

A ce jour, l'espèce *Klebsiella pneumoniae* appartient au règne des *Procaryotae*, au domaine des *Bacteria*, au phylum des *Proteobacteria*, à la classe des *Gammaproteobacteria*, à l'ordre des *Enterobacteriales*, à la famille des *Enterobacteriaceae* et au genre *Klebsiella*.

Le genre *Klebsiella* a été créé en 1885 en l'honneur du microbiologiste allemand Edwin Klebs (1834-1913), inventeur de la technique de fixation des prélèvements dans la paraffine et co-découvreur de *Corynebacterium diphtheriae* (1).

La taxonomie du genre *Klebsiella* a été révisée à de nombreuses reprises, notamment grâce au développement des méthodes d'identification et de typage. Parmi les différentes classifications, la plus communément admise jusqu'à la fin du vingtième siècle est celle proposé par Orskov (2) en 1984. *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis* et *K. ozaenae* sont regroupées pour former une seule espèce *K. pneumoniae*, elle-même divisée en trois sous-espèces : *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*.

Le genre comprend alors cinq espèces : *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. terrigena* et *K. ornithinolytica*. En 1999, *Calymmatobacterium granulomatis* (agent de la Donovanose) est transféré dans le genre *Klebsiella* et renommé *K. granulomatis* (3).

En 2001, un nouveau nom de genre, *Raoultella*, est donné aux espèces jusque la dénommées *K. ornithinolytica*, *K. planticola* et *K. terrigena*. La justification de cette nouvelle dénomination a été apportée par l'étude combinée des gènes codant pour l'ARN16S et du gène *rpoB* codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase (4).

Dans les années 2000, de nouvelles espèces ont été ajoutées à la nomenclature : *K. variicola* (5) et *K. singaporensis* (6).

## **II Ecologie et épidémiologie**

*K. pneumoniae* est une espèce ubiquitaire, isolée dans l'environnement à partir d'échantillons de sol, d'eaux de surface, d'eaux usées, de végétaux et des muqueuses des mammifères, en particulier de la flore fécale.

Chez l'Homme, *K. pneumoniae* est saprophyte du tube digestif et du nasopharynx. Les taux de colonisation varient selon les études : de 5 à 38 % dans les selles et de 1 à 6 % au

niveau du nasopharynx. Elle est rarement isolée sur la peau, son portage à ce niveau étant transitoire (7).

En milieu hospitalier, les taux de colonisation sont considérablement plus élevés, chez les patients comme chez le personnel ; ils augmentent proportionnellement à la durée du séjour. Chez les patients hospitalisés, le portage est de 77 % dans les selles, de 19 % dans le nasopharynx et de 42 % sur les mains. La prise d'antibiotiques à large spectre ou de multiples antibiotiques constituent des facteurs favorisant cette colonisation (7).

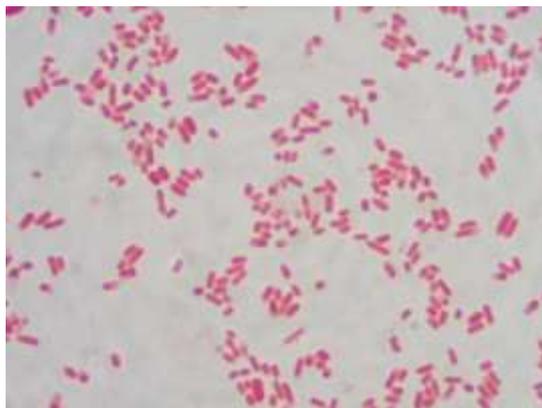
*K. pneumoniae* peut être isolée lors de pathologies communautaires ou nosocomiales. Au cours des infections liées aux soins, les principaux réservoirs de transmission sont le tube digestif des patients ainsi que les mains du personnel soignant. Elle est alors capable de diffuser rapidement ce qui lui permet d'être à l'origine d'épidémies nosocomiales (7).

### III Caractères bactériologiques

#### III.1 Aspect microscopique

*K. pneumoniae* est un bacille à Gram négatif, toujours immobile, à coloration souvent bipolaire, généralement entouré d'une capsule polysidique, donnant un aspect muqueux, assez typique.

**Figure 1 : Examen microscopique de *K. pneumoniae* après coloration de Gram.**



### III.2 Caractères cultureux

*K. pneumoniae* présente tous les caractères généraux des entérobactéries. C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, qui cultive sur milieux usuels non-enrichis : gélose trypticase-soja (TS), gélose Mac Conkey, gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP), gélose de Drigalski, etc.

Après 18-24 heures à 37°C, elle forme des colonies arrondies, muqueuses, généralement bombées et brillantes. Sur les milieux contenant du lactose et un indicateur de pH (gélose BCP), les colonies de *K. pneumoniae* apparaissent lactose-positives avec virage de l'indicateur coloré.

Des milieux chromogènes peuvent orienter le diagnostic vers le groupe K. E. S. (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* - 8). Des substrats artificiels incolores incorporés dans la gélose libèrent des composés chromogènes directement visibles lors de la croissance des bactéries, dont la couleur varie selon l'activité enzymatique de celle-ci. Le groupe K. E. S. regroupe des bactéries qui possèdent une  $\beta$ -galactosidase et une  $\beta$ -glucosidase. Elles donnent une coloration bleue intense sur CHROMagar Orientation<sup>®</sup>, UriSelect 4<sup>®</sup>, UTI<sup>®</sup>, et une coloration bleu-vert sur CPS-ID3<sup>®</sup> (Figure 2). La mise en évidence de bacilles à Gram négatif à l'examen direct donne une forte présomption de bactéries appartenant à ce groupe, permettant une orientation diagnostique rapide en pratique quotidienne.

**Figure 2 : Culture de *K. pneumoniae* sur gélose chromogène UTI<sup>®</sup>.**



La coloration bleue des colonies évoque une bactérie du groupe K. E. S.

### III.3 Caractères biochimiques

*K. pneumoniae* possède les caractères suivants :

- oxydase négative
- catalase positive
- fermentation du D-glucose
- réduction des nitrates en nitrites

Les caractères biochimiques conduisant au diagnostic de l'espèce sont les suivants :

- $\beta$ -galactosidase positive
- uréase positive
- VP positive (réaction de Voges-Proskauer : production d'acétoïne)
- lysine-décarboxylase (LDC) positive
- ornithine-décarboxylase (ODC) négative
- arginine di-hydrolase (ADH) négative
- indole négative
- gélatinase négative
- absence de production d'H<sub>2</sub>S
- fermentation de nombreux sucres dont le saccharose, le rhamnose et le mélibiose

L'identification phénotypique des différentes espèces du genre *Klebsiella* repose sur les caractères biochimiques présentés dans le tableau 1, page 17.

L'identification automatisée ou semi-automatisée est possible grâce à différents systèmes : Vitek<sup>®</sup> (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), API 20E<sup>®</sup>, API 32GN<sup>®</sup> (bioMérieux), MicroScan<sup>®</sup> (WalkAway, Dade Behring, Etats-Unis), etc. L'identification phénotypique de *R. planticola*, *R. terrigena* et *R. ornithinolytica* est rendue difficile du fait de l'absence de codage de ces espèces dans la base de données de certaines galeries d'identification (dont API 20E<sup>®</sup>). Elles peuvent alors être confondues avec *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* (9).

Par ailleurs, en diagnostic de routine les 3 sous-espèces de *K. pneumoniae* ne sont pas toujours différenciées.

**Tableau 1 : Diagnostic différentiel des espèces des genres *Klebsiella* et *Raoultella* (10).**

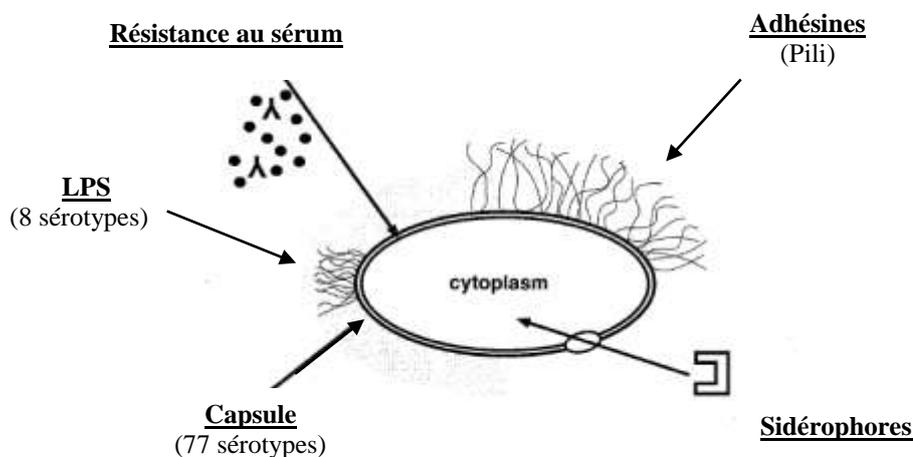
Tests	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>K. oytoca</i>	<i>R. terrigena</i>	<i>R. planticola</i>	<i>R. ornithinolytica</i>
	subsp. <i>pneumoniae</i>	subsp. <i>ozanae</i>	subsp. <i>rhinoscleromatis</i>				
Indole	-	-	-	+	-	+	+
ODC	-	-	-	-	-	-	+
LDC	+	v	-	+	+	+	+
VP	+	-	-	+	+	+	+
Croissance et fermentation du glucose à :							
- 4°C	-	-	-	-	+	+	+
- 10°C	-	-	-	+	+	+	+
- 41°C	+	+	+	+	-	+	+
Assimilation à 30°C :							
- Ethanolamine	+	v	+	+	-	-	-
- D-mélézitose	-	-	-	-	+	-	-

ODC : ornithine décarboxylase, LDC : lysine décarboxylase, VP : Voges Proskauer, v : variable

## IV Facteurs de pathogénicité

*K. pneumoniae* est un pathogène opportuniste fréquent, isolée le plus souvent, d'infections urinaires, respiratoires ou lors de septicémies. Habituellement saprophyte, chez l'Homme, elle profite d'une défaillance du système immunitaire de l'hôte pour provoquer une infection. Les facteurs de pathogénicité sont résumés sur la figure ci-dessous.

**Figure 3 : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *Klebsiella* sp. (7).**



### IV.1 La capsule

La plupart des souches isolées produisent une capsule polysaccharidique, de structure fibrillaire, recouvrant la totalité de la paroi bactérienne et apparaissant, à la coloration de Gram, sous la forme d'un halo clair. Les sous-unités de cette capsule sont composées par quatre ou six sucres, avec une prédominance d'acide glucuronique, conférant une charge négative à la capsule. Les antigènes capsulaires K déterminent 77 sérotypes (2). Les études de létalité chez la souris ont montré que les sérotypes K1 et K2 pouvaient être considérés comme les plus virulents (11).

#### IV.1.1 Adhérence

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

#### **IV.1.2 Protection contre la phagocytose, l'action du complément et le pouvoir**

##### **bactéricide du sérum**

Lorsque la bactérie pénètre dans l'organisme d'un hôte, son système immunitaire réagit et mobilise des défenses à la fois spécifiques et non spécifiques. L'immunité non spécifique fait intervenir les cellules phagocytaires, le complément, les protéines de l'inflammation et les peptides anti-bactériens.

Le complément peut être activé selon deux voies : la voie alterne, qui est activée directement par certains polysaccharides bactériens et est mise en jeu avant l'apparition de l'immunité innée ; la voie classique, qui est activée par certains anticorps liés à leur antigène spécifique. Quelle que soit la voie d'activation, il en résulte un dépôt de C3b sur les bactéries. La capsule inhibe la fixation de la fraction C3b, agissant par opsonisation, et perturbe alors la phagocytose par les polynucléaires et les monocytes-macrophages (12).

Par ailleurs, la capsule protège contre l'action lytique du complément : l'activation de la cascade du complément aboutit normalement à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC - C5b-C9) qui va former un pore dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif, entraînant une lyse osmotique. La capsule permet d'échapper à cette première ligne de défense non spécifique (7).

Enfin, la capsule protège contre le pouvoir bactéricide du sérum (13).

#### **IV.1.3 Protection contre les peptides anti-microbiens**

Les peptides antimicrobiens, comme la lactoferrine, la polymyxine B, le sulfate de protamine et le lysozyme, sont des armes essentielles pour la défense antibactérienne *in vivo*, en particulier au niveau de l'appareil respiratoire. Ils sont sécrétés par les glandes muqueuses, les cellules épithéliales et les polynucléaires neutrophiles. La capsule confère à la bactérie une protection contre ces peptides, limitant leur interaction avec la surface bactérienne. Par ailleurs, en présence de polymyxine B et de lactoferrine, *K. pneumoniae* est capable d'accroître la synthèse de sa capsule, en augmentant la transcription du gène *cps* correspondant (14).

## IV.2 Les adhésines

Une infection débute généralement par la fixation de la bactérie sur les muqueuses. Cette fixation évite à la bactérie d'être éliminée par des phénomènes mécaniques tels que le flux urinaire, la toux ou les mouvements péristaltiques de l'intestin. Chez *K. pneumoniae*, les phénomènes d'adhérence sont dépendants des pili (*fimbriae*). Ce sont des projections filamenteuses situées à la surface de la bactérie, qui permettent un rapprochement étroit, puis une fixation aux cellules hôtes. Les pili sont formés d'unités de piline, ils mesurent 10 µM de long et 1 à 11 nm de diamètre. Différents types de pili sont décrits, dont deux prédominent chez *Klebsiella* sp.

- Pili de type I (ou commun)

Ils sont impliqués dans l'adhérence aux cellules épithéliales et aux muqueuses des tractus urogénital, respiratoire et intestinal (15). Leur rôle dans la physiopathologie des infections urinaires à *K. pneumoniae* a été clairement démontré à l'aide de modèles animaux (16). Leur implication lors de pyélonéphrites s'explique par leur capacité à adhérer aux cellules tubulaires proximales (17).

Il existe un phénomène de « variation de phase » contrôlé par des facteurs génétiques et environnementaux. Lorsque la bactérie a pénétré dans les tissus situés sous les muqueuses, elle n'exprime plus les pili de type I ; en effet, ceux-ci deviennent alors inutiles et favoriseraient la phagocytose par liaison à des récepteurs spécifiques sur les leucocytes (18).

- Pili de type III

Ils sont capables d'adhérer aux cellules endothéliales et aux cellules épithéliales des tractus urogénital et respiratoire (19). Au niveau des reins, ils sont impliqués dans l'adhérence aux membranes tubulaires, à la capsule de Bowman et aux vaisseaux sanguins (20).

D'autres adhésines ont été décrites :

- CF29K, dont le gène est codé par un plasmide, permet l'adhérence aux cellules intestinales (21) : son homologue CS31A chez *Escherichia coli* est impliqué lors de diarrhées ; elle appartient à la famille des adhésines K88 (adhésines de type non *fimbriae*) (22).

- Une adhésine dont la composition se rapproche de celle de la capsule (adhésine de

type non *fimbriae* - 23).

- KPF-28, impliquée dans l'adhérence aux cellules de l'intestin (adhésine de type *fimbriae* - 24).

### **IV.3 Les endotoxines**

Comme tous les bacilles à Gram négatif, *K. pneumoniae* possède une endotoxine encore appelée lipopolysaccharide (LPS), composée de trois parties : le lipide A, le core polysaccharidique et la chaîne latérale O. Le LPS provoque une activation du système immunitaire induisant des effets physiopathologiques chez l'hôte, *via* la sécrétion de différentes cytokines pro-inflammatoires (leucopénie, réaction fébrile, voire choc anaphylactique et collapsus - 25).

### **IV.4 Les sidérophores**

La concentration en fer libre dans les tissus hôtes est insuffisante pour assurer la croissance bactérienne. La plupart des bactéries sécrètent des chélateurs de fer de faible poids moléculaire, les sidérophores, capables de rentrer en compétition avec les protéines de l'hôte, pour capter le fer.

Deux groupes de sidérophores ont été décrits :

- Les sidérophores de type phénolate, tel que l'entérobactine ;
- Les sidérophores de type hydroxymate, comme l'aérobactine.

Le rôle de l'entérobactine, comme facteur de virulence, n'a pas été démontré. A l'inverse, celui de l'aérobactine, grâce à des modèles animaux, a été prouvé (26). En revanche, il ne semble pas jouer un rôle essentiel chez *Klebsiella* sp., par rapport à d'autres entérobactéries (13).

## **V Pouvoir pathogène**

### **V.1 Pneumonies communautaires**

*K. pneumoniae* est connue depuis plus d'un siècle comme responsable de pneumonie communautaire. Cependant, une diminution de l'incidence de cette pathologie a été notée ces dernières années (27).

Le tableau typique est celui, d'une pneumonie de début brutal, se traduisant par une fièvre élevée, associée à des frissons, des douleurs thoraciques, un syndrome pseudo-grippal et une toux s'accompagnant de crachats souvent hémoptoïques. L'issue est souvent fatale, malgré une antibiothérapie adéquate : le taux de mortalité rapporté est de 50 % (28).

Les patients alcooliques chroniques constituent la principale population à risque identifiée. Dans cette population, une pneumonie associée à une bactériémie engendre une mortalité de 100 % (29).

### **V.2 Abscess hépatique pyogène communautaire**

Depuis une vingtaine d'années, une pathologie communautaire due à *K. pneumoniae* émerge : l'abcès hépatique pyogène (PLA - 30). Le premier cas de PLA a été décrit chez un patient diabétique à Taïwan. D'autres cas ont ensuite été rapportés dans différents pays d'Asie, en Amérique du Nord et en Europe.

Les signes retrouvés à l'examen clinique dans ce contexte sont peu spécifiques : asthénie, anorexie, fièvre (31). Une bactériémie est présente dans 95 % des cas. Des métastases septiques de localisations diverses peuvent être observées dans certains cas : endophtalmites, abcès et/ou embolies pulmonaires, abcès cérébraux et/ou méningites purulentes, ostéomyélites, arthrites... (32, 33).

Les principaux facteurs de risque de PLA à *K. pneumoniae* semblent être le diabète (34), une pathologie des voies biliaires (cancers, chirurgie préalable...) et l'origine ethnique (prévalence plus élevée chez les patients originaires d'Asie - 35). Le traitement associe le plus souvent un drainage chirurgical à une antibiothérapie (36). Le taux de mortalité varie selon les études de 2,5 (35) à 6 % (34).

### **V.3 Méningites**

*K. pneumoniae* est rarement responsable de méningite communautaire. Néanmoins, dans une étude rétrospective des méningites bactériennes chez l'adulte observées entre 1987 et 1995, à Taïwan, Tang LM. *et al.* ont montré que *K. pneumoniae* était isolée dans 16,5 % des cas (37). Les facteurs de risques étaient le sexe masculin, un diabète et une cirrhose. La mortalité des méningites à *K. pneumoniae* était de 50 %. Les facteurs de mauvais pronostic mis en évidence étaient : un âge > 60 ans, un diabète, une bactériémie associée, ainsi que la présence d'un déficit neurologique sévère lors de la mise en route du traitement.

### **V.4 Pathologies spécifiques : ozène et rhinosclérome**

L'ozène est une rhinite chronique atrophique, liée à *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*. L'infection se manifeste par une ulcération chronique de la muqueuse nasale pouvant aboutir à une perforation du cartilage nasal, accompagnée de décharges purulentes nauséabondes (10).

Le rhinosclérome est une infection granulomateuse chronique des voies aériennes supérieures, liée à *K. pneumoniae* subsp. *rhinosleromatis* (10). Cette pathologie, rare en France, persiste à l'état endémique en Europe de l'Est, en Afrique centrale, Amérique du Sud et en Asie du Sud-ouest (38).

### **V.5 Infections nosocomiales**

Actuellement, les infections à *Klebsiella* sp. sont, le plus souvent, des infections nosocomiales. Pathogènes opportunistes, les Klebsielles sont surtout isolées chez des patients hospitalisés présentant un terrain débilité (éthylisme, diabète, immunodépression, ...).

*K. pneumoniae* est l'espèce la plus fréquemment impliquée dans ce contexte. Elle est responsable de 5 à 10 % des infections acquises à l'hôpital (39), entraînant des infections urinaires, des septicémies, des pneumonies, des infections de sites opératoires et des infections néonatales (7, 10) (Tableau 2, page 24).

*K. pneumoniae* est un pathogène à fort potentiel épidémique, fréquemment impliqué lors d'infections sévères. De nombreuses épidémies nosocomiales ont été décrites, notamment

chez des patients hospitalisés dans des unités de soins intensifs adultes ou pédiatriques (40 – 42).

**Tableau 2 : Infections nosocomiales dues à *Klebsiella* sp. (7).**

Infections	Pourcentage d'infections à <i>Klebsiella</i>	Rang du genre <i>Klebsiella</i> parmi les autres bactéries
Infections du tractus urinaire	6 - 17	5 - 7
Pneumonies	7 - 14	2 - 4
Septicémies	4 - 15	3 - 8
Infections de plaie	2 - 4	6 - 11
Infections nosocomiales dans un service de soins intensifs	4 - 17	4 - 9
Septicémies néonatales	3 - 20	2 - 8

***RESISTANCE AUX B-LACTAMINES ET AUX  
QUINOLONES CHEZ K. PNEUMONIAE***

## I Résistance aux $\beta$ -lactamines

La famille des  $\beta$ -lactamines regroupe un ensemble de molécules actives sur la paroi bactérienne : elles inhibent l'activité des transpeptidases et des carboxypeptidases, les PLP (Protéines Liant les Pénicillines), impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. Elle est divisée en sous-groupes en fonction de la structure chimique du noyau de base (Tableau 3).

Les  $\beta$ -lactamines détiennent une place majeure dans l'arsenal thérapeutique anti-infectieux disponible pour le traitement des infections bactériennes. Elles restent à l'heure actuelle les molécules les plus largement prescrites.

**Tableau 3 : Classification des  $\beta$ -lactamines.**

Classe	Molécule (s)	Spectre
<b><u>Les pénicillines = "pénams"</u></b>		
<b>Pénicillines G et V ("naturelles")</b>	pénicilline G, pénicilline V	Spectre étroit. Inactif sur les bacilles Gram -
<b>Pénicillines M</b>	méticilline, oxacilline, cloxacilline	Spectre limité aux staphylocoques sensibles
<b>Pénicillines A (aminopénicillines)</b>	amoxicilline	Spectre élargi à certains bacilles Gram -
<b>Carboxypénicillines</b>	ticarcelline	Spectre élargi au <i>Pseudomonas</i>
<b>Uréidopénicillines</b>	mezlocilline, pipéracilline	Spectre élargi à certains bacilles Gram -
<b>Inhibiteurs de <math>\beta</math>-lactamases</b>	acide clavulanique, sulbactam, tazobactam	Pas d'activité anti-bactérienne propre Inhibe la majorité des pénicillinases
<b><u>Les céphalosporines = "céphèmes"</u></b>		
<b>Céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération (C1G)</b>	céfaloine, céfalexine, céfclor	Actives sur les Gram + et sur les Gram -
<b>Céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération (C2G)</b>	céfuroxime, céfamandole, céfoxitine	idem C1G + meilleure résistance aux $\beta$ -lactamases
<b>Céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G)</b>	céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime	Spectre large (entérobactéries, <i>P. aeruginosa</i> ...)
<b>Céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération (C4G)</b>	céfépime, cefpirome	Spectre large
<b><u>Les monobactams</u></b>		
	Aztréonam	Inactifs sur Gram + et anaérobies
<b><u>Les carbapénèmes = "pénèmes"</u></b>		
	Imipénème, méropénème, ertapénème, doripénème	Spectre très large : Gram +, anaérobies, Gram - Actifs sur le <i>P. aeruginosa</i> sauf l'ertapénème

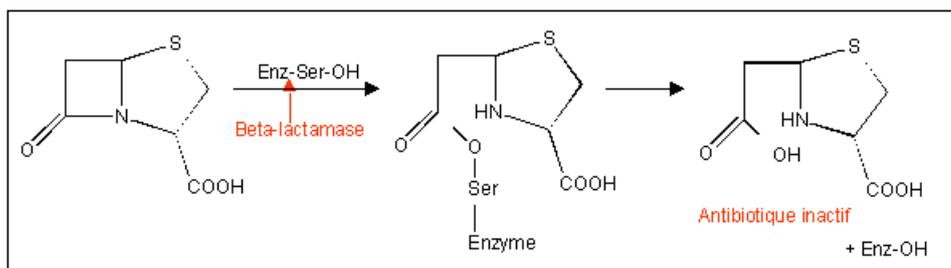
## I.1 Généralités sur la résistance enzymatique aux $\beta$ -lactamines

La première  $\beta$ -lactamase a été décrite dès 1940 par Abraham *et al.*, qui ont mis en évidence une enzyme capable d'empêcher l'action de la pénicilline chez *E. coli* ; ils la nommèrent alors pénicillinase (43). La découverte par la suite d'enzymes hydrolysant d'autres  $\beta$ -lactamines, céphalosporines, monobactams ou carbapénèmes, laisse place au nom de  $\beta$ -lactamases.

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines. Chez les bacilles à Gram négatif, elles sont localisées au niveau de l'espace périplasmique. L'inactivation survient après ouverture du cycle  $\beta$ -lactame par l'enzyme, structure commune à toutes les molécules de cette famille (Figure 4). L'enzyme hydrolyse le pont amide du cycle  $\beta$ -lactame pour donner une acyl-enzyme qui sera ensuite dégradée en acide inactif. Le support génétique des  $\beta$ -lactamases est soit chromosomique, soit plasmidique.

Chez les entérobactéries, ces enzymes constituent le mécanisme prépondérant de résistance aux  $\beta$ -lactamines. Depuis trente ans, la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques a toujours été suivie, dans un délai plus ou moins long, par l'émergence de bactérie de sensibilité diminuée à ces molécules. En effet, les bactéries étant dotées d'extraordinaires facultés d'adaptation vis-à-vis des traitements mis en œuvre, suite à la mise sur le marché d'une nouvelle molécule, apparaissent et se développent des bactéries productrices d'enzyme inactivant ce nouvel antibiotique. L'alphabet des  $\beta$ -lactamases ne cesse de croître, avec la description d'enzymes conférant une résistance naturelle ou liées à l'acquisition par ces bactéries, d'éléments génétiques mobiles de supports toujours plus complexes. Ceci constitue aujourd'hui un problème majeur en antibiothérapie.

**Figure 4 : Inactivation des  $\beta$ -lactamines par une  $\beta$ -lactamase (<http://www.antiinfectieux.org>).**



## **I.2 Rappel sur la classification des $\beta$ -lactamases**

Aujourd'hui, plus de 650  $\beta$ -lactamases ont été mises en évidence chez les bacilles à Gram négatif. Elles sont très hétérogènes (structures nucléotidiques diverses, activité hydrolytique variable d'une enzyme à l'autre) expliquant la difficulté à les classer. Différentes classifications se sont succédé au fur et à mesure des avancées scientifiques.

Les deux classifications les plus utilisées, détaillées dans le tableau 4, page 30, sont celle d'Amblar et celle de Bush.

### **I.2.1 Classification de Amblar**

En 1980, Amblar a proposé de classer les  $\beta$ -lactamases en fonction de leur structure moléculaire, reposant sur leur séquence en acides aminés (44). A cette époque, deux classes d'enzymes étaient décrites : la classe A regroupant des enzymes à activité de type sérine-protéase et la classe B constituée par des métallo-enzymes dont l'activité nécessite la présence d'un atome de zinc. La classe C correspondant aux céphalosporinases (sérine-enzyme) a été décrite en 1981 par Jaurin et Grunström (45). La classe D regroupant les oxacillinases a été dissociée des autres classes de sérine-enzymes au milieu des années 90 (46). Cette classification est la plus utilisée en pratique médicale et est disponible sur le site : <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>

- Classe A

La classe A comprend des enzymes à sérine-active inhibées par l'acide clavulanique hydrolysant préférentiellement les pénicillines et, à moindre degré, les céphalosporines. Le support génétique est chromosomique ou plasmidique. Cette classe comprend des  $\beta$ -lactamases à spectre restreint (TEM-1, TEM-2, SHV-1), des  $\beta$ -lactamases résistantes aux inhibiteurs (TEM-30 à 45, TEM-59), des  $\beta$ -lactamases à spectre étendues ou BLSE (SHV-2 à SHV-9, TEM-3 à TEM-29, CTX-M, PER-1, VEB-1...) et des carbapénémases (NmcA, IMI-1, KPC...)

- Classe B

Elle comprend des métallo-enzymes nécessitant un atome de zinc pour être active. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser l'ensemble des  $\beta$ -lactamines, y compris les

carbapénèmes. Leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique. *In vitro*, l'activité des  $\beta$ -lactamines est restaurée par l'EDTA qui chélate l'ion divalent et inhibe l'action de la métallo-enzyme. Le support génétique est chromosomique ou plasmidique.

- Classe C

Elle est constituée d'enzymes à sérine-active capables d'hydrolyser les céphalosporines. Elles restent insensibles à l'action de l'acide clavulanique. Le support génétique est chromosomique ou plasmidique. Leur action est inhibée *in vitro* par la cloxacilline (47).

- Classe D

Cette classe regroupe des enzymes à sérine-active capables d'hydrolyser les pénicillines et, plus particulièrement l'oxacilline et ses dérivés : ce sont des oxacillinases ou OXA. Elles ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique.

### **I.2.2 Classification de Bush-Jacoby-Medeiros**

Cette classification fonctionnelle proposée initialement en 1989 a été mise à jour en 1995 (48). Elle reflète le spectre d'hydrolyse des enzymes : elle prend en compte le profil de substrats et le profil d'inhibition. Elle reste malgré tout peu utilisée en pratique médicale.

Le groupe 1 regroupe des céphalosporinases peu inhibées par l'acide clavulanique. L'enzyme type de cette famille est la céphalosporinase AmpC et ses dérivés retrouvés chez les bacilles à Gram négatif.

Le groupe 2 se compose de  $\beta$ -lactamases inhibées par l'acide clavulanique (classe A) ou non (classe D de Ambler). En 1995, en raison de l'augmentation du nombre de dérivés des  $\beta$ -lactamases TEM et SHV, différents groupes de préfixes 2b ont été ajoutés : 2be ( $\beta$ -lactamases à spectre étendu), 2br ( $\beta$ -lactamases dérivant du groupe 2b ayant une affinité réduite pour l'acide clavulanique) et le groupe 2f (carbapénémases possédant un site à sérine-active et inhibées par l'acide clavulanique).

Le groupe 3 est composé par les métallo- $\beta$ -lactamases peu inhibées par les inhibiteurs classiques des  $\beta$ -lactamases mais inhibées par l'EDTA et le para-chloromercuribenzoate (48).

**Tableau 4 : Classification des  $\beta$ -lactamases selon Ambler et Bush-Jacoby et Medeiros (48).**

Classification de Bush-Jacoby-Medeiros	Classification de Ambler	Substrats	Enzymes représentatives
1	C	Céphalosporines	Enzymes AmpC des bacilles à Gram - : CMY-1 à CMY-11, DHA-1 à DHA-3, MIR-1, ACT-1, ACC, FOX-1 à FOX-5, MOX-1, BIL-1, LAT-1 et LAT-2
2a	A	Pénicillines	Pénicillinase des Gram +
2b	A	Pénicillines, C1G	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Pénicillines, C1G, C2G, C3G, monobactams	TEM-3 à TEM-29, TEM-42, TEM-43, TEM-51, SHV-2 à SHV-9, PER-1, PER-2, CTX-M, VEB-1, TOHO-1
2br	A	Penicillines	TEM-30 à TEM-41, TEM-44 et 45, TRC-1
2c	A	Pénicillines, carbénicillines	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Pénicillines, cloxacilline	OXA-1 à OXA-11
2e	A	Céphalosporines	Céphalosporinase inductible de <i>Proteus vulgaris</i>
2f	A	Pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes	NMC-A, SME-1, IMI-1, KPC-1 à KPC-4
3	B	La plupart des $\beta$ -lactamines, y compris les carbapénèmes	IMP-1 à IMP-18, VIM-1 à VIM-12, SPM-1, GIM-1, SIM-1
4	ND	Pénicillines	Pénicillinase de <i>Burkholderia cepacia</i>

ND : Non déterminé

## I.2 Résistance enzymatique chez *Klebsiella pneumoniae*

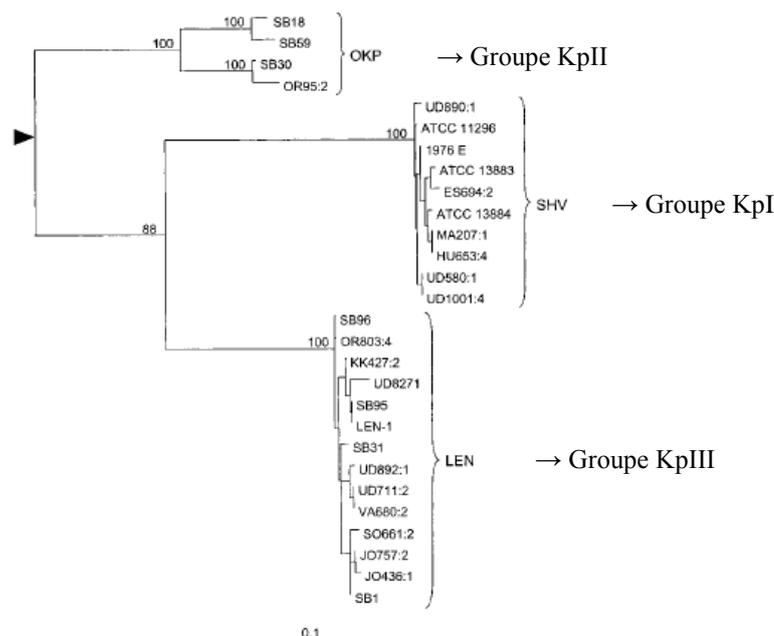
### I.2.1 Résistance naturelle

#### I.2.1.1 Phénotype sauvage

*K. pneumoniae* est classée au sein du groupe 2 des entérobactéries. Le phénotype correspondant appelé phénotype « pénicillinase de bas niveau » se caractérise par la production naturelle, constitutive à bas niveau, d'une pénicillinase codée par un gène chromosomique, inactivant la benzylpénicilline, les amino- (amoxicilline) et les carboxypénicillines (ticarcilline). Cette  $\beta$ -lactamase naturelle appartient à la classe A de Ambler et au groupe 2b de Bush. Elle est inhibée par de faibles concentrations d'inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases et est donc sensible aux associations amoxicilline + acide clavulanique ou ticarcilline + sulbactam.

Trois familles de  $\beta$ -lactamases ont été identifiées chez les isolats cliniques de *K. pneumoniae* : SHV (49), LEN (50) et plus récemment, OKP (51). Les enzymes de type SHV-1, restent cependant prédominantes (80 à 90 % des souches de *K. pneumoniae*) (52, 53). En 2004, Haeggman *et al.* (51) ont montré, grâce à une analyse phylogénétique portant sur 28 souches de *K. pneumoniae*, que les gènes des  $\beta$ -lactamases SHV, LEN et OKP avaient évolué parallèlement aux trois groupes phylogénétiques décrits par Brisse *et al.*, en 2001 (54) : KpI, KpIII et KpII respectivement (Figure 5).

**Figure 5 : Phylogénie du gène chromosomique de la  $\beta$ -lactamase de *K. pneumoniae* (51).**

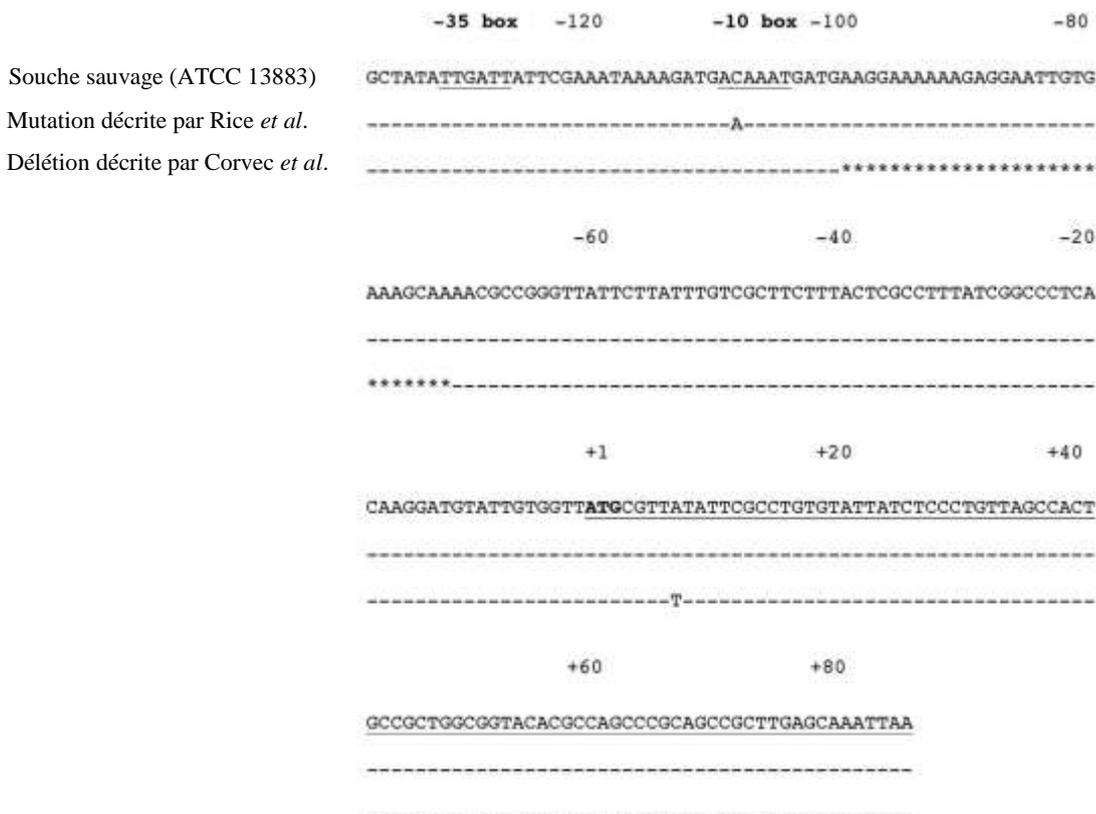


### I.2.1.2 Phénotype hyperproducteur

L'hyperproduction par *K. pneumoniae* de sa  $\beta$ -lactamase chromosomique de classe A, SHV-1, a été décrite pour la première fois, en 2000, par Rice *et al.* (55). Par mutagenèse dirigée, ils ont montré qu'une mutation survenant au niveau du promoteur du gène *bla*<sub>SHV-1</sub> (substitution C  $\rightarrow$  A de la 2<sup>ème</sup> base de la boîte Pribnow), était associée à une production 200 fois plus élevée de SHV-1. En 2006, Corvec *et al.* (56) ont décrit une délétion de 30 paires de bases située en aval de la boîte Pribnow du gène *bla*<sub>SHV-1</sub>, responsable d'une production 15 fois plus importante de SHV-1 (Figure 6).

Chez *K. pneumoniae*, l'hyperproduction de SHV-1 se traduit sur l'antibiogramme, par une résistance aux aminopénicillines et dérivés sans et avec inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases ainsi qu'à la céfalotine (57).

**Figure 6 : Représentation des mutations impliquées dans l'hyperproduction de SHV-1 (56).**



Le codon start est figuré en gras et la séquence du gène *bla*<sub>SHV-1</sub> est soulignée. Les homologies de séquences sont représentées par les tirets ; les délétions sont représentées par les astérisques.

L'hyperproduction de SHV-1 reste un phénomène rare chez *K. pneumoniae*. Au C.H.U. de Nantes, ce mécanisme était présent chez moins de 1 % des souches (56). Cependant, il est important de ne pas méconnaître ce mécanisme car l'association : hyperproduction de SHV-1 + imperméabilité peut induire une résistance à la ceftazidime et conduire ainsi à l'identification erronée d'une BLSE (58).

## **I.2.2 Résistance acquise**

### I.2.2.1 Résistance aux inhibiteurs de $\beta$ -lactamases

Les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases ont été développés pour restaurer l'efficacité des  $\beta$ -lactamines lors de l'acquisition de  $\beta$ -lactamases de type pénicillinase, par les entérobactéries.

Un premier mécanisme de résistance aux inhibiteurs est l'acquisition de  $\beta$ -lactamases de type TEM résistantes aux inhibiteurs (TRI), qui sont des variants des  $\beta$ -lactamases à spectre restreint TEM-1 ou TEM-2 : TEM-39 à TEM-41, TEM-44, TEM-45, TEM-59 (59). Les substitutions ponctuelles d'acides aminés, responsables de ce phénotype, sont distinctes de celles responsables du phénotype BLSE et sont localisées dans des zones proches ou à l'intérieur du site catalytique, empêchant l'activité des inhibiteurs (59).

Ces enzymes, principalement décrites chez *E. coli*, ont également été retrouvées chez *K. pneumoniae* (60). Le phénotype correspondant à l'acquisition de ces TRI se caractérise par une résistance à l'amoxicilline, à la ticarcilline, à la pipéracilline et aux associations amoxicilline + acide clavulanique, ticarcilline + acide clavulanique. Le tazobactam peut rester actif sur ces enzymes (61). L'activité des céphalosporines demeure conservée.

Un second mécanisme de résistance aux inhibiteurs est lié à l'hyperproduction par *K. pneumoniae* de TEM-1, TEM-2 ou SHV-1. L'hyperproduction d'enzyme de type TEM est due, le plus fréquemment, à une mutation ponctuelle localisée en amont (position -177) du codon d'initiation du gène *bla*<sub>TEM</sub>. L'enzyme TEM avec ce type de promoteur est alors produite à un taux 10 fois plus important qu'en présence du promoteur sauvage (62).

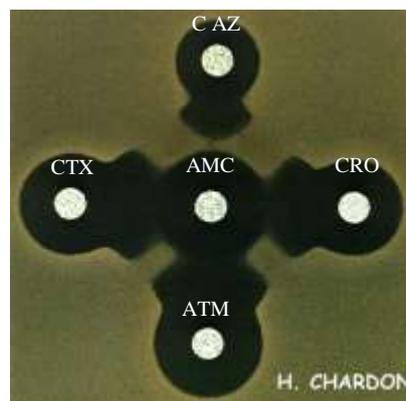
### I.2.2.2 BLSE

En 1980, l'introduction des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, les oxyimino-céphalosporines, ayant une meilleure activité antibactérienne et réputées non hydrolysables par les  $\beta$ -lactamases de type TEM, a constitué un réel progrès thérapeutique. Dès lors, ces antibiotiques furent largement prescrits pour le traitement des infections sévères à bacilles à Gram négatif. Sans surprise, suite à l'utilisation massive des  $\beta$ -lactamines à large spectre, l'émergence de la résistance a été rapidement observée chez certaines souches de *K. pneumoniae*, isolées essentiellement en milieu hospitalier. La première enzyme capable d'hydrolyser ces nouvelles  $\beta$ -lactamines a été décrite en 1983 par Knothe, chez une souche de *K. pneumoniae* isolée en Allemagne (63). En raison de son large spectre d'activité, cette enzyme fut qualifiée de  $\beta$ -lactamase à large spectre (BLSE - 64). Cette enzyme constituait la première description d'un variant plasmidique de l'enzyme chromosomique de *K. pneumoniae*, SHV-1 et fut dénommée SHV-2 (65).

Le nombre et la diversité des BLSE, initialement rencontrées en Europe, puis décrites dans le monde entier, ont rapidement augmenté et de nouveaux mécanismes régulant leur production et leur dissémination ont été mis en évidence (59, 66).

Le phénotype de résistance acquis lié à la production de BLSE se caractérise par une diminution de l'activité des pénicillines, des céphalosporines, ainsi que de l'aztréonam ; les céphamycines (céfoxitine) et carbapénèmes restent actifs. Une forte synergie est observée entre les  $\beta$ -lactamines inactivées (céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération) et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, tels que l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam (Figure 7). Parmi ces trois inhibiteurs, l'acide clavulanique reste le plus efficace (67) et cette synergie est à la base des tests de détection des souches productrices de BLSE au laboratoire (59).

**Figure 7 : Image de synergie dite « en bouchon de champagne » évocatrice d'une BLSE.**  
(<http://www.acnbh.org>)



Jusqu'à la fin des années 90, les BLSE étaient principalement identifiées chez des souches de *K. pneumoniae* en milieu hospitalier. Ces BLSE dérivait des pénicillinases à spectre restreint TEM et SHV, dont le spectre d'hydrolyse était élargi par la sélection de mutations ponctuelles localisées au niveau du site actif de l'enzyme. Actuellement, plus de 160 variants de TEM et 100 variants de SHV sont connus (59). De nombreuses épidémies ont été décrites associées à la diffusion de quelques clones (clone K25 produisant SHV-4 - 40). Au début des années 2000, l'identification des premières souches de *E. coli* communautaires productrices de BLSE, de type CTX-M, a modifié l'épidémiologie (68, 69). Des infections nosocomiales associées à la production de *E. coli* producteurs de CTX-M ont été décrites très rapidement (70, 71).

Actuellement, les BLSE de type CTX-M sont les plus fréquentes. La dissémination de ces enzymes, en particulier du variant CTX-M-15, concerne maintenant l'ensemble des entérobactéries, notamment *K. pneumoniae* (72). Ces enzymes doivent leur dénomination en raison d'une plus forte hydrolyse du céfotaxime. Le variant CTX-M-15 présente une mutation ponctuelle en position 240 qui conduit alors à une plus forte hydrolyse de la ceftazidime par rapport au céfotaxime. En Europe, des cas sporadiques de *K. pneumoniae* productrices de CTX-M-15 ont été rapportés. C'est le cas en France, en Angleterre, en Italie, en Espagne et au Portugal. Dans ces différents pays, la comparaison moléculaire des souches de *K. pneumoniae* n'a pas mis en évidence de dissémination d'un clone majeur, producteur de CTX-M-15, mais plusieurs groupes de souches proches les unes des autres (73). De façon plus alarmante, des épidémies hospitalières de *K. pneumoniae* CTX-M-15 ont également été décrites en Russie, en France, en Hongrie et en Suède, caractérisant le fort potentiel épidémique de cette espèce d'entérobactérie et favorisant la dissémination de ce type de BLSE (73).

D'autres BLSE, ne dérivant ni de TEM, ni de SHV, ni de CTX-M, ont été décrites mais sont rarement observées chez *K. pneumoniae* :

- PER-1, décrite initialement chez *Pseudomonas aeruginosa* en Turquie (74), puis chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et *Acinetobacter baumannii* (75, 76)
- PER-2, décrite chez *S. enterica* serovar Typhimurium en Amérique du Sud (77)
- VEB-1, retrouvée chez des souches de *E. coli* et de *P. aeruginosa* (78)
- GES-1, dérivée d'une pénicillinase présente chez *Proteus mirabilis*, a été décrite par Poirel *et al.* chez une souche de *K. pneumoniae* isolée en Guyane (79).

Différentes études de surveillance mondiale ont confirmé cette omniprésence des BLSE chez *K. pneumoniae*. En Europe, entre 1997 et 2004, la prévalence de ces souches est passée de 9 à 13,6 % selon le programme « meropenem yearly susceptibility test information collection » (MYSTIC - 73). Des études nationales réalisées en France, en Italie, en Espagne, en Belgique et en Pologne corroborent ce résultat (80).

L'isolement de *K. pneumoniae* productrice de BLSE restreint considérablement l'arsenal thérapeutique disponible pour le traitement des infections sévères. L'association de nombreux gènes de résistances (aux aminoglycosides ou fluoroquinolones) sur les mêmes plasmides limite alors l'utilisation de plusieurs familles d'antibiotiques (81).

### I.2.2.3 Carbapénémases de classe A

Les carbapénèmes tels que l'imipénème ou le méropénème représentent une alternative de choix dans le traitement des infections sévères à entérobactéries productrices de BLSE ou de céphalosporinases de haut niveau (82). L'émergence de résistance à l'égard des pénèmes constitue une inquiétude, menant le plus souvent à une impasse thérapeutique (83).

Les carbapénémases de classe A, les plus fréquemment rencontrées sont de loin les enzymes de type KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase). La première souche de *K. pneumoniae* productrice de KPC a été identifiée en 1996, en Caroline du Nord (84). Cette souche était résistante à toutes les  $\beta$ -lactamines, mais les CMI des carbapénèmes étaient faiblement abaissées après addition d'acide clavulanique. La découverte de cette  $\beta$ -lactamase plasmidique, dénommée KPC-1, a été suivie par la description d'un variant, KPC-2, identifié chez des patients hospitalisés sur la côte Est des Etats-Unis (85). La vérification récente des séquences des gènes codant pour KPC-1 et KPC-2 a montré que ces deux gènes étaient identiques. Depuis leur découverte, cinq autres variants (KPC-3 à KPC-7) ont été rapportés dans plusieurs pays, différant de KPC-1/2 par la substitution d'au moins deux acides aminés (86 – 88).

Des données biochimiques ont montré que ces enzymes hydrolysaient toutes les  $\beta$ -lactamines : pénicillines, céphalosporines et monobactams (aztréonam). Les céphamycines et la ceftazidime sont faiblement hydrolysées. L'imipénème, le méropénème, l'ertapénème, le céfotaxime et l'aztréonam sont hydrolysés de manière moins efficace que les pénicillines et les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération. Par conséquent, les enzymes de type KPC sont parfois difficiles à mettre en évidence et peuvent être identifiées à tort comme des BLSE (83). A la différence des BLSE, elles ne sont que faiblement inhibées par les inhibiteurs de  $\beta$ -

lactamases (84). La seule présence d'une KPC ne confère qu'une diminution de sensibilité aux carbapénèmes aux bactéries qui la produisent. La conjugaison de ces  $\beta$ -lactamases à large spectre à des phénomènes d'imperméabilité concourt alors à une résistance avérée aux carbapénèmes (89).

Ces enzymes KPC étaient majoritairement détectées chez des souches de *K. pneumoniae*. Désormais, ces  $\beta$ -lactamases ont diffusé chez d'autres espèces bactériennes comme *E. coli*, *Salmonella* sp., *Enterobacter cloacae*, *P. mirabilis*, *K. oxytoca*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*... (83, 85). Initialement décrites aux Etats-Unis et en Israël (83, 87), elles ont rapidement diffusé dans le monde entier et ont été décrites en Amérique du Sud (90) et en Chine (91, 92). En Europe, seuls quelques cas ont été rapportés. En France, sept souches productrices de KPC ont été isolées ; il s'agissait de souches de *K. pneumoniae*, de *E. coli* et de *E. cloacae* isolées chez des patients transférés d'hôpitaux situés aux Etats-Unis, en Grèce ou en Israël (83).

La dissémination rapide des ces gènes au sein de différentes espèces ou clones de *K. pneumoniae* souligne la facilité de transmission, entre bactéries, des supports génétiques de ces gènes (83).

Les gènes *bla*<sub>KPC</sub> sont habituellement identifiés sur des grands plasmides de tailles et de structures variées (83). Ils portent souvent en plus du gène *bla*<sub>KPC</sub>, des gènes codant pour la résistance aux aminoglycosides, aux fluoroquinolones (QnrA et QnrB) et/ou des gènes codant pour d'autres  $\beta$ -lactamases comme *bla*<sub>CTX-M</sub> (93).

Le typage moléculaire, par technique MLST (Multi-Locus Sequence Typing) (94), a montré qu'au sein de l'espèce *K. pneumoniae*, un ST (Sequence Type) semblait nettement associé à ce type de  $\beta$ -lactamase : le ST258 (95 – 97).

#### I.2.2.4 Enzymes de classe B

Les  $\beta$ -lactamases de classe B de Ambler hydrolysent toutes les  $\beta$ -lactamines et très fortement les carbapénèmes. L'émergence de ces enzymes codées par des gènes plasmidiques, habituellement décrites chez *P. aeruginosa* et *A. baumannii* génère une réelle inquiétude (98, 99).

VIM-2 est l'enzyme prépondérante dans le monde (98). Chez les entérobactéries, ces enzymes sont moins fréquemment rencontrées. En 2004, en France, VIM-1 a été détectée pour la première fois en association avec la BLSE SHV-5, chez une souche de *K. pneumoniae* (100), soulignant la nécessité d'analyser en détail, les phénotypes de multirésistance. Depuis

le début des années 2000, la fréquence d'isolement de ce type de souche ne cesse de croître en Grèce (101). D'autres auteurs ont rapporté la description de souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes par production de IMP-1 ou IMP-8 associées à des modifications de perméabilité ou à des BLSE (102, 103).

#### I.2.2.5 Enzymes de classe D

Les enzymes de classe D sont rarement retrouvées chez *K. pneumoniae*. En 2004, l'émergence d'une oxacillinase, OXA-48, a été observée chez cette espèce. Il s'agit d'une oxacillinase à spectre étendu, capable d'hydrolyser les carbapénèmes (104). Cette  $\beta$ -lactamase plasmidique, décrite essentiellement chez des souches de *K. pneumoniae*, isolées en Turquie, a également été retrouvée en Belgique et au Liban (105 – 107).

#### I.2.2.6 Enzymes de classe C

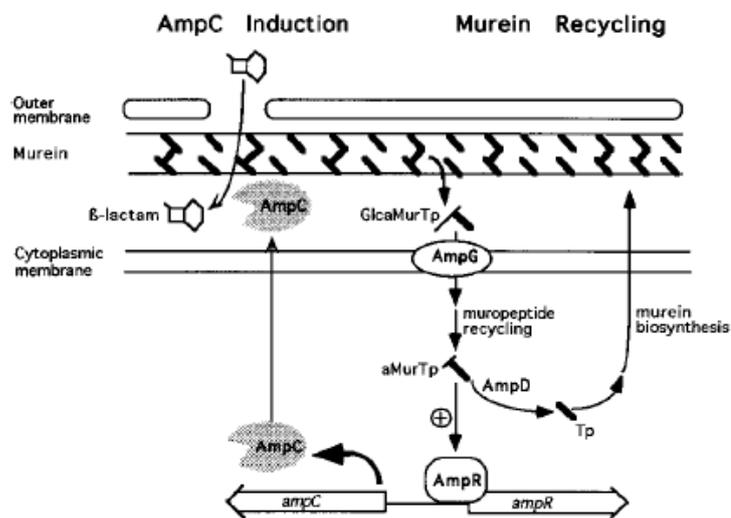
##### I.2.2.6.1 Rappel sur les $\beta$ -lactamases de classe C chromosomiques

Les  $\beta$ -lactamases de classe C chromosomiques, également dénommées  $\beta$ -lactamases AmpC sont des céphalosporinases naturelles décrites chez un grand nombre de bactéries. La régulation de leur synthèse conduit à une subdivision en deux sous-classes : d'une part, les enzymes inductibles, regroupant la majorité d'entre elles, telles que les  $\beta$ -lactamases de *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* ou *Citrobacter freundii*, ainsi que celle produite par *P. aeruginosa* et, d'autre part, les enzymes constitutives avec, comme représentant principal, la céphalosporinase AmpC de *E. coli* ou bien celle de *Acinetobacter baumannii*.

Chez les entérobactéries du groupe 3, l'expression de AmpC est induite en réponse à une exposition aux  $\beta$ -lactamines. Le mécanisme d'induction est complexe faisant intervenir un système de régulation impliquant les gènes *ampD*, *ampG* et *AmpR* et les produits de recyclage du peptidoglycane bactérien (108, 109) : en présence de  $\beta$ -lactamine, la synthèse du peptidoglycane est perturbée, cela conduit à une accumulation dans le cytoplasme de produits de dégradation de la muréine, des acides N-acétyl-glucosamine-1,6-anhydro-N-acétyl-muramyl-tripeptides (GlcNAc-anhMurNAc-tripeptides), dégradés ensuite en N-acétyl-glucosamine et en acide 1,6- anhydro-N-acétyl-muramyl tripeptides (anhMurNAc-tripeptides). Ces derniers entrent en compétition avec l'uridine-diphosphate-N-acétyl-muramyl-pentapeptide (UDP-MurNAc, qui est un précurseur du peptidoglycane) pour un site de liaison sur AmpR, qui fait parti de la famille LysR des régulateurs de transcription.

L'UDP-MurNAc maintient AmpR sous sa forme inactive. Le déplacement de l'UDP-MurNAc provoque des modifications conformationnelles de AmpR, qui va alors activer la transcription de *ampC*. Par ailleurs, la cellule possède une enzyme cytoplasmique, AmpD, une N-acétyl-muramyl-L-alanine amidase qui est capable de dégrader les anhMurNAc-tripeptides et les GlcNAc-anhMurNAc-tripeptides en tripeptides libres et en anhMurNAc et GlcNAc-anhMurNAc, réduisant alors leurs concentrations et prévenant ainsi l'hyperexpression de AmpC (Figure 8 - 110).

**Figure 8 : Interconnexion entre induction de AmpC et recyclage de la muréine (110).**



GlcMurTp : GlcNAc-anhMurNAc-tripeptide ; aMurTp : anhMurNAc-tripeptide; Tp: tripeptide

Les  $\beta$ -lactamines diffèrent entre elle par leur capacité à induire l'expression du gène *ampC* : la benzylpénicilline, l'amoxicilline et la céfalotine sont des inducteurs forts et sont de bons substrats pour les céphalosporinases AmpC. La céfoxitine et l'imipénème sont aussi des inducteurs forts mais ils sont peu hydrolysés. Le céfotaxime, la ceftriaxone, la ceftazidime, le céfépime, la pipéracilline et l'aztréonam sont des inducteurs faibles et de mauvais substrats pour ces enzymes. Toutefois, ils peuvent être hydrolysés si elles sont produites en grande quantité (111).

Des mutations du gène *ampD* vont être responsables de l'altération de l'expression de AmpC qui va alors être produite de manière constitutive à haut niveau (112). Les souches mutées détectées en clinique ont un phénotype dit « déréprimé ». Cela se traduit par une

diminution de la sensibilité aux carboxy- et uréido-pénicillines, à l'aztréonam, aux céphalosporines de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération ainsi qu'à la céfoxitine. Ces souches dites déréprimées restent, en principe, sensibles au céfépime ainsi qu'aux carbapénèmes.

Les mutations du gène *ampR* sont moins fréquemment rapportées mais peuvent elles aussi conduire à une expression à haut niveau de AmpC (113).

Enfin, les mutations du gène *ampG* sont plus rares et conduisent à une expression à bas niveau de AmpC. AmpG est une perméase localisée au niveau de la membrane interne qui assure le transport des peptides impliqués dans le recyclage des produits de dégradation de la muréine (Figure 8, page 39 - 114).

#### I.2.2.6.2 $\beta$ -lactamases de classe C plasmidiques (pAmpC)

Avec l'utilisation des 7- $\alpha$ -méthoxy-céphalosporines (céfoxitine) et l'introduction en clinique des associations  $\beta$ -lactamines + inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases, les premières  $\beta$ -lactamases de classe C plasmidiques (pAmpC) ont été progressivement rapportées (115).

- Historique

En 1976, Bobrowski *et al.*, ont décrit une  $\beta$ -lactamase plasmidique indifférentiable de l'enzyme AmpC de *E. coli*, chez une souche de *P. mirabilis* (116). Malheureusement, le plasmide original fut égaré et les études moléculaires ne purent être conduites. En 1982, Levesque *et al.* décrivaient un plasmide, support génétique d'une céphalosporinase chez un *Achromobacter* sp. (117). Là encore, la souche fût perdue et la  $\beta$ -lactamase ne put être séquencée.

En 1989, Bauernfeind *et al.* ont décrit une souche de *K. pneumoniae* isolée en Corée du Sud, dont la résistance à la céfoxitine, au céfotétan, aux pénicillines, aux oxyimino-céphalosporines et aux monobactams était transférable à une souche de *E. coli* (118). Cette enzyme, en raison de son activité sur les céphamycines, fut dénommée CMY-1. Elle était plus sensible à l'inhibition par le sulbactam que par l'acide clavulanique ou le tazobactam, suggérant une appartenance à la classe C des  $\beta$ -lactamases. Cependant, la première preuve de l'existence d'une  $\beta$ -lactamase de classe C plasmidique a été apportée par Papanicolaou *et al.*, en 1990. La résistance transférable aux  $\alpha$ -méthoxy et oxyimino- $\beta$ -lactamines était conférée par une enzyme (MIR-1), ayant les propriétés biochimiques des  $\beta$ -lactamases de classe 1 et dont le gène montrait 90 % d'homologie avec le gène *ampC* de *E. cloacae* (119).

Depuis, différentes  $\beta$ -lactamases plasmidiques de classe C ont été découvertes dans le monde entier (Tableau 5 - 120). Elles ont été nommées selon une nomenclature arbitraire : leur dénomination est soit fonction de la résistance observée : aux céphamycines (CMY), à la céfoxitine (FOX), ou au moxalactam (MOX) ; soit fonction du type de la  $\beta$ -lactamase, telles que « AmpC type » (ACT) ou « Ambler Class C » (ACC) ; enfin, elle peut être liée au lieu de découverte, tel que Miriam Hospital aux Etats-Unis (MIR-1) ou Dhahran Hospital en Arabie Saoudite (DHA), ou au nom du patient (Bilal) chez qui elle a été isolée pour la première fois (BIL-1 - 120).

**Tableau 5 : Chronologie de la découverte des  $\beta$ -lactamases plasmidiques de classe C (120).**

Nom	Pays <sup>a</sup>	Année <sup>b</sup>	Espèces	Référence
MIR-1	Etats-Unis	1988	<i>K. pneumoniae</i>	(63)
CMY-1	Corée du Sud	1988	<i>K. pneumoniae</i>	(118)
BIL-1	Grande Bretagne (Pakistan)	1989	<i>E. coli</i>	(121)
FOX-1	Argentine	1989	<i>K. pneumoniae</i>	(122)
CMY-2	Grèce	1990	<i>K. pneumoniae</i>	(123)
	France (Algérie)	1994	<i>S. senftenberg</i>	(124)
MOX-1	Japon	1991	<i>K. pneumoniae</i>	(125)
DHA-1	Arabie Saoudite	1992	<i>S. enteritidis</i>	(126)
	France	1998	<i>K. pneumoniae</i>	(127)
DHA-2	France	1992	<i>K. pneumoniae</i>	(128)
FOX-2	Allemagne (Guatemala)	1993	<i>K. pneumoniae</i>	(129)
LAT-1	Grèce	1993	<i>K. pneumoniae</i>	(130)
FOX-3	Italie	1994	<i>K. oxytoca, K. pneumoniae</i>	(131)
LAT-2	Grèce	1994	<i>K. pneumoniae, E. coli, E. aerogenes</i>	(132)
ACT-1	Etats-Unis	1994	<i>K. pneumoniae, E. coli</i>	(133)
MOX-2	France (Grèce)	1995	<i>K. pneumoniae</i>	(134)
CMY-4	Tunisie	1996	<i>P. mirabilis</i>	(135)
	Grande Bretagne	1999 (P)	<i>E. coli</i>	(136)
	Suède	1998	<i>K. pneumoniae</i>	(137)
ACC-1	Allemagne	1997	<i>K. pneumoniae</i>	(138)
	France (Tunisie)	1998	<i>K. pneumoniae</i>	(139)
	Tunisie	1997-2000	<i>K. pneumoniae, P. mirabilis, Salmonella sp.</i>	(140)
	France (Tunisie)	2000	<i>P. mirabilis, E. coli</i>	(141)
CMY-3 <sup>c</sup>	France	1998 (P)	<i>P. mirabilis</i>	(142)
LAT-3	Grèce	1998 (P)	<i>E. coli</i>	(143)
LAT-4	Grèce	1998 (P)	<i>E. coli</i>	(143)
CMY-8	Taïwan	1998	<i>K. pneumoniae</i>	(144)
CMY-5	Suède	1999 (P)	<i>K. oxytoca</i>	(145)
FOX-4	Espagne	2000 (P)	<i>E. coli</i>	(146)

<sup>a</sup> Pays d'isolement (si différent, probable pays d'origine indiqué entre parenthèses)

<sup>b</sup> Année d'isolement ou date de publication (P)

<sup>c</sup> Localisation chromosomique

Récemment, une nouvelle analyse des gènes plasmidiques *ampC* effectuée par Hall B.G. et Barlow M. a montré une identité des séquences protéiques de CMY-2, BIL-1 et LAT-2, de LAT-1 et LAT-4, et de CMY-6 et LAT-3 (147).

▪ Epidémiologie des pAmpC

Les  $\beta$ -lactamases plamidiques de classe C ont généralement été décrites pour la première fois chez des souches de *K. pneumoniae* (Tableau 5, page 41). D'autres espèces dépourvues d'une AmpC naturelle telles que *K. oxytoca*, *Salmonella* sp. et *P. mirabilis* ont également été à l'origine de nouvelles descriptions. Enfin, bien que *E. coli* puisse hyperproduire son AmpC chromosomique (148), certaines de ces enzymes ont été rapportées chez cette espèce.

En Grèce, LAT-2 (CMY-2) a été retrouvée chez une souche clinique de *E. aerogenes*, et simultanément chez des souches de *K. pneumoniae* et de *E. coli* (132). En France, ACC-1, a été rapportée chez une souche de *E. coli* et une souche de *P. mirabilis*, isolées d'un même prélèvement d'urine (141). Aux Etats-Unis, la résistante à la ceftriaxone chez des souches de Salmonelles a émergé avec l'acquisition de  $\beta$ -lactamases de type CMY-2 : entre 1996 et 1998, 13 souches ont été isolées de patients symptomatiques dans huit états différents (149). Une des caractéristiques frappantes des souches productrices de céphalosporinase plasmidique est leur distribution dans le monde entier. Comme pour certaines souches productrices de BLSE telle que SHV-2 ou SHV-5 (150), les voyages et les transferts de patients ont permis l'importation de souches d'un pays à l'autre : BIL-1 du Pakistan en Grande Bretagne (151), CMY-2 d'Algérie en France (124), FOX-2 du Guatemala en Allemagne (129), ACC-1 de Tunisie en France (139, 141) et MOX-2 de Grèce en France (134).

Néanmoins, CMY-2 reste l'enzyme plasmidique de type AmpC la plus prévalente et avec une distribution géographique large. Elle a été rapportée dans de nombreux pays : Algérie, France, Allemagne, Grèce, Inde, Pakistan, Taïwan, Turquie, Angleterre et Etats-Unis (152).

D'après le site <http://www.lahey.org/Studies/>, au 30 août 2010, 58 variants de CMY ont été décrits (CMY-1 à -58), quatre variants de ACC (ACC-1 à -4), huit variants de ACT (ACT-1 à -8), six variants de DHA (DHA-1 à -6), huit variants de FOX (FOX-1 à -8), un

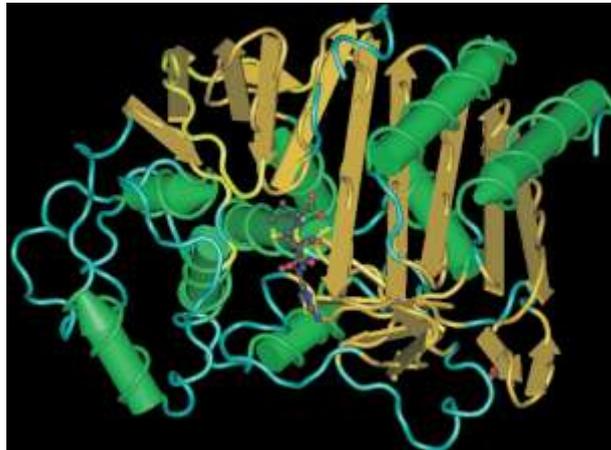
variant de LAT (LAT-1), cinq variants de MIR (MIR-1 à 5), huit variants de MOX (MOX-1 à 8) et un variant de CFE (CFE-1).

▪ Structure et propriétés des enzymes pAmpC

Les AmpC plasmidiques sont des enzymes dont le poids moléculaire varie de 38 à 42 kDa, constituées de 381, 382 ou 387 acides aminés. Leurs points isoélectriques varient de 6,4 à 9,4.

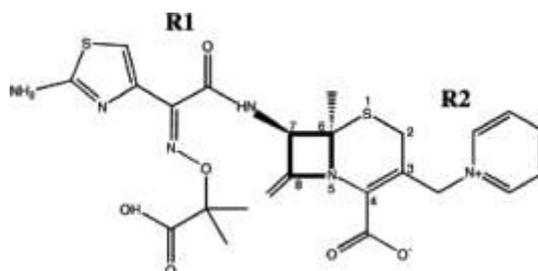
La structure tri-dimensionnelle des AmpC est constituée d'une part, d'un domaine en hélice  $\alpha$  et, d'autre part, d'un domaine  $\alpha/\beta$  (Figure 9 - 153).

**Figure 9 : Représentation de AmpC complexée avec la ceftazidime (153).**



Le site actif peut être décomposé en deux parties : le site R, qui héberge la chaîne latérale R1 du noyau  $\beta$ -lactame, et le site R2 pour la chaîne latérale R2 (Figure 10).

**Figure 10 : Représentation schématique de la ceftazidime avec la chaîne latérale R1 en C7 et la chaîne latérale R2 en C3 (153).**



La séquence en acides aminés de ces enzymes révèle un site à sérine-active avec un motif Ser-X-X-Lys au niveau des résidus 64 à 67 de la protéine mature (X = acide aminé variable). Un motif Lys-Ser/Thr-Gly a été identifié aux positions 315 à 317 et joue un rôle essentiel dans la formation de la structure tertiaire du site actif. Un résidu tyrosine en position 150 forme une partie d'un motif Tyr-X-Asn typique de la classe C, important pour catalyser l'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines (120).

Les propriétés cinétiques sont les mêmes que celles des AmpC chromosomiques avec une valeur de  $V_{\max}$  au moins 10 fois plus élevée pour la céfalotine que pour l'amoxicilline et la pénicilline et un taux d'hydrolyse faible pour les oxyimino- ou  $\alpha$ -méthoxy-céphalosporines. D'autre part, les valeurs de  $K_m$  pour la céfoxitine, le céfotaxime ou l'aztréonam sont généralement moins élevées que celles observées pour la pénicilline ou l'amoxicilline et beaucoup plus faibles que les valeurs de  $K_m$  obtenues pour le céfépime (120).

Les enzymes pAmpC sont, comme toutes les enzymes de classe 1, inhibées par de faibles concentrations d'aztréonam ou de cloxacilline. Par ailleurs, il est important de noter, que leur capacité d'hydrolyse varie d'un type d'enzyme à l'autre pour une molécule donnée : par exemple, une souche de *E. coli* qui possède une ACC-1 peut-être résistante à la ceftazidime et sensible à la céfoxitine, alors qu'une souche productrice de DHA-2 sera intermédiaire ou résistante vis-à-vis de la céfoxitine et sensible au céfotaxime ou à la ceftazidime (Tableau 6, page 45).

**Tableau 6 : CMI observées chez des transconjugants de *E. coli* produisant une pAmpC (120).**

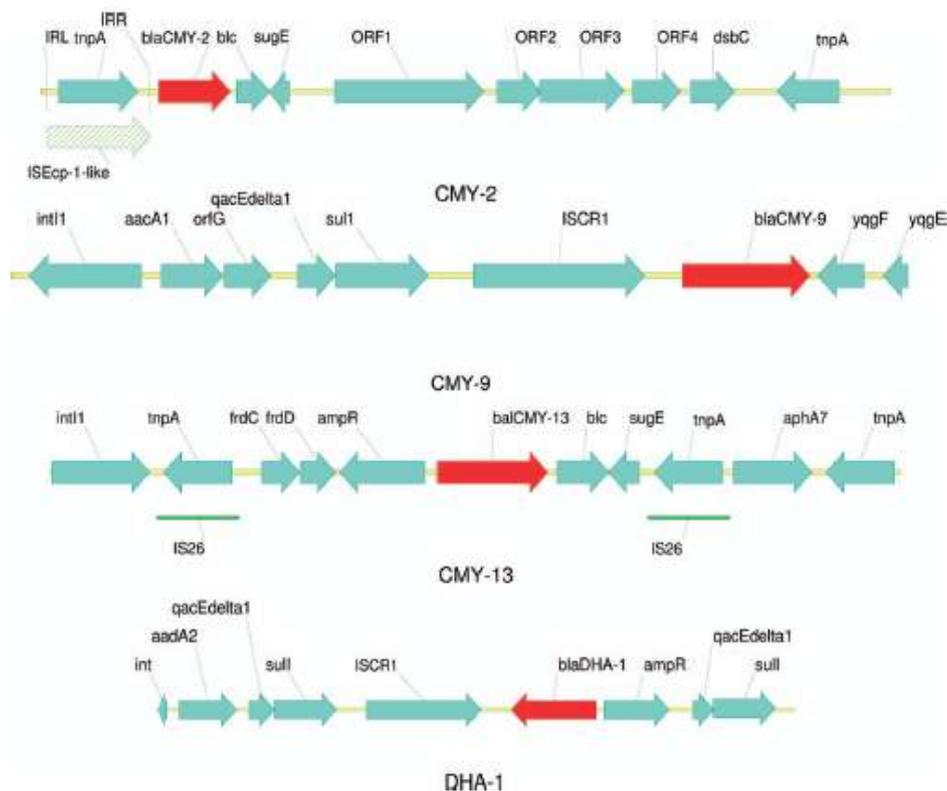
Anti-microbial agent	MIC ( $\mu$ g/ml) (reference no.) for derivatives producing:																				
	ACC-1 (7)	ACT-1 (13)	BIL-1 (CMY-2) <sup>a</sup> (66, 88)	CMY-1 (9)	CMY-2 (8)	CMY-3 (14)	CMY-4 (85)	CMY-5 (90)	CMY-8 (91)	DHA-1 (26)	DHA-2 (24)	FOX-1 (31)	FOX-2 (10)	FOX-3 (51)	FOX-4 (12)	LAT-1 (83)	LAT-2 (CMY-2) <sup>a</sup> (28)	LAT-3 (29)	LAT-4 (LAT-1) <sup>a</sup> (29)	MIR-1 (65)	MOX-1 (36)
Ampicillin <sup>b</sup>			64	2,048		1,024	>128		>256	>512	>512				1,024	256	>128			1,000	>512
Carbenicillin <sup>c</sup>			128			1,024	>128			128	128	>2,048		$\geq$ 1,024	512	>128				128	
Piperacillin	32	32	64	128	64		64			128	64										
Temocillin	4			8	8								8		16						64
Mecillinam										4											4
Cephalothir <sup>d</sup>				>1,028		>1,024	>128				512	128									>512
Cefotaxime	8	$\leq$ 2	8	64	16	16	16	64	>256	64	4	2	16	1	64	128	64	96	4	64	>512
Ceftazidime	32	4	>16	4	128	64	8	256	32-64	64	8	8	32	16	>128	>128	>256	128	8	128	16
Cefoxitin	4	>256		256	256	128	8		>256	128	16	128	256	64	>512	64	256	256	64	$\geq$ 256	
Cefotetan	2	16		256	64		32					32	64		128	128				$\geq$ 64	>512
Cefmetazole				128	64							4								$\geq$ 64	512
Moxalactam	1			8	2		0.06			0.5		1	1		32					64	>512
Aztreonam	1	4	4	16	64	32		64		16	2	1	2	1	64	64	64	64	8	128	16
Cefepime	0.25	$\leq$ 0.06		0.25	0.5		0.06			0.125	0.03		0.13	$\leq$ 0.06	2			0.5	0.125	1	
Cefpirome	1			2	0.5						0.25		1							1	
Imipenem	0.13	1		0.25	0.5	0.25	0.25	0.5-1	0.25-0.5	$\leq$ 0.125	0.25		0.5	0.12	0.5	2				1	0.5
Meropenem	0.03			0.06	0.06								0.03		0.12						0.125



La plupart des gènes *ampC* plasmidiques sont exprimés de manière constitutive à haut niveau. Quelques plasmides portent, en plus du gène codant pour la  $\beta$ -lactamase, un gène de régulation, le gène *ampR* capable d'induire l'expression du gène *ampC*. Cela a été décrit avec : ACT-1, DHA-1, DHA-2 et CMY-13 (159, 160). Des éléments génétiques variés sont impliqués dans la mobilisation des gènes *ampC* sur des plasmides (Figure 12). La séquence d'insertion *ISEcp1* est associée à de nombreux allèles de CMY tels que CMY-2 (161, 162), CMY-4 (163), CMY-15 (164) ou aux  $\beta$ -lactamases ACC-1 (165) et ACC-4 (166).

Les autres gènes *bla*<sub>AmpC</sub> sont associés à des séquences d'insertion de région commune (*ISCR1*) impliquées dans la mobilisation, au sein d'intégrons complexes de classe 1 (167) : c'est le cas pour certains variants CMY (CMY-1, -8, -9, -10, -11 et -19), pour DHA-1, et pour MOX-1 (167). CMY-13 et son gène *ampR* sont liés par les éléments répétés IS26, gène codant pour une transposase (*tnpA*) (158).

**Figure 12 : Environnement génétique des gènes *ampC* plasmidiques (153).**



- Phénotype de résistance des souches productrices de pAmpC

Les souches possédant une enzyme AmpC plasmidique sont constamment résistantes aux amino-, carboxy- et ureido-pénicillines (la seule pénicilline restant active est la témocilline). Ces enzymes confèrent une résistance aux oxyimino-céphalosporines (céfuroxime, ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone) et aux 7- $\alpha$ -méthoxy-céphalosporines (cefoxitine, céfotétan, moxalactam). Les CMI sont habituellement plus élevées pour la ceftazidime que pour le céfotaxime et pour la céfoxitine que pour le céfotétan. Ces enzymes inactivent les monobactams (aztréonam). La sensibilité du céfépime et du ceftpirome est peu affectée et celle des carbapénèmes (imipénème, méropénème) est conservée (120). Ces enzymes ne sont pas inhibées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (sauf le sulbactam qui provoque une réduction modeste des CMI).

Une altération de la perméabilité aux antibiotiques va pouvoir modifier considérablement le profil de sensibilité d'une souche. Martinez-Martinez *et al.* ont montré qu'une perte de porine associée à la production de pAmpC chez des souches de *K. pneumoniae*, conduisait à des CMI très élevées à l'imipénème (>64 mg/L) et au méropénème (16 mg/L - 168). Par ailleurs, chez ces souches, les CMI du céfépime et du ceftpirome deviennent dépendantes de l'inoculum ; avec un inoculum fort ( $10^7$  UFC/mL), les CMI peuvent excéder 256 mg/L (168). Des souches cliniques de *K. pneumoniae* avec des CMI d'imipénème, comprises entre 16 et 64 mg/L ont déjà été décrites : elles combinaient une perte de porine à la production de ACT-1 (133) ou de CMY-4 (137).

- Détection des pAmpC au laboratoire

Chez les espèces bactériennes qui ne possèdent pas de  $\beta$ -lactamases de type AmpC naturelle, l'apparence d'un phénotype typique d'un *E. cloacae* ou d'un *C. freundii* qui hyperproduit sa  $\beta$ -lactamase chromosomique est hautement en faveur d'une enzyme de type AmpC, d'origine plasmidique (66, 115). Malheureusement, la détection des souches productrices de pAmpC n'est pas toujours aisée car d'autres mécanismes de résistances peuvent conférer un phénotype identique. Chez *E. coli*, l'hyperproduction de l'AmpC chromosomique associée à une perte de porine OmpF (169) ou la présence d'un déficit en porines seul chez *K. pneumoniae* (170), se traduisent par une résistance aux céphamycines et oxyimino-céphalosporines.

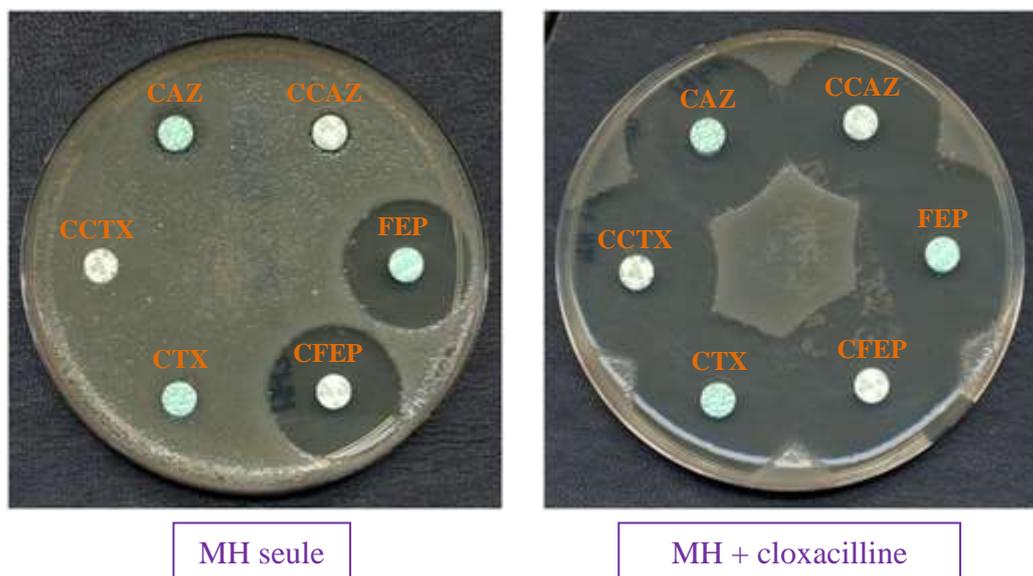
La méthode utilisée en routine au laboratoire, pour détecter les enzymes de type AmpC, repose sur l'utilisation d'un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase de classe 1, la cloxacilline

(171) : le test consiste à réaliser deux antibiogrammes en parallèle (comportant des disques de céfotaxime, ceftazidime et céfépime simples et combinés à l'acide clavulanique), sur MH seule et sur MH + cloxacilline à la concentration de 250 mg/L. L'inhibition d'une éventuelle AmpC se traduit par une augmentation de la zone d'inhibition autour des disques d'antibiotiques sur la boîte contenant la cloxacilline (Figure 13).

Les tests utilisant la cloxacilline peuvent parfois conduire à la détection erronée d'une céphalosporinase (172). Une autre méthode, pour détecter ces enzymes, consiste à utiliser un dérivé de l'acide boronique, qui est un inhibiteur spécifiques des  $\beta$ -lactamases de type AmpC (173). Cependant, cette méthode n'est pas disponible en routine dans tous les laboratoires (172).

Enfin, aucun test phénotypique ne permet de typer l'enzyme produite. Le typage fait appel à des techniques d'identification moléculaire telle que la PCR Multiplex utilisant six couples d'amorces spécifiques, mise au point par Perez-Perez F. J. *et al.*, en 2002 (174).

**Figure 13 : Mise en évidence d'une pAmpC au laboratoire.**



▪ Facteurs de risques de bactériémie à *K. pneumoniae* productrices de pAmpC

Les facteurs de risques de bactériémie à *K. pneumoniae* productrice de pAmpC, sont les mêmes que ceux incriminés lors d'infections à *K. pneumoniae* productrice de BLSE (175, 176) :

- durée du séjour à l'hôpital ;
- hospitalisation en unités de soins intensifs ;
- pose de cathéters veineux centraux ;
- sondes urinaires ;
- prise préalable d'antibiotiques, en particulier, les céphalosporines à large spectre, et les associations contenant un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases.

Les patients atteints de leucémies (175), de cancers (175) et les patients greffés (177) sont particulièrement à risque.

Des épidémies nosocomiales à *K. pneumoniae* productrices de AmpC ont été rapportées avec les enzymes de type: MIR-1 (11 patients - 119), BIL-1 (5 patients - 177), ACC-1 (13 patients – 139 ou 19 patients - 178), ACT-1 (17 patients - 133).

### I.3 Résistance aux $\beta$ -lactamines par imperméabilité

Chez *K. pneumoniae*, la résistance aux  $\beta$ -lactamines est essentiellement d'origine enzymatique. Cependant, comme les  $\beta$ -lactamines pénètrent dans la bactérie par les porines de la membrane externe, un autre mécanisme de résistance peut être la perte ou la diminution d'expression de porines majeures (179).

#### I.3.1 Notions générales sur les porines de *K. pneumoniae*

Les porines sont des protéines de structure canalaire remplies d'eau, enchassées dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif, permettant la pénétration des molécules hydrophiles, de faible poids moléculaire (Figure 14).

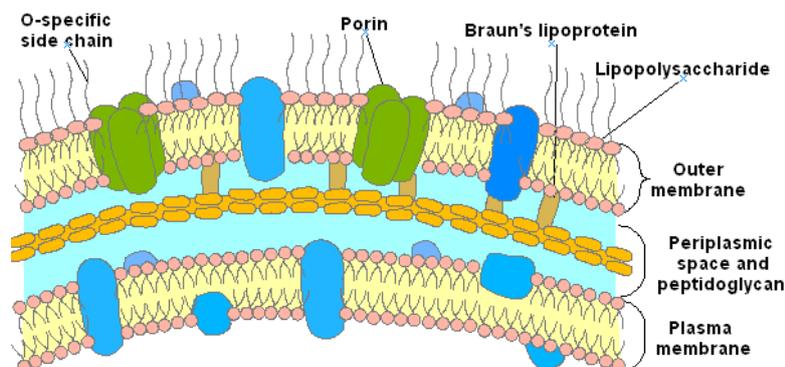
Elles appartiennent à la classe des protéines de membrane externe ou OMPs (Outer Membrane Proteins). Elles sont habituellement subdivisées en deux classes :

- les porines non spécifiques, permettant la diffusion de petites molécules polaires (sucres, sels, détergents, antibiotiques, métaux lourds), comme OmpC, OmpF et PhoE chez *E. coli*.
- les porines spécifiques de certains substrats : vitamine B12, maltodexine...(180).

*K. pneumoniae* possède deux porines majeures, OmpK35 (181) et OmpK36 (182), homologues respectivement de OmpF et de OmpC chez *E. coli*, ainsi qu'une porine transitoire, OmpK37, analogue de OmpN chez *E. coli* et de OmpS2 chez *S. typhi* (183).

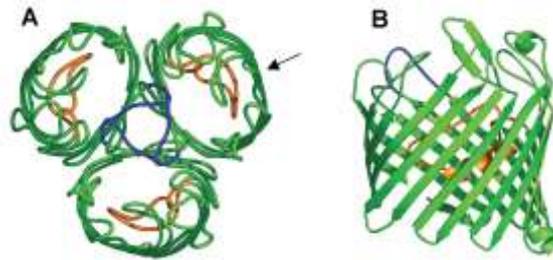
**Figure 14 : Représentation schématique de l'enveloppe d'une bactérie à Gram négatif.**

(<http://www.microbio.karbonedesign.com>)



Les porines forment des canaux transmembranaires. Elles possèdent une structure trimérique (Figure 15). Des feuillettes  $\beta$  organisent un tonneau, enfoui dans la membrane, constitué par un canal hydrophile en son milieu et une paroi hydrophobe vers la membrane. Des boucles, longues à la surface externe et courtes vers le périplasma, relient les différents feuillettes anti-parallèles et complètent la formation du monomère.

**Figure 15 : Structure de la porine OmpF chez *E. coli* (184).**  
(A : trimère ; B : monomère).



Les porines et la barrière constituée par la couche de phospholipides ne permettent pas le passage de molécules de poids moléculaires importants ou de molécules hydrophobes, excepté les solutés qui diffusent rapidement. Par conséquent, les bactéries à Gram négatif sont résistantes, par exemple, aux macrolides et à la vancomycine.

Les  $\beta$ -lactamines diffusent à travers la membrane externe, en utilisant la voie des porines. L'absence complète ou une diminution d'expression d'une ou plusieurs porines peut donc induire une résistance à ces antibiotiques. Ce mécanisme de résistance a été décrit chez de nombreuses espèces. L'exemple classique est celui de *P. aeruginosa* avec perte de la porine D2, responsable d'une résistance aux carbapénèmes (185). Chez les *Klebsiella* sp., comme chez les entérobactéries, la résistance à l'ertapénème peut être due à une perte des porines (186). Ce mécanisme a également été décrit chez des souches de *Enterobacter* sp. (187), *E. coli* (188), *S. typhimurium* (189),...

### **I.3.2 Impact de la perte des porines chez *K. pneumoniae***

La plupart des souches de *K. pneumoniae*, non productrices de BLSE synthétisent OmpK35 et OmpK36. A l'inverse, la majorité de celles productrices de BLSE synthétisent uniquement OmpK36 (170). La perte des deux porines OmpK35 et OmpK36, chez une

souche de *K. pneumoniae* productrice de BLSE, confère une résistance à la céfoxitine, accroît la résistance aux oxyimino-céphalosporines et diminue la sensibilité aux carbapénèmes (168, 190, 191). La perte de porines affecte également la sensibilité à d'autres antibiotiques tels que les fluoroquinolones (192).

Afin d'étudier le rôle de chaque porine, dans la résistance aux antibiotiques, chacune des porines OmpK35, OmpK36 et OmpK37 a été clonée chez des souches de *K. pneumoniae* déficientes en porines et productrices de BLSE (182, 183, 193).

L'expression de OmpK35 chez ce type de souches, entraîne une diminution des CMI de plus de 128 fois pour les céphamycines (céfoxitine et céfotétan), certaines oxyimino-céphalosporines (ceftazidime, céfotaxime, céfépime et ceftazidime) et le méropénème. Des diminutions significatives sont également observées ( $\geq 8$  fois) pour l'imipénème, la ciprofloxacine et le chloramphénicol (193).

Il apparaît que la diminution de la CMI, provoquée par l'expression de OmpK35 par rapport à celle d'OmpK36, est 4 fois plus importante pour le céfépime, 8 fois pour le céfotétan, le céfotaxime et le ceftazidime, et 128 fois pour la ceftazidime. Ces résultats ne signifient cependant pas que OmpK35 soit spécifique de ces antibiotiques, puisque l'expression de OmpK36 entraîne également une diminution significative des CMI pour ces molécules (193). Enfin, l'expression de OmpK35 et de OmpK36 provoque une diminution des CMI des tétracyclines et du chloramphénicol (193).

La porine OmpK37, quant à elle, semble avoir un impact plus faible sur la résistance aux antibiotiques, par rapport à OmpK35 et OmpK36 (183).

Un déficit en porine, associé à un autre mécanisme de résistance comme la production de BLSE ou d'enzyme de type AmpC plasmidique, confère aux souches qui les produisent, des résistantes à de nombreux antibiotiques, notamment aux carbapénèmes, molécules précieuses pour le traitement des infections à bactéries multi-résistantes. Ce phénomène a déjà été observé chez *K. pneumoniae*, généralement lié à un déficit en OmpK36 associé à une production d'AmpC plasmidique ou de BLSE (194 – 197).

## II Résistance aux quinolones

La famille des quinolones regroupe un ensemble de molécules capables d'inhiber la synthèse d'ADN et d'induire ainsi la mort rapide de la bactérie. Elles exercent leur action en inhibant deux enzymes indispensables à la réplication du chromosome bactérien : l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, qui sont deux topoisomérases de type II, constituées de 2 sous-unités A ou  $\alpha$  et 2 sous-unités B ou  $\beta$ .

L'incidence de la résistance aux fluoroquinolones chez les entérobactéries n'a cessé de croître depuis l'introduction de ces antibiotiques sur le marché (198). Les souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE sont plus fréquemment résistantes aux fluoroquinolones que celles n'en produisant pas (199).

La résistance aux quinolones fait intervenir différents mécanismes. Le mécanisme le plus fréquent et le mieux connu est la modification des cibles (200).

### II.1 Résistance par modification des cibles

L'ADN gyrase possède une structure tétramérique constituée de 2 sous-unités GyrA codées par un gène *gyrA* et de 2 sous-unités GyrB codées par un gène *gyrB*. La topoisomérase IV est une enzyme de structure tétramérique constituée de 2 sous-unités ParC codées par le gène *parC* et de 2 sous-unités ParE codées par le gène *parE*. Des mutations ponctuelles dans les gènes codant pour les sous-unités de l'ADN gyrase et/ou de la topoisomérase IV, vont entraîner une ou plusieurs substitution(s) protéique(s).

Les mutations capables d'induire une diminution de l'affinité des quinolones pour leurs cibles et ainsi diminuer leur action, interviennent dans une région appelée « QRDR » (Quinolone-Resistance Determined Region), essentiellement au sein des gènes *gyrA* et *parC*. L'accumulation de mutations dans cette région est associée à une résistance de haut niveau aux fluoroquinolones (201).

Chez *K. pneumoniae*, les substitutions de *gyrA* les plus fréquemment observées sont situées en position 83 (Ser  $\rightarrow$  Tyr) et 87 (Asp  $\rightarrow$  Ala). Une mutation au niveau du codon 78 a également été décrite (Gly  $\rightarrow$  Cys - 202 - 204). Comme chez *E. coli*, ces mutations en positions 83 ou 87 confèrent de plus hauts niveaux de résistance aux quinolones que les autres mutations survenant dans cette région. Ainsi, une seule de ces mutations suffit pour obtenir une CMI de l'acide nalidixique supérieure à 32 mg/L (200).

Comme chez *E. coli*, la topoisomérase IV constitue pour les quinolones, une cible secondaire. Les mutations au sein des gènes codant pour cette enzyme ont toujours été associées à des mutations au sein du gène *gyrA*. Ainsi, ces mutations additionnelles ne se produiraient qu'en cas de baisse d'affinité des fluoroquinolones pour l'ADN gyrase (200). Chez *K. pneumoniae*, les mutations au sein du gène *parC* sont localisées au niveau des codons 80 (Ser → Ile) et 84 (Glu → Gly - 204). La mutation au niveau du codon 80 est la plus fréquemment retrouvée (203).

Les souches de *K. pneumoniae*, productrices de BLSE, intermédiaires ou résistantes à la ciprofloxacine comportent des mutations dans le gène *gyrA*, seules ou associées à des mutations dans le gène *parC* (205, 206).

## **II.2 Résistance par défaut d'accumulation**

*K. pneumoniae* peut également développer une résistance aux quinolones par diminution de pénétration à travers la paroi ou par efflux actif. Cette résistance par défaut d'accumulation concerne surtout les quinolones hydrophiles (norfloxacine, ciprofloxacine par exemple).

Domenech-Sanchez *et al.*, ont montré que l'expression de OmpK35 et OmpK36, après clonage chez des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE déficientes en porines, induisait une diminution de la résistance aux fluoroquinolones (193).

En l'absence d'autres mécanismes de résistance, la délétion de OmpK35 et/ou OmpK36 n'est pas suffisante pour conférer une résistance significative aux quinolones (170). De la même façon, un efflux actif des fluoroquinolones n'augmente pas seul, de manière significative, le niveau de résistance (204).

Lorsque les deux mécanismes, perte de porines et expression d'efflux actif, sont présents chez une souche de *K. pneumoniae* possédant des modifications de l'ADN gyrase associées ou non à des modifications de la topoisomérase IV, une élévation modérée du niveau de résistance aux quinolones est observée (190, 191, 204). Les multiples mutations des cibles rencontrées sont plus importantes que les mécanismes de résistance non-spécifiques pour conférer une résistance de haut niveau à l'égard des quinolones (204).

## II.3 Résistance plasmidique aux quinolones

Classiquement, les déterminants de la résistance aux quinolones sont chromosomiques et non transférables. Le premier cas avéré de résistance plasmidique aux quinolones (PMQR : Plasmide-Mediated Resistance Quinolone) a été mis en évidence par l'équipe de Martinez-Martinez *et al.*, en 1998 (207). Le gène responsable de ce phénotype a été cloné puis séquencé, et la protéine nommée Qnr (Quinolone resistance) puis QnrA en raison de la découverte de nouveaux variants QnrS puis QnrB (208). Ce mécanisme de résistance a fait l'objet de nombreuses études ces 10 dernières années et d'autres mécanismes de ce type ont été rapportés.

Actuellement, trois mécanismes majeurs de résistance plasmidique aux quinolones ont été décrits : Qnr, AAC(6')-Ib-cr et QepA (209).

### II.3.1 Les déterminants Qnr

Le gène *qnr* a été le premier gène plasmidique impliqué dans la résistance aux quinolones décrit en 1998, aux Etats-Unis, chez une souche de *K. pneumoniae* (207). Il code pour une protéine Qnr, appartenant à la famille des pentapeptides répétés, capable d'assurer la protection de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV de l'inhibition par les quinolones (210, 211).

Les déterminants Qnr confèrent un niveau de résistance variable aux quinolones selon les études et les molécules testées, cette résistance reste néanmoins modérée. Wang *et al.*, ont montré, par conjugaison plasmidique de gènes *qnrA*, que les transconjugants porteurs du gène présentaient des CMI 16 à 125 fois plus élevées pour la plupart des molécules testées (exemple : CMI de la ciprofloxacine comprise entre 0,125 et 2 mg/L). Cette augmentation était moins prononcée pour certaines nouvelles fluoroquinolones (premafloxacin, sitafloxacin) ainsi que pour l'acide nalidixique (élévation d'un facteur variant de 2 à 8, soit une CMI comprise entre 8 et 32 mg/L - 212). La présence de gène *qnr* favorise la survenue de mutations au sein des gènes codant pour les topoisomérases et, par conséquent, l'émergence d'une résistance de haut niveau lors d'un traitement par quinolones (213).

Cinq types de déterminants Qnr ont, à ce jour, été identifiés, essentiellement chez les entérobactéries : QnrA, QnrB, QnrS (214, 215), QnrC (216) et QnrD (217). Ces déterminants ont été rapportés dans le monde entier, QnrA étant le plus largement répandu (215). Différents

variants dont la dissémination est actuellement mondiale (218) ont été décrits pour chaque gène *qnr* : six pour *qnrA*, 19 pour *qnrB* et trois pour *qnrS* (208), un pour *qnrC* et un pour *qnrD*.

QnrA et QnrB sont souvent associés à des  $\beta$ -lactamases plasmidiques de type BLSE (SHV, CTX-M ou VEB-1) ou AmpC (FOX-5 et DHA-1), ce qui n'est pas le cas pour QnrS (214, 215, 219). QnrC et QnrD, récemment décrits, semblent être moins prévalents que les autres déterminants Qnr (216, 217).

### **II.3.2 L'enzyme AAC(6')-Ib-cr**

Le gène *aac(6')-Ib-cr* (cr pour ciprofoxacine résistance) est un variant du gène *aac(6')-Ib* qui code pour une aminoglycoside acétyltransférase responsable d'une résistance à la kanamycine, à la tobramycine et à l'amikacine (220). Le variant AAC(6')-Ib-cr possède deux substitutions au niveau des codons 102 (Trp  $\rightarrow$  Arg) et 179 (Asp  $\rightarrow$  Tyr). L'enzyme AAC(6')-Ib-cr est capable d'acétyler la ciprofloxacine et la norfloxacine diminuant l'activité de ces molécules (CMI 2 à 4 fois plus élevées - 221).

L'expression d'AAC(6')-Ib-cr, comme celle de Qnr, favorise la survenue de mutations au niveau des gènes codant pour l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (215, 221).

Cette enzyme semble être plus prévalente que les déterminants Qnr, et étroitement associée au problème émergent des BLSE d'origine communautaire chez les entérobactéries. Sa dissémination semble particulièrement liée à celle de la BLSE : CTX-M15, la plus prévalente en France (222).

### **II.3.3 La pompe d'efflux : QepA**

Le gène *qepA*, pour quinolone efflux pomp, à été décrit en 2007. Il code pour une pompe d'efflux qui va conférer une résistance aux quinolones hydrophiles telles que la norfloxacine et la ciprofloxacine (augmentation de 32 à 64 fois des CMI – 223, 224).

QepA, décrit uniquement chez *E. coli*, est moins fréquemment retrouvée (prévalence faible de 0,3 %) que les déterminants Qnr et AAC(6')-Ib-cr (209).

***MATERIEL ET METHODES***

## I Objectifs de l'étude

La résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération chez *K. pneumoniae* est le plus souvent liée à la production d'une BLSE de classe A plasmidique. Au cours des trois dernières années (2007 à 2009), nous avons constaté une recrudescence de souches de *K. pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, non productrices de BLSE. Ces souches étaient « étiquetées » par le laboratoire comme productrices de céphalosporinase AmpC plasmidique.

L'objectif de notre travail était, d'une part, d'effectuer la caractérisation moléculaire du mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines impliqué chez ces souches et, d'autre part, de réaliser une étude épidémiologique clinique (caractéristiques des patients : terrains, facteurs de risques, filières de soins...). Une analyse épidémiologique moléculaire a complété le travail afin de détecter un éventuel lien génétique entre ces isolats cliniques.

Dans un premier temps, la détection des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases de type AmpC (*bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>MIR/ACT</sub>) a été entreprise.

Chez les souches détectées positives pour un des gènes de type AmpC, nous nous sommes attachés dans un second temps, à caractériser le type de céphalosporinase produite ainsi que son environnement génétique.

Parmi les souches sélectionnées, certaines se sont avérées négatives pour les gènes testés, nous avons donc entrepris de rechercher le mécanisme de résistance impliqué : étude du gène *bla*<sub>SHV</sub> chromosomique, recherche d'éventuelles BLSE de diagnostic difficile, et enfin, étude des porines spécifiques OmpK35 et OmpK36.

Par ailleurs, les souches sélectionnées étaient pour la plupart résistantes aux fluoroquinolones. De nombreuses études ont montré que les gènes plasmidiques de  $\beta$ -lactamases sont souvent associés à des gènes de résistance aux quinolones (209, 215). Nous avons recherché la présence éventuelle de mécanismes de résistance plasmidique aux fluoroquinolones (Qnr, AAC(6')-Ib-cr et QepA). La résistance chromosomique aux quinolones n'a pas été recherchée dans notre étude.

## **II Souches de *K. pneumoniae* sélectionnées pour notre étude**

Les 15 souches sélectionnées pour notre étude étaient des souches de *K. pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, isolées entre 2007 et 2009, dans le service de Bactériologie-Hygiène du C.H.U. de Nantes (sites Hôtel-Dieu et HGRL).

Au cours de l'année 2007, 422 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées au C.H.U. de Nantes, parmi lesquelles une était suspecte de produire une pAmpC. En 2008, 526 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées parmi lesquelles quatre étaient suspectes de produire une pAmpC. En 2009, 557 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées parmi lesquelles dix étaient suspectes de produire une pAmpC.

La détermination des CMI de ces isolats à l'égard de différentes familles d'antibiotiques a été réalisée par méthode liquide semi-automatisée (carte AST-N052, Vitek2<sup>®</sup>, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). L'interprétation des phénotypes de résistance a été conduite selon les recommandations du CA-SFM ([www.sfm.asso.fr](http://www.sfm.asso.fr)). La production d'une BLSE ou d'une AmpC a été détectée par un test de synergie en doubles disques (BioRad, Californie, Etats-Unis) réalisé en parallèle sur gélose MH seule et sur gélose MH additionnée de cloxacilline à 250 mg/L, qui est un inhibiteur de céphalosporinase AmpC.

Parmi les 15 souches sélectionnées, toutes avaient été isolées sur le site de l'Hôtel-Dieu. Une souche suspecte de produire une pAmpC n'a pas pu être retrouvée au sein de la collection de 2009.

Une souche de *K. pneumoniae* productrice d'une céphalosporinase plasmidique du contrôle de qualité (CQ) du CCLIN (Centre de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales) de 2008, a également été incluse dans notre étude.

Ce travail a donc porté sur 14 isolats cliniques de *K. pneumoniae* et un CQ dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 7, page 61. Les CMI indiquées proviennent des données fournies par le laboratoire, au moment de l'isolement des souches. Nous avons contrôlé certaines d'entre elles par la suite.

Tableau 7 : Caractéristiques des isolats de *K. pneumoniae* sélectionnés pour notre étude.

N°	Nature de prélèvement	Date d'isolement	Service	CMI $\beta$ -lactamines (mg/L)											CMI aminosides (mg/L)				CMI quinolones (mg/L)				SXT	NT
				AMX	AMC	TIC	TZP	CF	FOX	CTX	CAZ	FEP( $\phi$ mm)	IMP	ETP	TM	GM	NET	AM	NA	NOR	OFX	CIP		
1*	Selles du sujet aplasique	19/01/2007	Hématologie	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 64$	$\geq 64$	$\leq 1$	4	26	$\leq 1$	/	8	$\geq 16$	16	$\leq 2$	$\geq 32$	$\geq 16$	$\geq 8$	$\geq 4$	80	256
2	CQ CCLIN	21/04/2008	-	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	64	$\geq 64$	$\geq 64$	32	$\geq 64$	26	2	$\leq 0,5$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 2$	$\leq 2$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 20$	128
3	KTv distal	17/06/2008	Service des Brûlés	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	$\leq 4$	$\geq 64$	$\geq 64$	$\leq 1$	4	28	$\leq 1$	$\leq 0,5$	4	$\geq 16$	4	$\leq 2$	$\geq 32$	2	1	1	$\geq 320$	$\leq 16$
4	Urines	17/07/2008	Urgences	$\geq 32$	8	$\geq 128$	8	$\geq 64$	8	$\leq 1$	4	35	$\leq 1$	$\leq 0,5$	$\geq 16$	$\geq 16$	$\leq 1$	$\leq 2$	$\geq 32$	8	$\geq 8$	2	$\leq 20$	64
5	Urines	31/07/2008	Clinique Medicale Pédiatrique	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 64$	32	$\geq 4$	4	/	$\leq 1$	1	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 2$	$\leq 2$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 20$	128
6	Urines	08/10/2008	Néphrologie	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 64$	$\geq 64$	$\geq 64$	8	25	$\leq 1$	4	8	4	$\geq 32$	16	$\geq 32$	8	4	2	$\geq 320$	128
7	LBA	11/02/2009	Réanimation Medicale	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	8	$\geq 64$	$\geq 64$	2	32	32	$\leq 1$	$\leq 0,5$	8	$\leq 1$	2	$\leq 2$	$\geq 32$	2	2	2	$\geq 320$	128
8	Hémoculture	12/02/2009	Réanimation Medicale	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	8	$\geq 64$	$\geq 64$	8	$\geq 64$	33	$\leq 1$	$\leq 0,5$	8	$\leq 1$	2	$\leq 2$	16	2	2	2	$\geq 320$	128
9	Urines (stomie)	10/03/2009	Réadaptation	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	8	$\geq 64$	$\geq 64$	$\leq 1$	4	32	$\leq 1$	$\leq 0,5$	8	$\leq 1$	2	$\leq 2$	$\geq 32$	2	2	1	$\geq 320$	128
10*	Selles du sujet aplasique	16/03/2009	Hématologie	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 64$	32	$\leq 1$	16	25	$\leq 1$	$\leq 0,5$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 2$	16	2	1	$\leq 0,25$	$\leq 20$	128
11	Selles	29/03/2009	Maladies Infectieuses	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	64	$\geq 64$	$\geq 64$	$\leq 1$	4	31	$\leq 1$	$\leq 0,5$	8	$\leq 1$	4	$\leq 2$	$\geq 32$	8	$\geq 8$	$\geq 4$	$\geq 320$	256
12	KTv central	02/06/2009	Réanimation Medicale	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 64$	$\geq 64$	$\geq 64$	$\geq 64$	29	$\leq 1$	/	$\geq 16$	$\geq 16$	$\geq 32$	$\geq 64$	16	2	2	2	$\geq 320$	64
13	Bile perop	29/06/2009	CCDE	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	32	$\geq 64$	$\geq 64$	$\leq 1$	16	32	$\leq 1$	$\leq 0,5$	$\geq 16$	$\geq 16$	$\geq 32$	$\geq 64$	8	1	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\geq 320$	32
15	KTbro	23/11/2009	Réanimation Chirurgicale	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 64$	$\geq 64$	8	16	30	$\leq 1$	$\leq 0,5$	8	$\leq 1$	2	$\leq 2$	16	2	2	2	$\geq 320$	128
16	KTv central	30/11/2009	Réanimation Medicale	$\geq 32$	$\geq 32$	$\geq 128$	32	$\geq 64$	$\geq 64$	$\leq 1$	4	32	$\leq 1$	$\leq 0,5$	8	$\leq 1$	2	$\leq 2$	8	2	2	1	$\geq 320$	128

AMX : amoxicilline; AMC : amoxicilline + acide clavulanique; TIC : ticarcilline; TZP : pipéracilline + tazobactam; CF : céfalotine; FOX : céfoxitine; CTX : céfotaxime; CAZ : ceftazidime; FEP : céfépime; IMP : imipénème; ETP : ertapénème; TM : tobramycine; GM : gentamicine; NET : nétéilmicine; AM : amikacine; NA : acide nalidixique; NOR : norfloxacine; CIP : ciprofloxacine; SXT : bactrim; NT : nitrofurane

CQ CCLIN: contrôle qualité; KTv: cathéter veineux; KTbro: cathéter bronchique; CCDE: Clinique Chirurgicale Digestive et Endocrinienne; MPR: Médecine Physique et Réadaptation

\* colonisation

## **III Méthodes**

### **III.1 Extraction de l'ADN bactérien : méthode rapide par ébullition**

Pour chaque isolat, l'ADN total a été extrait par ébullition à partir d'une culture sur pente Trypticase-Soja. Une anse de 1 µL de la culture bactérienne était mise en suspension dans 100 µL d'eau distillée stérile dans un tube eppendorf. Après 10 minutes, à 100°C (casserole d'eau bouillante ou bain-marie à sec), le tube était centrifugé 8 minutes à 11000 tours par minute. Le surnageant, contenant la matrice d'ADN, était récupéré et conservé à - 20°C pour étude ultérieure.

### **III.2 PCR et séquençage : principes**

#### **III.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)**

La PCR permet d'amplifier les séquences d'ADN, de manière spécifique, à l'aide d'un couple d'amorces constitué d'oligonucléotides complémentaires des extrémités du fragment d'ADN à amplifier, qu'elles vont délimiter.

Le mélange réactionnel, composé par les deux amorces, la Taq-polymérase, les désoxyribonucléotides est soumis à des modifications itératives de températures, selon le protocole suivant :

- la dénaturation des deux brins d'ADN, à 94°C,
- l'hybridation des amorces, à 60°C,
- la synthèse du brin complémentaire par la Taq-polymérase, à 72°C.

L'amplification d'ADN est exponentielle, ce qui permet d'augmenter, de manière considérable, la quantité d'ADN, afin de faciliter sa détection et son analyse.

Toutes nos PCR ont été réalisées dans les mêmes conditions (cf. Annexe 1, page 106)

### III.2.2 Séquençage des produits d'amplification

Le séquençage consiste à déterminer la séquence en nucléotides du fragment d'ADN amplifié par PCR. La méthode utilisée est celle proposée par Sanger en 1977 : après purification de la matrice d'ADN à séquencer, une PCR est réalisée, au cours de laquelle quatre didéoxynucléotides (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) marqués par des fluorochromes spécifiques sont ajoutés au mélange réactionnel. Chaque fois qu'un didéoxyribonucléotide est incorporé dans la chaîne d'ADN par la polymérase, l'élongation de la chaîne s'arrête par impossibilité de former une liaison phosphodiester avec d'autres nucléotides. La réaction aboutit à la fabrication d'une multitude de brins dont la taille diffère d'un nucléotide. Après purification, les produits de séquence sont analysés par électrophorèse capillaire (séquenceur capillaire ABI PrismR 3130 Genetic Analyser<sup>®</sup> - Applied Biosystems). L'appareil capte les différents fragments d'ADN marqués et les résultats sont acheminés vers un logiciel d'interprétation qui les retranscrit en un chromatogramme. Les séquences sont ensuite extraites à l'aide du logiciel Sequence Navigator<sup>®</sup> (Applied Biosystems) puis analysées et identifiées grâce à plusieurs bases de données disponibles en accès libre sur internet :

- Genbank (Blast) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- Clustalw (<http://align.genome.jp/>)

### III.3 Détection par PCR des gènes des $\beta$ -lactamases plasmidiques de type AmpC

Les gènes *ampC* plasmidiques dérivent de gènes chromosomiques présents chez certaines entérobactéries. Actuellement, 92 gènes différents de  $\beta$ -lactamases plasmidiques de type AmpC sont répertoriés sur le site américain de référence : <http://www.lahey.org/Studies/>. Pour amplifier ces gènes, nous avons utilisé les amorces décrites par Perez-Perez F. *et al.* (174), qui permettent d'amplifier les différents variants de chaque famille de gènes *bla*<sub>AmpC</sub> plasmidiques (Tableau 8, page 64).

Au laboratoire, nous disposons de six témoins positifs : CMY, ACC, FOX, MOX, DHA et MIR/ACT.

**Tableau 8: Amorces utilisées pour l'amplification des gènes plasmidiques de type AmpC (174).**

Cible(s)	Amorces	Séquence (5' → 3')	Taille de l'amplicon (pb*)
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 à CMY-11	MOXMF MOXMR	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	520
LAT-1 à LAT-4, CMY-2 à CMY-7, BIL-1	CITMF CITMR	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	462
DHA-1, DHA-2	DHAMF DHAMR	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	405
ACC	ACCMF ACCMR	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	346
MIR-1, ACT-1	EBCMF EBCMR	TGC GTA AAG CCG ATG TTG CGG CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	302
FOX-1 à FOX-5b	FOXMF FOXMR	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	190

\* paires de bases

### III.4 Typage et caractérisation de l'environnement génétique des gènes *ampC*

Dans notre étude, deux types de gènes *ampC* ont été détectés : *bla<sub>DHA</sub>* et *bla<sub>CMY</sub>*. Les amplicons obtenus avec les amorces précédemment décrites ne fournissaient qu'une séquence partielle des gènes *bla<sub>DHA</sub>* et *bla<sub>CMY</sub>*. Dans un 2<sup>ème</sup> temps, nous avons réalisé, l'amplification de la partie manquante : d'une part, à l'aide de l'amorce sens DHA-F et de l'amorce antisens DHA-R<sub>3</sub> pour le gène *bla<sub>DHA</sub>* et, d'autre part, à l'aide de l'amorce sens CIT-1 et de l'amorce antisens CIT-MR pour le gène *bla<sub>CMY</sub>*. L'analyse des séquences complètes obtenues a permis de déterminer la dénomination exacte de l'enzyme AmpC détectée. Leur environnement génétique a ensuite été étudié.

La région située en amont du gène *bla<sub>DHA</sub>* a été amplifiée à l'aide d'une amorce sens (AmpR<sub>1</sub>-DHA) s'hybridant au gène régulateur *ampR*, classiquement situé en amont du gène *bla<sub>DHA</sub>* (159), et d'une amorce antisens (DHA-R<sub>4</sub>) spécifique du gène *bla<sub>DHA</sub>*. Différentes études (127, 225) ont montré que les gènes *bla<sub>DHA</sub>* étaient localisés au sein d'un intégron complexe de type *sull* : une région commune CR1, composé notamment par le gène *orf513*, codant pour une recombinase impliquée dans le transfert horizontal de gènes de résistances aux antibiotiques, a été décrite en amont de la région *ampC-ampR* ; une séquence d'insertion IS26 a été identifiée en aval de la région *ampC-ampR*. La détection des gènes codant pour

Orf513 et IS26 (à l'aide des amorces Orf513D<sub>5</sub>/Orf513D<sub>3</sub> et IS26F/IS26R) a été réalisée afin de vérifier la similitude de l'environnement génétique de ce gène de résistance, chez les souches *bla*<sub>DHA</sub>-positives.

La région située en amont du gène *bla*<sub>CMY</sub> a été amplifiée à l'aide d'une amorce sens (PROM+) spécifique de la séquence d'insertion *ISEcp1*, décrite en amont de certains gènes *bla*<sub>CMY</sub> (226) et d'une amorce antisens (CIT-2) spécifique du gène *bla*<sub>CMY</sub>. La séquence située en aval du gène *bla*<sub>CMY</sub> a été étudiée à l'aide du couple d'amorces CIT-MF et PréCMY-2b.

Les amorces que nous avons utilisées pour étudier les environnements génétiques des gènes *bla*<sub>AmpC</sub> sont précisées dans le tableau 9.

**Tableau 9 : Amorces utilisées pour l'étude de l'environnement génétique de DHA et de CMY (225, 227)**

Cible(s)	Amorces	Séquence écrite de 5' en 3'	Taille de l'amplicon (pb*)
Environnement génétique de DHA	Orf 513 D <sub>5</sub> Orf 513 D <sub>3</sub>	CTT TTG CCC TAG CTG CGG CTC ACG CCC TGG CAA GGT TT	594
	Amp-R <sub>1</sub> -DHA DHA-R <sub>4</sub>	AGC GGG CGA ATT GCT GCA T CGC GAC ATT ATC AGC GGC AG	1016
	DHA-F DHA-R <sub>3</sub>	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CGC CAG AAT CAC AAT CGC CA	816
	IS26F IS26R	TCA CTC CAC GAT TTA CCG CT GCA CGC ATC ACC TCA ATA CC	500
Environnement génétique de CMY	ISECp1 prom+ CIT-2	TGC TCT GTG GAT AAC TTG C GTG CGA TTA ACG ATA TCG G	420
	CIT-1 CIT-MR	AAC TTA TAT CTG CTG CTA AAT TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	851
	CIT-MF Pré-CMY-2b	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TGC GCA TGG GAT TTT CCT TG	850

\* paires de bases

### III.5 Amplification et séquençage du gène *bla*<sub>SHV-1</sub> chromosomique

L'amplification et le séquençage du promoteur du gène *bla*<sub>SHV-1</sub> ont été réalisés avec les amorces mentionnées dans le tableau 10, page 66.

**Tableau 10 : Amorces utilisées pour l'amplification du promoteur du gène *bla<sub>SHV-1</sub>* (56).**

Cible	Amorces	Séquence écrite de 5' en 3'	Taille de l'amplicon (pb*)
<i>bla<sub>SHV-1</sub></i>	SHV <sub>3</sub>	AGT TCA TCA CGG GCC TTG AGT C	380
	SHV <sub>2</sub>	TCA TGG GAA AGC GTT CAT CGG	

\* paires de bases

Les séquences nucléotidiques obtenues ont été comparées à la séquence du promoteur du gène *bla<sub>SHV-1</sub>* d'une souche sauvage de référence (*K. pneumoniae* ATCC13833).

### III.6 Amplification et séquençage des gènes codant pour les porines OmpK35 et OmpK36

L'amplification des gènes codant pour les porines OmpK35 et OmpK36 a été réalisée pour les souches 1, 2, 3, 8, 9, 10 et 11, en utilisant les amorces mentionnées dans le tableau 12. Ces gènes ont ensuite été séquencés afin de rechercher d'éventuels événements génétiques pouvant affecter la fonctionnalité des porines.

**Tableau 11 : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes codant pour les porines OmpK35 et OmpK36.**

Cible(s)	Amorces	Séquence (5' → 3')	Taille de l'amplicon (pb*)
<i>ompK35</i>	OmpK35A	TTG ACA GAA CTT ATT GAC GG	1000
	OmpK35B	CGC ACG GTC GTG GTC GTT	
	OmpK35D	ACC TAC CGT AAC TCC GAC TT	
	OmpK35C	CAG CGT AGA CGT TCA TGT CC	
<i>ompK36</i>	OmpK36E	TAG CCG ACT GAT TAG AAG GG	1100
	OmpK36B	TTG TTG GTC GGA GAA GTA CC	
	OmpK36D	AAC TTC CTG CAG TCC CGT	
	OmpK36C	TTG TAG TCA ACA TAG GTG GAC	

\* paires de bases

Les séquences nucléotidiques et peptidiques obtenues pour OmpK35 et OmpK36 ont été comparées aux séquences de référence (GenBank AJ303057 et Z33506, respectivement).

### III.7 Détection des gènes de résistance plasmidique aux quinolones

Depuis le début des années 2000, trois mécanismes principaux de résistance plasmidique aux quinolones ont été décrits : Qnr (QnrA, QnrB et QnrS), AAC(6')-Ib-cr et Qep A (209). La détection des gènes correspondants a été réalisée par PCR, en utilisant les amorces figurant dans le tableau 12.

**Tableau 12 : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* et *qepA* (223, 227, 228).**

Cible(s)	Amorces	Séquence écrite de 5' en 3'	Taille de l'amplicon (pb*)
<i>qnrA</i>	QnrA-FM	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG	580
	QnrA-RM	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC	
<i>qnrB</i>	QnrB-FM	GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG	264
	QnrB-RM	TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA	
<i>qnrS</i>	QnrS-FM	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT	428
	QnrS-RM	TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG	
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	AAC(6')-Ib-F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA	482
	AAC(6')-Ib-R	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT	
<i>qepA</i>	QepA-F	GCA GGT CCA GCA GCG GGT AG	199
	QepA-R	CTT CCT GCC CGA GTA TCG TG	

M = A ou C; H = A ou C ou T; Y = C ou T

\* paires de base

Les séquences nucléotidiques obtenues pour le gène *qnrB* ont été comparées aux séquences de référence de *qnrB1*, *qnrB2*, *qnrB3*, *qnrB4*, *qnrB5* (respectivement, Genbank DQ351241, DQ351242, DQ303920, DQ303921, DQ303919). Celle obtenue pour le gène *qnrS* a été comparée aux séquences de référence *qnrS1*, *qnrS2*, et *qnrS3* (respectivement, Genbank AB187515, DQ485530 et EU077611).

Les séquences peptidiques obtenues après amplification du gène *aac(6')-Ib-cr* ont été comparées à la séquence de référence codant pour l'enzyme AAC(6')-Ib-cr (GenBank ABP87793).

### **III.8 Etude de transfert de résistance par conjugaison bactérienne**

Afin de déterminer si le gène codant pour la  $\beta$ -lactamases de type AmpC (DHA-1) était transférable, une technique de conjugaison bactérienne a été mise en œuvre chez les souches détectées positives par PCR.

#### **III.8.1 Principe**

La conjugaison bactérienne est un transfert génétique unidirectionnel qui nécessite un contact étroit entre une bactérie donatrice résistante par un déterminisme plasmidique et une bactérie réceptrice sensible aux antibiotiques à l'exception d'un antibiotique servant de marqueur. Le transconjugant correspond à la bactérie réceptrice ayant accepté le plasmide.

La souche réceptrice utilisée était *E. coli* J53-2 de phénotype sauvage vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines, résistante à l'azide de sodium (caractère d'origine chromosomique, considéré comme non transférable).

Souches donatrices étudiées :

- Une souche témoin positif : *E. coli* possédant un plasmide conjugatif codant pour une pénicillinase de bas niveau.
- Quatre souches positives pour DHA, de notre collection (les souches 7, 8, 15 et 16).

#### **III.8.2 Réalisation pratique**

Les bactéries donatrices et réceptrices ont été initialement cultivées séparément, dans un mL de bouillon BCC (bioMérieux, Marcy-L'Etoile, Paris), à 37°C, sous agitation lente, pendant 3 heures. Puis, un mélange, contenant 800  $\mu$ L de culture de *E. coli* J53-2 et 200  $\mu$ L de culture de souche donatrice, a été incubé à 37°C, pendant 3 heures.

Les transconjugants éventuels ont ensuite été sélectionnés sur gélose Muller Hinton contenant 100  $\mu$ g/mL d'amoxicilline et 100  $\mu$ g/mL d'azide de sodium. Cette étape d'isolement sur milieu sélectif, a également été réalisée, après 24 heures d'incubation du précédent mélange, afin d'optimiser la probabilité d'obtenir des transconjugants.

Un antibiogramme a été réalisé sur chaque colonie suspectée d'être un transconjugant.

### **III.9 Extraction de plasmide par technique de Kieser**

Les plasmides des souches étudiées ont été extraits selon la technique décrite par Kieser (extraction au phénol chloroforme acide), afin d'en évaluer la taille, le nombre et d'envisager éventuellement un transfert par électroporation (230).

### **III.10 Etude épidémiologique**

Rétrospectivement, nous avons analysé les dossiers médicaux des patients chez qui les souches de notre étude avaient été isolées. Le serveur de données cliniques mis à notre disposition au C.H.U. de Nantes a été utilisé. Différents points ont été étudiés, pour chaque patient : le terrain (immunodépression, cancers...), la prise antérieure d'antibiotiques, le service de l'épisode actuel, la durée d'hospitalisation et les filières de soins parcourues, la présence de dispositifs médicaux comme une sonde urinaire ou un cathéter. L'objectif était la recherche d'une part, de facteurs de risques et, d'autre part, d'un éventuel lien épidémiologique.

### **III.11 Typage des souches par électrophorèse en champs pulsés**

En raison de son pouvoir discriminant et de sa bonne reproductibilité, l'électrophorèse en champs pulsés (ECP) demeure aujourd'hui la technique de référence, pour le typage de souches bactériennes d'origine clinique. Nous l'avons utilisée, dans l'objectif de mettre en évidence une éventuelle clonalité des souches étudiées.

L'ECP repose sur le principe 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. Sa particularité réside dans le choix de l'enzyme. En effet, les enzymes de restriction utilisées doivent reconnaître des sites de coupure « rares » sur le chromosome bactérien, générant un nombre restreint de fragments d'ADN de grande taille (15 à 20). Pour *K. pneumoniae*, plusieurs enzymes répondent à ce critère, mais les plus fréquemment utilisées sont *Spe* I et *Xba* I.

Pour que l'ADN total puisse être extrait et purifié, indemne de toute coupure physique ou enzymatique, toutes les manipulations doivent être effectuées après inclusion des bactéries dans une matrice semi-solide d'agarose ou plugs.

Après digestion, les fragments sont séparés selon une technique particulière d'électrophorèse, basée sur l'application d'un champ électrique alterné multidirectionnel (champs pulsés). Un profil de « macrorestriction » est alors obtenu, appelé pulsotype.

Les pulsotypes sont comparés entre eux et interprétés à l'aide des critères de Tenover *et al.* (231).

Le mode opératoire que nous avons utilisé est présenté en annexe 2, page 107.

***RESULTATS***

## I Détection par PCR des gènes des $\beta$ -lactamases plasmidiques de type AmpC

Parmi les 15 souches sélectionnées, sept souches (souches 3, 7, 8, 9, 11, 15 et 16) ont été détectées positives pour le gène *bla*<sub>DHA</sub> et une souche a été détectée positive pour le gène *bla*<sub>CMY</sub> (souche 2). Aucun gène *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>MOX</sub>, ou *bla*<sub>MIR/ACT</sub> n'a été détecté (Tableau 13).

**Tableau 13 : Détection par PCR, des gènes codant pour *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>MIR/ACT</sub>, chez les souches sélectionnées.**

N°	CMY	DHA	ACC	FOX	MOX	ACT
1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	+	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-	-
9	-	+	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	+	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
15	-	+	-	-	-	-
16	-	+	-	-	-	-

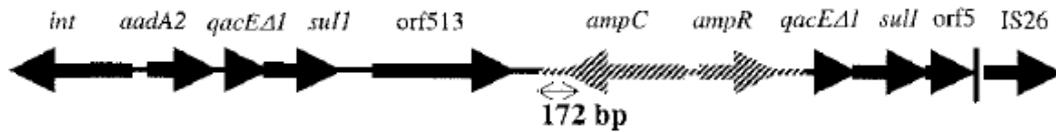
## II Typage et caractérisation de l'environnement génétique des gènes *ampC*

### II.1 Environnement génétique des gènes *bla*<sub>DHA</sub>

Le séquençage des gènes *bla*<sub>DHA</sub> amplifiés a permis d'identifier une AmpC de type DHA-1 chez tous les isolats *bla*<sub>DHA</sub>-positifs (souches 3, 7, 8, 9, 11, 15 et 16).

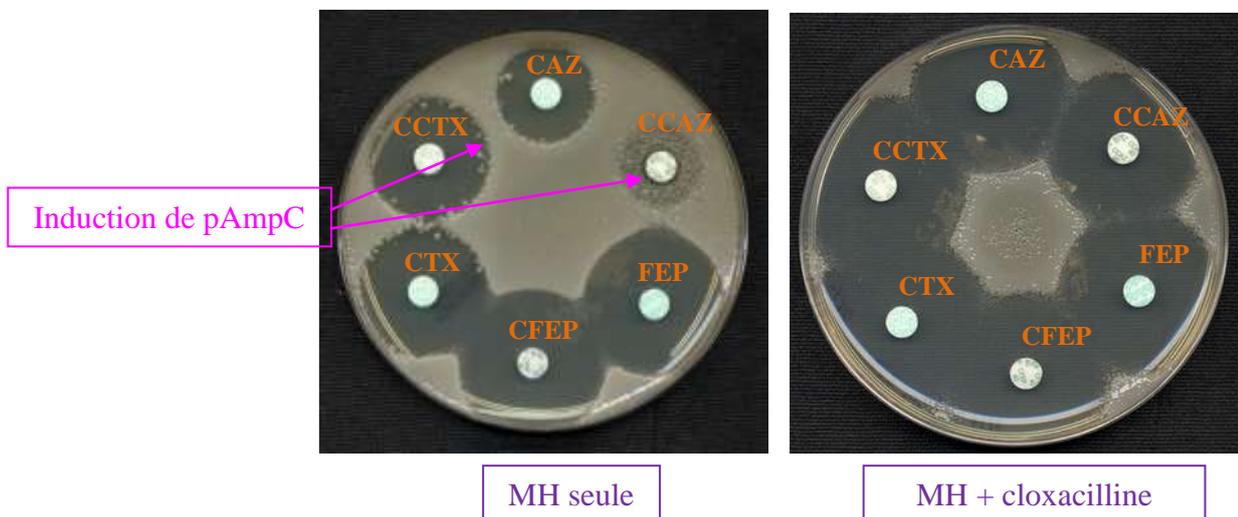
La caractérisation de l'environnement génétique du gène *bla*<sub>DHA-1</sub> a permis de mettre en évidence un gène *ampR* inclus dans un intégron complexe de type *sull* (Figure 16, page 73). Ce résultat a été obtenu pour toutes les souches *bla*<sub>DHA-1</sub>-positives.

Figure 16 : Organisation génétique de *bla*<sub>DHA-1</sub> d'après Verdet *et al.* (127).



DHA-1 est une des seules céphalosporinases AmpC plasmidiques inductibles. L'analyse des antibiogrammes complémentaires réalisés en routine faisait suspecter ce type d'enzyme comme le montre la figure 17.

Figure 17 : Mise en évidence d'une pAmpC de type DHA-1 chez une souche de *K. pneumoniae*.

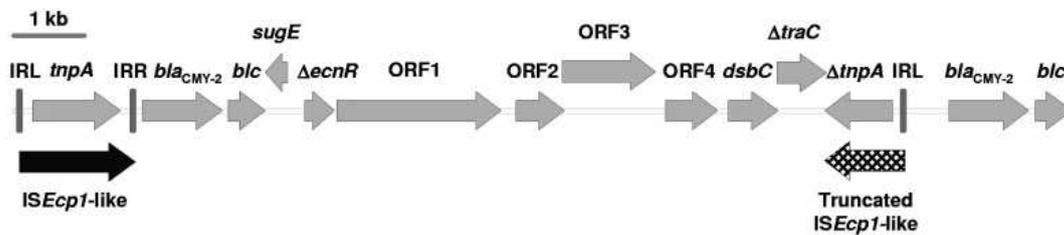


## II.2 Environnement génétique du gène *bla*<sub>CMY</sub>

Le séquençage du gène *bla*<sub>CMY</sub> a permis de mettre en évidence une AmpC de type CMY-2 chez la souche 2.

La séquence d'insertion *ISEcp1* était localisée en amont du gène *bla*<sub>CMY-2</sub> pour la souche 2 (Figure 18, page 74).

Figure 18 : Organisation génétique de *bla*<sub>CMY-2</sub> d'après Kang *et al.* (226).



### III Etude du promoteur du gène *bla*<sub>SHV-1</sub> chromosomique

La substitution C → A au niveau de la seconde base de la boîte Pribnow, décrite par Rice *et al.* (55) a été retrouvée chez deux isolats de notre cohorte (souches 1 et 10) (Figure 19).

Figure 19 : Comparaison de la région promotrice du gène *bla*<sub>SHV-1</sub> des souches 1 et 10 à celle de la souche de référence (ATCC 13833).

	Boîte -35
Isolat n°1	-----TTGATTA
Isolat n°10	-----GCGTGCCTAGGCAGGGCTAGATATTGATTA
Souche ATCC13833	TAGTTCATCACGGCCTTGAGTCAAAAAATAGCGTGCCTAGGCAGGGCTAGATATTGATTA
	*****
	-120                      Boîte -10                      -100    -80
Isolat n°1	TTCGAAATAAAAGATGAA <sup>A</sup> AAATGATGAAGGAAAAAAGAGGAATTGTGAATCAGCAAAACG
Isolat n°10	TTCGAAATAAAAGATGAA <sup>A</sup> AAATGATGAAGGAAAAAAGAGGAATTGTGAATCAGCAAAACG
Souche ATCC13833	TTCGAAATAAAAGATGAA <sup>C</sup> AAATGATGAAGGAAAAAAGAGGAATTGTGAATCAGCAAAACG
	*****
	-60    -40    -20
Isolat n°1	CCGGGTATTCTTATTTGTCGCTTCTTACTCGCCTTATCGGCCCTCACTCAAGGATGT
Isolat n°10	CCGGGTATTCTTATTTGTCGCTTCTTACTCGCCTTATCGGCCCTCACTCAAGGATGT
Souche ATCC13833	CCGGGTATTCTTATTTGTCGCTTCTTACTCGCCTTATCGGCCCTCACTCAAGGATGT
	*****
	+1    +20
Isolat n°1	ATTGTGGTTATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCAC
Isolat n°10	ATTGTGGTTATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCAC
Souche ATCC13833	ATTGTGGTTATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCAC
	*****

La boîte -35, TTGATT, est soulignée en rose ; la boîte -10, AAAAAT, est soulignée en bleu. Le codon start, ATG est figuré en gras et en violet et la séquence du gène *bla*<sub>SHV-1</sub> est soulignée en violet.

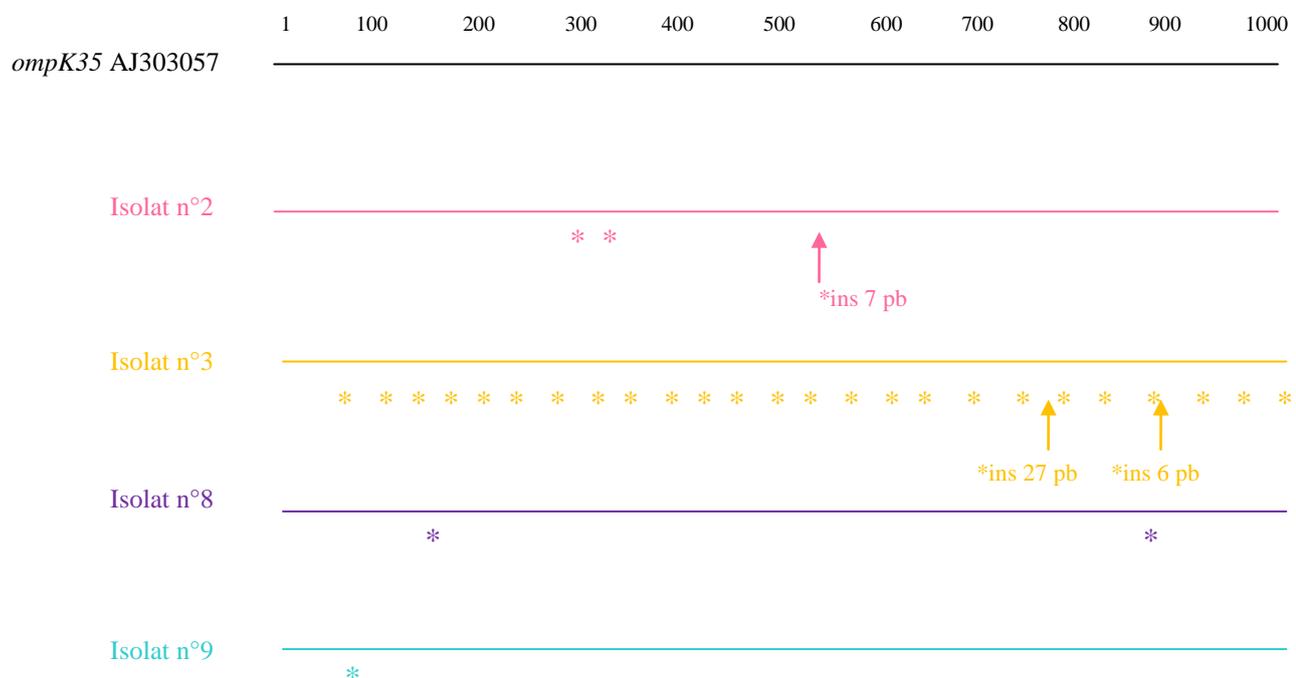
## IV Etude des porines OmpK35 et OmpK36

Les gènes codant pour les porines OmpK35 et OmpK36 ont pu être amplifiés chez toutes les souches testées. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été comparées aux séquences de référence afin de rechercher des modifications des gènes à l'origine d'anomalies fonctionnelles des porines OmpK35 et/ou OmpK36.

La comparaison des séquences nucléotidiques obtenues après amplification des gènes codant pour les porines OmpK35 et OmpK36 aux séquences de référence a permis de montrer que :

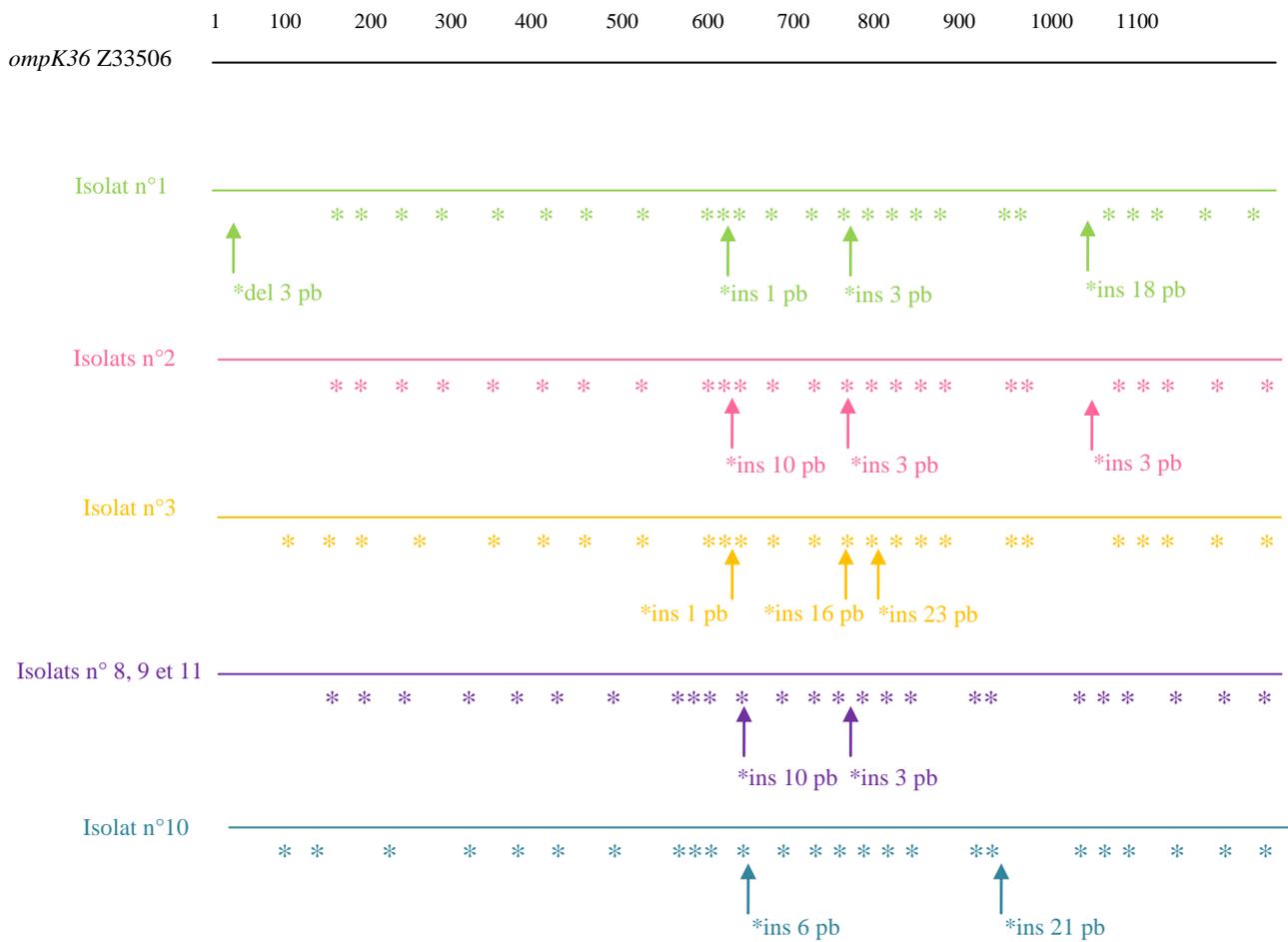
- La séquence du gène *ompK35* était conservée chez trois souches (souches 1, 10 et 11). Les modifications génétiques identifiées chez les souches 2, 3, 8 et 9 sont représentées figure 20.
- De nombreux événements génétiques ont été retrouvés pour le gène *ompK36* chez toutes les souches ; à noter que les séquences des gènes *ompK36* des souches 8, 9 et 11 étaient identiques (Figure 21, page 76).

**Figure 20 : Représentation des modifications génétiques identifiées dans le gène *ompK35***



del : délétion ; ins : insertion ; \* : substitution ; pb : paire de base

**Figure 21 : Représentation des modifications génétiques identifiées dans le gène *ompK36*.**



del : délétion ; ins : insertion ; \* : substitution ; pb : paire de base

La comparaison des séquences peptidiques obtenues pour les porines OmpK35 et Ompk36 a permis de mettre en évidence un certain nombre de substitutions, de délétions et d'insérations d'acides aminés : Figures 22 et 23, pages 77 et 78. L'insertion d'un codon STOP au sein des gènes des porines *ompK35* a pu être mise en évidence chez les souches 2 et 8 générant ainsi la synthèse de protéines tronquées, non fonctionnelles.

Figure 22 : Récapitulatif des événements génétiques identifiés pour la porine OmpK35 des souches 1, 2, 3, 8, 9, 10 et 11 (OmpK35 = 315 aa).

OmpK35	21	45	50	74	93	177	182	184	210	211	216	217	220	241	257	258	259	260	293	296	298	299	301	311		
Z33506	N	W	D	I	T	T	A	R	S	S	V	D	A	I	E	D	N	H	D	S	A	G	S	I		
Isolat n°1	N	W	D	I	T	T	A	R	S	S	V	D	A	I	E	D	N	H	D	S	A	G	S	I		
Isolat n°2	N	W	D	I	T	STOP																				
Isolat n°3	N	W	K	T	P	T	S	S	A	N	S	A	D	V	S	N	PSDAPATAK	K	Y	N	A	P	G	TD	E	V
Isolat n°8	N	STOP																								
Isolat n°9	D	W	D	I	T	T	A	R	S	S	V	D	A	I	E	D	N	H	D	S	A	G	S	I		
Isolat n°10	N	W	D	I	T	T	A	R	S	S	V	D	A	I	E	D	N	H	D	S	A	G	S	I		
Isolat n°11	N	W	D	I	T	T	A	R	S	S	V	D	A	I	E	D	N	H	D	S	A	G	S	I		

Les chiffres en gras indiquent la position de l'acide aminé dans la séquence de référence de OmpK35 (Z33506).

Les lettres en rouge indiquent une substitution.

Les codons stop sont surlignés en vert et les insertions en orange.

Figure 23 : Récapitulatif des événements génétiques identifiés pour la porine OmpK36 des souches 1, 2, 3, 8, 9, 10 et 11 (OmpK36 = 363 aa).

OmpK36	6	49	59	182	183	189	190	191	196	198	202	207	217	218	222	223	224	226	227	228		
Z33506	L	D	L	G	A	G	A	L	D	F	V	F	A	N	T	D	D	N		Q	L	
Isolat n°1	del	S	V	G	A	G	W	S	D	F	L	W	S	H	T	D	E	N	S	V	P	
Isolat n°2	L	S	V	G	A	LSP	T	A	L	D	Y	L	Y	S	N	L	G	D	N	S	K	L
Isolat n°3	L	S	V	D	S	G	F	Q	E	F	V	W	S	N	T	A	E	N	SINTRYIDTNGNS		R	R
Isolat n°8	L	S	V	G	A	LSP	T	A	L	D	Y	L	Y	S	N	L	G	D	N	S	K	L
Isolat n°9	L	S	V	G	A	LSP	T	A	L	D	Y	L	Y	S	N	L	G	D	N	S	K	L
Isolat n°10	L	S	V	G	T	SP	G	A	L	D	F	L	Y	S	H	N	G	D	N		R	L
Isolat n°11	L	S	V	G	A	LSP	T	A	L	D	Y	L	Y	S	N	L	G	D	N	S	K	L

OmpK36	229	230	232	235	250	254	265	266	267	268	269	272	280	302	303	304	305	311	
Z33506	L	L	E	H	I	T	A	G	S	L	G	N	A	D	L	N	G	I	
Isolat n°1	A	L	R	N	I	T	A	G	S	L	G	D	V	N	L	Q	N	NFTGVN	I
Isolat n°2	A	L	R	N	I	S	A	G	S	L	G	N	V	D	L	E	R	G	I
Isolat n°3	V	L	D	H	V	T	T	G	S	I	G	N	V	D	L	E	G	I	
Isolat n°8	A	L	R	N	I	T	A	G	S	L	G	N	V	D	L	E	G	I	
Isolat n°9	A	L	R	N	I	T	A	G	S	L	G	N	V	D	L	E	G	I	
Isolat n°10	D	K	R	N	I	T	F	S	G	N	G	ESDSISG	N	V	D	I	E	G	L
Isolat n°11	A	L	R	N	I	T	A	G	S	L	G	N	V	D	L	E	G	I	

Les chiffres en gras indiquent la position de l'acide aminé dans la séquence de référence de OmpK36 (Z33506).

Les lettres en rouge indiquent une substitution.

Les délétions sont surlignées en jaune et les insertions en bleu.

## V Détection des gènes de résistance plasmidique aux quinolones

La détection du gène *qnrB* s'est avérée positive pour sept souches (souches 3, 7, 8, 9, 11, 15 et 16). Une souche a été détectée positive pour le gène *qnrS* (souche 1). Aucun gène *qnrA* n'a été détecté.

Le gène codant pour une AAC(6')-Ib a été détecté chez huit souches : souches 3, 6, 7, 8, 9, 11, 15 et 16.

Le gène codant pour le système d'efflux plasmidique *qepA*, décrit chez *E. coli*, n'a pas été mis en évidence (Tableau 14).

**Tableau 14 : Détection par PCR, des gènes codant pour *qnr*, *aac(6')-Ib* et *qepA*.**

N°	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>qepA</i>
1	-	-	+	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	+	-	+	-
4	-	-	-	NT	NT
5	-	-	-	NT	NT
6	-	-	-	+	-
7	-	+	-	+	-
8	-	+	-	+	-
9	-	+	-	+	-
10	-	-	-	-	-
11	-	+	-	+	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
15	-	+	-	+	-
16	-	+	-	+	-

NT : non testé

La comparaison des séquences nucléotidiques obtenues pour chaque souche *qnrB*-positive aux séquences de référence a montré que toutes possédaient le même allèle : *qnrB4*.

L'alignement de la séquence nucléotidique du gène *qnrS* détecté chez la souche 1 avec les séquences de référence a révélé la présence du variant *qnrS1*.

Parmi les huit souches détectées positives pour le gène codant pour l'enzyme AAC(6')-Ib par PCR, le séquençage a permis d'identifier le variant *aac(6')-Ib-cr* chez sept d'entre elles (souches 3, 7, 8, 9, 11, 15 et 16). Le gène *aac(6')-Ib* présent chez la souche 6 ne présentait pas les deux substitutions Trp102Arg et Asp179Tyr (Figure 24, page 80).

**Figure 24 : Comparaison des séquences peptidiques des enzymes AAC(6')-Ib et AAC(6')-Ib-cr à celles obtenues pour les souches 3 et 6. Les séquences obtenues pour les souches 7, 8, 9, 11, 15 et 16 identiques à celle de la souche 3, ne sont pas représentées sur cette figure.**

```

AAC6'-Ib          -----AMLYEWLNRSHIVEWWGEEARPTLADVQEYQLPSVLAQESVTPYIAMLNGEPI
AAC6'-Ib-cr      MTEHDLAMLYEWLNRSHIVEWWGEEARPTLADVQEYQLPSVLAQESVTPYIAMLNGEPI
Isolat n°3       -----GGEEARPTLADVQEYQLPSVLAQESVTPYIAMLNGEPI
Isolat n°6       -----SHIVEWWGEEARPTLADVQEYQLPSVLAQESVTPYIAMLNGEPI
                  *****

                  102
AAC6'-Ib          GYAQSYVALGSGDGWEEETDPGVRGIDQLLANASQLGKGLGTKLVQALVELLFNDPEVT
AAC6'-Ib-cr      GYAQSYVALGSGDGYWEEETDPGVRGIDQLLANASQLGKGLGTKLVRALVELLFNDPEVT
Isolat n°3       GYAQSYVALGSGDGRWEEETDPGVRGIDQLLANASQLGKGLGTKLVRALVELLFNDPEVT
Isolat n°6       GYAQSYVALGSGDGYWEEETDPGVRGIDQLLANASQLGKGLGTKLVRALVELLFNDPEVT
                  *****

                  179
AAC6'-Ib          KIQTDPSPSNLRAIRCYEKAGFERQGTVTTPDGPAVYMVQTRQAF-----
AAC6'-Ib-cr      KIQTDPSPSNLRAIRCYEKAGFERQGTVTTPYGPVAVYMVQTRQAFERTRSDA
Isolat n°3       KIQTDPSPSNLRAIRCYEKAGFERQGTVTTPYGPVAVY-----
Isolat n°6       KIQTDPSPSNLRAIRCYEKAGFERQGTVTTPDGPAVY-----
                  *****

```

Un résumé des mécanismes de résistance mis en évidence chez les souches de *K. pneumoniae* sélectionnées pour notre étude est présenté dans le tableau 15. Les résultats montrent que toutes les souches positives pour DHA-1 possédaient également QnrB4 et AAC(6')-Ic-cr suggérant, soit la diffusion d'un plasmide support de ces trois déterminants de résistance, soit la diffusion d'un même clone de *K. pneumoniae* possédant ce plasmide. Ces deux hypothèses ont été explorées par différentes techniques (cf. résultats ci-après).

A ce stade de l'étude, nous n'avions pas identifié les mécanismes de résistances aux  $\beta$ -lactamines des souches 4, 5, 6, 12 et 13, conférant le phénotype de résistance observé. Nous avons donc entrepris de refaire des antibiogrammes sur ces souches afin de vérifier leur phénotype.

Après une nouvelle analyse, les souches 4, 5, 12 et 13 se sont avérées sensibles aux  $\beta$ -lactamines. La souche 6 possédait un phénotype de BLSE, mise en évidence par des images de synergie entre céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (ceftazidime ou céfotaxime) et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique).

**Tableau 15 : Tableau récapitulatif des mécanismes de résistance identifiés chez les souches de *K.pneumoniae* de notre étude.**

N°	CMY	DHA	TEM-6	SHV1 muté	QnrA	QnrB4	QnrS1	AAC 6'-Ib-cr
1	-	-	NT	+	-	-	+	-
2	+	-	NT	-	-	-	-	-
3	-	+	NT	-	-	+	-	+
4	-	-	NT	-	-	-	-	NT
5	-	-	-	-	-	-	-	NT
6	-	-	+	-	-	-	-	-
7	-	+	NT	-	-	+	-	+
8	-	+	NT	-	-	+	-	+
9	-	+	NT	-	-	+	-	+
10	-	-	NT	+	-	-	-	-
11	-	+	NT	-	-	+	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	NT	-	-	-	-	-
15	-	+	NT	-	-	+	-	+
16	-	+	NT	-	-	+	-	+

NT : non testé

## **VI Etude de transfert de résistance par conjugaison bactérienne**

### **VI.1 Conjugaison bactérienne**

Le transfert de la résistance aux  $\beta$ -lactamines et/ou aux quinolones, par conjugaison bactérienne, a été réalisé pour 4 souches productrices de DHA-1 : souches 7, 8, 15 et 16.

Plusieurs transconjugants (Tc) ont été sélectionnés sur gélose M.H. + amoxicilline (100  $\mu$ g/mL) + azide de sodium (100  $\mu$ g/mL). Nous avons sélectionné un Tc à partir de la souche 7 (Tc7), un Tc à partir de la souche 8 (Tc8), deux Tc à partir de la souche 15 (Tc15.1, Tc15.2) et deux Tc pour la souche 16 (Tc16.1, Tc16.2).

### **VI.2 Caractéristiques phénotypiques des transconjugants**

Les CMI mesurées pour chaque transconjugant sont mentionnées dans le tableau 16, page, 83.

Les transconjugants Tc7, Tc15.1, Tc15.2, Tc16.1 et Tc16.2 possédaient le même phénotype : résistance à l'amoxicilline, à la ticarcilline et au cotrimoxazole, sensibilité intermédiaire à l'association amoxicilline + acide clavulanique.

Le transconjugant Tc8 présentait une résistance à l'amoxicilline, à la ticarcilline, à la céfalotine, à l'association amoxicilline + acide clavulanique ; une sensibilité intermédiaire à l'association pipéracilline + tazobactam et à la céfoxitine ; une sensibilité à l'acide nalidixique, mais une sensibilité intermédiaire à la norfloxacine et une CMI augmentée à l'ofloxacine ; une augmentation des CMI de la tobramycine et de la nétilmicine était également observée.

L'étude du transfert génétique de la résistance par conjugaison bactérienne du Tc8 a mis en évidence le transfert de la résistance aux  $\beta$ -lactamines par production de DHA-1 ainsi que celle aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides par production de QnrB4 et AAC(6')-Ib-cr. La mesure par technique E-Test<sup>®</sup> des CMI du céfotaxime et de la ceftazidime a confirmé le transfert de DHA-1 avec une CMI du céfotaxime à 0,125 mg/L et de la ceftazidime à 1,5 mg/L. Le transfert d'un déterminant Qnr était évoqué par la valeur des CMI mesurées pour les quinolones du transconjugant Tc8 (232). Le transfert de AAC(6')-Ib-cr a été mis en évidence par l'augmentation des CMI des aminoglycosides du transconjugant Tc8.

Les résultats obtenus ont permis de déduire que, deux plasmides différents avaient été transférés : l'un codant pour une pénicillinase de haut niveau et la résistance au cotrimoxazole

(Tc7, Tc15.1, Tc15.2, Tc16.1 et Tc16.2) et l'autre codant pour le gène *bla*<sub>DHA-1</sub> associé aux gènes *qnrB4* et *aac(6')-Ib-cr*.

**Tableau 16 : Comparaison des CMI de la souche de référence de *E. coli* J53-2 à celles des transconjugants obtenus.**

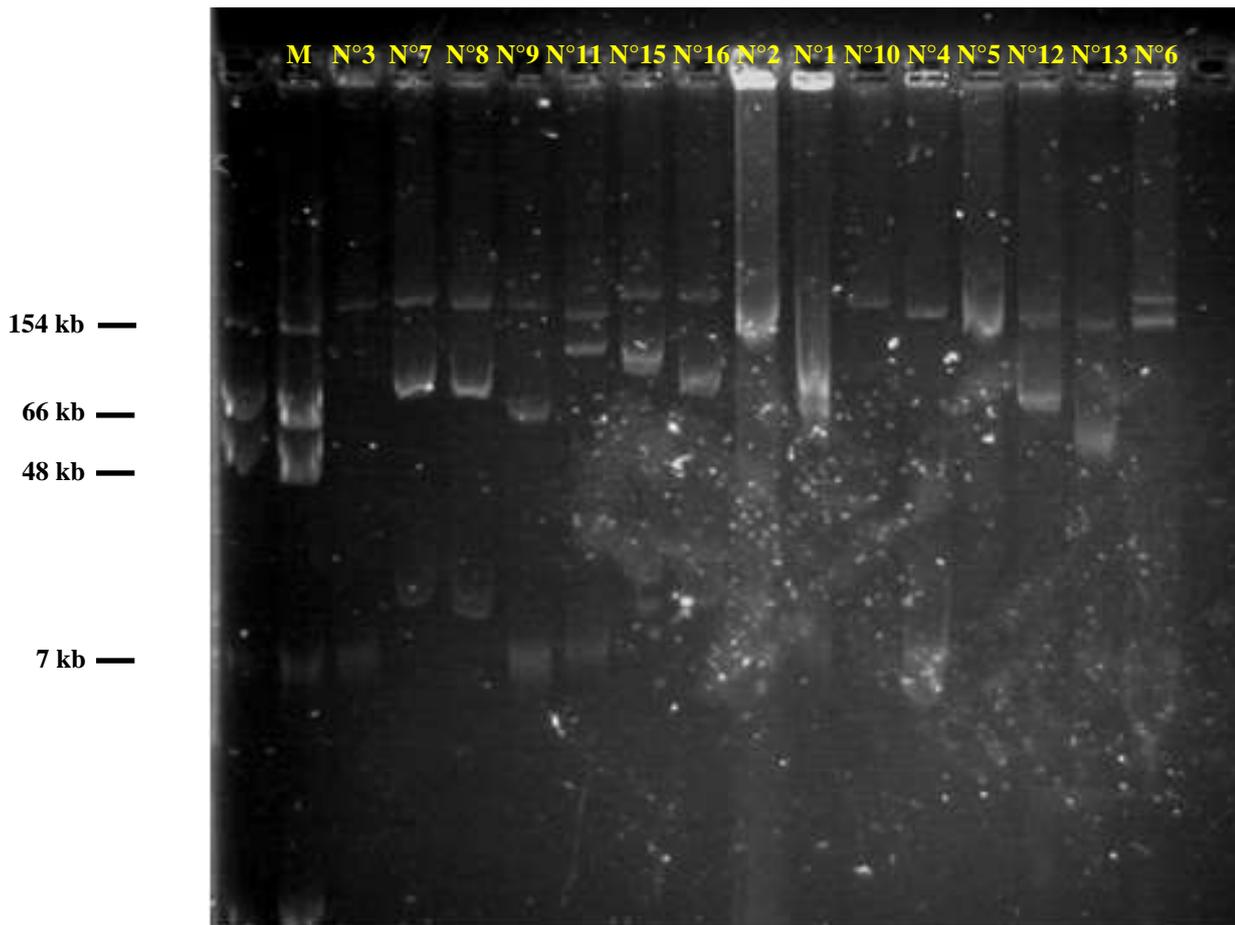
	<i>E. coli</i> J53-2	Tc7	Tc8	Tc15.1	Tc15.2	Tc16.1	Tc16.2
<b>Pénicillines</b>							
Amoxicilline	4	≥ 32	≥ 32	≥ 32	≥ 32	≥ 32	≥ 32
Amoxicilline+acide clavulanique	4	8	≥ 32	8	8	8	8
Ticarcilline	≤ 8	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128
Pipéracilline+tazobactam	≤ 4	≤ 4	16	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4
<b>Céphalosporines</b>							
Céfalocone	4	8	≥ 64	8	8	8	8
Céfoxitine	≤ 4	≤ 4	16	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4
Céfotaxime	≤ 1	≤ 1	≤ 1*	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Ceftazidime	≤ 1	≤ 1	≤ 1*	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
<b>Autres β-lactamines</b>							
Imipénème	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Ertapénème	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
<b>Quinolones</b>							
Acide nalidixique	≤ 2	≤ 2	8	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2
Norfloxacine	≤ 0,5	≤ 0,5	1	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
Oloxacine	≤ 0,25	≤ 0,25	0,5	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25
Ciprofloxacine	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25
<b>Aminosides</b>							
Amikacine	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2
Gentamicine	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Nétilmicine	≤ 1	≤ 1	2	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Tobramycine	≤ 1	≤ 1	4	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
<b>Autres antibiotiques</b>							
Cotrimoxazole	≤ 20	≥ 320	≤ 20	≥ 320	≥ 320	≥ 320	≥ 320
Nitrofuranes	≤ 16	≤ 16	≤ 16	≤ 16	≤ 16	≤ 16	≤ 16

\* Par technique E-Test : CMI céfotaxime = 0,125 mg/L et CMI ceftazidime = 1,5 mg/L

## VII Extraction de plasmide par technique de Kieser

La technique de Kieser a permis d'extraire et d'analyser le contenu plasmidique des souches (Figure 25).

**Figure 25 : Analyse du contenu plasmidique des isolats de *K. pneumoniae* de notre étude. Le témoin utilisé est la souche *E. coli* 50192 (M).**



Un ou plusieurs plasmides ont pu être mis en évidence chez toutes les souches testées :

- Pour les souches productrices de DHA-1 :
  - Souche 3 : un plasmide d'environ 170 kb
  - Souches 7 et 8 : deux plasmides, un d'environ 170 kb + un d'environ 75 kb
  - Souche 9 : deux plasmides, un d'environ 170 kb + un d'environ 66 kb
  - Souche 11 : deux plasmides, un d'environ 160 kb + un d'environ 110 kb
  - Souche 15 : deux plasmides, un d'environ 175 kb + un d'environ 110 kb

- Souche 16 : deux plasmides, un d'environ 175 kb + un d'environ 90 kb
  
- Pour la souche productrice de CMY-2 :
  - Souche 2 : un plasmide d'environ 154 kb
  
- Pour les souches hyperproductrices de SHV-1 :
  - Souche 1 : un plasmide d'environ 70 kb
  - Souche 10 : un plasmide d'environ 175 kb
  
- Pour la souche productrice de TEM-6 :
  - Souche 6 : un plasmide d'environ 170 kb
  
- Pour les autres souches :
  - Souche 4 : un plasmide d'environ 154 kb
  - Souche 5 : un plasmide d'environ 154 kb
  - Souche 12 : deux plasmides, un d'environ 154 kb + un d'environ 66 kb
  - Souche 13 : un plasmide d'environ 150 kb

La souche 3 possède un plasmide d'environ 170 kb, support génétique des gènes *bla*<sub>DHA-1</sub>, *qnrB4* et *aac(6)*'*Ib-cr* rapporté en 2009 par Corvec *et al.* (156). Le plasmide mis en évidence portait ces trois gènes et un gène *bla*<sub>SHV-2a</sub>, non recherché lors de notre étude. Un plasmide de taille équivalente, support probable des mêmes gènes, a été mis en évidence pour les souches 7, 8, 9, 11, 15 et 16. Ces six dernières souches possèdent, par ailleurs, un 2<sup>ème</sup> plasmide de taille variable selon la souche. Pour les souches 7, 8, 15 et 16, ce 2<sup>ème</sup> plasmide est le support génétique d'un gène codant pour une  $\beta$ -lactamase de classe A et un gène impliqué dans la résistance au cotrimoxazole.

La souche 2 possède un plasmide d'environ 154 kb, support génétique d'un gène *bla*<sub>CMY-2</sub>.

La souche 6 possède un plasmide d'environ 170 kb, support génétique d'un gène *bla*<sub>TEM-6</sub>.

La souche 1 possède un plasmide d'environ 70 kb, support génétique d'un gène *qnrS1*.

Les souches 4, 5, 12 et 13, possèdent un plasmide d'environ 154 kb, support de gènes non identifiés au cours de notre étude. Il en est de même pour le plasmide d'environ 175 kb, mis en évidence pour la souche 10.

## **VIII Etude épidémiologique**

Les résultats de l'investigation épidémiologique clinique concernant les patients chez qui les souches de notre étude ont été isolées, sont présentés dans le tableau 17, pages 87 et 88.

Les parcours hospitaliers des patients, chez qui une souche de *K. pneumoniae* DHA-1- positive a été isolée, sont détaillés dans la figure 26, page 89.

**Tableau 17 : Résultats de l'investigation clinique concernant les patients infectés ou colonisés par une souche de *K. pneumoniae* sélectionnée pour notre étude.**

Patient	Sexe	Age	ATCD médicaux	ATCD chirurgicaux	Motif d'hospitalisation	Date et durée de l'hospitalisation	Date d'isolement	Type de prélèvement
1	M	58 ans	Lymphome T périphérique en Aout 2006, traité par chimiothérapie- Allogreffe fin 2006	Ablation de varices mollet D	Pancytopenie sévère après allogreffe de MO	H du 03/01/07 au 05/01/07 en Réa Med puis du 02/01/07 au 19/02/07 en Hématologie (secteur stérile)	19/01/2007	Selles du sujet aplasique
2			CQ CCLIN				21/04/2008	
3	M	24 ans	Aucun	Aucun	Brûlures sur 70 % de la surface corporelle	H du 09/06/08 au 08/10/08 dans le service des Brûlés	17/06/2008	KTv distal
4	M	69 ans	AVC en janvier 2008		Rétention aigüe d'urines	H en clinique d'Urologie du 17/07/08 au 20/07/08	17/07/2008	Urines
5	F	1 mois	Syndrome de Pierre Robin (+ syndrome de Stickeler)	Aucun	Syndrome de Pierre Robin	H du 30/06/08 au 20/07/08 en Réa Néonatal puis du 20/07/08 au 05/09/08 en Clin Med Ped	31/07/2008	Urines
6	M	69 ans	DID - HTA - Cardiopathie ischémique - Artériopathie sévère - Greffe rénale le 21/12/05 - DDB depuis	Amputation trans-tibiale G en 2003 - Greffe rénale le 21/12/05	IRA sur pyélonéphrite	H du 29/09/08 au 07/10/08 en Urologie pour pose d'une sonde JJ, puis du 07/10/08 au 09/10/08 en Immunonéphrologie	08/10/2008	Urines
7	M	69 ans	HTA - Artériopathie oblitérante des MI - Cardioversions électriques pour ACFA en février 2007 et décembre 2008 - Sd d'apnée du sommeil appareillé - PM pour BAV III post-op en Août 2008	Remplacement valve aortique le 13/08/08	Pneumopathie infectieuse compliquée d'une défaillance multiviscérale	H en Réa Med du 28/01/09 au 20/02/09	11/02/2009	LBA
8	M	57 ans	Obésité - HTA - Mélanome en 2000 - Cancer de la prostate traité par chirurgie + radiothérapie	Prostatectomie - Appendicectomie	Défaillance multiviscérale chez un patient aplasique	H au CH de St Nazaire du 20/12/09 au 22/12/09 - H en hématologie au CHU de Nantes pour bilan de pancytopenie : diagnostic de LALB - Transfert en secteur stérile le 26/12 pour chimiothérapie puis transfert en Réa Med le 25/01.	12/02/2009	Hémoculture
9	F	49 ans	SEP évoluée - Obésité - Insuffisance respiratoire chronique restrictive - Hypothyroïdie - DNID - Erysipèle de cuisse G	Appendicectomie - Gastrostomie en 2003 - Duodénectomie pour exérèse de Leiomyome duodénal	Sepsis à point de départ urinaire	H en Réa Chir du 17/02/09 au 20/02/09 - H en Urologie du 20/02 au 24/02 - Réa Med du 24/02 au 27/02 - Retour en Urologie le 27/02 jusqu'au 04/03 - Ensuite transfert en MPR jusqu'en septembre 2009	10/03/2009	Urines (stomie)
10	M	67 ans	Myélodysplasie début 2008 - Allogreffe de MO le 03/12/08 - Hernie inguinale opérée - PM posé en 2003 pour BAV	Prostatectomie en 2005 pour hypertrophie bénigne	Pancytopenie sévère après allogreffe de MO	H le 19/02/09 en secteur stérile d'Hématologie	16/03/2009	Selles du sujet aplasique

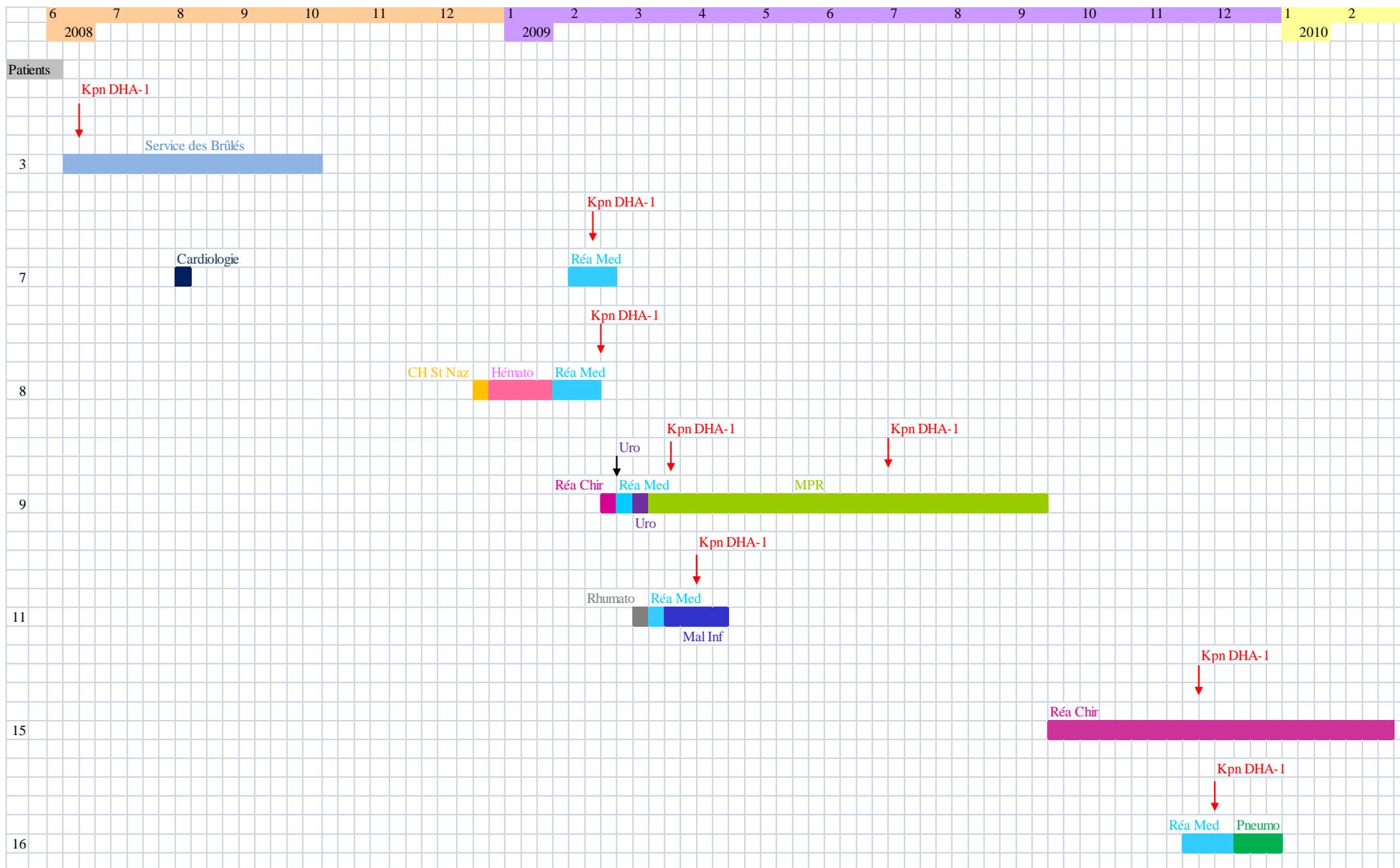
**Tableau 17 : Suite**

Patient	Sexe	Age	ATCD médicaux	ATCD chirurgicaux	Motif d'hospitalisation	Date et durée de l'hospitalisation	Date d'isolement	Type de prélèvement
11	M	68 ans	Neuropathie en 1999 - Sigmoidite diverticulaire en 2007 traitée médicalement	Résection d'un adénome colorectal en 2007	Spondylodiscite à SASM	H 03/03/09 au 07/03/09 en Rhumatologie - H en Réa Med du 07/03 au 13/03 puis H en Mal Inf pour suite de la prise en charge jusqu'au 22/04	29/03/2009	Selles
12	M	50 ans	IRC sur néphro-angiosclérose, hémodialysé de 2003 à 2008 - Greffe rénale en nov 2008 - Rejet greffe en février 2009 traitée par corticothérapie - HTA - Dyslipidémie - Sd d'apnée du sommeil appareillé - Obésité - Cardiopathie - Diabète cortico-induit	Splénectomie en 1978 - Néphrectomie gauche en 1978 pour hydronéphrose - Clolécystectomie	Détresse respiratoire sur pneumocystose	H en Réa Med du 19/05/09 au 05/06/09	02/06/2009	KTv central
13	M	60 ans	Lombalgies - Reflux gastro-oesophagien - Exogénose chronique - Pancréatite aiguë sévère en 2009	Appendicectomie	Cholécystectomie à distance d'une pancréatite aiguë lithiasique grave	H en chirurgie digestive du 28/06/09 au 13/07/09	29/06/2009	Bile perop
15	M	29 ans	Aucun	Aucun	AVP, arrêt cardiaque anoxique, coma, TC, brûlures	H du 16/09/09 au 21/02/10 en Réa Chir	23/11/2009	KT BRO
16	M	54 ans	BPCO - Polytraumatismes sur AVP en 2003 - Fistule anale opérée	Ostéosynthèse des MI	Décompensation aiguë de BPCO	H du 19/11/09 au 07/12/09 en Réa Med puis transfert en Pneumologie	30/11/2009	KTc

Abréviations utilisées :

ACFA : arythmie complète par fibrillation auriculaire ; AVP : accident de la voie publique ; AVC : accident vasculaire cérébral ; BAV : bloc auriculo-ventriculaire ; BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive ; CCLIN : Centre de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales ; Clin Med Ped : clinique médicale pédiatrique ; CQ : contrôle qualité ; D : droit(e) ; DDB : dilatation des bronches ; DID : diabète insulo-dépendant ; DNID : diabète non-insulino-dépendant ; G : gauche ; H : hospitalisation ; HTA : hypertension artérielle ; IRA : insuffisance rénale aiguë ; IRC : insuffisance rénale chronique ; KT BRO : cathéter bronchique ; KTc : cathéter central ; KTv : cathéter veineux ; LALB : leucémie aiguë lymphoïde de type B ; LBA : lavage broncho-alvéolaire ; Mal Inf : Maladies infectieuses et tropicales ; MI : membres inférieurs ; MO : moëlle osseuse ; MPR : médecine physique et réadaptation ; PM : pace-maker ; Post-op : post-opératoire ; Perop : per-opératoire Réa Chir : réanimation chirurgicale ; Réa Med : réanimation médicale ; Réa Néon : réanimation néonatale ; SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline ; Sd : syndrome ; SEP : sclérose en plaque ; TC : traumatisme crânien

Figure 26 : Représentation synoptique du parcours hospitalier emprunté par les patients infectés ou colonisés par une souche de *K. pneumoniae* DHA-1-positive.



## **IX Typage des souches par électrophorèse en champs pulsés**

Les pulsotypes obtenus après digestion par les enzymes de restriction *Spe* I d'une part, et par *Xba* I, d'autre part, sont représentés sur les Figures 27 et 28, page 91.

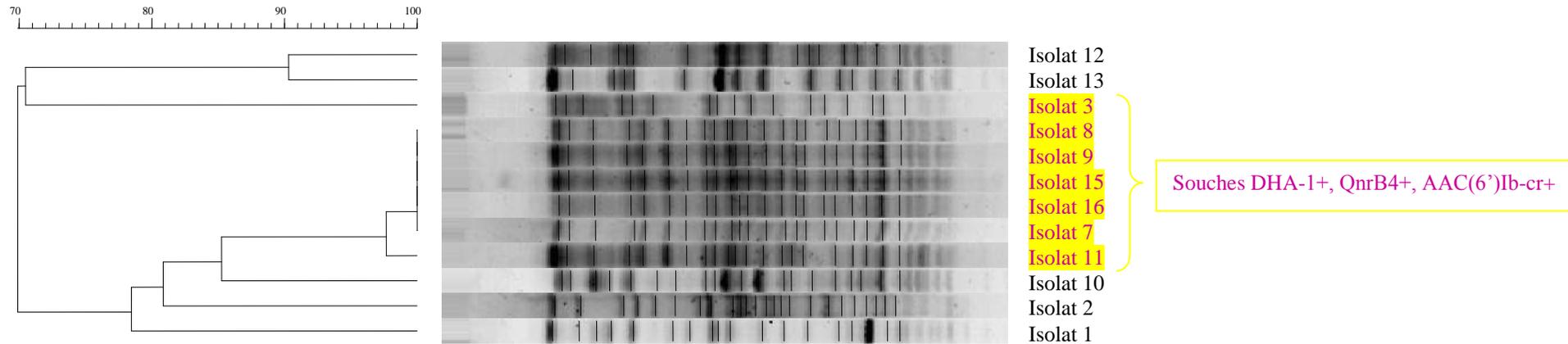
L'absence de résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération après repiquage nous a conduits à exclure les souches 4 et 5 de l'analyse en champs pulsés. La souche 6 productrice de BLSE a également été exclue.

Les profils de restriction obtenus avec *Spe* I respectaient les critères de Tenover *et al.*, puisque le nombre de bande obtenu était supérieur à 10 (231). Les résultats de cette ECP mettaient en évidence un lien génétique (100 % de similitude) entre les souches 7, 8, 9, 15 et 16. La souche 11 était proche de ces dernières, avec 97 % de similitude. Aucun lien génétique n'était mis en évidence pour les autres souches.

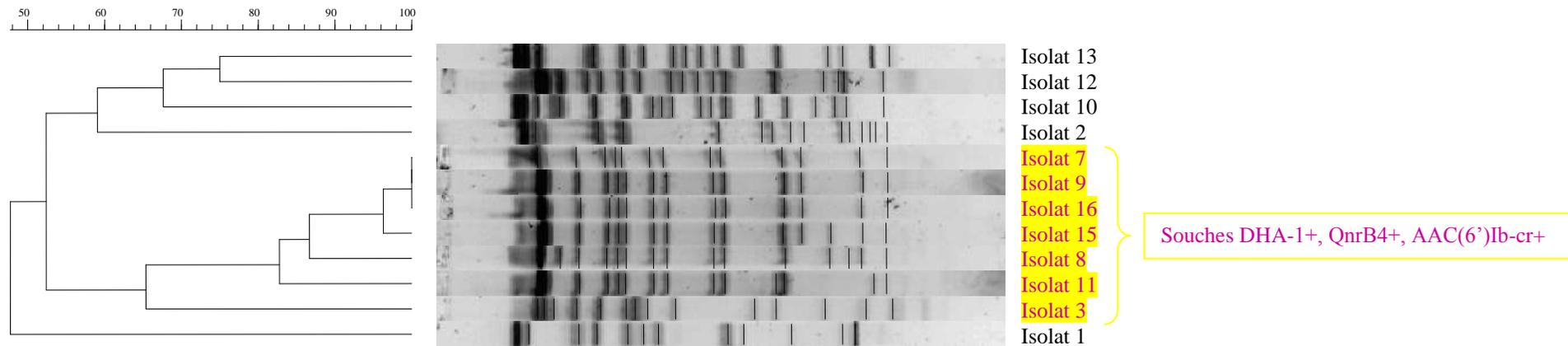
Cependant, l'analyse des profils de restriction obtenus avec *Spe* I était difficile à réaliser en pratique, ce qui ne nous permettait pas de pouvoir tirer des conclusions quant au lien génétique qui pouvait exister entre les souches. Nous avons alors entrepris de réaliser une autre ECP en utilisant l'enzyme *Xba* I, qui est l'enzyme recommandée par Tenover *et al.* pour comparer des souches de *K. pneumoniae* entre elles.

L'analyse des pulsotypes après digestion par *Xba* I plus facile d'interprétation que celle obtenue avec *Spe* I, est celle que nous avons retenue pour la suite de l'étude. Elle a montré que les profils de restriction des souches 7, 9 et 16 étaient strictement identiques ; il s'agissait donc vraisemblablement de souches issues du même clone. Le pulsotype de la souche 15 présentait une bande de différence avec ceux des souches précédentes (96 % de similitude) ; elle était donc, d'après les critères de Tenover *et al.*, fortement liée à ces souches sur le plan épidémiologique. Les pulsotypes des souches 8 et 11 présentaient quatre bandes de différences ; elles étaient donc possiblement liées aux souches 7, 9, 16 et 15. Enfin, les profils de restriction observés pour les autres souches ont permis de montrer qu'elles n'étaient pas liées épidémiologiquement.

**Figure 27 : Gel de l'électrophorèse en champs pulsés obtenu après digestion par *Spe* I pour les souches de *K. pneumoniae* de notre étude.**



**Figure 28 : Gel de l'électrophorèse en champs pulsés obtenu après digestion par *Xba* I pour les souches de *K. pneumoniae* de notre étude.**



***DISCUSSION***

Ces 20 dernières années, *K. pneumoniae* a démontré sa capacité à acquérir facilement de nouveaux mécanismes de résistance vis-à-vis de différentes classes d'antibiotiques (233). Sa grande capacité d'adaptation à l'environnement hospitalier, notamment à survivre plus longtemps que d'autres entérobactéries sur les mains ou sur les surfaces inertes, facilite la survenue d'infections croisées intra-hospitalières (234). Comme *P. aeruginosa* ou *A. baumannii*, cette espèce fait partie des principales bactéries à Gram négatif responsables d'infections nosocomiales chez des patients fragiles ou immunodéprimés (233).

Plusieurs mécanismes de résistance comme la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu de type BLSE ou KPC, par exemple, ont ainsi émergé chez *K. pneumoniae*. Cette espèce assure ensuite la dissémination de ces nouveaux gènes de résistance par transferts horizontaux aux autres entérobactéries, voire à certains bacilles à Gram négatif non fermentant contribuant à leur dissémination dans la communauté ou dans les hôpitaux.

La production d'une BLSE reste le mécanisme de résistance prépondérant aux céphalosporines à large spectre chez cette espèce, comme chez l'ensemble des entérobactéries. Néanmoins, depuis une dizaine d'années, d'autres mécanismes de résistance ont émergé chez *K. pneumoniae* tel que la production d'enzymes de type AmpC ou KPC. Ces  $\beta$ -lactamases plasmidiques sont souvent associées à d'autres gènes de résistances aux antibiotiques et constituent un réel problème en thérapeutique. A ce jour, peu d'études rapportent la prévalence de ces mécanismes émergents en Europe ou en France.

Au C.H.U. de Nantes, la constatation d'une augmentation de souches de *K. pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération non productrices de BLSE a motivé ce travail.

L'objectif de notre étude était de caractériser sur le plan épidémiologique et moléculaire ces souches cliniques de *K. pneumoniae* isolées entre 2007 et 2009.

En l'absence de production de BLSE, le mécanisme de résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération le plus souvent suspecté est la production d'une enzyme de type AmpC. Au cours des trois années d'étude, les souches sélectionnées avaient été rendues, par le laboratoire, comme étant des souches probablement productrices de céphalosporinase plasmidique. Notre investigation à la recherche de gènes *ampC* plasmidiques a permis la mise en évidence d'une enzyme de type DHA-1 pour sept des 15 souches incluses (souches 3, 7, 8, 9, 11, 15 et 16) et d'une enzyme de type CMY-2 pour une d'entre elles (souche 2).

Bien que CMY-2 soit la céphalosporinase plasmidique la plus répandue à travers le monde (120), nous avons mis en évidence une prédominance de DHA lors de notre étude. Décrite pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1992, chez une souche de *S. enterica* serovar Typhimurium isolée à Dhahran, en Arabie Saoudite (126), DHA-1 présente une distribution mondiale mais elle est généralement rapportée en Asie du Sud-est (235). De manière contemporaine, une souche de *K. pneumoniae* productrice de DHA-2 avait été isolée en France (128). A la fin des années 90, deux souches de *K. pneumoniae* DHA-1-positives étaient détectées au Etats-Unis (154). A Taïwan, entre 1999 et 2001, 10 cas sporadiques d'infections à *K. pneumoniae* DHA-1 ont été rapportés (236). Par la suite, entre 1998 et 2002, en Corée du Sud, 14 isolats de *K. pneumoniae* DHA-1-positives étaient rapportés lors de bactériémies (175). Plus récemment, DHA-1 a été détectée chez une souche de *S. enterica* serovar Montevideo en Corée (237) et une souche de *S. enterica* serotype Senftenberg en Angleterre (238).

Aucune des souches sélectionnées n'a été détectée positive pour les gènes *bla<sub>ACT</sub>* ou *bla<sub>FOX</sub>*. Bien que Nadjar *et al.* aient rapporté une épidémie nosocomiale à *K. pneumoniae* productrices de ACC-1, en 1999, en Ile de France (139), les plasmides codant pour ces gènes circulent essentiellement au Etats-Unis (154, 239, 240). Enfin, aucune souche n'a été détectée positive pour le gène *bla<sub>MOX</sub>*, rarement rencontré en France (120, 153), à l'exception d'un cas importé de Grèce, d'une *K. pneumoniae* productrice de MOX-2, en 1998 (134).

Bien que peu fréquente, dans notre établissement, la résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération des *K. pneumoniae*, hors production de BLSE, s'avère liée généralement à la présence de l'enzyme DHA-1 (50 % de notre cohorte). De manière intéressante, nous pouvons noter une différence nette avec l'épidémiologie d'une autre entérobactérie, *E. coli*, chez qui la  $\beta$ -lactamase CMY-2 est la plus fréquente dans notre établissement, hors production de BLSE, sur les mêmes années (241).

Au cours de l'année 2007, 422 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées au C.H.U. de Nantes, parmi lesquelles neuf produisaient une BLSE (2,1 %). Aucune souche ne produisait de  $\beta$ -lactamase plasmidique de type AmpC. En 2008, 526 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées, 22 produisaient une BLSE (4,2 %) et une souche était productrice d'une céphalosporinase plasmidique de type DHA-1 (0,2 %). En 2009, 557 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées, parmi lesquelles 18 produisaient une BLSE (3,2 %) et six produisaient une céphalosporinase plasmidique de type DHA-1 (1,1 %).

Ainsi, la prévalence des souches de *K. pneumoniae* productrices de BLSE a augmenté dans notre établissement, comme c'est le cas à l'échelle mondiale. Ce mécanisme reste le mécanisme de résistance prépondérant aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, en France, avec l'isolement de CTX-M dans 60 à 70 % des cas (données nantaises non publiées). Les chiffres observés au C.H.U. de Nantes restent cependant moins élevés que ceux rapportés au niveau national. Selon le programme EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System), en 2008, la prévalence, en France, des *K. pneumoniae* BLSE était de 5 à 10 % (80).

A l'inverse, peu de données concernant la prévalence des enzymes AmpC, à l'échelle nationale et/ou internationale, sont disponibles à l'heure actuelle. Au C.H.U. de Nantes, la production d'une  $\beta$ -lactamase plasmidique de type AmpC chez *K. pneumoniae* a émergé en 2008 et semble prendre une place plus importante d'année en année (un cas en 2008, six cas en 2009 et déjà sept cas sur les six premiers mois de l'année 2010). Cette prévalence, dans notre établissement, semble être plus faible que celle rapportée aux Etats-Unis (239) ou en Chine (242), où des études de surveillance épidémiologique ont montré respectivement que, 2,5 et 4,3 % des isolats cliniques de *K. pneumoniae* étaient producteurs d'une enzyme AmpC. Toutefois, elle demeure légèrement plus élevée que celle mesurée dans la région lyonnaise où 0,75 % des souches de *K. pneumoniae* produisent une AmpC plasmidique (deux DHA-1, une ACT-6 et une ACT-1 - 243). Enfin, l'enzyme DHA-1 représente la céphalosporinase plasmidique la plus répandue chez *K. pneumoniae* à Nantes, comme en région parisienne où Verdet *et al.* ont rapporté, en 2006, 12 souches de *Klebsiella* sp. (11 *K. pneumoniae* et une *K. oxytoca*) productrices de DHA-1 isolées (127).

Les  $\beta$ -lactamases de type AmpC, comme celles de type KPC, possèdent des spectres d'hydrolyse variables et l'expression d'une même enzyme peut conférer des niveaux de CMI différents d'une souche à l'autre (120). Leur détection s'avère délicate au laboratoire de Bactériologie. De plus, aucune recommandation n'est disponible concernant les méthodes à utiliser pour les détecter (172). Le test en double disque, utilisé pour détecter les BLSE, semble être insuffisant pour leur mise en évidence, y compris lors de la mise en œuvre d'une comparaison des phénotypes sur MH seule et MH + cloxacilline (172). La réalisation d'un test utilisant un dérivé de l'acide boronique comme inhibiteur, permettrait de détecter de manière plus spécifique la présence d'une  $\beta$ -lactamase de type AmpC, mais ce test ne constitue pas un argument formel et est peu utilisé en diagnostic (173). La confirmation de leur présence nécessite généralement des méthodes génotypiques, non utilisées en routine

(153). Au quotidien, il paraît important pour le Bactériologiste d'être vigilant aux CMI, aux écarts de CMI entre céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et aux éventuelles images caractéristiques de certains phénotypes de résistance. De plus, la caractérisation des enzymes impliquées s'avère compliquée par la combinaison fréquente de plusieurs mécanismes de résistance, chez une même souche (exemple de la souche 3 de notre cohorte - 104, 155, 157).

A ce jour, toutes les  $\beta$ -lactamases de classe C de type DHA décrites semblent être inductibles. Une étude antérieure concernant *Salmonella* serovar Enteritidis (KF92), produisant DHA-1, a montré que le gène *ampR*, fonctionnel chez KF92, est mobilisé en même temps que le gène *ampC* à partir du chromosome de *M. morganii* (225). Nous avons systématiquement mis en évidence la colinéarité du gène *ampR* et du gène *bla*<sub>DHA-1</sub>, chez les souches DHA-1-positives de notre collection, conduisant à un phénomène d'induction détecté lors de la lecture du test en double disque réalisé.

Par technique de PCR mapping, nous avons confirmé la présence des gènes *ampC-ampR* dans un intégron complexe de type *sulI* comportant les gènes *orf513* et *IS26*. Ces structures jouent un rôle essentiel dans les transferts horizontaux de gènes de résistances entre bactéries (127, 165). Ces organisations génétiques complexes et variées participent probablement à la mobilisation du gène *bla*<sub>DHA-1</sub>, facilitant sa diffusion au sein des populations bactériennes (127).

L'enzyme DHA-1 est connue pour hydrolyser plus efficacement la ceftazidime que le céfotaxime (127). Cependant, les valeurs de CMI obtenues sont variables d'une souche à l'autre (127). La mesure des CMI par technique E-test<sup>®</sup> a permis de confirmer ces deux points puisque les souches DHA-1-positives possédaient des CMI plus élevées pour la ceftazidime (CMI allant de 3 à 24 mg/L) que pour le céfotaxime (CMI allant de 0,50 à 2 mg/L). Ces CMI étaient moins élevées que celles rapportées lors de l'étude de Verdet et *al.* (CMI de la ceftazidime : 16 à 512 mg/L, CMI du céfotaxime : 2 à 256 mg/L - 127). Le transfert par conjugaison bactérienne a également mis en évidence une hydrolyse plus efficace de la ceftazidime (CMI de 1,5 mg/L) que du céfotaxime (CMI de 0,125 mg/L). Par ailleurs, les souches DHA-1-positives étaient sensibles au céfépime et aux carbapénèmes.

Parmi les souches sélectionnées pour notre travail, la production d'une  $\beta$ -lactamase de type AmpC expliquait le phénotype observé pour huit d'entre elles. Un autre mécanisme de résistances aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération décrit chez *K. pneumoniae* peut être

confondu, notamment lors d'une association à des modifications de porines : l'hyperexpression de SHV-1. L'investigation moléculaire à la recherche d'éventuelles mutations au niveau du promoteur a permis de retrouver à deux reprises la mutation affectant le promoteur de *bla<sub>SHV-1</sub>* décrite par Rice *et al.* (55). Il s'agit d'une substitution C → A au niveau de la seconde base de la boîte Pribnow. Cette substitution, est responsable d'une hyperexpression du gène *bla<sub>SHV-1</sub>*, conférant une augmentation des CMI à l'égard des pénicillines et des céphalosporines de 1<sup>ère</sup> et de 2<sup>ème</sup> génération.

L'hyperexpression de SHV-1 est compatible avec les CMI observées à l'égard de ces différents antibiotiques pour les deux souches concernées (souche 1 et 10). Toutefois, ce mécanisme n'explique pas les CMI mesurées à la ceftazidime de ces souches.

Le laboratoire avait rendu la recherche de céphalosporinase plasmidique positive, après avoir effectué un test en double disque sur MH seule. L'absence d'inhibition par les inhibiteurs de β-lactamase avait été interprétée comme une preuve (indirecte) de la présence d'une céphalosporinase. Si le test avait été effectué en parallèle sur MH + cloxacilline, il aurait probablement montré, dès le départ, qu'il ne s'agissait pas d'une céphalosporinase plasmidique.

Lors de la réalisation de nouveaux antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé, les souches 4, 5, 12 et 13 se sont révélées sensibles à l'ensemble des β-lactamines testées. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer la différence entre les antibiogrammes :

- les CMI rendues par l'automate (Vitek2<sup>®</sup>) étaient faussement augmentées ; ceci peut être observé lorsque l'inoculum bactérien est trop élevé (« effet inoculum ») ou lorsque l'inoculum de départ n'est pas pur.

- les souches peuvent avoir perdu le plasmide codant pour une β-lactamase plasmidique après repiquage.

- enfin, une erreur a pu être commise lors de la mise en collection des souches et/ou au moment de la réalisation de l'antibiogramme.

Il est difficile de privilégier une des hypothèses, néanmoins un inoculum fort pour certaines d'entre elles ou la perte du plasmide après repiquage pour d'autres constituent des pistes sérieuses. Par ailleurs, l'extraction de plasmide, par la technique de Kieser, a permis de mettre en évidence un plasmide d'environ 154 kb chez ces souches ainsi que chez la souche 10. Aucun mécanisme de résistance plasmidique n'ayant été identifié chez ces souches, nous n'avons pas pu déterminer le rôle des gènes portés par ces plasmides : il pourrait s'agir, de

gènes de résistance non recherchés dans notre étude, de gènes codant pour des facteurs de virulence ou encore de gènes codant pour des enzymes du métabolisme bactérien, par exemple.

Les souches sélectionnées pour notre étude étaient résistantes à une ou plusieurs quinolones, à l'exception des souches 2 et 5. Afin de compléter notre étude, nous avons entrepris la recherche des déterminants plasmidiques de résistance aux quinolones : Qnr, AAC-6'-Ib-cr et QepA.

Le gène *qnrB4* a été détecté chez les sept souches DHA-1-positives. L'association QnrB4/DHA-1 a été rapportée à plusieurs reprises (214, 215). Le gène *qnrS1* a été détecté chez une souche hyperproductrice de SHV-1. A noter qu'à l'inverse des autres gènes *qnr*, le gène *qnrS1* peut être porté par un plasmide dépourvu de gène codant pour une BLSE ou une AmpC (214, 215). Son association à des  $\beta$ -lactamases de classe A telle que LAP-1 a souvent été rapportée (244).

La majorité des gènes *qnr* mis en évidence codaient pour QnrB4. Ce résultat est différent de celui retrouvé lors d'une étude antérieure menée dans l'établissement, concernant des souches d'entérobactéries productrices de BLSE. Dans cette étude, seules deux souches de *K. pneumoniae* possédaient des gènes CTX-M associés à un gène *qnrS1* (245).

Au C.H.U. de Nantes, il a toujours été mis en évidence plus fréquemment des gènes *qnrB* et *qnrS*. Par ailleurs, bien que le gène *qnrA* fût le premier décrit (désormais de répartition mondiale - 215), ce déterminant plasmidique de résistance aux quinolones n'a pas été détecté dans notre étude. Néanmoins, en France, une étude de 2006, dans des hôpitaux du Sud-est, mettait en évidence une prévalence de 7,7 % de souches *qnrA*-positives parmi des souches de *E. coli* productrices de CTX-M (246). L'épidémiologie des gènes *qnr* semble différente dans notre établissement. Enfin, les gènes *qnrC* ou *qnrD*, plus rares et de description plus récente, n'ont pas été recherchés (216, 217).

La recherche du déterminant plasmidique AAC(6')-Ib-cr récemment décrit (2003) et dont la dissémination est actuellement mondial (218), s'est avérée positive pour sept souches correspondant aux sept souches *bla*<sub>DHA-1</sub> et *qnrB4*-positives. L'enzyme AAC(6')-Ib et ces variants confèrent une résistance aux aminoglycosides suivants : kanamycine, tobramycine et amikacine, l'activité de la gentamicine restant conservée (220). Sa dissémination pourrait avoir été favorisée par son intégration sous forme de cassettes, au sein de vecteurs naturels, les intégrons. Ces structures génétiques constituent un des supports de la multi-résistance

grâce à l'accumulation de ces gènes cassettes, notamment les gènes modifiant les aminoglycosides (220).

Le transfert par conjugaison du plasmide, support du gène *aac(6')-Ib-cr* a permis de confirmer la contribution de cette enzyme dans la résistance aux aminoglycosides puisque le transconjugant Tc8 avait des CMI augmentées à la nétilmicine (CMI = 2 mg/L) et la tobramycine (CMI = 4 mg/L).

Le déterminant QepA, de découverte récente (2007 - 223), n'a été retrouvé chez aucune des souches. La prévalence de ce système d'efflux plasmidique reste faible. Pour l'instant, il n'a été décrit que chez *E. coli* (209). Si les autres déterminants plasmidiques de résistance aux quinolones ont été décrits chez de nombreuses entérobactéries, la question de la spécificité à cette espèce de ce gène plasmidique peut être posée.

Les souches Qnr et/ou AAC(6')-Ib-cr positives présentaient une résistance de haut niveau aux quinolones. Leur mise en évidence ne peut expliquer, à elle seule, ce haut niveau de résistance. De tels niveaux de résistance (CMI de l'acide nalidixique  $\geq 32$  mg/L) ne peuvent s'expliquer que par la présence additionnelle de mutations au niveau des gènes codant pour l'ADN gyrase et/ou la topoisomérase IV. Par ailleurs, la production d'une enzyme AAC(6')Ib-cr et d'un déterminant Qnr chez le transconjugant confère une augmentation modérée des CMI des quinolones (norfloxacine et ciprofloxacine) mais leur combinaison pourrait considérablement accroître la fréquence de sélection de mutants par modification de la cible chromosomique (214, 215).

L'extraction par technique de Kieser et le transfert par conjugaison bactérienne ont démontré que les gènes *bla<sub>DHA-1</sub>*, *qnrB4* et *aac(6')-Ib-cr* étaient localisés sur un même plasmide. De même, ils ont permis de prouver la co-existence de deux plasmides dont l'un conférait la résistance au cotrimoxazole chez une même souche.

Ainsi, ces structures génétiques, souvent complexes, associant différents gènes de résistance à diverses familles d'antibiotiques, soulignent le risque de co-résistances, et par conséquent, de co-sélection et de co-diffusion. L'association d'une  $\beta$ -lactamase plasmidique de classe C (DHA-1) à une résistance aux quinolones, aux aminoglycosides ou/et à d'autres molécules comme le cotrimoxazole, génère des souches multi-résistantes et constitue une réelle problématique de Santé publique, réduisant les alternatives thérapeutiques lors de la mise en place d'un traitement adapté, dans les sepsis sévères.

L'analyse moléculaire des gènes *ompK35* et *ompK36* a permis de mettre en évidence la perte de la porine OmpK35 chez deux souches (souches 2 et 8), l'insertion d'un codon « stop » au début de leur séquence nucléotidique générant la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle.

Pour les cinq autres souches testées, l'étude des gènes de porine n'a pas permis d'affirmer l'existence d'une altération de la perméabilité membranaire. Des études complémentaires seraient nécessaires (étude de l'expression du gène, étude des protéines synthétisées). En effet, l'hétérogénéité des séquences des gènes codant pour les porines (substitutions d'acides aminés situées hors de certains sites clés des porines), est un phénomène décrit comme n'affectant pas la sensibilité aux antibiotiques (193). Ainsi, la substitution de quelques paires de bases au sein d'un gène codant pour une porine n'affecte probablement pas toujours la fonctionnalité de la porine. Cependant, nous pouvons raisonnablement émettre l'hypothèse que des modifications majeures, telles que des insertions ou des délétions de quelques acides aminés, affectent probablement la conformation des porines, perturbant leurs propriétés et leurs fonctions. Nous pouvons donc supposer que la porine OmpK35 de la souche 3 et les porines OmpK36 de l'ensemble des souches testées étaient altérées.

L'altération de la porine OmpK36, pourrait expliquer l'augmentation des CMI de la ceftazidime observée pour les souches 1 et 10 (respectivement 4 et 16 mg/L). En effet, Rice *et al.*, avaient déjà décrit une souche de *K. pneumoniae* résistante à la ceftazidime (CMI à 32 mg/L) combinant hyperproduction de SHV-1 et délétion de porines (55).

Par ailleurs, l'altération des porines mis en évidence chez les souches de notre étude, ne semble pas affecter les CMI à l'égard des carbapénèmes bien que différentes études aient rapporté l'émergence de souches de *K. pneumoniae* productrices de céphalosporinases plasmidique résistantes aux carbapénèmes, par perte de la perméabilité membranaire : une souche produisant CMY-4, en Suède (137) ; trois souches produisant ACT-1, aux Etats-Unis (133) ; 24 souches produisant CMY-2 et 16 souches produisant DHA-1 en Corée (195) et deux souches produisant DHA-1, en Chine (194). Seule la souche 2 présentait une CMI augmentée à l'égard de l'imipénème (CMI = 2 mg/L). La perte de OmpK35 et l'altération de OmpK36 pourrait ainsi expliquer cette diminution de sensibilité.

Les souches productrices de  $\beta$ -lactamases de type DHA-1, étaient d'origine nosocomiale. Elles ont été isolées chez des patients présentant pour la plupart de nombreux antécédents médicaux et/ou des terrains débilisés (pathologies sévères, diabète,

immunodépressions, cancers...). Le sexe ratio H/F était de 6/1, la moyenne d'âge de 50 ans, avec un intervalle compris entre 24 et 69 ans. Ces patients ont été hospitalisés à de nombreuses reprises par le passé, notamment dans des services de soins intensifs, à l'exception des patients chez qui ont été isolées les souches 3 et 15. Ils avaient reçu des traitements antérieurs par céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et/ou associations  $\beta$ -lactamines + inhibiteur de  $\beta$ -lactamases (amoxiciline + acide clavulanique ou pipéracilline + tazobactam). Ils possédaient tous des facteurs de risques d'acquisition de souches productrices de  $\beta$ -lactamase de type AmpC (175, 176).

L'électrophorèse en champs pulsés a montré que les souches 7, 9, 15 et 16 étaient fortement liées sur le plan épidémiologique, et qu'elles étaient possiblement liées aux souches 8 et 11, selon les critères de Tenover *et al.* (231). L'investigation épidémiologique clinique concernant les patients chez qui ont été isolées ces souches (DHA-1, QnrB4 et AAC-(6')-Ib-cr) a souligné que le dénominateur commun était un séjour en Réanimation médicale ou chirurgicale. Les souches ont été isolées au cours ou à la suite de cette hospitalisation. Ces six souches pourraient appartenir à un même clone, ayant persisté en milieu de Réanimation. Les patients hospitalisés dans ces unités de soins sont toujours en chambre seule. Quels gestes pourraient éventuellement concourir à une transmission croisée ? A partir de quel réservoir ou quelle source commune ? Dans le cadre des infections liées aux soins, il a été rapporté que le principal réservoir de transmission de *K. pneumoniae* semblait être le tube digestif des patients et que les mains du personnel soignant constituaient un vecteur potentiel (7). Pourtant, ces services représentent les plus gros consommateurs de soluté hydro-alcoolique pour prévenir les infections liées aux soins. *K. pneumoniae* possède cependant une réelle capacité à se développer sur des surfaces inertes ou sur du matériel (cathéter, sonde, plaque de radiologie... – 7).

Enfin, l'électrophorèse en champs pulsés a montré que la souche 3, isolée chez un patient hospitalisé dans le service des Brûlés, ne possédait aucun lien épidémiologique avec les autres souches productrices de DHA-1, QnrB4 et AAC(6')-Ib-cr. Cette souche possède un fond génétique complètement différent des autres (porines délétées, phénotype de résistance différent).

L'augmentation des isolats de ce type ces dernières années suggère que l'enzyme DHA-1 est la  $\beta$ -lactamase AmpC plasmidique la plus prévalente au C.H.U. de Nantes, comme

c'est le cas en Ile de France (127). Ce phénomène est inquiétant et pourrait constituer un réel problème de Santé publique dans les années à venir.

De plus, depuis le début de l'année 2010, sept souches de *K. pneumoniae* ont été détectées positives pour la production de AmpC. Deux de ces souches, ont été étudiées parallèlement aux souches sélectionnées pour notre étude. Elles possédaient le même profil que les souches DHA-1-positives : *aac(6')-Ib-cr-*, *qnrB4*-positives. Elles ont également été isolées chez des patients ayant eu un parcours de soins avec un passage en milieu de Réanimation. Toutefois, leurs pulsotypes étaient différents de celui du clone précédemment évoqué.

L'ensemble de ces résultats souligne que l'émergence de la céphalosporinase plasmidique DHA-1 chez *K. pneumoniae*, dans notre hôpital, est probablement liée, d'une part, à la diffusion d'un clone essentiellement identifié chez des patients des services de Réanimation et, d'autre part, à une circulation et une dissémination par transfert horizontal d'un plasmide, support des gènes *bla<sub>DHA-1</sub>*, *qnrB4* et *aac(6')-Ib-cr* dans l'hôpital.

Enfin, l'émergence de ces souches permet de rappeler qu'il est évidemment nécessaire d'être attentif aux divers types de souches qui circulent dans nos hôpitaux. La gestion du risque infectieux que représente la diffusion de souches multi-résistantes exige une collaboration étroite entre les différents acteurs de Santé concernés (Cliniciens, Infectiologues, Bactériologistes, Hygiénistes, Personnels soignants...). Des mesures d'hygiène strictes restent indispensables au sein des services, pour limiter la diffusion de ces souches multi-résistantes. Elles demeurent indissociables d'une politique d'antibiothérapie raisonnée, basée sur la surveillance de la sensibilité des souches et sur la meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la résistance.

***CONCLUSION***

Notre étude avait pour but d'identifier les mécanismes de résistances aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, hors BLSE, chez des souches de *K. pneumoniae*. Pour la première fois, à Nantes, nous rapportons l'émergence de souches productrices de céphalosporinase plasmidique de type DHA-1. La prévalence de ces souches semble augmentée d'année en année. L'étude des gènes de résistance associés sur un même plasmide, a permis de montrer que le plasmide était le support non seulement de *bla*<sub>DHA-1</sub> mais également des gènes de résistance plasmidique aux quinolones *qnrB4* et *aac(6')-Ib-cr*.

L'étude épidémiologique clinique et moléculaire a permis de mettre en évidence la diffusion, d'une part, d'une souche de *K. pneumoniae* hébergeant un plasmide support de *bla*<sub>DHA-1</sub>, de *qnrB4* et de *aac(6')-Ib-cr*, et d'autre part, la dissémination de ce même plasmide au sein de souches de *K. pneumoniae* possédant un fond génétique différent. La diffusion de ces souches multi-résistantes dans nos hôpitaux constitue une menace de Santé publique, réduisant de manière importante les alternatives thérapeutiques pour le traitement des infections sévères. Il est nécessaire que les différents acteurs de Santé concernés collaborent étroitement et soient attentifs (surveillance rigoureuse, mesures d'hygiène strictes...), afin d'assurer une gestion optimale du risque infectieux que représente l'émergence de telles souches et d'en limiter leur diffusion.

Par ailleurs, notre travail a souligné le fait qu'il était nécessaire pour le Bactériologiste d'être vigilant, en routine, afin de ne pas identifier par défaut des souches productrices de céphalosporinases plasmidiques qui n'en sont pas. En effet, ceci a un impact pour les services cliniques où sont isolées ces souches : l'isolement de souches possédant une  $\beta$ -lactamase à large spectre plasmidique nécessite des mesures d'hygiène appropriées alors que l'hyperproduction de SHV-1 et/ou la perte de perméabilité, d'origine chromosomique ne nécessite pas la mise en place de mesures particulières.

***ANNEXES***

## Annexe 1 : PCR

### ▪ Préparation du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel de PCR est préparé en fonction du nombre d'extraits à amplifier. Un tube témoin négatif et un tube témoin positif doivent être inclus dans la technique pour valider la série.

Le mix, distribué dans des tubes de PCR, à raison de 20  $\mu$ L est le suivant :

- Prémix : 12,5  $\mu$ L
- Eau distillée : 7,1  $\mu$ L
- Amorce sens (100  $\mu$ M) : 0,2  $\mu$ L
- Amorce anti-sens (100  $\mu$ M) : 0,2  $\mu$ L

### ▪ La PCR

Pour chaque souche, ajouter 5  $\mu$ L d'extrait d'ADN au mix afin d'obtenir un volume final de 25  $\mu$ L. Ajouter 5  $\mu$ L d'eau distillée dans le tube témoin négatif, à la place de l'extrait d'ADN. Les tubes sont introduits dans un thermocycleur (Applied Biosystems®) et l'amplification se déroule selon les conditions suivantes :

- |  |   |           |
|--|---|-----------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 minutes à 94°C</li> <li>- 30 secondes à 94°C</li> <li>- 1 minute à 60°C</li> <li>- 1 minute à 72°C</li> <li>- 7 minutes à 72°C</li> </ul> | } | 30 cycles |
|--|---|-----------|

### ▪ Electrophorèse et révélation

Après amplification, les produits de PCR obtenus sont soumis à une migration à 120 Volts, en gel d'agarose à 1 % et visualisé sous lumière U.V. après passage dans un bain de bromure d'éthidium 0,1 % (Merck®, Darmstadt, Allemagne). Le marqueur de taille 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®, Carlsbad, Nouveau Mexique), est déposé en même temps que les échantillons.

## **Annexe 2 : Mode opératoire de l'électrophorèse en champ pulsé**

### ▪ **Lyse et extraction de l'ADN**

Une suspension bactérienne, obtenue après culture en bouillon cœur-cerveille (BCC, bioMérieux<sup>®</sup>, Marcy l'Etoile, France) durant une nuit à 37°C sous agitation, a été ajustée à une densité optique de 0,6 à 600 nm. Un millilitre de suspension a été centrifugé 5 minutes à 8000 tours/minute, puis le culot a été repris dans 1 mL de PetIV (NaCl 1M ; Tris-HCl 10M). Après une 2<sup>ème</sup> centrifugation de 5 minutes à 8000 tours/minute, le culot final a été remis en suspension dans 300 µL de tampon EC (Tris-HCl 6 mM ; NaCl 1 M ; EDTA 100 mM ; Brij 58 0,5 % ; désoxycholate de Na 0,2 % ; N-laurylsarcosine 0,5 %).

Chaque suspension bactérienne a été mélangée à 300 µL d'agarose SeaPlaque<sup>®</sup> à 1 % (FMC Corp. Roackland, Maine, Etats-Unis) dans du tampon EC. Ce mélange a été rapidement incorporé dans des moules, puis laissé solidifier 10 minutes à température ambiante, puis 30 minutes à 4°C.

Après solidification, les plugs ont été incubés 1 heure à 37°C en agitation douce dans 10 mL d'EC additionné de lysozyme (1 mg/mL). L'EC a ensuite été éliminé et remplacé par 10 mL de solution de lyse bactérienne ESP (EDTA 0,5 M ; N-laurylsarcosine 1 % ; protéinase K 50 µg/mL), puis les tubes ont été incubés une nuit à 55°C.

Enfin, les plugs ont été lavés 6 fois avec 10 mL de TE 10-1 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM), pendant 1 heure à température ambiante, en agitation douce, et conservés à 4°C jusqu'à analyse.

### ▪ **Restriction et électrophorèse**

Pour la digestion enzymatique, chaque plug a été soumis à l'action de 2,5 µL d'enzyme de restriction *Xba I* ou *Spe I* (20000 UI/mL, BioLabs<sup>®</sup>, Pickering, Ontario) diluée dans 120 µL de tampon de l'enzyme, dilué au 1/10, pendant une nuit, à 37°C.

La migration a été effectuée parallèlement à celle d'un marqueur de poids moléculaire, obtenu après digestion de l'ADN de *Staphylococcus aureus* NCTC 8325, par l'enzyme *Sma I* (20000 UI/mL, BioLabs<sup>®</sup>), durant 5 heures, à 25°C.

Les plugs digérés ont été insérés dans un gel d'agarose SeaKem<sup>®</sup> à 1 % (FMC Corp. Roackland, Maine, Etats-Unis) en TBE 0,5X et les puits scellés par de l'agarose SeaPlaque<sup>®</sup> à 1 % en TBE 0,5X.

La migration a été réalisée sur l'appareil CHEF-DR III<sup>®</sup> (BioRad<sup>®</sup>, Californie, Etats-Unis), en présence de TBE 0,5X, selon les conditions suivantes :

Pulse initial : 2 secondes

Voltage : 200 V

Pulse final : 20 secondes

Température : 14°C

Temps : 20 heures

Angle d'inclinaison : 120°

Les profils de macrorestriction obtenus ont été révélés par immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium 0,1%, puis photographie sous lumière U.V.

▪ **Analyse des pulsotypes**

L'interprétation des pulsotypes a été réalisée par comparaison des fragments obtenus (nombre et taille), en utilisant le logiciel GelCompar II<sup>®</sup> (Applied Maths<sup>®</sup>, Sint-Martens-Latum, Belgique).

***BIBLIOGRAPHIE***

1. Martínez J, Martínez L, *et al.* (2004) How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *Int. Microbiol.* **7**:261-268
2. Orskov I. (1984) Genus *Klebsiella*. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. The William & Wilkins Co.; Baltimore.
3. Carter JS, Bowden FJ, *et al.* (1999) Phylogenetic evidence for reclassification of *Calymmatobacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49 Pt 4**:1695-1700.
4. Drancourt M, Bollet C, *et al.* (2001) Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51(Pt 3)**:925-932.
5. Rosenblueth M, Martínez L, *et al.* (2004) *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst. Appl. Microbiol.* **27(1)**:27-35.
6. Li X, Zhang D, Chen F, *et al.* (2004) *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54(Pt 6)**:2131-2136.
7. Podschun R, Ullmann U. (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11(4)**:589-603.
8. Denis F. (2007) *Bactériologie médicale; technique usuelles*. Masson.
9. Monnet D, Freney J, *et al.* (1991) Difficulties in identifying *Klebsiella* strains of clinical origin. *Zentralbl. Bakteriol.* **274(4)**:456-464.
10. Freney J., Renaud F., *et al.* (2000) *Précis de bactériologie médicale*. Alexandre Lacassagne. 2000.
11. Mizuta K, Ohta M, *et al.* (1983) Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infect. Immun.* **40(1)**:56-61.
12. Williams P, Lambert PA, *et al.* (1983) The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J. Gen. Microbiol.* **129(7)**:2181-2191.
13. Podschun R, Sievers D, *et al.* (1993) Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. *J. Infect. Dis.* **168(6)**:1415-1421.
14. Campos MA, Vargas MA, *et al.* (2004) Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* **72(12)**:7107-7114.
15. Ofek I, Beachey EH. (1978) Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **22(1)**:247-254.
16. Fader RC, Davis CP. (1980) Effect of piliation on *Klebsiella pneumoniae* infection in rat bladders. *Infect. Immun.* **30(2)**:554-561.
17. Fader RC, Davis CP. (1982) *Klebsiella pneumoniae*-induced experimental pyelitis: the effect of piliation on infectivity. *J. Urol.* **128(1)**:197-201.
18. Ofek I, Sharon N. (1988) Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infect. Immun.* **56(3)**:539-547.
19. Würker M, Beuth J, *et al.* (1990) Type of fimbriation determines adherence of *Klebsiella* bacteria to human epithelial cells. *Zentralbl. Bakteriol.* **274(2)**:239-245.
20. Tarkkanen AM, Virkola R, *et al.* (1997) Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infect. Immun.* **65(4)**:1546-1549.

21. Darfeuille-Michaud A, Jallat C, *et al.* (1992) R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. *Infect. Immun.* **60(1)**:44-55.
22. Di Martino P, Bertin Y, *et al.* (1995) Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect. Immun.* **63(11)**:4336-4344.
23. Favre-Bonte S, Darfeuille-Michaud A, Forestier C. (1995) Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human intestine-407 cells. *Infect. Immun.* **63(4)**:1318-1328.
24. Di Martino P, Livrelli V, *et al.* (1996) A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect. Immun.* **64(6)**:2266-2273.
25. Gaytán-Martínez J, Mateos-García E, *et al.* (2000) Microbiological findings in febrile neutropenia. *Arch. Med. Res.* **31(4)**:388-392.
26. De Lorenzo V, Martinez JL. (1988) Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7(5)**:621-629.
27. Ko W, Paterson DL, *et al.* (2002) Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerging Infect. Dis.* **8(2)**:160-166.
28. Feldman C, Ross S, *et al.* (1995) The aetiology of severe community-acquired pneumonia and its impact on initial, empiric, antimicrobial chemotherapy. *Respir Med.* **89(3)**:187-192.
29. Jong GM, Hsiue TR, *et al.* (1995) Rapidly fatal outcome of bacteremic *Klebsiella pneumoniae pneumonia* in alcoholics. *Chest.* **107(1)**:214-217.
30. Yeh K, Kurup A, *et al.* (2007) Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* **45(2)**:466-471.
31. Cheng DL, Liu YC, *et al.* (1990) Pyogenic liver abscess: clinical manifestations and value of percutaneous catheter drainage treatment. *J. Formos. Med. Assoc.* **89(7)**:571-576.
32. Cheng DL, Liu YC, *et al.* (1991) Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess. Their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. *Arch. Intern. Med.* **151(8)**:1557-1559.
33. Fang C, Lai S, *et al.* (2007) *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. *Clin. Infect. Dis.* **45(3)**:284-293.
34. Lee KT, Wong SR, Sheen PC. (2001) Pyogenic liver abscess: an audit of 10 years' experience and analysis of risk factors. *Dig Surg.* **18(6)**:459-465.
35. Rahimian J, Wilson T, *et al.* (2004) Pyogenic liver abscess: recent trends in etiology and mortality. *Clin. Infect. Dis.* **2004 39(11)**:1654-1659.
36. Cheng H, Siu LK, Chang F. (2003) Extended-spectrum cephalosporin compared to cefazolin for treatment of *Klebsiella pneumoniae*-caused liver abscess. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47(7)**:2088-2092.
37. Tang LM, Chen ST, *et al.* (1997) *Klebsiella meningitis* in Taiwan: an overview. *Epidemiol. Infect.* **119(2)**:135-142.
38. De Pontual L, Ovetchkine P, *et al.* (2008) Rhinoscleroma: a French national retrospective study of epidemiological and clinical features. *Clin. Infect. Dis.* **47(11)**:1396-1402.
39. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. (1991) Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am. J. Med.* **91(3B)**:72-75.

40. Arlet G, Sanson-le Pors MJ, *et al.* (1990) Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4 beta-lactamase. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9(11)**:797-803.
41. Peña C, Pujol M, *et al.* (2001) An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia, including strains producing extended-spectrum beta-lactamase. *J. Hosp. Infect.* **47(1)**:53-59.
42. Briñas L, Lantero M, *et al.* (2004) Outbreak of SHV-5 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal-pediatric intensive care unit in Spain. *Microb. Drug Resist.* **10(4)**:354-358.
43. Abraham EP, Chain E. (1988) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev. Infect. Dis.* **10(4)**:677-678.
44. Ambler RP. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **289**:321-331.
45. Jaurin B, Grundström T. (1981) AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78(8)**:4897-4901.
46. Sanschagrín F, Couture F, Levesque RC. (1995) Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39(4)**:887-893.
47. Knott-Hunziker V, Petursson S, W *et al.* (1982) The acyl-enzyme mechanism of beta-lactamase action. The evidence for class C Beta-lactamases. *Biochem. J.* **207(2)**:315-322.
48. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39(6)**:1211-1233.
49. Mercier J, Levesque RC. (1990) Cloning of SHV-2, OHIO-1, and OXA-6 beta-lactamases and cloning and sequencing of SHV-1 beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34(8)**:1577-1583
50. Arakawa Y, Ohta M, *et al.* (1986) Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded beta-lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM beta-lactamase gene mediated by R plasmids. *FEBS Lett.* **207(1)**:69-74.
51. Haeggman S, Löfdahl S, *et al.* (2004) Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(7)**:2400-2408.
52. Leung M, Shannon K, French G. (1997) Rarity of transferable beta-lactamase production by *Klebsiella* species. *J. Antimicrob. Chemother.* **39(6)**:737-745.
53. Chaves J, Ladona MG, *et al.* (2001) Ampurdanés C. SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45(10)**:2856-2861.
54. Brisse S, Verhoef J. (2001) Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51(Pt 3)**:915-924.
55. Rice LB, Carias LL, *et al.* (2000) High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta-lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(2)**:362-367.
56. Corvec S, Caroff N, *et al.* (2006) Increased resistance to beta-lactams in a *Klebsiella pneumoniae* strain: role of a deletion downstream of the Pribnow box in the blaSHV-1 promoter. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **28(4)**:308-312.
57. Petit A, Ben Yaghlane-Bousslama H, *et al.* (1992) Does high level production of SHV-type penicillinase confer resistance to ceftazidime in *Enterobacteriaceae*? *FEMS Microbiol. Lett.* **71(1)**:89-94.

58. Wu TL, Siu LK, et al. (2001) Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 beta-lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **47(6)**:755-761.
59. Bradford PA. (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14(4)**:933-951
60. Lemozy J, Sirot D, et al. (1995) First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39(11)**:2580-2582.
61. Bonomo RA, Rudin SA, Shlaes DM. (1997) Tazobactam is a potent inactivator of selected inhibitor-resistant class A beta-lactamases. *FEMS Microbiol. Lett.* **148(1)**:59-62.
62. Chen ST, Clowes RC. (1984) Two improved promoter sequences for the beta-lactamase expression arising from a single base-pair substitution. *Nucleic Acids Res.* **12(7)**:3219-3234.
63. Knothe H, Shah P, et al. (1983) Transferable resistance to cefotaxime, ceftaxime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* **11(6)**:315-317.
64. Sirot D. (1995) Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **36 Suppl A**:19-34.
65. Kliebe C, Nies BA, et al. (1985) Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28(2)**:302-307.
66. Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. (1994) Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13 Suppl 1**:S17-29.
67. Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SG. (1995) TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function. *J. Antimicrob. Chemother.* **35(1)**:7-22.
68. Pitout JDD, Nordmann P, et al. (2005) Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J. Antimicrob. Chemother.* **56(1)**:52-59.
69. Livermore DM, Canton R, et al. (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **59(2)**:165-174.
70. Kassis-Chikhani N, Vimont S, et al. (2004) CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in long-term care facilities, France. *Emerging Infect. Dis.* **10(9)**:1697-1698.
71. Pai H, Kim MR, et al. (2006) A nosocomial outbreak of *Escherichia coli* producing CTX-M-15 and OXA-30 beta-lactamase. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **27(3)**:312-314.
72. Paterson DL, Hujer KM, et al. (2003) Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47(11)**:3554-3560.
73. Carrër A, Nordmann P. (2009) CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: A change in the epidemiology of ESBL. *Pathol. Biol.* **4**.
74. Nordmann P, Ronco E, et al. (1993) Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37(5)**:962-969.
75. Vahaboglu H, Hall LM, et al. (1995) Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 beta-lactamase, in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. *J. Med. Microbiol.* **43(4)**:294-299.
76. Vahaboglu H, Oztürk R, et al. (1997) Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(10)**:2265-2269.

77. Bauernfeind A, Stemplinger I, *et al.* (1996) Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40(3)**:616-620.
78. Poirel L, Naas T, *et al.* (1999) Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(3)**:573-581.
79. Poirel L, Le Thomas I, *et al.* (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(3)**:622-632.
80. Coque TM, Baquero F, Canton R. (2008) Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill* **20**
81. Rice LB. (2007) Emerging issues in the management of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Cleve Clin J Med.* **74 Suppl 4**:S12-20.
82. Pitout JDD, Laupland KB. (2008) Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* **8(3)**:159-166.
83. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* **9(4)**:228-236.
84. Yigit H, Queenan AM, *et al.* (2001) Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45(4)**:1151-1161.
85. Yigit H, Queenan AM, *et al.* (2003) Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47(12)**:3881-3889.
86. Woodford N, Tierno PM, *et al.* (2004) Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(12)**:4793-4799.
87. Leavitt A, Navon-Venezia S, *et al.* (2007) Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51(8)**:3026-3029.
88. Wolter DJ, Kurpiel PM, *et al.* (2009) Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53(2)**:557-562.
89. Landman D, Bratu S, Quale J. (2009) Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.* **58(Pt 10)**:1303-1308.
90. Villegas MV, Lolans K, *et al.* (2006) First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50(8)**:2880-2882.
91. Cai J, Zhou H, *et al.* (2008) Detection of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in a strain of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* **88(2)**:135-138.
92. Wei Z, Du X, *et al.* (2007) Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51(2)**:763-765.
93. Endimiani A, Carias LL, *et al.* (2008) Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing blaKPC in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52(7)**:2680-2682.
94. Diancourt L, Passet V, *et al.* (2005) Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **43(8)**:4178-4182.

95. Kitchel B, Rasheed JK, *et al.* (2009) Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53(8)**:3365-3370.
96. Samuelsen Ø, Naseer U, *et al.* (2009) Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J. Antimicrob. Chemother.* **63(4)**:654-658.
97. Osterblad M, Kirveskari J, *et al.* (2009) First isolations of KPC-2-carrying ST258 *Klebsiella pneumoniae* strains in Finland, June and August 2009. *Euro Surveill.* **14(40)**.
98. Nordmann P, Poirel L. (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* **8(6)**:321-331.
99. Walsh TR, Toleman MA, *et al.* (2005) Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* **18(2)**:306-325.
100. Lartigue M, Poirel L, Nordmann P. (2004) First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in an *Enterobacteriaceae* isolate in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(12)**:4929-4930.
101. Psychogiou M, Tassios PT, *et al.* (2008) Ongoing epidemic of blaVIM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J. Antimicrob. Chemother.* **61(1)**:59-63.
102. Koh TH, Babini GS, *et al.* (1999) Carbapenem-hydrolyzing IMP-1 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. *Lancet.* **353(9170)**:2162.
103. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo-beta-lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45(8)**:2368-2371.
104. Poirel L, Héritier C, *et al.* (2004) Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(1)**:15-22.
105. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. (2007) Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.* **2(5)**:501-512.
106. Matar GM, Cuzon G, *et al.* (2008) Oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Lebanon. *Clin. Microbiol. Infect.* **14(9)**:887-888.
107. Cuzon G, Naas T, *et al.* (2008) Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52(9)**:3463-3464.
108. Hanson ND, Sanders CC. (1999) Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Curr. Pharm. Des.* **5(11)**:881-894.
109. Jacobs C, Huang LJ, *et al.* (1994) Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J.* **13(19)**:4684-4694.
110. Jacobs C, Frère JM, Normark S. (1997) Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell.* **88(6)**:823-832.
111. Livermore DM. (1987) Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6(4)**:439-445.
112. Schmidtke AJ, Hanson ND. (2006) Model system to evaluate the effect of *ampD* mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50(6)**:2030-2037.
113. Kuga A, Okamoto R, Inoue M. (2000) *ampR* gene mutations that greatly increase class C beta-lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(3)**:561-567.

114. Lindquist S, Weston-Hafer K, et al. (1993) AmpG, a signal transducer in chromosomal beta-lactamase induction. *Mol. Microbiol.* **9(4)**:703-715.
115. Medeiros AA. (1997) Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* **24 Suppl 1**:S19-45.
116. Bobrowski MM, Matthew M, et al. (1976) Plasmid-determined beta-lactamase indistinguishable from the chromosomal beta-lactamase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **125(1)**:149-157.
117. Levesque R, Roy PH, et al. (1982) A plasmid-mediated cephalosporinase from *Achromobacter* species. *J. Infect. Dis.* **145(5)**:753-761.
118. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. (1989) Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection.* **17(5)**:316-321.
119. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. (1990) Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34(11)**:2200-2209.
120. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. (2002) Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46(1)**:1-11.
121. Woodford N, Payne DJ, et al. (1990) Transferable cephalosporin resistance not inhibited by clavulanate in *Escherichia coli*. *Lancet.* **336(8709)**:253.
122. Gonzalez Leiza M, Perez-Diaz JC, et al. (1994) Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38(9)**:2150-2157.
123. Bauernfeind A, Stemplinger I, et al. (1996) Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40(1)**:221-224.
124. Koeck JL, Arlet G, et al. (1997) A plasmid-mediated CMY-2 beta-lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella senftenberg*. *FEMS Microbiol. Lett.* **152(2)**:255-260.
125. Horii T, Arakawa Y, et al. (1993) Plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum beta-lactams, including moxalactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37(5)**:984-990.
126. Gaillot O, Clément C, et al. (1997) Novel transferable beta-lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **39(1)**:85-87.
127. Verdet C, Benzerara Y, et al. (2006) Emergence of DHA-1-producing *Klebsiella spp.* in the Parisian region: genetic organization of the *ampC* and *ampR* genes originating from *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50(2)**:607-617.
128. Fortineau N, Poirel L, Nordmann P. (2001) Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **47(2)**:207-210.
129. Bauernfeind A, Wagner S, et al. (1997) A novel class C beta-lactamase (FOX-2) in *Escherichia coli* conferring resistance to cephamycins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(9)**:2041-2046.
130. Tzouveleki LS, Tzelepi E, et al. (1993). Identification of a novel plasmid-mediated beta-lactamase with chromosomal cephalosporinase characteristics from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **31(5)**:645-654.
131. Marchese A, Arlet G, et al. (1998) Characterization of FOX-3, an AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase from an Italian isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42(2)**:464-467.
132. Gazouli M, Tzouveleki LS, et al. (1996) Transferable cefoxitin resistance in *enterobacteria* from Greek

- hospitals and characterization of a plasmid-mediated group 1 beta-lactamase (LAT-2). *Antimicrob. Agents Chemother.* **40(7)**:1736-1740.
133. Bradford PA, Urban C, et al. (1997). Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(3)**:563-569.
134. Raskine L, Borrel I, et al. (2002) Novel plasmid-encoded class C beta-lactamase (MOX-2) in *Klebsiella pneumoniae* from Greece. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46(7)**:2262-2265.
135. Verdet C, Arlet G, et al. (1998) Characterisation of CMY-4, an AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase in a Tunisian clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **169(2)**:235-240.
136. Stapleton PD, Shannon KP, French GL. (1999) Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 beta-lactamase production and loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(5)**:1206-1210.
137. Cao VT, Arlet G, et al. (2000) Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. *J. Antimicrob. Chemother.* **46(6)**:895-900.
138. Bauernfeind A, Schneider I, et al. (1999) A novel type of AmpC beta-lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(8)**:1924-1931.
139. Nadjar D, Rouveau M, et al. (2000) Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing transferable AmpC-type beta-lactamase (ACC-1) originating from *Hafnia alvei*. *FEMS Microbiol. Lett.* **187(1)**:35-40.
140. Rhimi-Mahjoubi F, Bernier M, et al. (2002) Identification of plasmid-encoded cephalosporinase ACC-1 among various enterobacteria (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*) isolated from a Tunisian hospital *Pathol. Biol.* **50(1)**:7-11.
141. Girlich D, Karim A, et al. (2000) Plasmid-mediated cephalosporinase ACC-1 in clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19(11)**:893-895.
142. Bret L, Chanal-Claris C, et al. (1998). Chromosomally encoded ampC-type beta-lactamase in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42(5)**:1110-1114.
143. Gazouli M, Tzouveleki LS, et al. (1998) Transferable class C beta-lactamases in *Escherichia coli* strains isolated in Greek hospitals and characterization of two enzyme variants (LAT-3 and LAT-4) closely related to *Citrobacter freundii* AmpC beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* **42(4)**:419-425.
144. Yan JJ, Wu SM, et al. (2000). Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(6)**:1438-1442.
145. Wu SW, Dornbusch K, et al. (1999) Characterization and nucleotide sequence of a *Klebsiella oxytoca* cryptic plasmid encoding a CMY-type beta-lactamase: confirmation that the plasmid-mediated cephalosporinase originated from the *Citrobacter freundii* AmpC beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(6)**:1350-1357.
146. Bou G, Oliver A, et al. (2000) Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(9)**:2549-2553.
147. Hall BG, Barlow M. (2004) Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug Resist. Updat.* **7(2)**:111-123.
148. Corvec S, Caroff N, et al. (2002) -11 Mutation in the ampC promoter increasing resistance to beta-lactams in a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.*; **46(10)**:3265-3267.

149. Dunne EF, Fey PD, *et al.* (2000) Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC beta-lactamase. *JAMA*. **284(24)**:3151-3156.
150. Shannon KP, King A, *et al.* (1990) Importance of organisms producing broad-spectrum SHV-group beta-lactamases into the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* **25(3)**:343-351.
151. Payne DJ, Woodford N, Amyes SG. (1992) Characterization of the plasmid mediated beta-lactamase BIL-1. *J. Antimicrob. Chemother.* **30(2)**:119-127.
152. Bauernfeind A, Chong Y, Lee K. (1998) Plasmid-encoded AmpC beta-lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery? *Yonsei Med. J.* **39(6)**:520-525.
153. Jacoby GA.(2009) AmpC beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **22(1)**:161-182.
154. Alvarez M, Tran JH, *et al.* (2004) Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(2)**:533-537.
155. Chen Y, Lauderdale T, *et al.* (2007) Sequencing and comparative genomic analysis of pK29, a 269-kilobase conjugative plasmid encoding CMY-8 and CTX-M-3 beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51(8)**:3004-3007.
156. Corvec S, Crémet L, *et al.* (2009) *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate coproducing SHV-2a, DHA-1, QnrB4, and AAC(6')-Ib-cr determinants in France. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **64(4)**:462-463.
157. Hanson ND, Thomson KS, *et al.* (1999) Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *J. Antimicrob. Chemother.* **44(3)**:377-380.
158. Miriagou V, Tzouveleki LS, *et al.* (2004) CMY-13, a novel inducible cephalosporinase encoded by an *Escherichia coli* plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(8)**:3172-3174.
159. Barnaud G, Arlet G, *et al.* (1998) *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamase (DHA-1) with an *ampR* gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42(9)**:2352-2358.
160. Reisbig MD, Hanson ND. (2002) The ACT-1 plasmid-encoded AmpC beta-lactamase is inducible: detection in a complex beta-lactamase background. *J. Antimicrob. Chemother.* **49(3)**:557-560.
161. Giles WP, Benson AK, *et al.* (2004) DNA sequence analysis of regions surrounding blaCMY-2 from multiple *Salmonella* plasmid backbones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(8)**:2845-2852.
162. Haldorsen B, Aasnaes B, *et al.* (2008) The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired ISEcp1-like *ampC* element or hyperproduction of the endogenous AmpC. *J. Antimicrob. Chemother.* **62(4)**:694-702.
163. Nakano R, Okamoto R, *et al.* (2007) Resistance to gram-negative organisms due to high-level expression of plasmid-encoded *ampC* beta-lactamase blaCMY-4 promoted by insertion sequence ISEcp1. *J. Infect. Chemother.* **13(1)**:18-23.
164. Literacka E, Empel J, *et al.* (2004) Four variants of the *Citrobacter freundii* AmpC-Type cephalosporinases, including novel enzymes CMY-14 and CMY-15, in a *Proteus mirabilis* clone widespread in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(11)**:4136-4143.
165. Partridge SR. (2007) Genetic environment of ISEcp1 and blaACC-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51(7)**:2658-2659.
166. Papagiannitsis CC, Tzouveleki LS, *et al.* (2007) Plasmid-encoded ACC-4, an extended-spectrum cephalosporinase variant from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51(10)**:3763-3767.
167. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. (2006) ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70(2)**:296-316.

168. Martínez-Martínez L, Pascual A, *et al.* (1999) Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(7)**:1669-1673.
169. Martínez-Martínez L, Conejo MC, *et al.* (2000) Activities of imipenem and cephalosporins against clonally related strains of *Escherichia coli* hyperproducing chromosomal beta-lactamase and showing altered porin profiles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(9)**:2534-2536.
170. Hernández-Allés S, Conejo MD, *et al.* (2000) Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46(2)**:273-277.
171. Pitout JD, Thomson KS, *et al.* (1998) beta-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42(6)**:1350-1354.
172. Doi Y, Paterson DL. (2007) Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases. *Int. J. Infect. Dis.* **11(3)**:191-197.
173. Yagi T, Wachino J, *et al.* (2005) Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **43(6)**:2551-2558.
174. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40(6)**:2153-2162.
175. Pai H, Kang C, *et al.* (2004) Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(10)**:3720-3728.
176. Yan J, Ko W, *et al.* (2004). Epidemiological investigation of bloodstream infections by extended spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in a Taiwanese teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.* **42(7)**:3329-3332.
177. M'Zali FH, Heritage J, *et al.* (1997). Transcontinental importation into the UK of *Escherichia coli* expressing a plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase exposed during an outbreak of SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in a Leeds hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **40(6)**:823-831.
178. Ohana S, Leflon V, *et al.* (2005) Spread of a *Klebsiella pneumoniae* strain producing a plasmid-mediated ACC-1 AmpC beta-lactamase in a teaching hospital admitting disabled patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49(5)**:2095-2097.
179. Nikaido H. (1989) Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33(11)**:1831-1836.
180. Nikaido H, Vaara M.(1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49(1)**:1-32.
181. Hernández-Allés S, Albertí S, *et al.* (1999) Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology.* **145 ( Pt 3)**:673-679.
182. Albertí S, Rodríguez-Quñones F, *et al.* (1995) A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. *Infect. Immun.* **63(3)**:903-910.
183. Doménech-Sánchez A, Hernández-Allés S, *et al.* (1999) Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **181(9)**:2726-2732.
184. Nikaido H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67(4)**:593-656.

185. Livermore DM. (1992) Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36(9)**:2046-2048.
186. Doumith M, Ellington MJ, *et al.* (2009) Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter spp.* clinical isolates from the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **63(4)**:659-667.
187. Aggeler R, Then RL, Ghosh R. (1987) Reduced expression of outer-membrane proteins in beta-lactam-resistant mutants of *Enterobacter cloacae*. *J. Gen. Microbiol.* **133(12)**:3383-3392.
188. Chia JH, Siu LK, *et al.* (2009) Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Taiwan: resistance due to combined CMY-2 production and porin deficiency. *J. Chemother.* **21(6)**:621-626.
189. Medeiros AA, O'Brien TF, *et al.* (1987) Loss of OmpC porin in a strain of *Salmonella typhimurium* causes increased resistance to cephalosporins during therapy. *J. Infect. Dis.* **156(5)**:751-757.
190. Ardanuy C, Liñares J, *et al.* (1998) Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42(7)**:1636-1640.
191. Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, *et al.* (1996) In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40(2)**:342-348.
192. Martínez-Martínez (2008) L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin. Microbiol. Infect.* **14 Suppl 1**:82-89.
193. Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, *et al.* (2003) Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47(10)**:3332-3335.
194. Wang XD, Cai JC, Z *et al.* (2009) Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated beta-lactamase production and OmpK36 porin deficiency. *J. Med. Microbiol.* **58(Pt 9)**:1196-1202.
195. Lee C, Chu C, *et al.* (2007) Collateral damage of flomoxef therapy: in vivo development of porin deficiency and acquisition of blaDHA-1 leading to ertapenem resistance in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-3 and SHV-5 beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **60(2)**:410-413.
196. Bidet P, Burghoffer B, *et al.* (2005) In vivo transfer of plasmid-encoded ACC-1 AmpC from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in an infant and selection of impermeability to imipenem in *K. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49(8)**:3562-3565.
197. Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, *et al.* (2006). High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50(10)**:3396-3406.
198. Landman D, Bratu S, *et al.* (2007) Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. *J. Antimicrob. Chemother.* **60(1)**:78-82.
199. Paterson DL, Mulazimoglu L, *et al.* (2000) Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **30(3)**:473-478.
200. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. (2005) Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **25(5)**:358-373.
201. Hooper DC, Wolfson JS, Ng EY, Swartz MN. (1987) Mechanisms of action of and resistance to ciprofloxacin. *Am. J. Med.* **82(4A)**:12-20.

202. Deguchi T, Fukuoka A, *et al.* (1997) Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(3)**:699-701.
203. Aathithan S, French GL. (2010) Hypermutability in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* is uncommon and is unrelated to ciprofloxacin resistance. *Int J Antimicrob Agents* **36(3)**:239-242.
204. Martínez-Martínez L, Pascual A, *et al.* (2002) Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46(12)**:3926-3932.
205. Deguchi T, Kawamura T, *et al.* (1997) *In vivo* selection of *Klebsiella pneumoniae* strains with enhanced quinolone resistance during fluoroquinolone treatment of urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(7)**:1609-1611.
206. Martínez-Martínez L, García I, *et al.* (1998) Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42(7)**:1850-1852.
207. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* **351(9105)**:797-799.
208. Jacoby G, Cattoir V, *et al.* (2008) *qnr* Gene nomenclature. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52(7)**:2297-2299.
209. Martínez-Martínez L, Eliecer Cano M, *et al.* (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **6(5)**:685-711.
210. Tran JH, Jacoby GA. (2002) Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99(8)**:5638-5642.
211. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. (2005) Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49(1)**:118-125.
212. Wang M, Sahm DF, *et al.* (2004) Activities of newer quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(4)**:1400-1401.
213. Poirel L, Pitout JDD, *et al.* (2006) *In vivo* selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50(4)**:1525-1527.
214. Nordmann P, Poirel L. (2005) Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **56(3)**:463-469.
215. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. (2006) The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* **6(10)**:629-640.
216. Cattoir V, Nordmann P. (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr. Med. Chem.* **16(8)**:1028-1046.
217. Cavaco LM, Hasman H, *et al.* (2009) *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53(2)**:603-608.
218. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. (2008) Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? *Clin. Microbiol. Infect.* **14(4)**:295-297.

219. Wang M, Sahm DF, *et al.* (2004) Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004 48(4):1295-1299.
220. Fihman V, Lartigue MF, *et al.* (2008) Appearance of *aac(6')-Ib-cr* gene among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a French hospital. *J. Infect.* **56(6)**:454-459.
221. Robicsek A, Strahilevitz J, *et al.* (2006) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* **12(1)**:83-88.
222. Karisik E, Ellington MJ, *et al.* (2006) Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 beta-lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* **58(3)**:665-668.
223. Yamane K, Wachino J, *et al.* (2007) New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51(9)**:3354-3360.
224. Périchon B, Courvalin P, Galimand M. (2007) Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51(7)**:2464-2469.
225. Verdet C, Arlet G, *et al.* (2000) A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the *bla*(DHA-1) gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(1)**:222-225.
226. Kang M, Besser TE, Call DR. (2006) Variability in the region downstream of the *bla*CMY-2 beta-lactamase gene in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50(4)**:1590-1593.
227. Poirel L, Guibert M, *et al.* (1999) Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of *ampC-ampR* from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43(4)**:769-776.
228. Cattoir V, Poirel L, *et al.* (2007) Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 60(2):394-397.
229. Park CH, Robicsek A, *et al.* (2006) Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50(11)**:3953-3955.
230. Kieser T. (1984) Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid.* **12(1)**:19-36.
231. Tenover FC, Arbeit RD, *et al.* (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33(9)**:2233-2239.
232. Corvec S, Crémet L, *et al.* (2009) Vitek2 system: a reliable tool to detect *qnr* determinants in *Enterobacteriaceae* without quinolone resistance-determining region modifications. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64(4):455-457.
233. Falagas ME, Bliziotis IA. (2007) Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int. J. Antimicrob. Agents.* **29(6)**:630-636.
234. Casewell MW, Phillips I. (1981) Aspects of the plasmid-mediated antibiotic resistance and epidemiology of *Klebsiella* species. *Am. J. Med.* **70(2)**:459-462.
235. Ding H, Yang Y, *et al.* (2008) The prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27(10)**:915-921.

236. Yan J, Ko W, *et al.* (2004) Complexity of *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to both cephamycins and extended-spectrum cephalosporins at a teaching hospital in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* **42(11)**:5337-5340.
237. Kim J, Park Y, *et al.* (2004) Case report: Bacteremia due to *Salmonella enterica* Serotype Montevideo producing plasmid-mediated AmpC beta-lactamase (DHA-1). *Ann. Clin. Lab. Sci.* **34(2)**:214-217.
238. Liebana E, Batchelor M, *et al.* (2004) First report of *Salmonella* isolates with the DHA-1 AmpC beta-lactamase in the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48(11)**:4492.
239. Coudron PE, Hanson ND, Climo MW. (2003) Occurrence of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC beta-lactamases. *J. Clin. Microbiol.* **41(2)**:772-777.
240. Queenan AM, Jenkins S, Bush K. (2001) Cloning and biochemical characterization of FOX-5, an AmpC-type plasmid-encoded beta-lactamase from a New York City *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45(11)**:3189-3194.
241. Corvec S, Crémet L, *et al.* (2010) Epidemiology of *Escherichia coli* clinical isolates producing AmpC plasmidic beta-lactamase during a 5-year period in a French teaching Hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **67(3)**:277-281.
242. Li Y, Li Q, *et al.* (2008) Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-Type AmpC beta-lactamase resistance in China. *J. Clin. Microbiol.* **46(4)**:1317-1321.
243. Driche Z, Salord H. *et al.* (2010) Prevalence and molécular characterization of plasmid-mediated AmpC B-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in Rhone-Alpes area, France. *Clin. Microbiol. Inf.* **16(2)**:S182.
244. Poirel L, Leviandier C, Nordmann P. (2006) Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50(12)**:3992-3997.
245. Crémet L, Caroff N, *et al.* (2009) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL *Enterobacteriaceae* clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. *Pathol. Biol.* **Mai**.
246. Lavigne J, Marchandin H, *et al.* (2006) *qnrA* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50(12)**:4224-4228.

**Nom – Prénom :** Illiaquer Marina

**Titre du mémoire-thèse :** Epidémiologie et caractérisation moléculaire de souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, hors BLSE, isolées entre 2007 et 2009, au C.H.U. de Nantes.

---

**Résumé du mémoire-thèse :**

Depuis 2007, nous constatons au C.H.U. de Nantes, une recrudescence de souches de *K. pneumoniae*, résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, hors BLSE.

L'objectif de notre étude était de caractériser, sur un plan moléculaire et sur un plan épidémiologique, le mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines impliqué chez 15 souches isolées entre 2007 et 2009.

Pour la 1<sup>ère</sup> fois, à Nantes, nous avons mis en évidence, l'émergence de souches de *K. pneumoniae* productrices d'une céphalosporinase plasmidique de type DHA-1 : sept souches ont été détectées positives (prévalence 0,47 %). Parmi les souches sélectionnées, une seule souche (contrôle qualité) produisait une enzyme de type CMY-2. Enfin, une mutation au sein du promoteur de la  $\beta$ -lactamase chromosomique SHV-1, à l'origine d'une hyperproduction de l'enzyme, a été rapportée chez deux souches, associée à un déficit en porine OmpK35 et/ou OmpK36

Par ailleurs, l'étude des gènes de résistance associés et l'analyse épidémiologique clinique et moléculaire a permis de mettre en évidence la diffusion, d'une part, d'une souche de *K. pneumoniae* hébergeant un plasmide support de *bla*<sub>DHA-1</sub>, *qnrB4* et *aac(6')-Ib-cr* et, d'autre part, la dissémination de ce même plasmide au sein de souches de *K. pneumoniae* possédant un fond génétique différent.

---

**MOTS CLES :** *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* – RESISTANCE AUX  $\beta$ -LACTAMINES – CO-RESISTANCES

---

**JURY**

**PRESIDENT :** Mme Berthe-Marie IMBERT, Professeur de Virologie  
Faculté de Pharmacie de Nantes

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

M. François RAFFI, Professeur de Maladies Infectieuses et Tropicales  
Faculté de Médecine de Nantes

M. Daniel VILLERS, Professeur de Réanimation Médicale  
Faculté de Médecine de Nantes

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

---

**Adresse de l'auteur :** Marina Illiaquer  
46 rue Félix Faure - 44000 Nantes