Université de Lille Faculté de Pharmacie de Lille
Année Universitaire 2017/2018

MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu publiquement le 28/09/2018
Par Mlle CAUCHIE Anne-Gaëlle

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Résistance des entérobactéries à la colistine : évaluation d'une méthode de CMI en microdilution, prévalence des souches *mcr-1* et description de la population

---

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Benoît FOLIGNE, PU Faculté de Pharmacie de Lille

Directeur de thèse : Madame le Docteur Anne VACHEE, PH au CH de Roubaix

Assesseurs :
Madame le Professeur Karine FAURE, PU-PH Faculté de Médecine de Lille
Madame le Docteur Caroline LOIEZ, PH au CHU de Lille
Madame le Docteur Dominique DESCAMPS, PH au CH de Béthune

Université de Lille
Année Universitaire 2017/2018

Faculté de Pharmacie de Lille

MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu publiquement le 28/09/2018
Par Mlle CAUCHIE Anne-Gaëlle

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Résistance des entérobactéries à la colistine : évaluation d'une méthode de CMI en microdilution, prévalence des souches *mcr-1* et description de la population

---

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Benoît FOLIGNE, PU Faculté de Pharmacie de Lille

Directeur de thèse : Madame le Docteur Anne VACHEE, PH au CH de Roubaix

Assesseurs :
Madame le Professeur Karine FAURE, PU-PH Faculté de Médecine de Lille
Madame le Docteur Caroline LOIEZ, PH au CHU de Lille
Madame le Docteur Dominique DESCAMPS, PH au CH de Béthune

Faculté de Pharmacie
de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - 🖷 : 03.20.96.43.64
http://pharmacie.univ-lille2.fr

Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSE	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation

Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie

Université de Lille

Faculté de Pharmacie de Lille

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
http://pharmacie.univ-lille2.fr

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **11**

ABREVIATIONS **17**

TABLE DES ILLUSTRATIONS **19**

INTRODUCTION **21**

1. Entérobactéries et résistance 21
2. Généralités sur la colistine 26
3. Résistance à la colistine 30
   A) Résistances chromosomiques 32
   B) 2015 : découverte d'une résistance plasmidique (mcr-1) 32
4. Détermination de la sensibilité à la colistine 37
   A) Rappels sur les méthodes d'antibiogrammes 37
      1. Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé : 37
      2. CMI déterminées par bandelettes imprégnées d'un gradient de concentrations d'antibiotiques : E-test® ou autres dispositifs 37
      3. Antibiogramme par dilution en milieu liquide : 38
   B) Problèmes rencontrés pour la détermination de la sensibilité à la colistine au laboratoire 38
   C) Evaluation des différentes méthodes commercialisées 39
   D) Alerte bioMérieux 40
5. Objectifs de la thèse 41

MATERIELS ET METHODES **43**

1. Données 43
2. Recueil des souches 43
3. Détermination des CMI de la colistine par méthode Sensititre® 44
   A) Description de la méthode 44
   B) Technique 46
   C) Lecture des plaques 47
4. Détection du gène *mcr-1* 49
5. Analyse statistique 49

RESULTATS **51**

1. Description de la population 51
2. Performance du Sensititre® 57
3. Détermination des souches productrices du gène *mcr-1* 59

DISCUSSION **61**

1. Evaluation de la performance de la technique Sensititre® 61
2. Limites de la technique, problèmes rencontrés lors de la détection de la résistance à la colistine et alternatives 62
3. Impacts de la résistance et actions visant à diminuer sa propagation 67
   A) Impacts de la résistance 68
   B) Actions visant à diminuer la propagation de la résistance à la colistine 69
4. Alternatives thérapeutiques ? 72

CONCLUSION **73**

BIBLIOGRAPHIE..... 75

ANNEXE 1 : FEUILLES DE TRAVAIL : SENSITITRE CUSTOM PLATE FORMAT *(Plate Code : FRCOL)*..... 87

REMERCIEMENTS

Au président de mon jury,

Monsieur le Professeur Benoît FOLIGNE

Professeur des Universités
Laboratoire de Bactériologie

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse.
Je vous remercie pour l'attention que vous avez portée à ce travail.
Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A mes juges,

Madame le Professeur Karine FAURE,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Faculté de Médecine de Lille
Unité d'Infectiologie - Hôpital Huriez - Pavillon Fourrier
Chef de service

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté d'évaluer cette thèse et de l'intérêt porté à ce travail. Recevez ici le témoignage de mon profond respect et de toute ma considération.

Madame le Docteur Caroline LOIEZ

Praticien Hospitalier
Centre Hospitalier Universitaire de Lille
Centre de Biologie Pathologie Génétique
Service de Bactériologie

Je vous remercie pour votre disponibilité, votre aide et votre écoute lors de mes différentes venues dans votre service. Vous me faites l'honneur de participer à ce jury, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Madame le Docteur Dominique DESCAMPS

Praticien Hospitalier
Centre Hospitalier de Béthune
Chef de service

Je souhaite tout d'abord vous remercier pour l'année d'internat passée dans votre service. Votre pédagogie, votre écoute et votre formation sont liées avec mon intérêt grandissant pour la bactériologie. De plus, l'attention que vous avez portée à ce travail et la possibilité de réaliser mes manipulations au CH de Béthune m'ont été d'une grande aide et je vous en remercie. Vous me faites l'honneur de juger ce travail et je vous en suis très reconnaissante.

A ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Anne VACHEE

Praticien Hospitalier
Centre Hospitalier de Roubaix
Laboratoire de Bactériologie

Je vous remercie pour le temps et la confiance que vous m'avez accordés. Votre disponibilité, votre rigueur et vos précieux conseils m'ont permis de réaliser ce travail et d'enrichir mes connaissances. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec vous. Soyez assurée de mon profond respect et de ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier,

Mme Sylvie ARMAND, technicienne au laboratoire du CHU de Lille. Un immense merci pour votre aide pour la réalisation des PCR et pour votre disponibilité.

Safia, qui m'a bien aidé lors de la récupération des souches du CHU de Lille. Ta présence et ta bonne humeur ont rendu ce travail plus agréable.

Toute l'équipe du laboratoire de Béthune qui m'a accompagnée et supportée au début de ce travail. Je n'oublierai jamais cette année passée avec vous. Votre bonne humeur tous les jours, votre écoute et les nombreux petits-déjeuners restent à jamais gravés dans ma mémoire. Je vous en remercie infiniment !

Toute l'équipe du laboratoire de Versailles. Je vous remercie pour vos conseils, votre pédagogie et votre disponibilité. Je suis très heureuse de rejoindre votre équipe en novembre et de démarrer ma nouvelle vie parisienne auprès de vous.

Et enfin, toute l'équipe du laboratoire de Roubaix. Merci pour votre patience, votre accueil chaleureux et votre disponibilité qui m'ont permis de pouvoir écrire ce travail dans les meilleures conditions. Je suis très heureuse de finir mon internat avec vous.

Merci aussi à mon comité de relecture, Nico et Esther, qui n'ont pas dû chômer !!

Je souhaite dédier ce travail,

A mes parents, qui ont toujours été présents pour moi. Toutes ces années à vivre avec vous ont été plus qu'agréables grâce à votre présence, votre amour, votre soutien et la confiance que vous avez pour moi. Merci de m'avoir supporté ces six derniers mois et de m'avoir accueilli alors que vous étiez enfin tranquilles !

A Delph, Tim et petit Achille. La famille médecin toujours disponible pour une ordonnance ou un avis. Delph, mon modèle depuis toujours, je te remercie de supporter mes sautes d'humeur depuis tout ce temps. Tim, je te remercie pour ta patience et ta bonne humeur, tes blagues me feront toujours autant rire. Et Achille, j'ai hâte que tu grandisses pour que tu vois la vraie tata gâteau qui est en moi !

A Greg, Camille et crevette. Votre présence sur Amiens avec moi était un vrai réconfort. Votre générosité incroyable est un modèle pour moi. Greg, toujours présent dans nos blagues d'enfants que je n'oublierai jamais ! On s'est souvent chamaillé mais « qui aime bien, châtie bien » ! Camille, merci pour tes doux conseils et ta gentillesse. Tu trouves toujours les bons mots ! Et crevette, j'ai hâte de faire ta connaissance !!

A mes grands-parents qui ont toujours été là pour moi. Bonne-maman, merci pour tous ces jeudis midi passés ensemble, nos petits repas à deux où tu sais très bien comment me faire plaisir ! Manou, merci pour ta générosité, tes accueils chaleureux et tes longues conversations sur la plage de St Lunaire et partout ailleurs ! Bon-papa, merci pour ta patience, ton écoute, ton humour et les nombreux apéro/yam's ! Merci pour tout l'amour que vous portez à tous vos petits-enfants.

A toute ma famille : tantes, oncles et cousins. Toutes ces réunions de familles à Noël, lors de grandes cousinades ou autres grands événements sont toujours des merveilleux moments. Que cela continue encore longtemps !

A mes copines de toujours, Agathe et Diane. Merci d'être présente pour moi depuis si longtemps dans les bons et mauvais moments. Votre amitié m'est si précieuse !

A mes copines de longue date, Alix et Soso. Merci pour votre joie de vivre et pour tous les supers moments qu'on a vécu ensemble. A quand un nouveau voyage ensemble ?

A mes copines depuis le collège avec qui nous avons appris et découvert tant de choses sur la vie : Caro, Clem, Momo, Jojo et Math.

A mes ch'tites bretonnes : Philou, Jeanne, Flo, Adé, Léo et Constance. Toujours aussi contente de vous retrouver chaque été à St Lunaire (ou St Cast) !

A mes copains de la fac : les animaux !! Les mots ne suffisent pas pour dire à quel point vous êtes géniaux et que j'ai de la chance de vous avoir rencontré... Un immense merci pour toutes ces looooongues années passées ensemble et toutes celles à venir ! Entre nos weekends d'été, d'hiver et tous les autres projets en cours et à venir, j'espère que cela durera encore longtemps !

Petites dédicaces à :

- Ma Tentense, mon premier binôme et ma première très belle amitié sur les bancs du CAPPEC. Merci ma tête de lézard d'avoir rendu cette P1 si facile à vivre !!
- Ma Vancass (-croute) : de la P1 jusqu'au concours de l'internat, tu as toujours été présente à mes côtés ! Je n'oublierai jamais les « voir Vancass » sur mes cours mais surtout merci pour ton accueil tous les jeudis soir chez toi après nos folles soirées ! Ta motivation tous les matins post-soirée m'impressionnera toujours autant !
- Mon Clemish, le guadeloupéen ou british. Toujours un peu perché mais toujours présent dans toutes les situations. Tu es quelqu'un sur qui on peut toujours compter ! Merci d'être là !

A mes supers colocs d'Amiens, « la ville que personne ne choisit » : Lucas et Albane. Merci d'avoir partagé cette vie Amiénoise avec moi et d'en avoir fait de très bons souvenirs. Je ne pense pas revenir sur Amiens un jour mais je serai toujours nostalgique de ces deux années passées avec vous… !! PS : j'attends toujours votre radeau…

A mes supers colocs Lillois : Lucas (toujours présent), Maram (et Alice qui était presque notre quatrième coloc) ! On était mal parti avec l'appartement mais c'est les larmes aux yeux que je vous ai quitté… Merci pour cette année incroyable ! Je n'oublierai jamais tous ces supers bons moments passés avec vous !

A mes co-internes qui ont dû supporter mes sautes d'humeur ou blagues en tout genre mais qui ont surtout rendus ces stages d'internes juste magique et inoubliable ! Particulièrement à Esther, ma première co-interne. Merci pour tous ces délires qui ont fait de mon premier semestre un des meilleurs. A Elodie pour avoir fait de la biochimie un stage beaucoup moins ennuyant. A Maud pour cette année à Béthune juste incroyable ! A Rayan et Emilie, mes derniers co-internes parisiens, qui m'ont aidé à surmonter la salle de garde de Versailles !

Et enfin, à Nico : mon amoureux, meilleur ami et confident ! Merci d'être présent pour moi depuis maintenant plus de sept ans ! Je ne sais pas ce que je serais et ferais sans toi… Nous avons plein de projets ensemble et j'ai hâte de te rejoindre sur Paris pour enfin vivre notre vie à deux !!

ABREVIATIONS

ANSES : Agence Nationale de SEcurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ATCC : American Type Culture Collection

BCP : BromoCrésol Pourpre

BGN : Bacille à Gram Négatif

BHRe : Bactérie Hautement Résistante et émergente

BLSE : Bêta-Lactamase à Spectre Etendu

BMR : Bactérie Multi-Résistante

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CH : Centre Hospitalier

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMS : Colistine MéthaneSulfonate

CNR : Centre National de Référence

CTX-M : Céfotaximase

DDJ : Doses Définies Journalières

DI : Densité d'Incidence

EARS-Net : European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

EBLSE : Entérobactérie productrice de Bêta-Lactamase à Spectre Etendu

ECBU : Examen Cyto-Bactériologique des Urines

ECDC : European Centre for Disease prevention and Control

EMA : Agence Européenne des Médicaments

EPC : Entérobactérie Productrice de Carbapénèmase

ESAC-Net : European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network

EUCAST : EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

HCSP : Haut Conseil de la Santé Publique

IV : IntraVeineuse

JH : Journées d'Hospitalisation

KPC : *Klebsiella Pneumoniae* Carbapénèmase

LPS : LipoPolySaccharide

NDM : New Delhi Metallo-bêta-lactamase

ONERBA : Observation National de l'Epidémiologie et de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques

OXA : OXAcillinase

PCR : Polymerase Chain Reaction

PK/PD : Pharmacocinétique et Pharmacodynamique

PLP : Protéines Liant les Pénicillines

SDD : Selective Decontamination of the Digestive tract

SF2H : Société française d'Hygiène hospitalière

spp : Sous-espèce

UE : Union Européenne

UFC : Unité Formant Colonie

VIM : Verona Integron-encoded Metallo-bêta-lactamase

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Densité d'incidence des SARM et des EBLSE pour 1 000 JH (densité d'incidence globale par année) entre 2002 et 2016. Réseau BMR-Raisin – Résultats 2016 22

Figure 2 : Evolution de la consommation d'antibiotiques de la famille des bêtalactamines en nombre de DDJ/1 000 JH dans la cohorte de 490 établissements ayant participé de 2009 à 2016. Réseau ATB-Raisin – Résultats 2016 23

Figure 3 : Répartition en France de 2012 à 2014 des souches d'entérobactéries ayant une sensibilité diminuée aux carbapénèmes reçues au CNR. 24

Figure 4 : Répartition des épisodes impliquant des EPC en France signalés entre 2009 et 2016, selon les mécanismes de résistance impliqués et l'année de signalement (N=3 595). RICAI 2017 – Santé Publique France 25

Figure 5 : Pourcentage de souches invasives de *Klebsiella pneumoniae* ayant une résistance aux carbapénèmes en 2016 par pays en Europe. EARS-Net 2016-2017 26

Figure 6 : Structure de la colistine A et B (polymyxine E1 et E2) 27

Figure 7 : Mécanisme d'action de la colistine sur la membrane des bactéries à Gram négatif 28

Figure 8 : Tendances de la consommation de polymyxines en Europe, 2010-2014..... 29

Figure 9 : Consommation de polymyxines par pays de l'Europe en 2016. ECDC 2016 30

Figure 10 : Pourcentage de *Klebsiella pneumoniae* isolées à partir du sang ayant une résistance associée aux carbapénèmes et à la colistine en Europe en 2016. ECDC Novembre 2017..... 31

Figure 11 : Répartition géographique du gène *mcr-1* (au 2 juin 2016)..... 34

Figure 12 : Photo d'une plaque de microtitration Sensitire® à 96 puits..... 45

Figure 13 : Format de la plaque Sensititre® 46

Figure 14 : Cupule Sensititre® avec trois puits présentant une croissance 48

Figure 15 : Logigramme sur le processus de sélection des souches..... 52

Figure 16 : Répartition des souches catégorisées résistantes à la colistine par méthode VITEK2® ou E-test® selon le type de prélèvement : dépistage *vs*. diagnostique 54

Figure 17 : Répartition en pourcentage des phénotypes de résistance parmi les souches à visée diagnostique catégorisées résistantes à la colistine par méthode VITEK2® ou E-test®..... 56

Figure 18 : Répartition en pourcentage des phénotypes de résistance parmi les souches à visée dépistage catégorisées résistantes à la colistine par méthode VITEK2® ou E-test®. 56

Figure 19 : Distribution des CMI pour la méthode Sensititre® 57

Figure 20 : Comparaison des CMI des souches *mcr-1* positives et négatives..... 59

Figure 21 : Présentation du système UMIC® (biocentric). 64

Tableaux

Tableau 1 : Répartition des souches catégorisées résistantes à la colistine par méthode VITEK2® ou E-test® selon le service 53

Tableau 2 : Répartition des souches catégorisées résistantes à la colistine par méthode VITEK2® ou E-test® isolées à partir de prélèvements à visée diagnostique selon la nature du prélèvement 55

Tableau 3 : Discordances des CMI obtenues par méthode VITEK2®/E-test® *vs.* méthode Sensititre® 58

Tableau 4 : Description de la population des souches porteuses du gène *mcr-1* 60

INTRODUCTION

1. Entérobactéries et résistance

Les entérobactéries *(Enterobacteriaceae*) sont des bacilles à Gram négatif constituant l'une des plus importantes familles de bactéries. Les entérobactéries rassemblent de nombreux genres dont *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Shigella, Serratia, Citrobacter, Proteus*. Pour la plupart, ce sont des commensaux résidant principalement au niveau du tube digestif de l'homme et des animaux. *Escherichia coli* représente l'espèce bactérienne aérobie dominante de l'intestin à raison de 10^8 par gramme de fèces (flore totale : 10^{11} à 10^{12} bactéries par gramme) (1). Pour certaines, ce sont des pathogènes stricts (ex : *Salmonella* Typhi ou *Shigella dysenteria*). Elles peuvent aussi être, à l'hôpital, responsables d'infections dites opportunistes chez des patients souvent fragilisés. On estime qu'elles sont impliquées dans 50% des cas de septicémies, 60 à 70% des entérites et 70% des infections urinaires (2). Elles sont généralement traitées par des bêtalactamines. Les bêtalactamines constituent la plus grande famille d'antibiotiques. Elle regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes. Toutes se fixent aux protéines de liaison des pénicillines (PLP) inhibant ainsi la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne (3).

Cependant, depuis de nombreuses années, on observe une émergence de bactéries multi-résistantes (BMR). L'émergence des BMR et leur diffusion sont le résultat de deux facteurs conjoints : la pression de sélection par les antibiotiques et la transmission des souches résistantes, transmission croisée, ou des supports génétiques de la résistance (plasmides) (4). Les bactéries sont dites multi-résistantes aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique. La multirésistance est une étape vers l'impasse thérapeutique. En France, la surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques repose sur de nombreux partenaires et réseaux de surveillance.

La résistance des entérobactéries aux bêtalactamines est principalement due à des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), enzymes qui hydrolysent l'ensemble des pénicillines ou céphalosporines à l'exception des céphamycines et des

carbapénèmes (5). Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE) ont émergé dans les années 1980 : elles étaient alors principalement représentées par *K. pneumoniae* et *E. aerogenes* et quasi exclusivement responsables d'infections nosocomiales. A la fin des années 1990, on observe l'émergence d'un nouveau type de BLSE (les céfotaximase-Munich (BLSE CTX-M)), retrouvées principalement chez *E. coli* et dans les infections communautaires. Ce phénotype de BLSE touchant principalement *E. coli*, entérobactérie principale du tube digestif de l'homme, constitue un nouveau péril fécal et un réservoir de BLSE pour les autres espèces d'entérobactéries qui colonisent ou transitent par le tube digestif de l'homme (6,7).

En 2016, le nombre annuel des infections nosocomiales à EBLSE était estimé entre 58 000 et 109 000, dont entre 7 000 et 11 500 bactériémies. Depuis 2002, la densité d'incidence (DI) globale des infections à EBLSE a été multipliée par 5,4 (+443%) (Figure 1). Elle est estimée, en 2016, à 0,71 pour 1 000 journées d'hospitalisation (JH) et la proportion de l'espèce *E. coli* a augmenté de 19 à 58%. Cette augmentation importante peut être inquiétante car elle peut servir de réservoir potentiel pour l'émergence de nouvelles souches résistantes aux carbapénèmes (8).

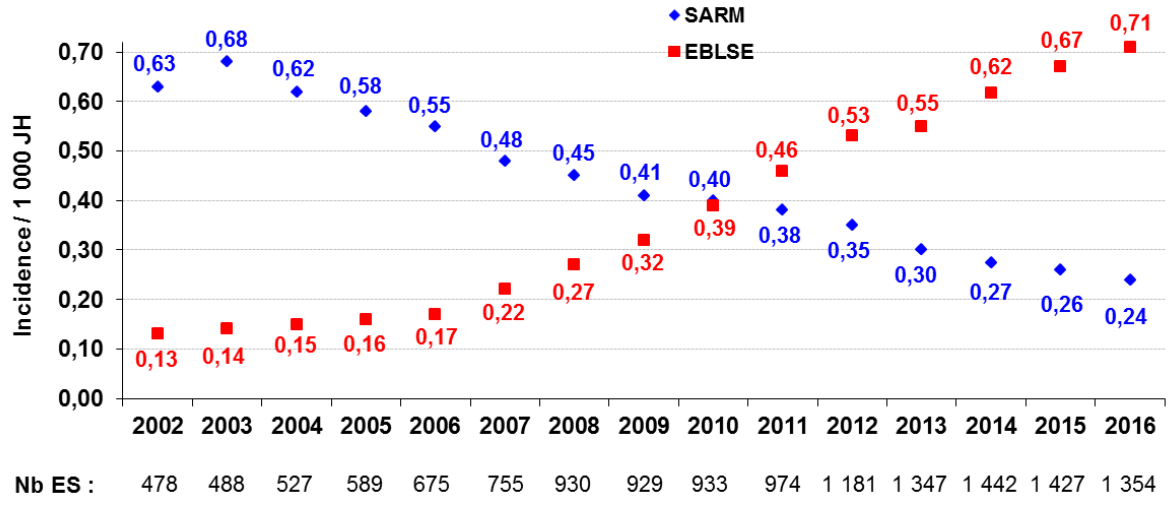
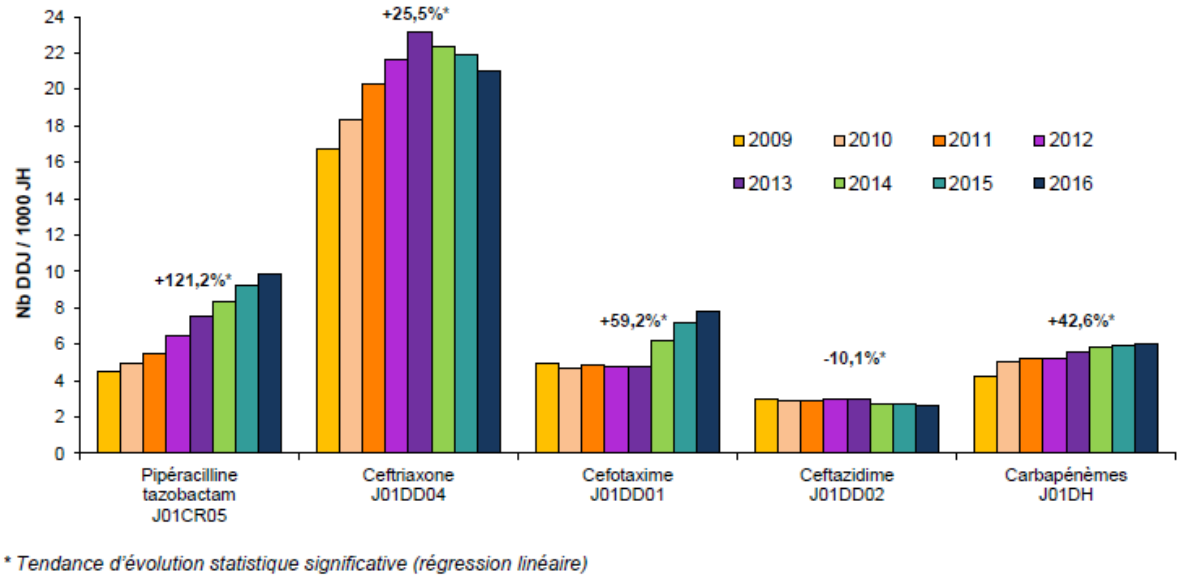


Figure 1 : Densité d'incidence des SARM et des EBLSE pour 1 000 JH (densité d'incidence globale par année) entre 2002 et 2016. ES : établissement. Réseau BMR-Raisin – Résultats 2016

Avec l'augmentation de l'incidence des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (EBLSE ou hyperproduction de la céphalosporinases), la consommation des carbapénèmes a augmenté ces dernières années (Figure 2) (9).



** Tendance d'évolution statistique significative (régression linéaire)*

Figure 2 : Evolution de la consommation d'antibiotiques de la famille des bêtalactamines en nombre de DDJ/1 000 JH dans la cohorte de 490 établissements ayant participé de 2009 à 2016 (pourcentage d'évolution entre 2009 et 2016). DDJ : Doses définies journalières. Réseau ATB-Raisin – Résultats 2016

Par conséquent, des souches résistantes aux carbapénèmes apparaissent. Cette résistance peut provenir de deux mécanismes différents : soit la présence d'une imperméabilité aux carbapénèmes, soit l'acquisition d'une carbapénémase (10). Le nombre d'entérobactéries ayant une sensibilité diminuée aux carbapénèmes reçus au centre national de référence (CNR) a rapidement augmenté avec une proportion croissante d'entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) : 23,1% en 2012 contre 36,2% en 2014 (Figure 3) (11).

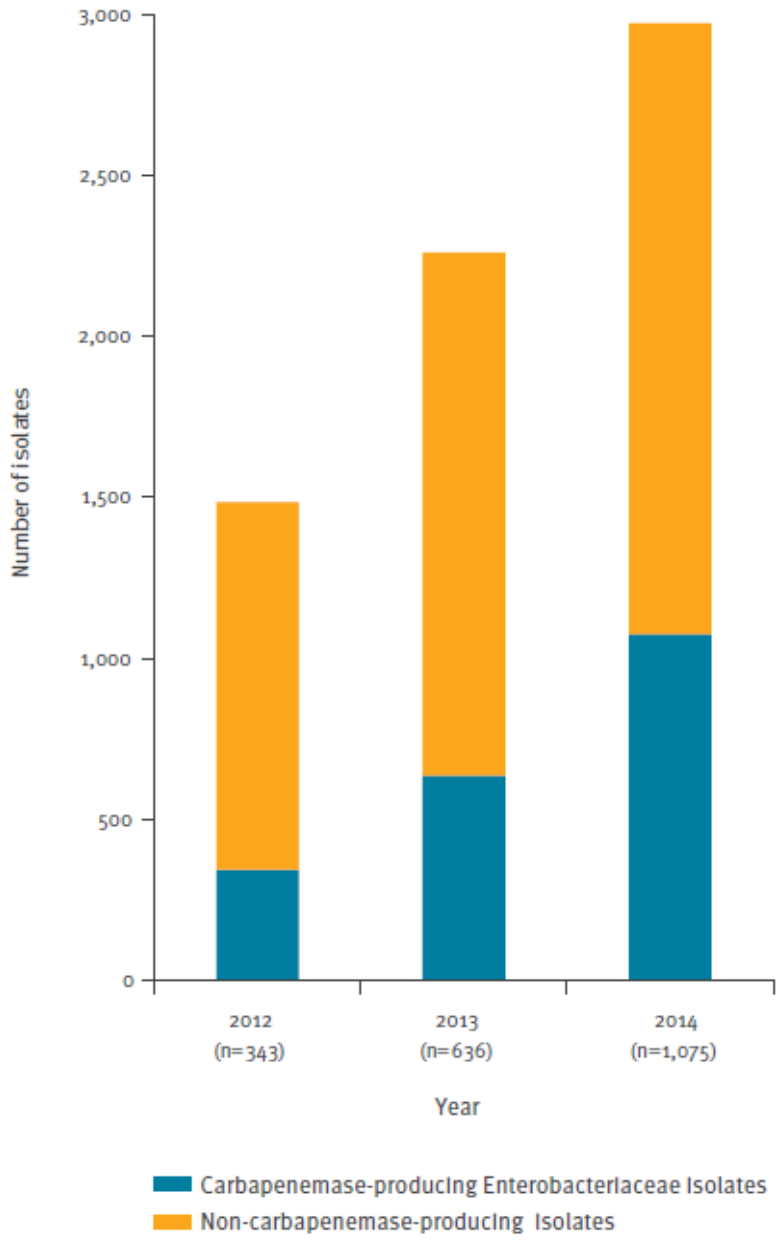


Figure 3 : Répartition en France de 2012 à 2014 des souches d'entérobactéries ayant une sensibilité diminuée aux carbapénèmes reçues au CNR.

Les EPC sont des bactéries dites hautement résistantes et émergentes (BHRe). Elles sont identifiées de plus en plus fréquemment dans le monde et sont généralement associées à d'autres mécanismes de résistance touchant d'autres familles d'antibiotiques. En 2016, les entérobactéries les plus touchées sont *K. pneumoniae* (54%) suivi de *E. coli* (38%) et les mécanismes les plus fréquemment retrouvés sont OXA-48 et NDM (Figure 4) (12).

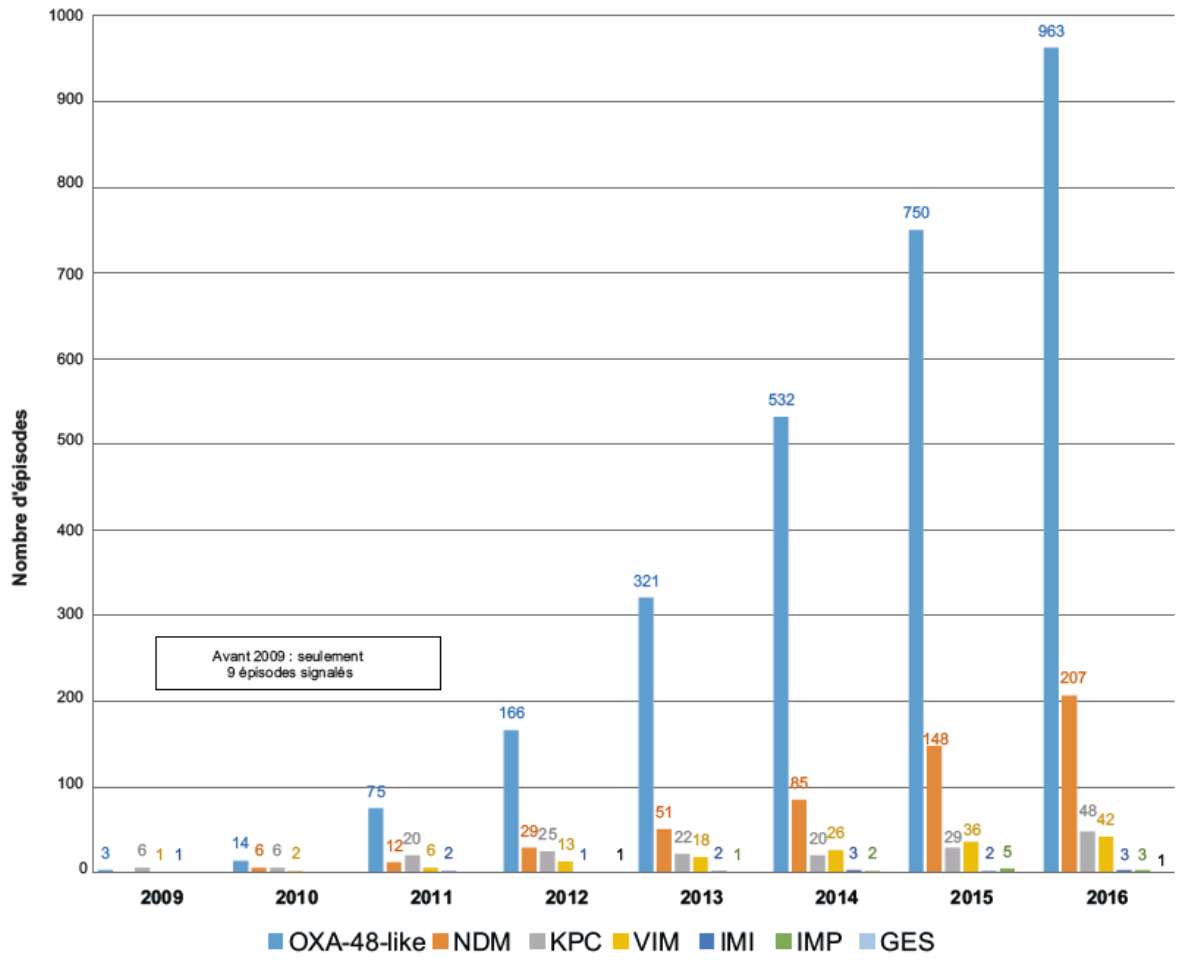


Figure 4 : Répartition des épisodes impliquant des EPC en France signalés entre 2009 et 2016, selon les mécanismes de résistance impliqués et l'année de signalement (N=3 595). RICAI 2017 – Santé Publique France

En Europe, la résistance aux carbapénèmes reste très limitée. Les données du réseau EARS-Net montrent que la proportion de souches résistantes aux carbapénèmes, en France en 2016, était de 0,4% dans l'espèce *K. pneumoniae*. En comparaison, cette dernière proportion était bien plus élevée dans les pays tel que la Grèce (66,9%), l'Italie (33,9%) et la Roumanie (31,4%) (Figure 5) (13). Mais le contrôle de la diffusion de ces carbapénèmases reste difficile (14).

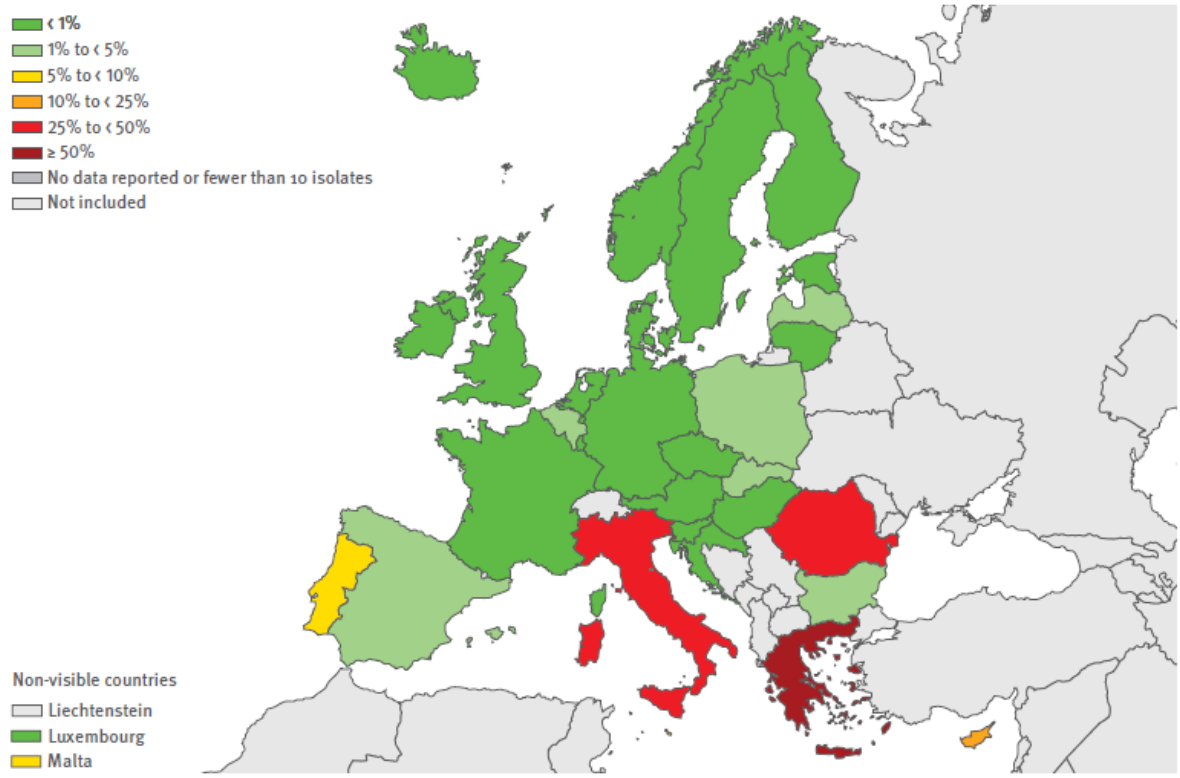


Figure 5 : Pourcentage de souches invasives de *Klebsiella pneumoniae* ayant une résistance aux carbapénèmes en 2016 par pays en Europe. EARS-Net 2016-2017

Les EPC conduisent à une inefficacité partielle ou totale des antibiotiques de la classe des carbapénèmes. L'émergence et la diffusion des EPC peuvent être à l'origine d'infections difficiles voire impossibles à traiter.

2. Généralités sur la colistine

Les polymyxines sont des antibiotiques naturellement produits par différentes espèces de *Paenibacillus*. Il existe cinq classes de polymyxines mais seulement deux sont utilisées en thérapeutique : la polymyxine B et la polymyxine E (15).

La colistine est un polypeptide de la famille des polymyxines du groupe E, produit par *Bacillus polymyxa subspecies colistinus.* Elle a été découverte en 1950 par Y. Koyama (16) puis a été disponible dans les années 1950 pour le traitement des infections à bacilles Gram négatif (17).

Il s'agit d'un mélange complexe d'au moins 30 composés, dont les deux majeurs sont la colistine A (polymyxine E1) et la colistine B (polymyxine E2). La colistine A et la colistine B diffèrent par une chaine d'acide gras en position terminale (Figure 6) (18).

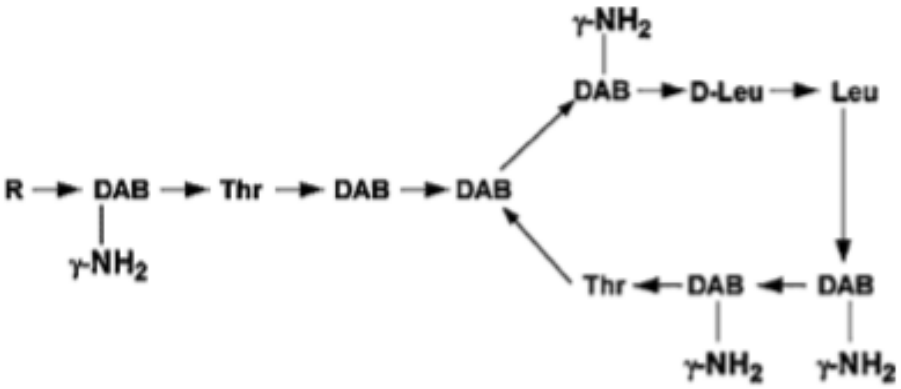


Figure 6 : Structure de la colistine A et B (polymyxine E1 et E2). Polymyxine E1 (colistine A) : R: acide 6-méthylctanoïque; polymyxine E2 (colistine B): R: acide 6-méthylheptanoïque; DAB: acide α,γ-diaminobutyrique; Thr: threonine; Leu: leucine

La colistine agit en se liant aux lipopolysaccharides (LPS), composant de la membrane externe, uniquement présente chez les bacilles à Gram négatif. Son mécanisme d'action, non totalement élucidé, peut être expliqué par trois modes distincts et concomitants : lyse des membranes bactériennes (mode principal), contact « vésicule-vésicule », et formation de radicaux libres. Ces trois mécanismes aboutissent à la mort de la bactérie (15). Une activité anti-toxinique a aussi été découverte (19).

Son mécanisme d'action principalement décrit est le suivant : les polymyxines possèdent des charges positives et se lient alors aux LPS chargés négativement. Cette interaction provoque un déplacement des cations divalents (essentiellement Mg^{2+} et Ca^{2+}) responsable de la désorganisation de la structure membranaire permettant à la colistine de s'insérer dans la membrane externe. La colistine va ensuite entraîner une altération de la perméabilité membranaire et la formation de pores entrainant ainsi une fuite du contenu intracellulaire, à l'origine de la mort de la bactérie (Figure 7) (17,20,21).

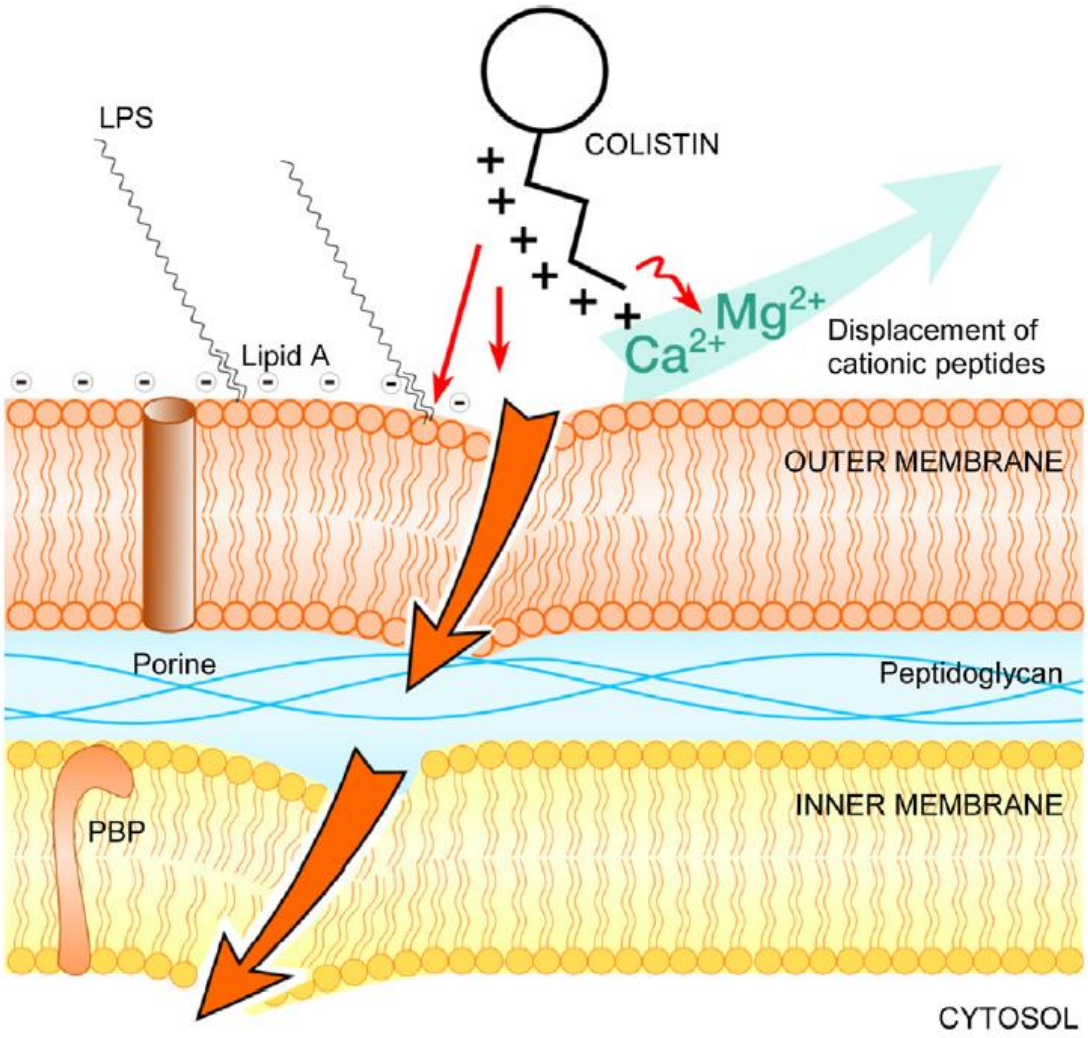


Figure 7 : Mécanisme d'action de la colistine sur la membrane des bactéries à Gram négatif

La colistine est caractérisée par une activité bactéricide dirigée contre une majorité de bactéries à Gram négatif, telles que les entérobactéries, à l'exception des genres *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Serratia* spp. et *Providencia* spp. (17). De récentes études ont démontré la résistance naturelle à la colistine du genre *Hafnia* spp. (22) et la résistance possible de certains « clusters » du complexe *Enterobacter cloacae* (23). Des niveaux plus élevés de résistance à la colistine ont été observés sur certains sérotypes de *Salmonella* dont *S.* Enteritidis*.* Ainsi, l'auteur suggère que les CMI de la colistine doivent être évaluées selon le sérovar (nom donné à la variété sérologique correspondant à une espèce) (24).

La colistine a été utilisée jusque dans les années 1980 et a ensuite été écartée des protocoles thérapeutiques du fait de l'apparition de nouvelles molécules telles que les céphalosporines de troisième génération mais surtout en raison de sa toxicité rénale (25). Son utilisation est restée exceptionnelle chez les patients atteints de

mucoviscidose pour contrôler les complications infectieuses (26). Depuis l'émergence de bactéries multi-résistantes dont principalement *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *K. pneumoniae* et l'absence de nouveaux antibiotiques efficaces contre ces bactéries, un regain d'intérêt de l'utilisation de la colistine a été observé dès les années 1990 (27). Ainsi en 2012, elle est redevenue un antibiotique prescrit pour le traitement d'infections humaines sévères liées à des bactéries résistantes à toutes les autres options thérapeutiques (28). La colistine est majoritairement utilisée par voie intraveineuse (IV) mais une récente étude a souligné l'intérêt et l'efficacité de l'inhalation de la colistine pour traiter des infections respiratoires en plus d'une toxicité probablement moindre que par voie IV (29).

Entre 2010 et 2014, les données du réseau européen de surveillance de la consommation d'antibiotiques (ESAC-Net) ont montré que la consommation hospitalière totale de colistine en Europe a augmenté d'environ 50% (Figure 8) (30).

Source: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC): "*Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union, ESAC-Net surveillance data, November 2015*" (ECDC, 2015)

Country	2010	2011	2012	2013	2014	Trends in consumption of polymyxins, 2010–2014	Average annual change 2010–2014	Statistical significance
Finland (b)	0	0	0	0	0			n.a.
Lithuania (a)			0	0	0			n.a.
Norway	0.0002	0.0004	0.0006	0.0006	0.0006		<0.001	significant
Poland (a)					0.001			n.a.
Latvia	0	0	0.003	0.002	0.001		<0.001	n.s.
Sweden	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001		<0.001	n.s.
Netherland	0.006	0.003	0.002	0.003	0.002		-0,001	n.s.
Bulgaria	0	0	0	0	0.002		<0.001	n.s.
Estonia	<0.001	<0.001	0.002	0	0.002		<0.001	n.s.
Denmark	0.002	0.002	0.002	0.001	0.003		<0.001	n.s.
Luxembourg	0.005	0.005	0.005	0.006	0.003		<0.001	n.s.
Slovenia	0.001	0.002	0.003	0.003	0.005		0.001	n.s.
United Kingdom (a)(d)				0.005	0.006			n.a.
Hungary	0.002	0.004	0.005	0.006	0.007		0.001	significant
France	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008		<0.001	n.s.
Malta	0.026	0.004	0.002	0.006	0.011		0.003	n.s.
EU/EEA	**0.008**	**0.011**	**0.014**	**0.012**	**0.012**		**<0.001**	**n.s.**
Ireland	0.014	0.014	0.015	0.015	0.013		<0.001	n.s.
Portugal (c)	0.013	0.018	0.019	0.020	0.019		0.001	n.s.
Croatia	0.055	0.010	0.029	0.003	0.019		0.008	n.s.
Slovakia (a)			0.020	0.023	0.025			n.a.
Italy	0.012	0.011	0.019	0.023	0.025		0.004	significant
Greece (a)		0.078	0.085	0.084	0.095			n.a.
Belgium	0.008	0.009	0.006	0.008				n.a.

The number for EU/EEA refers to the corresponding population-weighted mean consumption, calculated by summing the products of each country's consumption in DDD per 1 000 inhabitants an per day x country population as in Eurostat, and then dividing this sum by the total EU/EEA population.

a) These countries did not report data for all years during the period 2010-2014.
b) Finland: data include consumption in remote primary healthcare centres and nursing homes.
c) Portugal: data relate to public hospitals only.
d) United Kingdom: data do not include consumption from UK-Wales (2013) or UK-Northern Ireland (2014).
n.a.: not applicable; linear regression was not applied due to missing data.
n.s.: not significant.

Figure 8 : Tendances de la consommation de polymyxines en Europe, 2010-2014 (exprimée en DDD : defined daily dose (doses définies journalières) pour 1 000 habitants et par jour)

Toutefois, les tendances de consommation des polymyxines en Europe sont variées selon les pays et sont surtout liées à la prévalence élevée d'EPC (Figure 9).

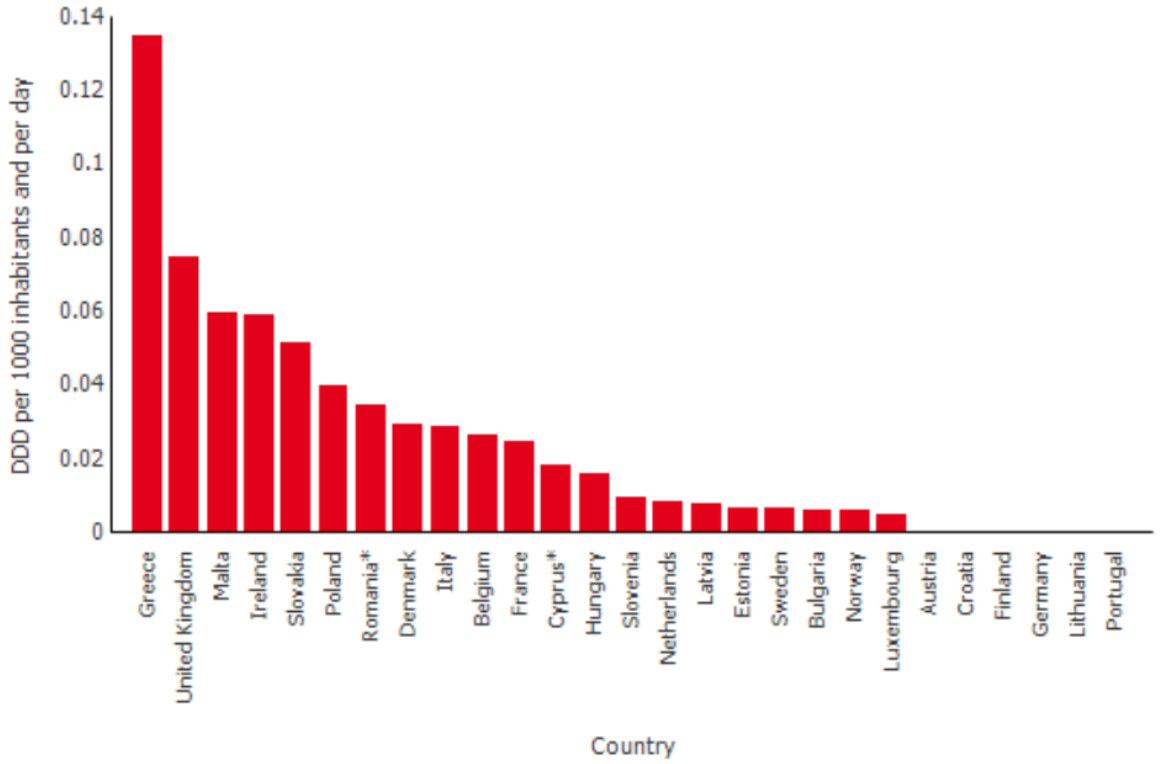


Figure 9 : Consommation de polymyxines par pays de l'Europe en 2016. DDD : defined daily dose (doses définies journalières). ECDC 2016

3. Résistance à la colistine

L'émergence de la résistance à la colistine apparaît depuis ces dernières années et semble être fortement liée à une utilisation excessive de la colistine et à des doses non optimales favorisant la pression de de sélection (31,32). Les résistances observées ces cinq dernières années concernent principalement *K. pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (15).

On observe, dans les pays où la prévalence des EPC est importante et qui ont ainsi une consommation de polymyxines élevée, l'émergence de bactéries résistantes à la colistine (33–35). En Grèce ou en Italie, par exemple, la résistance à la colistine atteint des proportions inquiétantes notamment chez *K. pneumoniae* producteurs de carbapénémases (Figure 10) (36). En effet, chez cette espèce, dans un hôpital en Grèce entre 2007 et 2010, 18,6 % de souches productrices de carbapénémases de type KPC sont résistantes à la colistine (37). Cette résistance est en constante augmentation. Lors d'une enquête nationale réalisée en 2011 en Italie, 22,4 % des

souches productrices de carbapénémases sont résistantes à la colistine et 43% en 2013-2014 (38,39).

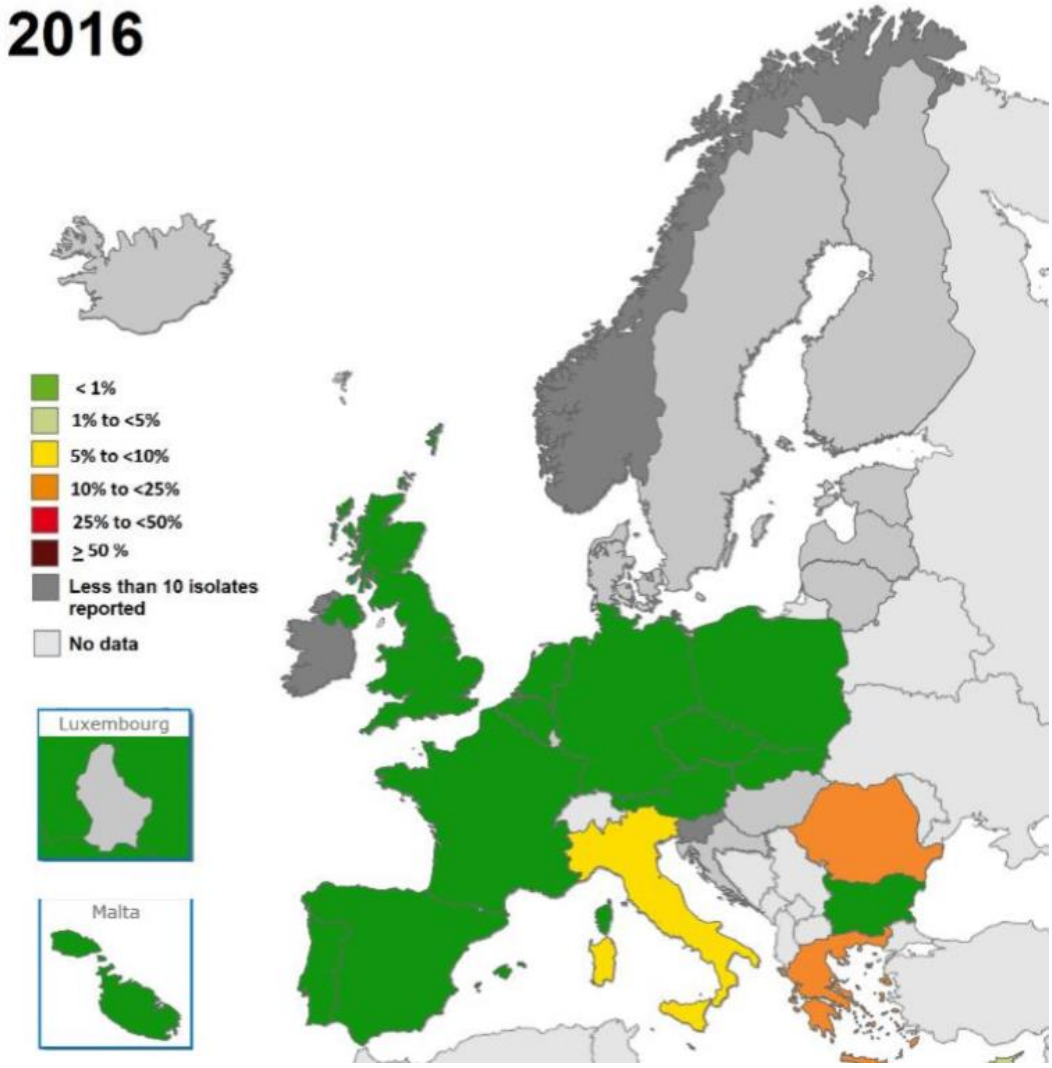


Figure 10 : Pourcentage de *Klebsiella pneumoniae* isolées à partir du sang ayant une résistance associée aux carbapénèmes et à la colistine en Europe en 2016. ECDC Novembre 2017

Les infections à EPC sont très souvent associées à un taux de mortalité élevée de l'ordre de 50% (40). La résistance à la colistine limite encore plus les options thérapeutiques chez les EPC et est donc associée à un risque accru de décès (41).

Une enquête nationale sur la résistance à la colistine, chez les EPC en France en 2014, a rapporté un taux élevé de résistance chez *K. pneumoniae* et *E. cloacae* (6,2% et 7,7%, respectivement) (42). Ceci est d'autant plus inquiétant que les genres *Klebsiella* spp. et *Enterobacter* spp. sont fréquemment isolés dans les infections nosocomiales (cinquième et neuvième bactéries les plus fréquentes respectivement en 2012) (43).

A) Résistances chromosomiques

Cette résistance est pour l'essentiel liée à des altérations chromosomiques dans divers gènes. Ces altérations ont pour principal objectif de conduire à des modifications de charges du LPS ou à une perte du LPS, ce qui va empêcher la fixation de la colistine.
Chez les entérobactéries, les modifications du LPS sont régulées par deux systèmes appelés PhoP/PhoQ (lui-même régulé par la protéine transmembranaire MgrB) et PmrA/PmrB. Les principaux mécanismes de résistance à la colistine chez ces bactéries sont l'apparition de mutations, délétions ou insertions sur les gènes impliqués dans l'un ou l'autre de ces systèmes (15,44). Une altération sur l'un de ces gènes conduit à des modifications covalente du lipide A du LPS avec des groupes chargés positivement tel que le 4-amino-4-désoxy-L-arabinose ou le phosphoéthanolamine (45). Une étude récente a permis de montrer l'implication du gène *PhoP* dans la résistance à la colistine et à déchiffrer les mécanismes conduisant à l'hétérorésistance de la colistine chez *K. pneumoniae* (46).

D'autres stratégies de résistance également utilisées par les bactéries sont la synthèse d'une capsule ou l'expression de pompes à efflux (47,48).

Une étude a permis de souligner la rapidité de sélection de souches résistantes sous pression antibiotique (49). Toutefois, une autre étude a démontré la présence d'un coût biologique associé aux mutations chromosomiques à l'encontre de la colistine, principalement chez *A. baumannii* (50). Cela signifie que la présence d'une mutation chromosomique peut être associée à une baisse de virulence, mais ceci dépend des souches et du mécanisme de résistance impliqué (chez *A. baumannii* (51) et chez *K. pneumoniae* (52)). Ainsi, avec la diminution du fitness évoquée chez certaines souches, la probabilité de retrouver un mécanisme de résistance plasmidique était très largement rejetée par la communauté scientifique.

B) 2015 : découverte d'une résistance plasmidique (*mcr-1*)

En 2015, le premier mécanisme de résistance plasmidique à la colistine a été décrit en Chine chez l'animal sur une souche d'*E. coli* (le porc). A ensuite été décrit la

présence de ce gène aussi chez l'homme et dans l'alimentation (53). Puis, le même gène a été signalé au Danemark parmi des isolats de BLSE et d'*E. coli* productrices d'*AmpC* (hyperproduction de céphalosporinase) provenant de viande de poulet et chez un homme, mais à une prévalence très faible (54). Cette découverte implique un risque de diffusion par transfert horizontal et le taux de transfert des plasmides portant *mcr-1* a une valeur élevée, de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-3} (53).

Le gène correspondant, *mcr-1*, code pour une phosphoéthanolamine transférase plasmidique, qui catalyse l'addition de phosphoéthanolamine sur le lipide A conférant un bas niveau de résistance à la colistine (concentration minimale inhibitrice (CMI) comprises entre 4 mg/L et 8 mg/L) (53). L'origine du gène pourrait être *Paenibacillus* spp. (55).

Dans les six mois suivant sa découverte, le gène *mcr-1* a été signalé sur la plupart des continents et présent de façon ubiquitaire puisqu'il a été trouvé dans des isolats provenant d'animaux, d'aliments, de l'environnement et d'humains : particulièrement en Chine (premier pays utilisateur de colistine en santé animale) (Figure 11) (56). En France, chez les animaux de productions, le taux de portage d'*E. coli* porteurs du gène *mcr-1* est variable : 0,5% chez les porcs en 2013, 2% et 6% chez les poulets et dindes respectivement en 2014 (57). Selon le bilan épidémiologique de Santé Publique France du 10 mai 2017, 16 souches porteuses du gène *mcr-1* ont été identifiées chez l'homme entre janvier 2016 et mai 2017 en France et quatre identifiées à l'occasion d'études rétrospectives sur des souches de 2012/13/14. Un cas de transmission croisée a été rapporté concernant une *K. pneumoniae* BLSE.

E. coli représente plus de 80% des souches positives pour *mcr-1*. Des isolats ont aussi été décrits pour les genres *Salmonella*, *Klebsiella, Enterobacter* et *Shigella* (58).

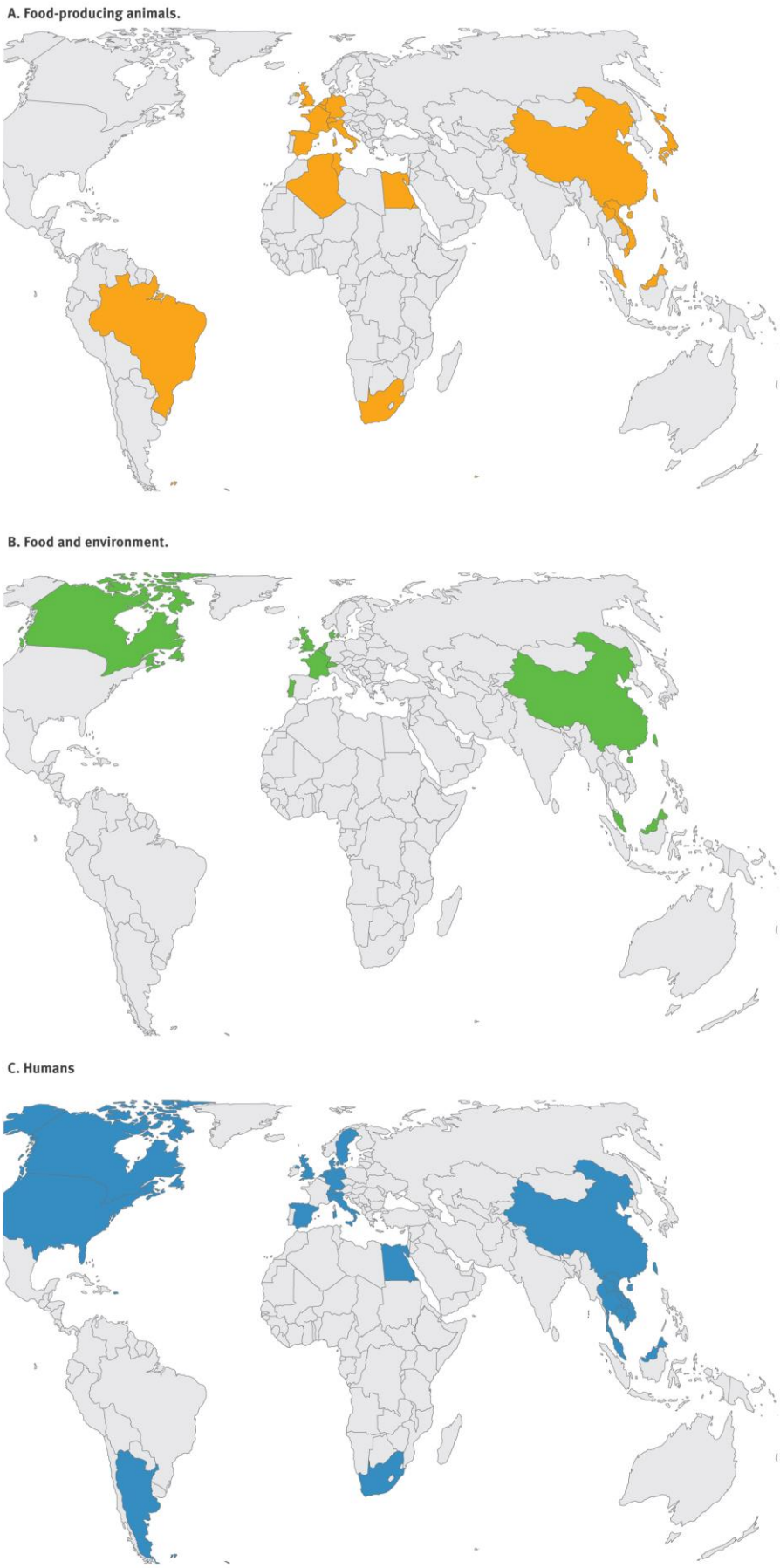


Figure 11 : Répartition géographique du gène *mcr-1* (au 2 juin 2016). Les pays représentés en couleur ont signalé au moins un isolat avec le gène *mcr-1*

On observe une diversité de plasmides véhiculant le gène *mcr*-1, et certains ont été retrouvés chez des souches de bactéries différentes permettant d'imaginer qu'il s'agit d'une diffusion ancienne. En effet, des enquêtes rétrospectives ont permis d'établir la présence du gène *mcr-1* sur des souches de poulets en Chine dès les années 1980 (59) et en France depuis au moins 2005 à partir d'une souche isolée d'un veau (60). Ces différents plasmides sont principalement identifiés dans le monde animal mais possèdent toutes les caractéristiques pour une diffusion efficace chez l'Homme (15). Liu *et al*. suggèrent que les plasmides *mcr-1* restent stables même en l'absence d'une pression de sélection par les polymyxines. Cela faciliterait ainsi la propagation du plasmide dans les populations d'entérobactéries au sein de la population humaine (53).

Le réservoir d'origine supposé du gène *mcr-1* est le monde animal (61) pour diverses raisons :

- L'usage important de polymyxines dans le traitement et la prévention des maladies du bétail pourrait être responsable d'une pression de sélection efficace pour l'évolution de la résistance (53,62). En effet, la colistine est utilisée dans l'agriculture depuis les années 1950. En 2010, c'était le cinquième antibiotique le plus vendu dans l'agriculture (63).
- La prévalence de *mcr-1* est plus faible chez l'homme comparativement à l'animal. On note une prévalence de 21% chez des souches d'*E. coli* BLSE isolées chez des veaux en France entre 2014 et 2015 (60). La prévalence des souches animales productrices de *mcr-1* a largement augmenté ces dernières années (progression des taux de prévalence d'environ 3% par an entre 2008 et 2014) (59,64). Tandis que les résultats de l'étude SENTRY sur 183 hôpitaux à travers le monde en 2014-2015 montrait une prévalence globale chez l'homme inférieure à 0,1% parmi l'ensemble des souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* (65).
- L'association génétique de *mcr-1* avec des résistances au florfénicol (antibiotique uniquement utilisé chez les animaux) (66).

Le gène *mcr-1* a aussi été isolé sur des souches d'entérobactéries comprenant déjà des résistances notamment sur des entérobactéries produisant une BLSE (principalement de type CTX-M) (15,60,67). La première détection en France d'une souche d'entérobactérie porteuse du gène *mcr-1*, également productrice d'une BLSE (signalée par l'Institut Pasteur de Nouméa en Nouvelle-Calédonie) a été déclarée le 25 juillet 2016 (68). Plus rarement, le gène *mcr-1* a été isolé sur des souches productrices de carbapénémases (66,69–71). Dans 90% des cas, ces souches porteuses du gène *mcr-1* et également productrices d'une carbapénémase, étaient retrouvées sur des prélèvements d'origine humaine (15).

A titre indicatif, des variants de *mcr-1* ont été identifiés : *mcr-1.2*, *mcr-2, mcr-3, mcr-4* et *mcr-5* (72–76).

L'émergence et la dissémination de la résistance plasmidique sont extrêmement inquiétantes, compromettant le dernier rempart sur la route vers la toto-résistance aux antibiotiques, ce d'autant que les perspectives de nouvelles molécules thérapeutiques dans le traitement des infections à EPC sont assez limitées.

Le Haut Conseil de Santé Publique (HCSP), dans un avis en mai 2017, rappelle alors les circonstances au cours desquelles la résistance à la colistine doit être identifiée. Il est ainsi recommandé de tester la résistance à la colistine et de rechercher, en cas de résistance, la présence du gène *mcr-1* chez toute souche d'EPC isolée soit lors d'un dépistage ou soit dans un prélèvement à visée diagnostique (77). Des précautions complémentaires d'hygiène devront être prises et dépendront du profil de résistance de la souche : s'il s'agit d'une EPC porteuse du gène *mcr-1*, il faudra mettre en œuvre les précautions spécifiques BHRe, en plus des précautions standard (78), et s'il ne s'agit pas d'une EPC, les recommandations de la SF2H 2009 « Transmission croisée : précautions complémentaires contact » s'appliqueront (79).

4. Détermination de la sensibilité à la colistine

A) Rappels sur les méthodes d'antibiogrammes

L'antibiogramme consiste à classer les bactéries dans l'une des trois catégories cliniques : sensible, intermédiaire ou résistante, vis-à-vis d'une série d'antibiotiques. Pour cela, la procédure consiste à déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), de la comparer aux valeurs critiques qui délimitent les catégories cliniques et de réaliser une lecture interprétative (validation biologique et thérapeutique). Les valeurs critiques sont établies sur la base de données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (PK/PD) par des comités d'experts (en France, le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie : CA-SFM).
Pour réaliser l'antibiogramme, les laboratoires disposent d'une variété de méthodes dont principalement la diffusion en milieu gélosé, l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient de concentrations d'antibiotiques ou différentes versions de la dilution en milieu liquide (80).

1. Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé :

L'antibiogramme par diffusion en gélose consiste à déposer des disques imprégnés d'antibiotiques sur une gélose ensemencée en nappe avec la bactérie à tester. Après incubation, la culture délimite autour des disques des zones d'inhibition circulaires dont le diamètre est inversement proportionnel à la CMI. Des droites de régression permettent d'établir pour chaque antibiotique les diamètres critiques correspondant aux concentrations critiques et d'interpréter les diamètres obtenus pour la bactérie à tester en catégories cliniques (sensible, intermédiaire ou résistante).

2. CMI déterminées par bandelettes imprégnées d'un gradient de concentrations d'antibiotiques : E-test® ou autres dispositifs

Ces dispositifs permettent de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester. Les bandelettes (supports inertes, hydrophobes, de 5 mm de largeur et de 50 mm de longueur) sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec un inoculum de la souche à étudier. Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI.

3. Antibiogramme par dilution en milieu liquide :

Il existe plusieurs systèmes pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques par dilution en bouillon (en milieu liquide).

L'un utilise une gamme de concentrations. Pour cela, des plaques de microdilution incluant plusieurs antibiotiques à différentes concentrations sont utilisées. Après distribution de l'inoculum dans chaque puits et incubation, les CMI sont définies comme la plus faible concentration d'antimicrobien qui inhibe la croissance visible.

L'autre est basé sur des concentrations d'épreuves. Ce système est représenté par l'automate VITEK2® (bioMérieux). Les microplaques sont remplacées par de petites cartes en plastiques contenant des antibiotiques sous forme déshydratée. Avec ce système, la CMI n'est pas lue mais calculée grâce à un algorithme, par comparaison de la croissance en l'absence d'antibiotique (témoin) et en présence d'une concentration test de chaque antibiotique.

B) Problèmes rencontrés pour la détermination de la sensibilité à la colistine au laboratoire

Les tests de sensibilité à la colistine sont techniquement difficiles en raison de plusieurs problèmes. Tout d'abord, la colistine diffuse très mal en gélose. Ensuite, les polymyxines se lient à une gamme de plastiques et de verre, y compris les plastiques les plus courants (polystyrène et polypropylène) utilisés dans les plateaux de microdilution des tests de sensibilité en laboratoire, ce qui augmente les problèmes de fiabilité et de reproductibilité (28,81). Des tentatives pour éviter cette liaison ont été faites en utilisant un surfactant tel que le polysorbate (P-80) (82). Mais l'ajout de ce surfactant peut influencer les résultats de la CMI (83).

Actuellement, les techniques de détermination de la CMI (diffusion en milieu gélosé ou en gradient de concentrations) ne sont plus recommandées en raison de la mauvaise diffusion de la colistine dans la gélose (84). La corrélation des CMI avec les diamètres des zones de diffusion des disques avait déjà été considérée comme problématique il y a plus de 30 ans (85). De plus, de nombreuses études ont montré une variabilité significative entre les résultats de la CMI lors de l'utilisation de différentes méthodes et la présence d'erreurs très importantes pour certaines (86,87).

Ces problèmes ont été largement étudiés par le Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens (EUCAST) et le Clinical Laboratories Standards Institute (CLSI). Les deux recommandent, comme seule méthode de test de sensibilité fiable et reproductible, la détermination de la CMI par méthode de microdilution en bouillon selon le standard ISO 20776-1. Ils précisent d'utiliser un milieu liquide Mueller-Hinton ajusté en cations, de réaliser le test avec la colistine sulfate (et non la colistine méthanesulfonate : CMS) et d'utiliser des plaques de titrage en polystyrène dépourvues de prétraitement. Aucun autre additif tel que les polysorbates ne doit être utilisé (88).

Le HCSP, en 2016, a donc pris des décisions pour détecter ces souches résistantes à la colistine associées au gène *mcr-1*. Il est ainsi recommandé de déterminer la CMI de la colistine par la méthode de référence de microdilution en milieu liquide selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST (89). La résistance s'exprime le plus souvent à bas niveau avec des valeurs de CMI rapportées comprises entre 2 et 16 mg/L et une CMI médiane à 4 mg/L. Pour pouvoir ensuite attribuer une résistance détectée par la mesure des CMI à l'expression d'un gène *mcr*, il faut détecter la présence de ce gène à l'aide de techniques moléculaires, qui sont les seules permettant un diagnostic spécifique de certitude (68).

C) Evaluation des différentes méthodes commercialisées

L'EUCAST a publié un avertissement (mis à jour en février 2018) sur les différents tests de sensibilité à la colistine disponibles dans le commerce et sur les différents problèmes détectés. Cet avertissement confirme que la méthode de diffusion sur disque ne peut être utilisée car il n'y a pas de distinction entre les isolats sensibles et résistants en raison d'un problème de diffusion.

L'EUCAST a voulu ainsi évaluer différents tests de sensibilité à la colistine commercialisés utilisant la méthode de microdilution en bouillon (Sensititre®, MICRONAUT-S®, MICRONAUT MIC-Strip®, SensiTest® et UMIC®). Deux tests utilisant des gradients de diffusion (E-test® et CMI Test Strip®) ont aussi été comparés. La méthode de microdilution en bouillon selon la norme ISO 20776-1 a été choisie comme méthode de référence (90).

Soixante-quinze souches de bactéries à Gram négatif ayant des profils de sensibilités vis-à-vis de la colistine variables, ont été testées. Cette étude conclut que les tests en gradients de diffusion sous-estiment les valeurs de la CMI et doivent ainsi être évités même lorsque les résultats du contrôle de qualité se trouvent dans les valeurs limites. Les tests commerciaux ont bien fonctionné et avec des résultats reproductibles. On observe une meilleure corrélation pour Sensititre® et les deux tests MICRONAUT®. L'EUCAST souligne la nécessité d'un contrôle rigoureux de la qualité de toute méthode et recommande aussi d'inclure le contrôle de qualité *E. coli* NCTC 13846 résistant à la colistine (*mcr-1* positif).

Les méthodes semi-automatisées n'ont pas pu être évaluées mais des études ont révélé la survenue fréquente d'erreurs très importantes. Par exemple, une étude a comparé deux systèmes semi-automatisés (Phoenix100® et VITEK2®) sur des souches *d'A. baumannii* et conclut que la résistance à la colistine est grandement sous-estimée, ce qui pourrait entraîner une administration inappropriée de colistine. Ainsi, les résultats sensibles à la colistine doivent être vérifiés par une méthode de microdilution en milieu liquide (91). Ainsi, l'EUCAST conseille aux utilisateurs de ces systèmes d'appliquer des contrôles de qualité rigoureux et de vérifier auprès du fabricant s'ils sont convaincus de la justesse des résultats.

D) Alerte bioMérieux

Au Centre Hospitalier de Roubaix et au Centre Hospitalier Universitaire de Lille, des techniques de dilution en milieu liquide semi-automatisées (système VITEK2® - bioMérieux) sont utilisées.

L'évaluation de la sensibilité à la colistine des cartes VITEK 2 AST-GN a été corrélé à la technique de référence de dilution en gélose. Pour donner suite aux recommandations de l'EUCAST et CLSI, bioMérieux a mené une enquête interne afin d'identifier tout changement de performance pour la colistine depuis le développement du test VITEK 2 Colistine. Ainsi, 290 isolats avec des degrés différents de sensibilité à la colistine ont été testés sur le système VITEK2®, avec la technique de référence de microdilution en bouillon et la dilution en gélose. Deux souches de contrôle de qualité (*E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853) ont également été testées. Les investigations ont démontré un taux élevé d'erreurs

très majeures (souches catégorisées sensibles au lieu de résistantes) avec la Colistine VITEK 2 AST-GN par rapport à la dilution en gélose et en comparaison à la microdilution en bouillon. Ainsi, un traitement inapproprié pourrait être prescrit entraînant un échec thérapeutique. C'est pourquoi, un avis de sécurité a été envoyé à tous les utilisateurs des cartes VITEK 2 Gram-Négatif en mai 2017 et demandent en conséquence de réaliser une méthode alternative avant de communiquer tout résultat sensible de la colistine.

5. Objectifs de la thèse

L'émergence de la résistance plasmidique à la colistine est un enjeu majeur de santé publique. En l'absence de nouveaux traitements efficaces, il est essentiel de prendre des mesures pour contrôler la propagation de la résistance à la colistine. Pour cela, les laboratoires de microbiologie doivent détenir les meilleurs moyens diagnostiques afin de détecter ces résistances. Il est donc nécessaire d'avoir des techniques de détermination de la sensibilité à la colistine fiables et reproductibles.

Ainsi, l'objectif principal de notre étude est, à la suite des recommandations de l'EUCAST et de l'alerte bioMérieux, d'évaluer les performances d'une technique de dilution en microplaques sur une collection de souches résistantes et sensibles à la colistine. Nous avons choisi de travailler avec la méthode Sensititre® (Thermo Fischer) qui avait obtenu de bons résultats lors de l'étude EUCAST.
Les objectifs secondaires sont de corréler les résultats de cette méthode à celles utilisées en routine au laboratoire (VITEK2®, E-test®), de déterminer la prévalence des souches productrices de *mcr-1* au sein des souches confirmées résistantes et enfin de décrire cette population.

MATERIELS ET METHODES

1. Données

L'étude a été réalisée à partir d'un recueil rétrospectif issu de bases de données du laboratoire de microbiologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Lille, et de manière rétrospective et prospective au Centre Hospitalier (CH) de Roubaix. Cette étude s'étale sur une période allant de janvier 2016 à octobre 2017. Ont donc été sélectionnées des souches d'entérobactéries résistantes à la colistine pour le CHU de Lille et le CH de Roubaix mais aussi des souches d'entérobactéries sensibles à la colistine mais présentant, à l'exception d'une souche, un haut phénotype de résistance (BLSE, carbapénèmase, hyperproduction de la céphalosporinase ou pénicillinase de haut niveau) au CH de Roubaix.

Les données récoltées sur ces souches comportent les caractéristiques des patients (sexe, âge, date de naissance), la date d'entrée et de sortie du séjour du patient, la durée du séjour, le service, la nature du prélèvement et la date du prélèvement. Les phénotypes de résistances et la CMI à la colistine, obtenue à l'aide de l'automate VITEK2® (bioMérieux) ou E-test®, dans les deux centres ont également été recueillis.

2. Recueil des souches

L'identification des souches provenant du CHU de Lille a été vérifiée avant la réalisation des techniques Sensititre®. Pour cela, chaque souche a été isolée sur des milieux non sélectifs permettant l'isolement des entérobactéries (milieu au pourpre de bromocrésol, aussi dit BCP). Après 24h d'incubation à 37°C, les isolats ont pu être identifiés par spectrométrie de masse (Microflex®, Bruker). Enfin, la résistance des souches à la colistine a été vérifiée par diffusion en milieu gélosé. Pour cela, une suspension bactérienne à partir de souches pures était réalisée en prélevant plusieurs colonies misent ensuite en suspension en milieu liquide salé. Puis, cette suspension était ajustée à 0,5 McFarland grâce à un néphélomètre et ensuite ensemencée selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de Société Française de Microbiologie 2017 (CA-SFM 2017) (89) sur une gélose de Mueller-Hinton. Après avoir placé un disque de colistine sur les géloses, celles-ci ont

été incubées pendant 24h à 37°C. Malgré le retrait des recommandations pour évaluer la résistance à la colistine avec un diamètre d'inhibition, les souches avec un diamètre d'inhibition strictement inférieur à 15 mm étaient considérées comme résistantes selon le CA-SFM 2013 (92).

Concernant les souches provenant du CH de Roubaix, il n'y a pas eu de vérification préalable de leur identification. Cependant, si au cours de la technique des souches non pures étaient observées, une vérification de l'identification était réalisée par spectrométrie de masse (Microflex®, Bruker) ou par VITEK2® (bioMérieux).

De plus, pour les deux centres, si des discordances de CMI étaient observées (Sensititre® *vs*. VITEK2® ou E-test®), une identification associée à un antibiogramme étaient réalisés par VITEK2® pour s'assurer que la souche étudiée correspondait bien à celle attendue.

3. Détermination des CMI de la colistine par méthode Sensititre®

A) Description de la méthode

Une plaque Sensititre® est composée de 96 puits et permet d'étudier huit souches (A à H) (Figure 12). Sur chaque plaque, sept souches étaient ensemencées et un contrôle de qualité était réalisé permettant de surveiller la sensibilité et de vérifier l'activité des antimicrobiens. Le contrôle était une souche ATCC (American Type Culture Collection) d'*Escherichia Coli* (ATCC 25922). La procédure du test pouvait être considérée comme satisfaisante si les résultats de sensibilités obtenus avec la souche ATCC étaient situés dans les limites acceptables proposées par le CA-SFM.

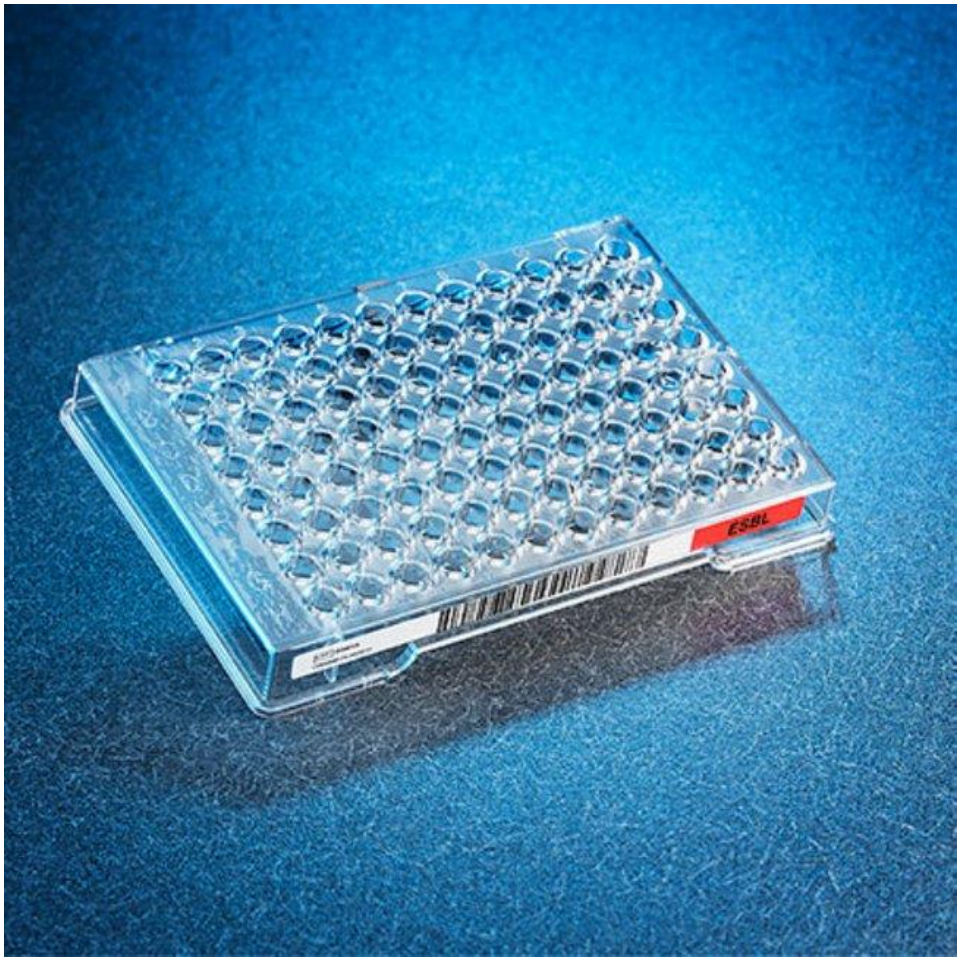


Figure 12 : Photo d'une plaque de microtitration Sensitire® à 96 puits

Chaque plaque est dosée avec de la colistine à des dilutions appropriées. Toutes les plaques comprennent des cupules de contrôle positif par souches testées. Les tests ne sont pas validés s'il n'y a pas une croissance distincte dans les cupules de contrôle positif (Figure 13).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
B	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
C	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
D	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
E	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
F	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
G	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
H	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON

Figure 13 : Format de la plaque Sensititre®. Les CMI sont exprimées en mg/L.COL : colistine ; POS : Contrôle Positif

Les conditions de conservation et de péremption ont été respectées (conservation à température ambiante (15 à 25°C), à l'abri de la lumière directe et de la chaleur). Chaque plaque est emballée dans un sachet en aluminium contenant du gel de silice dessicant. En suivant les recommandations du fournisseur, les plaques n'ont pas été utilisées si la couleur du dessicant n'était pas orange.

B) Technique

Pour ensemencer une plaque Sensititre®, des colonies isolées à partir d'une gélose BCP fraiche (ensemencée la veille) étaient prélevées puis misent en suspension dans de l'eau stérile. 10µl de la suspension McFarland (ajustée à 0,5 McFarland à l'aide d'un néphélomètre) était transféré dans un tube de 11ml de bouillon Mueller-Hinton dont la concentration en cations a été ajustée avec un tampon TES. La totalité du bouillon est ensuite transférée dans une boite de Pétri stérile. A l'aide d'une pipette, une ligne de la plaque est ensemencée en transférant 50µl de la suspension en bouillon dans les puits dans les 30 minutes qui suivent la préparation.

Toutes les cupules sont ensuite couvertes à l'aide d'une feuille adhésive et sont incubées à 34-36°C pendant 18-24h.
En ce qui concerne la souche ATCC d'*Escherichia Coli*, les colonies étaient prélevées à partir d'une gélose au sang fraiche, ensemencée la veille aussi.

Pour chaque souche, un test de pureté est réalisé. Ce test correspond au dépôt et à l'ensemencement d'une goutte de suspension sur une gélose au sang. La gélose est incubée avec les plaques Sensititre® et la pureté est vérifiée après 18-24h d'incubation.

Un contrôle périodique du dénombrement des colonies doit être effectué. Ce test a été réalisé par méthode directe sur chaque plaque testée et sur une souche. Pour cela, 1µl de suspension était prélevé au niveau de la cupule de contrôle positif de croissance et ensuite ensemencé sur une gélose au sang. Ce prélèvement est renouvelé une deuxième fois mais est, cette fois-ci, dilué dans un tube de 50µl d'eau distillée stérile préalablement préparé. Puis de nouveau, 1µl de cette dilution est prélevé puis ensemencé sur une gélose au sang. L'ensemencement se fait dans tous les cas par épuisement pour pouvoir ainsi dénombrer les colonies. Les géloses au sang sont ensuite incubées à 34-36°C pendant 18-24h d'incubation.
L'inoculum final prévu est de $1x10^5$ UFC/ml. Le nombre de colonies sur la gélose non diluée doit être compris entre 50 et 500, et entre un et 10 sur la gélose diluée.

C) Lecture des plaques

Avant la lecture manuelle des plaques, la pureté de chaque souche était vérifiée. Les résultats n'étaient pas valides si une culture mixte était présente.

La croissance dans une cupule apparaît sous forme de turbidité ou d'un dépôt de cellules au fond de la cupule (Figure 14).

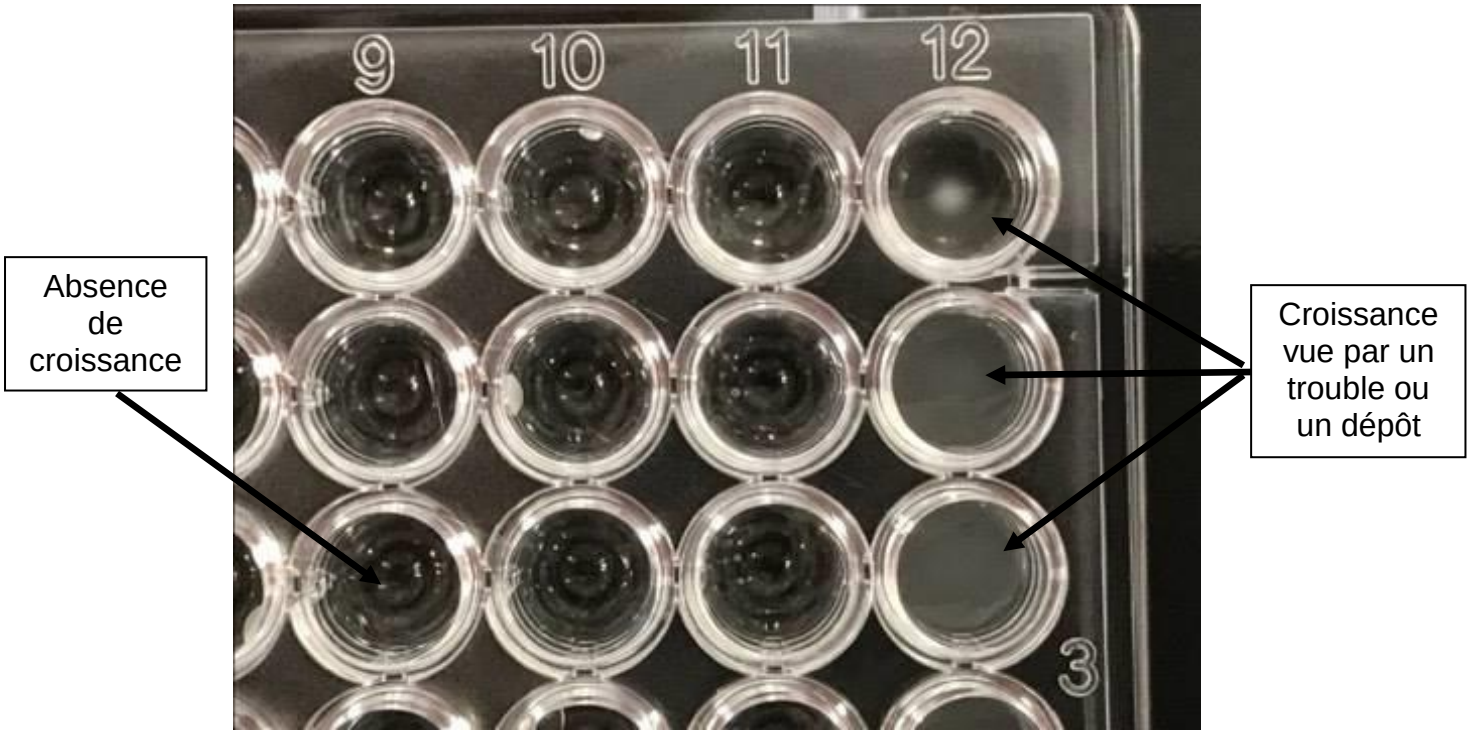


Figure 14 : Cupule Sensititre® avec trois puits présentant une croissance

La CMI est alors définie comme la plus faible concentration d'antimicrobien qui inhibe la croissance visible.
Les cupules des contrôles positifs étaient lues en premier. S'il n'y avait pas de croissance dans ces cupules, le test était alors répété.

Des contaminations ont occasionnellement été observées. Il s'agit d'une croissance dans une cupule bordée de cupules ne présentant pas de croissance. Une contamination d'une seule cupule été ignorée. Nous avons observé lors de notre étude qu'une seule contamination par plaque, ainsi n'obligeant pas à répéter le test.

Des « sauts » pouvaient aussi être observés. Il s'agit de cupule ne présentant pas de croissance. Cela peut avoir diverses explications incluant une contamination, une mutation, des plis lors de la fermeture ou une erreur d'alignement lors du dosage. Dans ces cas-là, le test était répété pour obtenir avec certitude une CMI exacte.

Enfin, si les CMI obtenues étaient proches de la valeur critique proposée par le CA-SFM/EUCAST (breakpoint égal à 2 mg/L soit CMI obtenues égal à 1 ou 4 mg/L) ou s'il y avait des discordances entre les deux techniques, le test était de nouveau réalisé pour confirmer la catégorie clinique de la souche.

4. Détection du gène *mcr-1*

Pour pouvoir ensuite attribuer la résistance détectée par la mesure de la CMI à l'expression du gène *mcr-1,* une PCR a été réalisée sur toute souche confirmée résistante pas la méthode Sensititre®.

Pour cela, les souches ont été ensemencées sur des géloses BCP puis incubées à 37°C pendant 24h. Les souches isolées ont ensuite été extraites sur Microlab Star Let (Hamilton) puis les PCR ont été faites sur SDS 7500 (Applied) en SyBrGreen. Il s'agit d'une PCR quantitative en temps réel : le processus de PCR est suivi au cours du temps à l'aide de la fluorescence correspondant à la quantité de produits amplifiés à cet instant. Le SyBrGreen utilise un fluorophore qui s'incorpore dans la double hélice d'ADN et qui à l'état libre n'émet pas de fluorescence. On mesure l'augmentation de la fluorescence à chaque étape d'élongation de chaque cycle. La spécificité des amorces utilisées est vérifiée à la fin de l'étape d'amplification grâce à la courbe de fusion : on observe une diminution de la fluorescence en fonction de l'augmentation de la température. Les produits non spécifiques vont se dissocier à des températures plus basses qu'un produit spécifique d'amplification.

5. Analyse statistique

Dans cette étude, une comparaison de moyenne des CMI entre les souches confirmées résistantes à la colistine par la méthode Sensititre® *mcr-1* positives et *mcr-1* négatives a été réalisée par le test de Student. Ce test statistique a été réalisé de façon bilatérale et la limite de significativité a été définie à 0,05. Les conditions pour réaliser le test ont été respectées : la distribution des variables suit une loi normale centrée et réduite et l'égalité des variances entre les deux variables.

RESULTATS

1. Description de la population

L'étude comprend 141 souches dont 114 sont des entérobactéries ayant une sensibilité vis-à-vis de la colistine catégorisée résistante (112 proviennent du CHU de Lille et 2 du CH de Roubaix). Les 27 souches restantes sont des entérobactéries catégorisées sensibles à la colistine. Elles proviennent du CH de Roubaix et à l'exception d'une souche, toutes présentent un haut phénotype de résistance (BLSE, hyperproduction de la céphalosporinase, carbapénémase ou pénicillinase de haut niveau). Les CMI ont été obtenues par méthode VITEK2® ou E-test®.

Des doublons, définis comme des souches avec la même combinaison espèce/antibiotype, appartenant aux mêmes patients ont été isolés. Ont donc été exclus, selon les recommandations ONERBA, ces souches redondantes pour garantir la sensibilité de l'analyse (93). Deux souches sont ainsi considérées comme différentes si leurs antibiotypes diffèrent par au moins une différence majeure. Des souches comprenant un antibiotype avec des différences mineures sont redondantes. Ainsi, 19 souches ont été exclues de l'analyse dont trois comprenant des différences mineures (Figure 15). Une vingtième a été retirée de l'analyse car il ne s'agissait pas de la souche attendue. L'étude a donc finalement un nombre total de souches exploitables égal à 121 dont 95 catégorisées résistantes à la colistine.

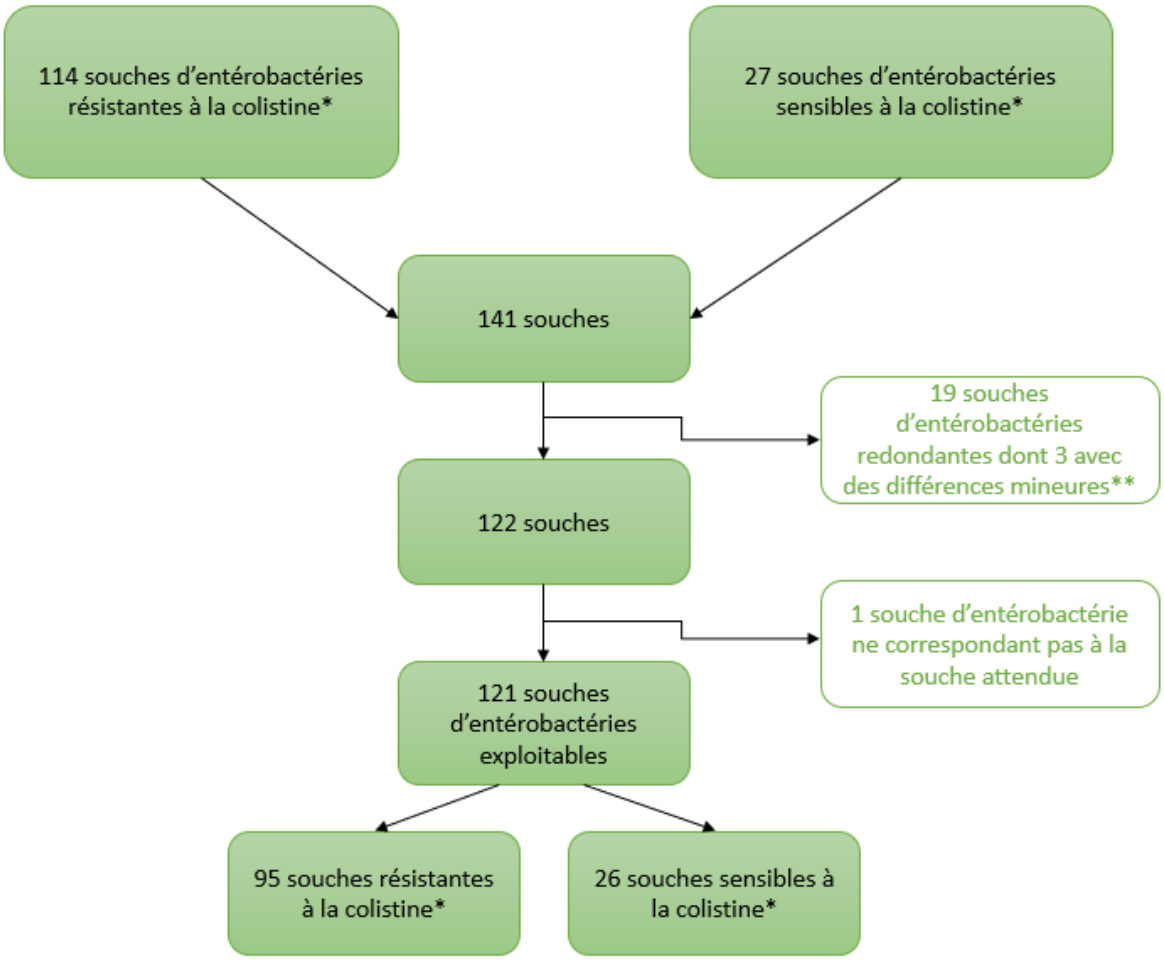


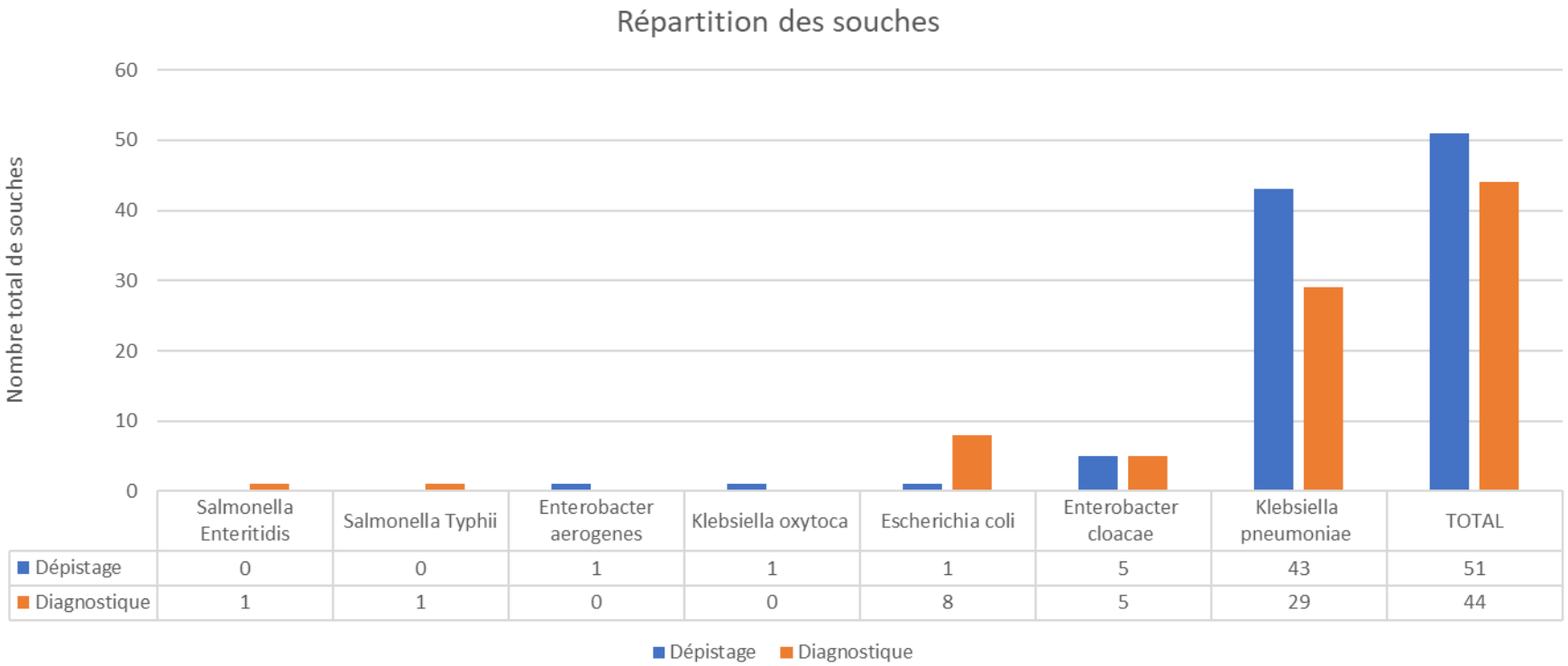
Figure 15 : Logigramme sur le processus de sélection des souches. *La détermination de la sensibilité à la colistine a été effectuée par VITEK2® ou E-test®. **Les différences mineures des 3 souches correspondent aux différences suivantes : une souche de *K. pneumoniae* avec une sensibilité vis-à-vis de la piperacilline-tazocilline catégorisée intermédiaire (I) puis résistante (R) ; une autre souche de *K. pneumoniae* avec une sensibilité vis-à-vis de l'amikacine catégorisée R puis I et une troisième souche de *K. pneumoniae* avec une sensibilité vis-à-vis de la tigécycline catégorisée I puis sensible (S).

Parmi les 121 souches étudiées, huit espèces d'entérobactéries ont été isolées : *Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhi.

Concernant les souches catégorisées résistantes, 76% d'entre elles sont des *Klebsiella pneumoniae* et plus de la moitié ont été isolées dans des services de réanimation (Tableau 1). Les souches isolées lors d'un dépistage sont au nombre de 51, et 44 ont été isolées dans un prélèvement à visée diagnostique (Figure 16). Parmi les prélèvements à visée diagnostique, 43,2% des souches sont isolées à partir d'urines et 25,0% à partir d'hémocultures (Tableau 2).

Services	Nombre total de souches								Nombre total de souches	% de souches
	C.freundii	*E.aerogenes*	*E.cloacae*	*E.coli*	*K.oxytoca*	*K.pneumoniae*	*S.Enteritidis*	*S.Typhii*		
Réanimation	0	1	7	1	1	52	0	0	62	65,3
Urgences	0	0	1	3	0	4	1	0	9	9,5
Gastrologie	0	0	0	1	0	6	0	0	7	7,4
Hématologie clinique	0	0	0	1	0	5	0	0	6	6,3
Endocrinologie	0	0	1	1	0	0	0	1	3	3,2
Pneumologie	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2,1
Cardiologie	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1,1
Gynécologie	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1,1
Maladie infectieuse	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1,1
Médecine interne	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1,1
Neurologie	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1,1
Ortho/Traumatologie	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1,1
TOTAL (%)	**0 (0)**	**1 (1,1)**	**10 (10,5)**	**9 (9,4)**	**1 (1,1)**	**72 (75,7)**	**1 (1,1)**	**1 (1,1)**	**95**	**100**

Tableau 1 : Répartition des souches catégorisées résistantes à la colistine par méthode VITEK2® ou E-test® selon le service



	Salmonella Enteritidis	Salmonella Typhii	Enterobacter aerogenes	Klebsiella oxytoca	Escherichia coli	Enterobacter cloacae	Klebsiella pneumoniae	TOTAL
Dépistage	0	0	1	1	1	5	43	51
Diagnostique	1	1	0	0	8	5	29	44

Figure 16 : Répartition des souches catégorisées résistantes à la colistine par méthode VITEK2® ou E-test® selon le type de prélèvement : dépistage *vs*. diagnostique

Prélèvements	Nombre total de souches								Nombre total de souches	% de souches
	C.freundii	*E.aerogenes*	*E.cloacae*	*E.coli*	*K.oxytoca*	*K.pneumoniae*	*S.Enteritidis*	*S.Typhii*		
Urines	0	0	1	6	0	12	0	0	19	43,2
Hémoculture	0	0	0	1	0	10	0	0	11	25,0
Cathéter	0	0	1	0	0	3	0	0	4	9,1
Prélèvements respiratoires	0	0	1	0	0	2	0	0	3	6,8
Os	0	0	2	0	0	0	0	0	2	4,5
Selles	0	0	0	0	0	0	1	1	2	4,5
Abcès	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2,3
Liquide péritonéal	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2,3
Prélèvement génitaux	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2,3
TOTAL (%)	**0 (0)**	**0 (0)**	**5 (11,3)**	**8 (18,2)**	**0 (0)**	**29 (65,9)**	**1 (2,3)**	**1 (2,3)**	**44**	**100**

Tableau 2 : Répartition des souches catégorisées résistantes à la colistine par méthode VITEK2® ou E-test® isolées à partir de prélèvements à visée diagnostique selon la nature du prélèvement

Concernant les phénotypes de résistance associés à la résistance à la colistine, quel que soit le type de prélèvements (dépistage ou diagnostique), plus de la moitié des souches correspondent à des entérobactéries produisant une BLSE (Figure 17 et Figure 18). Parmi les 11 souches d'EPC étudiées, cinq sont résistantes à la colistine.

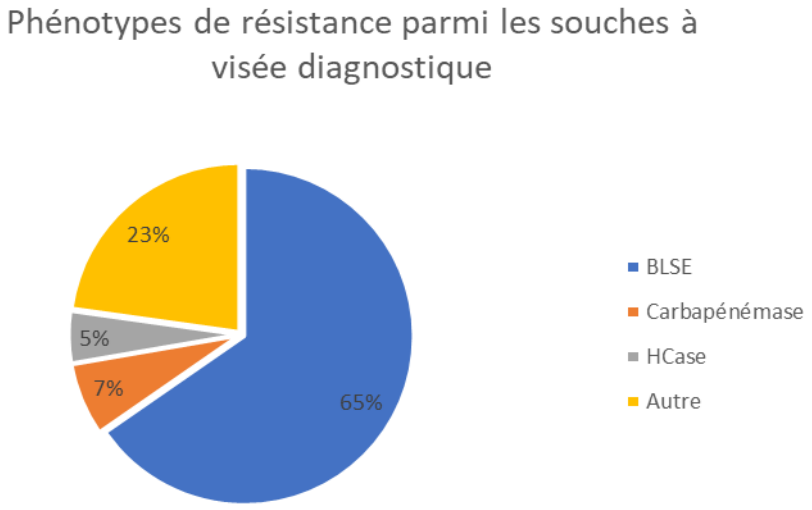


Figure 17 : Répartition en pourcentage des phénotypes de résistance parmi les souches à visée diagnostique catégorisées résistantes à la colistine par méthode VITEK2® ou E-test®. HCase = Hyperproduction de la céphalosporinase, BLSE = bêta-lactamase à spectre étendu, Autre comprend des souches de phénotype sauvage aux bêtalactamines ou comportant d'autres mécanismes de résistance tel que des pénicillinases

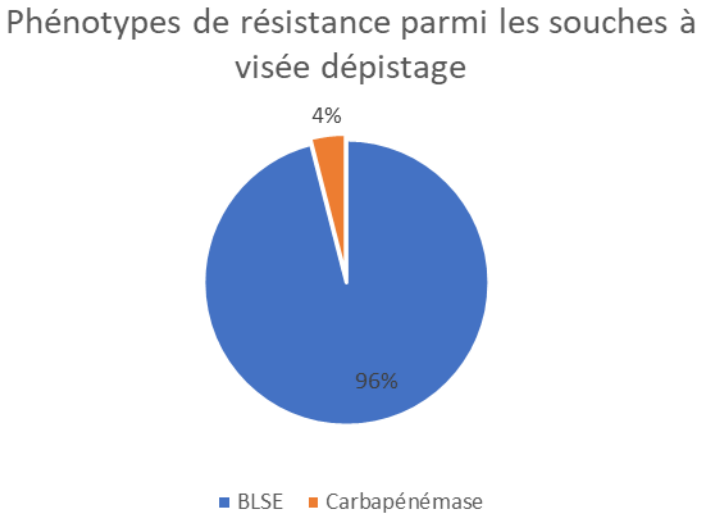


Figure 18 : Répartition en pourcentage des phénotypes de résistance parmi les souches à visée dépistage catégorisées résistantes à la colistine par méthode VITEK2® ou E-test®. BLSE = bêta-lactamase à spectre étendu

En moyenne, l'âge des patients d'où proviennent ces souches est de 61 ans et le ratio homme/femme est de 0,98 (60 hommes pour 61 femmes).

2. Performance du Sensititre®

Les recommandations du CA-SFM EUCAST 2017 catégorisent une souche sensible à la colistine si la CMI obtenue par dilution en milieu liquide est inférieure ou égale à 2 mg/L (89). Parmi les 121 souches exploitables, avec la méthode Sensititre®, 91 souches ont été catégorisées résistantes contre 30 sensibles.

Un contrôle de qualité a été réalisé sur chaque plaque et les limites acceptables des CMI se situent entre 0,25-2 mg/L. Chaque contrôle effectué avait une CMI de 0,25 mg/L ou de 0,5 mg/L, ce qui permet ainsi de valider les résultats obtenus.

Les CMI obtenues, pour les souches confirmées résistantes, par méthode Sensititre® s'étendent de 4 à plus de 128 mg/L selon la distribution figurant dans la Figure 19.

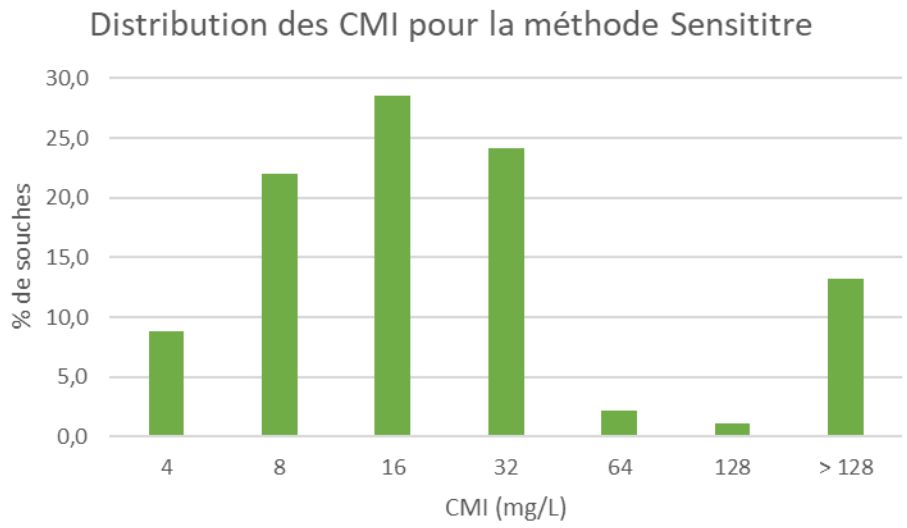


Figure 19 : Distribution des CMI pour la méthode Sensititre®

Une corrélation de ces résultats a ensuite été effectuée avec ceux obtenus par méthode VITEK2® ou E-test®. Néanmoins, cinq souches ont dû être retirées de cette analyse par manque de données. Toutes les souches sensibles en VITEK2® ou E-test® ont bien été catégorisées sensibles par la méthode Sensititre®. Cependant, on observe quatre discordances correspondant à des souches catégorisées résistantes par méthode VITEK2® ou E-test® contre une catégorisation sensible par méthode Sensititre® (Tableau 3). Le pourcentage de corrélation est donc égal à 96,6%.

	Souches	Phénotype de résistance	Service	Origine	CMI Vitek (v) ou E-test (E)	Interprétation CA-SFM 2017	CMI Sensititre	Interprétation CA-SFM 2017
1	*Klebsiella oxytoca*	BLSE	Réanimation	Dépistage anal	> 8 (v)	**R**	0,5	**S**
2	*Klebsiella pneumoniae*	BLSE	Réanimation	Hémoculture	4 (v)	**R**	1	**S**
3	*Klebsiella pneumoniae*	BLSE	Réanimation	Dépistage anal	> 8 (v)	**R**	1	**S**
4	*Klebsiella pneumoniae*	BLSE	Réanimation	Dépistage anal	> 8 (v)	**R**	0,5	**S**

Tableau 3 : Discordances des CMI obtenues par méthode VITEK2®/E-test® *vs.* méthode Sensititre®. Les CMI sont exprimées en mg/L

3. Détermination des souches productrices du gène *mcr-1*

Une PCR a été réalisée sur toutes les souches catégorisées résistantes par la méthode Sensititre®. Cette technique de PCR permet de détecter la présence ou non du gène *mcr-1*. Ainsi, 91 PCR ont été réalisées et 12 souches (13,2%) étaient positives. Les caractéristiques de la population des souches porteuses du gène *mcr-1* sont décrites dans le Tableau 4.

Parmi les 12 souches *mcr-1* identifiées sont retrouvées :

- 10 souches d'entérobactéries productrices de BLSE dont 6 sur des prélèvements à visée diagnostique (ECBU ou hémoculture) ;
- Une souche de *Salmonella* Typhi avec une pénicillinase de haut niveau isolée dans les selles ;
- Une souche d'*E. coli* avec une pénicillinase de haut niveau isolée dans un ECBU.

Aucune des cinq souches d'EPC résistantes à la colistine ne possédait le gène *mcr-1*.

La CMI moyenne de la colistine de ces souches est de 31 mg/L. Il n'y a pas de différence significative par rapport à la population non porteuse du gène *mcr-1* (p-value = 0,7758) même si les CMI des souches *mcr-1* positives ont une tendance à être plus basses (Figure 20).

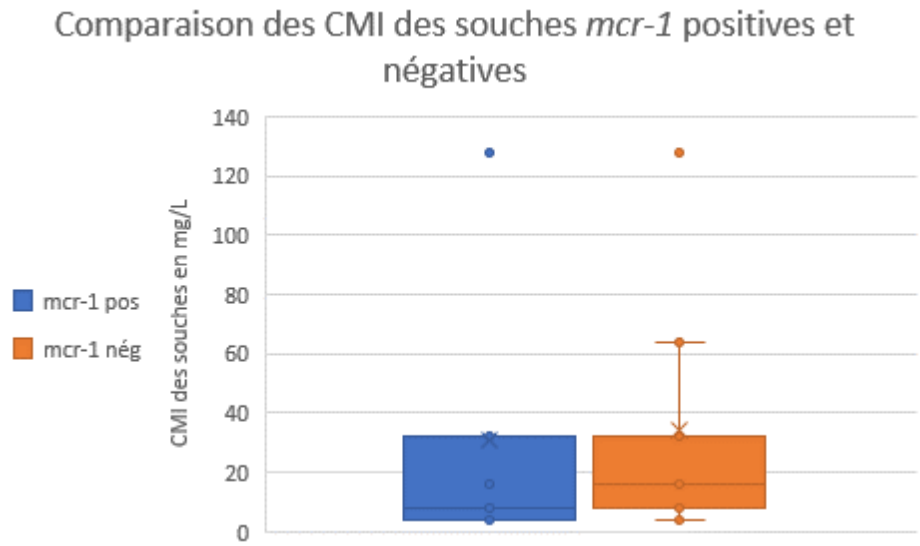


Figure 20 : Comparaison des CMI des souches *mcr-1* positives et négatives

	Age	Souches	Résistance	Origine	Service	CMI Vitek (v) ou E-test (E)	CMI Sensititre	Durée d'acquisition *(jours)*
1	68	*Enterobacter cloacae*	BLSE	Dépistage anal	Réanimation	> 8 (v)	32	3
2	42	*Escherichia coli*	Pénicillinase de haut niveau	Urine	Cardiologie	8 (v)	4	20
3	81	*Escherichia coli*	BLSE	Dépistage anal	Réanimation	8 (v)	4	3
4	78	*Escherichia coli*	BLSE	Urine	Endocrinologie	8 (v)	8	0
5	80	*Klebsiella pneumoniae*	BLSE	Dépistage anal	Réanimation	> 8 (v)	16	14
6	52	*Klebsiella pneumoniae*	BLSE	Dépistage anal	Réanimation	> 8 (v)	32	5
7	46	*Klebsiella pneumoniae*	BLSE	Hémoculture	Réanimation	> 8 (v)	> 128	36
8	58	*Klebsiella pneumoniae*	BLSE	Hémoculture	Réanimation	> 8 (v)	128	8
9	57	*Klebsiella pneumoniae*	BLSE	Hémoculture	Gastrologie	> 8 (v)	4	1
10	63	*Klebsiella pneumoniae*	BLSE	Urine	Gynécologie	4 (v)	4	5
11	75	*Klebsiella pneumoniae*	BLSE	Urine	Urgences	4 (E)	4	0
12	47	*Salmonella Typhii*	Pénicillinase de haut niveau	Selles	Endocrinologie	4 (v)	8	0

Tableau 4 : Description de la population des souches porteuses du gène *mcr-1*. Les CMI sont exprimées en mg/L

La moyenne d'âge des patients porteurs de ces souches est de 62 ans. La durée d'acquisition moyenne des souches est de huit jours.

DISCUSSION

La colistine est l'un des rares antibiotiques encore actif sur les souches d'EPC. Sa résistance est complexe et très variée, d'une part par la présence de diverses mutations chromosomiques et d'autre part par l'apparition récente d'une résistance plasmidique *mcr*. Les altérations chromosomiques conduisent à l'apparition de résistances non transférables horizontalement et donnent un « coût énergétique » à la bactérie. Concernant la résistance plasmidique, bien qu'elle soit plus prévalente dans le monde animal, le plasmide a toutes les caractéristiques pour diffuser chez l'homme. La résistance à la colistine chez les entérobactéries productrices de BLSE ou d'EPC est un problème majeur de santé publique et conduit à une impasse thérapeutique et à un risque accru de mortalité. C'est pourquoi, il est primordial pour les laboratoires de détenir des techniques fiables et reproductibles afin de bien détecter cette résistance pour limiter sa diffusion et préserver la colistine comme antibiotique de dernier recours.

Dans ce travail, nous avons évalué la performance d'une technique de CMI en milieu liquide (Sensititre®, Thermo Fischer), tel que recommandé par l'EUCAST en 2016, sur un échantillonnage de 121 souches d'entérobactéries dont 95 étaient catégorisées comme résistantes à la colistine par les méthodes VITEK2® (méthode de dilution en microplaques) ou E-test® (méthode en gradient de diffusion). Nous avons également étudié la prévalence du gène *mcr-1* chez les souches confirmées résistantes par méthode Sensititre®.

1. Evaluation de la performance de la technique Sensititre®

Les CMI du contrôle de qualité effectuées sur chaque plaque étaient strictement de 0,25 mg/L ou de 0,5 mg/L permettant ainsi de valider les résultats des plaques et de conclure à une bonne répétabilité des résultats obtenus par la méthode Sensititre®.
Une corrélation de 96,6% a été constatée sur la catégorisation de la sensibilité à la colistine entre la méthode Sensititre® et la méthode VITEK2® ou E-test®. Toutes les souches sensibles ont bien été confirmées par la méthode Sensititre®. Seules quatre souches d'entérobactéries avec des CMI à 4 mg/L ou >8 mg/L en VITEK2® ont été catégorisées sensibles par la méthode Sensititre® (CMI à 0,5 mg/L ou 1 mg/L). Dans ces cas-là, l'identification des souches ainsi qu'un antibiogramme étaient réalisés

pour vérifier l'identité de la souche étudiée ; la méthode Sensititre® était de nouveau effectuée pour confirmer le résultat. Ces différences majeures n'ont pas pu être expliquées.

Pour rappel, l'alerte bioMérieux datant de mai 2017 (date postérieure à cette étude), signalait qu'il était possible de rendre un résultat faussement sensible. C'est pourquoi, bioMérieux indique qu'il est nécessaire de réaliser une méthode alternative avant de communiquer tout résultat sensible de la colistine. Ce travail a étudié 95 souches résistantes à la colistine contre uniquement 26 souches sensibles. Bien que toutes les souches sensibles en VITEK2® aient été confirmées par la méthode Sensititre®, cette étude ne permet pas de conclure sur l'alerte en raison d'un nombre trop faible de souches sensibles. En revanche, la performance du VITEK2® pour la détection des souches résistantes à la colistine n'est pas remise en question. C'est pourquoi, le rendu de la sensibilité à la colistine avec les cartes VITEK®2 AST-GN pourrait rester utile en screening. Si la souche est considérée résistante par le VITEK2®, la probabilité pour que la souche soit en réalité sensible est très faible. En revanche, si la souche est considérée sensible, le résultat ne pourra être rendu et une méthode alternative devra être réalisée.

En conclusion, la méthode Sensititre® offre une bonne performance pour la détection des souches résistantes à la colistine. Cette méthode, facilement utilisable en laboratoire, donne des résultats de CMI réelles en 18-24h, nécessaire à la lutte contre la résistance aux antimicrobiens car permet un meilleur suivi de la résistance. De plus, les plaques Sensititre® peuvent être personnalisées selon les besoins des laboratoires. Ce qui est intéressant car cela permet de tester différents antibiotiques pour une même souche ce qui augmente le nombre d'options thérapeutiques, offre un gain de temps et une diminution des coûts.

2. Limites de la technique, problèmes rencontrés lors de la détection de la résistance à la colistine et alternatives

L'EUCAST conseille vivement d'utiliser, lors de la détermination de la CMI de la colistine, un contrôle de qualité d'*E. coli* résistant à la colistine (*mcr-1* positif) associé à un deuxième contrôle de qualité sensible à la colistine. Dans ce travail, seul un contrôle de qualité d'*E. coli* sensible à la colistine a été utilisé limitant ainsi l'étude.

De plus, les résultats des CMI n'ont été lus que manuellement. On considère une culture positive si on observe un trouble ou un dépôt au fond de la cupule. Ces résultats sont opérateur dépendant et peuvent varier d'une dilution si le trouble ou le dépôt est faible. Pour les CMI de la colistine, cet inconvénient est non négligeable puisque le breakpoint fixé par l'EUCAST est de 2 mg/L et, de plus, ne propose pas de catégorisation intermédiaire. Ainsi, une CMI à la colistine peut être rendue faussement sensible si la lecture manuelle n'est pas correcte, et pourrait avoir une influence négative sur la décision du traitement qui serait alors inapproprié et entraînerait un échec thérapeutique. Toutefois, des systèmes automatisés sont disponibles pour pouvoir palier à ce problème. En ce qui concerne cette étude, pour confirmer les résultats, toutes les CMI à la limite du breakpoint ont été testées deux fois permettant d'augmenter la sensibilité de l'étude.

Des sauts de puits ou encore dits « skip-wells » ont été observés. Selon les recommandations du fournisseur, lorsqu'un saut est observé, s'il est unique il peut être ignoré. Toutefois, ce phénomène peut traduire des hétérorésistances observées chez certaines souches d'entérobactéries (94). De ce fait, ces souches peuvent ne pas être détectées en ignorant ces sauts. Ainsi, quand ce phénomène se présentait, le test était répété. Ceci permet d'éliminer les causes de contaminations, de plis lors de la fermeture de la plaque ou encore d'erreurs d'alignement lors du dosage. Concernant cette étude, ces phénomènes n'ont pas eu d'impacts majeurs puisque les sauts observés correspondaient à des CMI strictement supérieure à 2 mg/L. Ainsi, la catégorisation de la souche n'était pas impactée.

Une autre technique de détermination de la CMI par microdilution en milieu liquide, suivant les recommandations de l'EUCAST, est commercialisée. Il s'agit du système UMIC® (biocentric). UMIC® est un test unitaire prêt à l'emploi, constitué de barrettes de 12 puits dont un pour le contrôle de croissance (Figure 21). La distribution des CMI est de 0,06 à 64 mg/L. La lecture est visuelle uniquement et les résultats sont obtenus en 18-24h.

Figure 21 : Présentation du système UMIC® (biocentric).

Une étude évaluant trois méthodes commercialisées de microdilution en milieu liquide, conclut que le Sensititre® est la méthode la plus fiable pour tester la sensibilité de la colistine pour toutes les espèces Gram négatif (concordance de 97,8% avec la méthode de référence). Tandis que, UMIC® n'est pas fiable pour les isolats avec une résistance à la colistine de bas niveau (95). Paradoxalement, après une enquête en juin 2018 lors de la 22ème journée de microbiologie clinique du COL.BVH, parmi 77 laboratoires, 51,9% utilisent la technique UMIC® contre 6,5% pour la technique Sensititre®.

Ces techniques de détermination de CMI par microdilution en milieu liquide sont confrontées à d'autres problèmes. Premièrement, la résistance plasmidique est principalement de bas niveau, rendant sa détection difficile et augmente le risque de diffusion. Une étude a montré l'existence d'une souche d'*E. coli,* isolée chez le porc, porteuse du gène *mcr-1* associée à une CMI à la colistine sensible (1 mg/L). Cette observation suggère que la détection des souches résistantes à la colistine par un mécanisme de résistance plasmidique de type *mcr* est difficile et ne peut pas se baser uniquement sur les valeurs des CMI. Cela peut contribuer à la dissémination silencieuse des souches hébergeant *mcr-1* (96). Comme le proposait une étude en

2017, l'introduction d'une catégorie intermédiaire pourrait être une solution pour diminuer les erreurs très majeures et pallier à ce problème (97). Secondairement, la méthode de référence validée par l'EUCAST est à l'heure actuelle la méthode de microdilution en bouillon selon le standard ISO 20776-1. Pour cela, le matériel utilisé doit être à base de polystyrène. Cependant, en raison de la récente publication sur l'importance des liaisons non-spécifiques de la colistine à ce matériau, il est probable que cette technique de référence soit modifiée prochainement (98). De plus, ces techniques de CMI en milieu liquide restent longues (24h pour obtenir des cultures bactériennes fraiches puis 18-24h pour la technique). Des tests rapides de détection de la résistance à la colistine sont nécessaires permettant au clinicien d'adapter rapidement le traitement. Ces tests pourraient être utilisés en screening en première intention, avant d'entreprendre la détermination de la CMI par microdilution en milieu liquide et la réalisation des techniques moléculaires pour la détection de la résistance plasmidique.

Le premier test disponible est un milieu de culture sélectif (SuperPolymyxin medium, ELITechGroup) permettant la détection d'isolats résistants à la colistine indépendamment de son mécanisme de résistance et de son niveau, à partir de cultures bactériennes ou d'écouvillons rectaux (99). Ce milieu est une gélose à base d'Eosin methylene blue (EMB) supplémentée avec de la daptomycine (pour inhiber la pousse des bactéries à Gram positif), de l'amphotéricine B (pour inhiber la pousse des levures et des champignons filamenteux) et de la colistine (3,5 mg/L en concentration finale). Ce dépistage présente une sensibilité de 95,2% et une spécificité de 95,3% pour les souches isolées à partir de cultures bactériennes. Pour les prélèvements rectaux, la sensibilité et la spécificité est de 100% et 90,3% respectivement (100). Ce milieu serait adapté pour le criblage et la détection d'isolats résistants à colistine et pourrait être utile pour la surveillance épidémiologique et la prévention d'épidémies.

Le deuxième test est le Rapid Polymyxin NP test® (ELITechGroup). Il est réalisé à partir de cultures bactériennes (101) et détecte la métabolisation du glucose lié à la croissance des bactéries en présence d'une concentration définie en colistine. Cette métabolisation est mise en évidence par un changement de couleur d'un indicateur de pH (orange virant au jaune). Ce test est facile à réaliser et permet d'obtenir un résultat en moins de deux heures. La résistance à la colistine est détectée pour

toutes les entérobactéries quel que soit le mécanisme de résistance avec une sensibilité de 99,3% et une spécificité de 95,4%. Il a aussi été évalué sur la détection des souches *mcr-1* et *mcr-2*. La sensibilité et la spécificité ont été trouvées à 100% (102). Cependant, ce test n'a pas évalué la capacité à détecter les souches hétérorésistantes avec des CMI à la colistine faibles. Il peut être utilisé pour le criblage de la résistance à la colistine et permet d'identifier rapidement les patients porteurs de ces souches conduisant ainsi à la mise en œuvre rapide de mesures d'hygiène adéquate pour contrôler leur propagation. Une étude a évalué ce test rapide directement à partir d'hémocultures et a montré une excellente discrimination entre les entérobactéries résistantes à la colistine et les entérobactéries sensibles avec un résultat obtenu en quatre heures (103). Dans les pays où les EPC sont endémiques (tel que la Grèce ou l'Italie), la mise en œuvre du test pourrait contribuer à l'instauration rapide d'une antibiothérapie appropriée et la mise en place rapide des précautions contacts permettant de prévenir la diffusion de ces souches résistantes.

Un nouveau test a été lancé en 2018 permettant la détection rapide de la présence du gène *mcr-1* à partir de cultures bactériennes : le NG-test *mcr-1*® (NG Biotech). Il s'agit d'un test immuno-chromatographique, rapide (15 minutes), utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre *mcr-1*. Sa sensibilité et sa spécificité sont de 100% et 98% respectivement. Ce test semble également utilisable pour la détection de *mcr-2,* mais des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer sa performance (104).

Enfin, des techniques de spectrométrie de masse utilisant le MALDI-TOF sont en développement. Cet outil vise à détecter la résistance à la colistine des entérobactéries en moins de 15 minutes. Une différenciation entre la résistance plasmidique et chromosomique semble être possible (105).

En routine, en France, la détection de la résistance à la colistine est rarement réalisée en première intention. Depuis l'émergence de la résistance plasmidique en 2015, il est nécessaire de détenir des méthodes adaptées pour la détection de ce nouveau mécanisme de résistance pour prévenir sa dissémination et adapter au plus vite le traitement. Cependant, ce travail conclut que la détection de la sensibilité à la colistine est complexe du fait de liaisons non-spécifiques, d'apparition de souches hétérorésistantes et d'un manque de sensibilité.

3. Impacts de la résistance et actions visant à diminuer sa propagation

Ce travail est en accord avec les données de la littérature. La résistance à la colistine touche essentiellement *K. pneumoniae* (76% des souches résistantes à la colistine dans cette étude) (42), tandis que, comme le signale le CNR de la résistance aux antibiotiques, la résistance plasmidique est faible et est principalement observée sur des souches d'*E. coli* (56,58,106). Effectivement, 10% des souches de *K. pneumoniae* résistantes à la colistine possèdent le gène *mcr-1* contre 33% pour les souches d'*E. coli*. Toutefois, la détection des autres gènes plasmidiques, tels que *mcr-2,* n'a pas été réalisée dans la population étudiée. Ceci pourrait sous-estimer la prévalence de la résistance plasmidique. Dans le cadre du programme de surveillance mondiale INFORM, la prévalence des gènes de type *mcr* a été étudiée. Parmi les entérobactéries résistantes à la colistine collectées en 2014-2016, cette étude montre une prévalence beaucoup plus faible pour les résistances plasmidiques autres que *mcr-1* (107).

Parmi les 12 souches *mcr-1* identifiées, 83,3% des souches possédaient également une BLSE, mais ce pourcentage peut être biaisé. En effet, la détection de la sensibilité à la colistine est réalisée en laboratoire sur des souches multi-résistantes. Ceci explique que la prévalence de la résistance à la colistine et ainsi du gène *mcr-1* peut être sous-estimée en raison d'un manque de détection.

Aucune des cinq souches d'EPC résistantes à la colistine n'hébergeaient le gène *mcr-1*. Parallèlement, en 2017, le CNR en lien avec le réseau ONERBA, a évalué la diffusion de la résistance plasmidique à la colistine sur 260 souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes. Seules 15 étaient résistantes à la colistine et une seule possédait le gène *mcr-1.* Ce qui suggère une faible diffusion de ces gènes plasmidiques au sein des souches résistantes aux carbapénèmes isolées chez l'homme en France (108).

La durée moyenne d'acquisition de ces souches *mcr-1* est de huit jours suggérant une acquisition nosocomiale. Dans ce travail, l'information sur un éventuel lien avec l'étranger n'a pas été recueillie.

A) Impacts de la résistance

Les résistances non plasmidiques à la colistine touchent principalement des souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases. Ces souches ont été responsables d'épidémies signalées dans plusieurs pays tels que la France (42), la Grèce (109), la Hongrie (110) et l'Italie (38). Les souches EPC et résistantes à la colistine restent pour la plupart uniquement sensibles à la fosfomycine et à l'aztréonam. La tigécycline montre un taux élevé de résistance : 70 % pour *K. pneumoniae* et 50% pour *E. cloacae* (42). Pour certaines souches, des mécanismes de résistances ne sont pas expliqués (106). Une étude suggère la possibilité de l'existence d'un plasmide portant une séquence IS1R pouvant s'insérer ensuite dans le chromosome bactérien au niveau de la zone promotrice du gène *mgrB* conférant ensuite la résistance à la colistine (111). Effectivement, en 2016, a été observé sur une souche de *K. pneumoniae*, l'acquisition d'un gène BLSE de type CTX-M associé à un élément IS conduisant à une résistante acquise à la colistine par transposition de cet élément dans le gène *mgrB* (112). Ces découvertes signifient que, en plus de la résistance plasmidique *mcr-1*, l'acquisition d'autres gènes multi-résistants augmente l'apparition de souches résistantes à la colistine. Ainsi aucun traitement efficace n'est disponible. Cette multirésistance est inquiétante et souligne l'urgence de lutter contre ces clones épidémiques.

A l'inverse, les souches EPC *mcr-1* positifs restent rares, et les souches *mcr-1* isolées sont pour la plupart encore sensibles à d'autres antibiotiques efficaces (113). De plus, la résistance plasmidique à la colistine reste, pour le moment, principalement localisée dans le monde animal (106). D'après une étude, le taux de transfert des plasmides varie de 10^{-6} à 10^{-4}, soit de façon moins fréquente qu'initialement avancé par Liu *et al.* (106). On pourrait penser aussi que la modification du LPS médiée par *mcr-1* pourrait donner un coût biologique comme cela a été démontré pour les souches exprimant des mutations chromosomiques (61,114). Toutefois, bien que la résistance plasmidique à la colistine reste rare, sa prévalence est difficile à évaluer et est probablement sous-estimée, d'une part, par un manque de données et de surveillance, et d'autre part, par la complexité de sa détection. Sa localisation sur des plasmides multi-résistants endémiques (BLSE, carbapénémases…) ou en association avec des sous-groupes pandémiques (*E. coli*

ST131 ou *K. pneumoniae* ST11/ST258) et sa distribution mondiale sont préoccupantes. De plus, l'hôte principal du gène *mcr-1* est *E. coli*, l'espèce bactérienne la plus répandue et largement distribuée entre l'environnement, les animaux et l'homme. Et enfin, la dissémination de ce plasmide *mcr-1* pourrait suivre celle observée par les BLSE de type CTX-M : premièrement observée chez *E. coli* puis chez des espèces nosocomiales tel que *K. pneumoniae* responsable de nombreuses épidémies (61).

Il est intéressant de noter que l'augmentation de l'utilisation de la colistine est associée à l'augmentation de l'isolement des souches intrinsèquement résistantes à la colistine telles que *Proteus* spp, *Morganella* spp, *Serratia* spp et *Providencia* spp. (115,116).

B) Actions visant à diminuer la propagation de la résistance à la colistine

Avec l'augmentation de la résistance à la colistine, l'émergence d'une résistance plasmidique et l'absence de nouveaux traitements efficaces, il est nécessaire de mettre en place des actions visant à empêcher la propagation de la résistance à la colistine et préserver l'efficacité de cet antibiotique. Les principales actions sont l'augmentation de la vigilance, l'amélioration de la surveillance au niveau local et national, la réalisation de mesures d'hygiène adaptées et l'optimisation de l'usage de la colistine.

L'utilisation massive de polymyxines chez les animaux est considérée comme étant l'origine de l'apparition de ces résistances. La colistine, dans l'Union Européenne (UE), est essentiellement à destination des animaux de production. La filière porcine figure parmi les gros utilisateurs de colistine (117). En France, on estime qu'environ un tiers de l'exposition totale des antibiotiques chez les porcs est due à la famille des polymyxines dont principalement la colistine, et que ce taux serait encore plus élevé chez les volailles (118). Ainsi, une utilisation restreinte doit être encouragée et un effort coordonné international doit être mis en place. L'agence européenne des médicaments (EMA), dans un projet d'avis en 2016, a conclu à la préconisation d'une baisse globale de l'utilisation de la colistine chez les animaux ; la mise en place de stratégies pour un meilleur usage de celui-ci et enfin la recommandation de

classer la colistine comme antibiotique d'importance critique. Toutefois, ce dernier point n'a pas été adopté en France par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) mais celle-ci souligne l'importance de diminuer son usage de moitié en trois ans et d'en renforcer la surveillance (119). L'utilisation de la colistine comme facteur de croissance chez les animaux par voie orale est interdite en Europe depuis 2006. Mais par exemple, l'Asie, a encore recours à cet usage à des doses sub-optimales entraînant un risque de sélection de résistance à cet antibiotique. Une progression importante de la proportion de souches d'*E. coli* résistantes à la colistine d'origine porcine a été rapportée en Chine : 7% en 2007 et 46% en 2015 (120). Ces forts taux de prévalence peuvent être associés à l'usage de la colistine comme promoteur de croissance. Ainsi, la Chine, consciente du danger, a très récemment décider d'interdire cet usage (121).

De même, les pratiques de l'utilisation de la colistine pour la décontamination sélective digestive (SDD) chez l'homme doit être révisées. La SDD a pour objectif de prévenir les infections endogènes des voies respiratoires et du sang et ainsi de diminuer la mortalité des patients en soins intensifs (122). Pour cela, une combinaison d'antibiotiques, dont la colistine, est administrée par voie orale. Cette pratique remonte au début des années 1980 mais est aujourd'hui controversée car suspecte de sélectionner des souches résistantes à la colistine. Une minorité de soins intensifs en Europe utiliseraient encore cette pratique (123).

Fernandes *et al*, en 2016, considèrent que l'émergence du gène *mcr-1* est lié à l'utilisation de polymyxines dans le monde animal (96). Ainsi, on pourrait penser qu'en l'absence d'une pression de sélection par les polymyxines, les souches *mcr-1* seraient rapidement éliminées de la flore digestive. Cependant, une étude a montré que le taux de prévalence *mcr-1* chez l'animal a augmenté d'environ 1% par an depuis 2006 malgré une diminution de la consommation de la colistine chez les animaux (124). Ces résultats soulignent que l'usage de colistine chez les animaux n'est probablement pas le seul déterminant de la diffusion de *mcr-1* et que de nombreuses autres voies de contamination existent. La probabilité de diffusion des souches résistantes à la colistine porteuses du gène *mcr-1* dans l'environnement, les denrées alimentaires, chez les animaux et les hommes est alarmante. De nombreuses études supportent cette hypothèse.

En effet, des cas de transmission entre l'animal et l'homme ont été suspectés (125,126).

De même, des études avancent que l'alimentation pourrait être une source potentielle de *mcr-1* (127,128). La présence du gène *mcr-1* au niveau alimentaire représente un danger par une éventuelle incorporation dans le microbiome intestinal humain. La durée du portage rectal de *mcr-1* n'est pas encore bien définie. Ce portage est potentiellement un réservoir de dissémination et un risque de transfert du gène *mcr-1* sur des souches multi-résistantes transitant par l'intestin. Saly *et al*. ont récemment réalisé une enquête prospective pour évaluer la prévalence du portage rectal des bacilles Gram négatif (BGN) ayant une résistance acquise à la colistine dans un hôpital en France. La prévalence de ce portage était faible (1,4%) et aucune souche ne portait le gène *mcr-1* (94).

Des souches *mcr-1* ont été retrouvées au niveau digestif chez des enfants âgés de deux à 10 mois. Ceci est intéressant puisque ces enfants n'ont pas été en contact avec des animaux et n'ont pas encore été exposés à de l'alimentation suggérant ainsi que *mcr-1* est déjà très répandu dans l'environnement et est transmissible par diverses voies (129). Cette hypothèse est fortement renforcée par la découverte en 2016, au Brésil, d'une souche d'*E. coli* hébergeant le gène *mcr-1* chez des volailles n'ayant pas été exposées aux polymyxines (130). Le gène *mcr-1* a été retrouvé chez des souches présentes dans des eaux usées, des légumes et dans des rivières (131,132).

C'est pourquoi, la gestion du risque lié à l'utilisation de colistine doit être appréhendée de façon globale, sous le concept « One Health » : un monde, une santé. Ce concept permet d'optimiser l'usage de la colistine et de prévenir le développement de résistance à son encontre.

Certains auteurs supposent que l'utilisation préalable d'antibiotiques serait un facteur de risque d'apparition de résistance à la colistine dont *mcr-1* (112,124). En conséquence, l'usage d'autres antibiotiques à la fois en médecine humaine et vétérinaire pourrait agir en co-sélection et maintenir la résistance à la colistine. Ceci conclut à la nécessité de programmes d'intervention globaux sur l'utilisation prudente de tous les antibiotiques dans le secteur agroalimentaire et en médecine humaine dans le monde.

4. Alternatives thérapeutiques ?

De nouvelles molécules dérivées de la polymyxine (NAB739 et NAB815) ont présenté une meilleure efficacité par rapport à la polymyxine B sur des souches d'*E. coli* et avec une toxicité rénale moindre (133). Des études supplémentaires sont nécessaires et devraient inclure des souches résistantes à la colistine.

Il a été montré chez des souches d'*A. baumannii,* une synergie entre la colistine et la vancomycine. Ils émettent l'hypothèse que la colistine perturberait la membrane externe et permettrait l'entrée de grosses molécules initialement résistantes (134). Des synergies ont aussi été décrites avec d'autres antibiotiques tels que la rifampicine (135). Ces synergies pourraient permettre de prévenir l'apparition de souches résistantes et d'utiliser de plus faibles doses de colistine, diminuant sa toxicité. Des études sur les effets cliniques de ces associations sont nécessaires.
Récemment, il a été démontré que la colistine en association avec des antibiotiques (en particulier ceux agissant sur la synthèse des protéines et de l'ARN) présente une synergie même contre les souches résistantes à la colistine (136).

Une étude en 2016, a étudié les effets de l'association de la colistine à d'autres agents antibactériens tel que les bactériocines (entérocines, nisines) sur des souches d'*E. coli* d'origine porcine. Cette association a permis d'éradiquer ces souches dont certaines hébergeaient le gène *mcr-1* (137).

Un composé naturel, pterostilbène, récemment découvert, serait le premier inhibiteur de *mcr-1* efficace. Ce composé a montré un effet synergique *in vitro* et *in vivo* en association avec la colistine contre des isolats humains de *K. pneumoniae mcr-1* positives (138).

CONCLUSION

L'émergence de la résistance plasmidique à la colistine *mcr-1*, découverte pour la première fois en Chine fin 2015, est inquiétante puisque cet antibiotique est un des derniers encore actif sur les EPC et augmente ainsi le risque de mortalité. Bien que sa prévalence chez l'homme semble faible, le HCSP recommande d'appliquer les précautions complémentaires contact quel que soit le profil de résistance chez un patient prouvé porteur d'une entérobactérie positive pour *mcr-1*. La nécessité d'évaluer la sensibilité de la colistine est donc devenue primordiale.

La méthode de microdilution en milieu liquide est la seule méthode recommandée par l'EUCAST depuis 2016. Bien que la détection de la sensibilité à la colistine soit complexe (liaisons non spécifiques, existence de souches hétérorésistantes, résistance plasmidique de bas niveau…), cette étude a permis de mettre en évidence que la méthode Sensititre® offre une bonne performance pour la détection des souches résistantes quel que soit leur mécanisme.

Par ailleurs, ce travail a également permis de montrer que le VITEK2® offrait lui aussi une bonne détection de ces résistances. En revanche, le nombre trop faible de souches étudiées sensibles à la colistine ne permet pas de répondre à l'alerte bioMérieux de mai 2017.

Concernant la population de souches résistantes à la colistine, 76% sont des *K. pneumoniae*. En revanche, les souches porteuses du gène *mcr-1* concernent plus particulièrement l'espèce *E. coli* (33% *vs.* 10% pour l'espèce *K. pneumoniae*) et sont également associées à plus de 80% à des BLSE.

La plupart des résistances à la colistine chez l'homme seraient dues à des résistances chromosomiques. Toutefois, des mécanismes de résistances à la colistine restent encore inconnus ou mal décrits.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bactériologie - Niveau DCEM1 - 2002 2003. [Internet]. Disponible sur : http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.7.html

2. Les infections microbiennes [Internet]. Disponible sur : http://gric.univ-lyon2.fr/gric3/decouverte/document/NotesdeCours/Les%20infections%20microbiennes.htm

3. Cavallo J-D, Fabre R, Jehl F, Rapp C, Garrabé E. Bêtalactamines. Mal Infect. 2004.

4. Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN). Protocole BMR-RAISIN 2018 [Internet]. Disponible sur : invs.santepubliquefrance.fr

5. Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN). Alerte sur la résistance aux antibiotiques des entérobactéries en France : diffusion des entérobactéries productrices de bétalactamases à spectre étendu (EBLSE) et émergence des entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC). Novembre 2013. [Internet]. Disponible sur : invs.santepubliquefrance.fr

6. Nicolas-Chanoine M-H. Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi : où sont les dangers ? Réanimation. mai 2012;21(3):260‑7.

7. Woerther P-L, Angebault C, Jacquier H, Clermont O, El Mniai A, Moreau B, et al. Characterization of Fecal Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Escherichia coli in a Remote Community during a Long Time Period. Antimicrob Agents Chemother. oct 2013;57(10):5060‑6.

8. Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN). Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Réseau BMR-Raisin – Résultats 2016 [Internet]. Disponible sur : invs.santepubliquefrance.fr

9. Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN). Surveillance de la consommation des antibiotiques, Réseau ATB-Raisin. Résultats 2016. [Internet]. Disponible sur : invs.santepubliquefrance.fr

10. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! Trends Mol Med. mai 2012;18(5):263‑72.

11. Dortet L, Cuzon G, Ponties V, Nordmann P. Trends in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, France, 2012 to 2014. Eurosurveillance 2017 ;22(6).

12. Pontiès V, Savitch Y, Soing-Altrach S, Colomb-Cotinat M, Blanchard H, Bernet C, Simon L, Sénéchal H, Venier A-G, Dortet L, Berger-Carbonne A. Surveillance des EPC en France : bilan 2004 - 2016. RICAI 2017.

13. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2016. 2017. [Internet]

14. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. Clin Microbiol Infect. sept 2014;20(9):821‑30.

15. Dortet L, Bonnin R, Jousset A, Gauthier L, Naas T. Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance ! J Anti-Infect. déc 2016;18(4):139‑59.

16. Suzuki T, Inouye H, Fujikawa K, Suketa Y. Studies on the chemical structure of colistin. I. Fractionation, molecular weight determination, amino acid and fatty acid composition. J Biochem (Tokyo). juill 1963;54:25‑33.

17. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents. janv 2005;25(1):11‑25.

18. Frasca D, Dahyotfizelier C, Mimoz O. La colistine en réanimation. Réanimation. mai 2008;17(3):251‑8.

19. Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. Clin Infect Dis. 1 mai 2005;40(9):1333‑41.

20. Martis N, Leroy S, Blanc V. Colistin in multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa blood-stream infections. J Infect. juill 2014;69(1):1‑12.

21. Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J. Structure−Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. J Med Chem. 11 mars 2010;53(5):1898‑916.

22. Jayol A, Saly M, Nordmann P, Ménard A, Poirel L, Dubois V. Hafnia, an enterobacterial genus naturally resistant to colistin revealed by three susceptibility testing methods. J Antimicrob Chemother. 1 sept 2017;72(9):2507‑11.

23. Guérin F, Isnard C, Sinel C, Morand P, Dhalluin A, Cattoir V, et al. Cluster-dependent colistin hetero-resistance in Enterobacter cloacae complex. J Antimicrob Chemother. 2016;71(11):3058‑61.

24. Agersø Y, Torpdahl M, Zachariasen C, Seyfarth A, Hammerum AM, Nielsen EM. Tentative colistin epidemiological cut-off value for Salmonella spp. Foodborne Pathog Dis. avr 2012;9(4):367‑9.

25. Stein A, Raoult D. Colistin: an antimicrobial for the 21st century? Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 oct 2002;35(7):901‑2.

26. Beringer P. The clinical use of colistin in patients with cystic fibrosis. Curr Opin Pulm Med. nov 2001;7(6):434‑40.

27. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet Infect Dis. sept 2006;6(9):589‑601.

28. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). RAPID RISK ASSESSMENT - Plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae. 2016. [Internet]. Disponible sur : https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/enterobacteriaceae-risk-assessment-diseases-caused-by-antimicrobial-resistant-microorganisms-europe-june-2016.pdf

29. Vardakas KZ, Voulgaris GL, Samonis G, Falagas ME. Inhaled colistin monotherapy for respiratory tract infections in adults without cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. Int J Antimicrob Agents. janv 2018;51(1):1‑9.

30. European Centre for Disease Prvention and Control (ECDC). Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union. 2015 nov. [Internet].

31. Hanulík V, Suchánková H, Urbánek K, Imwensi P, Htoutou Sedláková M, Vojtová V, et al. [Effect of colistin consumption and prevalence of colistin-resistant bacteria]. Klin Mikrobiol Infekcni Lek. juin 2013;19(2):52‑5.

32. Mezghani Maalej S, Rekik Meziou M, Mahjoubi F, Hammami A. Epidemiological study of Enterobacteriaceae resistance to colistin in Sfax (Tunisia). Médecine Mal Infect. juin 2012;42(6):256‑63.

33. Mammina C, Bonura C, Di Bernardo F, Aleo A, Fasciana T, Sodano C, et al. Ongoing spread of colistin-resistant Klebsiella pneumoniae in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 16 août 2012;17(33).

34. Arduino SM, Quiroga MP, Ramírez MS, Merkier AK, Errecalde L, Di Martino A, et al. Transposons and integrons in colistin-resistant clones of Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter baumannii with epidemic or sporadic behaviour. J Med Microbiol. oct 2012;61(Pt 10):1417‑20.

35. Johansen HK, Moskowitz SM, Ciofu O, Pressler T, Høiby N. Spread of colistin resistant non-mucoid Pseudomonas aeruginosa among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc. sept 2008;7(5):391‑7.

36. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. 2017 nov. [Internet].

37. Zagorianou A, Sianou E, Iosifidis E, Dimou V, Protonotariou E, Miyakis S, et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 16 févr 2012;17(7).

38. Giani T, Arena F, Vaggelli G, Conte V, Chiarelli A, Henrici De Angelis L, et al. Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing

Klebsiella pneumoniae Traced to Clonal Expansion of an mgrB Deletion Mutant. J Clin Microbiol. oct 2015;53(10):3341‑4.

39. Monaco M, Giani T, Raffone M, Arena F, Garcia-Fernandez A, Pollini S, et al. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 23 oct 2014;19(42).

40. Tumbarello M, Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Giacobbe DR, Bassetti M, et al. Infections caused by KPC-producing Klebsiella pneumoniae: differences in therapy and mortality in a multicentre study. J Antimicrob Chemother. juill 2015;70(7):2133‑43.

41. Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledandri M, Ballardini M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection accounts for an excess of mortality. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. janv 2013;19(1):E23‑30.

42. Jayol A, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. National survey of colistin resistance among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and outbreak caused by colistin-resistant OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae, France, 2014. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 15 sept 2016;21(37).

43. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Most frequently isolated microorganisms in HAIs (all HAI types) in acute care hospitals in EU/EEA. 2011 2012. [Internet].

44. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol. 2014;5:643.

45. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an « old » class of antibiotics. Future Microbiol. juin 2013;8(6):711‑24.

46. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Poirel L. Heteroresistance to colistin in Klebsiella pneumoniae associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. Antimicrob Agents Chemother. mai 2015;59(5):2780‑4.

47. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Albertí S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun. déc 2004;72(12):7107‑14.

48. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother. janv 2010;54(1):177‑83.

49. Lee J-Y, Choi M-J, Choi HJ, Ko KS. Preservation of Acquired Colistin Resistance in Gram-Negative Bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(1):609‑12.

50. Beceiro A, Moreno A, Fernández N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, et al. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(1):518‑26.

51. Pournaras S, Poulou A, Dafopoulou K, Chabane YN, Kristo I, Makris D, et al. Growth retardation, reduced invasiveness, and impaired colistin-mediated cell death associated with colistin resistance development in Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(2):828‑32.

52. Choi M-J, Ko KS. Loss of hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin-resistant Klebsiella pneumoniae sequence type 23 strains. Antimicrob Agents Chemother. nov 2015;59(11):6763‑73.

53. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. févr 2016;16(2):161‑8.

54. Hasman H, Hammerum AM, Hansen F, Hendriksen RS, Olesen B, Agersø Y, et al. Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant Escherichia coli isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2015;20(49).

55. Haut conseil de la Santé Publique (HCSP). Avis le 27 septembre 2016 relatif aux mesures à prendre par les établissements de santé en lien avec l'émergence d'une résistance plasmidique à la colistine (*mcr-1*) chez les entérobactéries. [Internet]. Disponible sur : https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=576

56. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr 1 gene): three months later, the story unfolds. Eurosurveillance 3 mars 2016;21(9).

57. Perrin-Guyomard A, Bruneau M, Houée P, Deleurme K, Legrandois P, Poirier C, et al. Prevalence of mcr-1 in commensal Escherichia coli from French livestock, 2007 to 2014. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2016;21(6).

58. Baron S, Hadjadj L, Rolain J-M, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. Int J Antimicrob Agents. déc 2016;48(6):583‑91.

59. Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. Early emergence of mcr-1 in Escherichia coli from food-producing animals. Lancet Infect Dis. mars 2016;16(3):293.

60. Haenni M, Poirel L, Kieffer N, Châtre P, Saras E, Métayer V, et al. Co-occurrence of extended spectrum β lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. Lancet Infect Dis. mars 2016;16(3):281‑2.

61. Nordmann P, Poirel L. Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. mai 2016;22(5):398‑400.

62. Jean-Claude P. Antibiotic resistance: the emergence of plasmid-mediated colistin resistance enhances the need of a proactive one-health approach. van Vliet A, éditeur. FEMS Microbiol Lett. mars 2016;363(5):fnw034.

63. Paterson DL, Harris PNA. Colistin resistance: a major breach in our last line of defence. Lancet Infect Dis. févr 2016;16(2):132‑3.

64. Kusumoto M, Ogura Y, Gotoh Y, Iwata T, Hayashi T, Akiba M. Colistin-Resistant mcr-1-Positive Pathogenic Escherichia coli in Swine, Japan, 2007−2014. Emerg Infect Dis. juill 2016;22(7):1315‑7.

65. Castanheira M, Griffin MA, Deshpande LM, Mendes RE, Jones RN, Flamm RK. Detection of mcr-1 among Escherichia coli Clinical Isolates Collected Worldwide as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in 2014 and 2015. Antimicrob Agents Chemother. sept 2016;60(9):5623‑4.

66. Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Thanh D, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of Escherichia coli. Lancet Infect Dis. mars 2016;16(3):281.

67. Falgenhauer L, Waezsada S-E, Gwozdzinski K, Ghosh H, Doijad S, Bunk B, et al. Chromosomal Locations of mcr-1 and bla CTX-M-15 in Fluoroquinolone-Resistant Escherichia coli ST410. Emerg Infect Dis. 2016;22(9):1689‑91.

68. Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP). Avis le 06 décembre 2016 relatif au diagnostic microbiologique des entérobactéries productrices de carbapénémases ou résistantes à la colistine renfermant le gène *mcr-1*. [Internet].

69. Du H, Chen L, Tang Y-W, Kreiswirth BN. Emergence of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Lancet Infect Dis. mars 2016;16(3):287‑8.

70. Delgado-Blas JF, Ovejero CM, Abadia-Patiño L, Gonzalez-Zorn B. Coexistence of mcr-1 and blaNDM-1 in Escherichia coli from Venezuela. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(10):6356‑8.

71. Falgenhauer L, Waezsada S-E, Yao Y, Imirzalioglu C, Käsbohrer A, Roesler U, et al. Colistin resistance gene mcr-1 in extended-spectrum β-lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. Lancet Infect Dis. mars 2016;16(3):282‑3.

72. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, Fortunato S, et al. mcr-1.2, a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Strain of Sequence Type 512. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(9):5612‑5.

73. Xavier BB, Lammens C, Ruhal R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 7 juill 2016;21(27).

74. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, et al. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. Bush K, éditeur. mBio. 5 juill 2017;8(3):e00543-17.

75. Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in Salmonella and Escherichia coli, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 3 août 2017;22(31).

76. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B. J Antimicrob Chemother. 1 déc 2017;72(12):3317‑24.

77. Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP). Avis le 23 mai 2017 en complément d'information aux mesures de maîtrise de la diffusion recommandées dans l'avis du HCSP du 27 septembre 2016 au regard de l'émergence d'une résistance plasmidique à la colistine (*mcr-1*) chez les entérobactéries. [Internet].

78. Haut Conseil de la santé publique (HCSP). Avis du 10 juillet 2013 relatif à la prévention de la transmission croisée des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe). [Internet].

79. Société française d'hygiène hospitalière (SF2H). Recommandations 2009 « Prévention de la transmission croisée : Précautions complémentaires contact ». [Internet].

80. Quentin-Noury C. Automatisation de l'antibiogramme au laboratoire de bactériologie. Rev Francoph Lab. mai 2016;2016(482):49‑59.

81. Humphries RM. Susceptibility Testing of the Polymyxins: Where Are We Now? Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther. janv 2015;35(1):22‑7.

82. Sader HS, Rhomberg PR, Flamm RK, Jones RN. Use of a surfactant (polysorbate 80) to improve MIC susceptibility testing results for polymyxin B and colistin. Diagn Microbiol Infect Dis. déc 2012;74(4):412‑4.

83. Albur M, Noel A, Bowker K, MacGowan A. Colistin susceptibility testing: time for a review. J Antimicrob Chemother. 1 mai 2014;69(5):1432‑4.

84. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. J Clin Microbiol. 1 janv 2001;39(1):183‑90.

85. Barry AL. The antimicrobic susceptibility test: principles and practices. Philadelphia: Lea & Febiger; 1976. 236 p.

86. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC Variability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. J Clin Microbiol. 1 juin 2013;51(6):1678‑84.

87. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, et al. Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter baumannii Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother. août 2015;59(8):4625‑30.

88. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. Mars 2016 [Internet]. Disponible sur : http://www.eucast.org

89. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2017. V1.0 Mars. [Internet].

90. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for Escherichia coli , Klebsiella pneumoniae , Pseudomonas aeruginosa , and Acinetobacter spp. Clin Microbiol Infect. 2018 Aug;24(8):865-870.

91. Vourli S, Dafopoulou K, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 1 sept 2017;72(9):2528‑30.

92. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2013. Juin. [Internet].

93. Observatoire Nationale de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA). Recommandations méthodologiques pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques dans les laboratoires de microbiologie [Internet]. Disponible sur : www.cpias.fr/nosobase/recommandations/onerba/2000_anribiotiques_ONERBA.pdf

94. Saly M, Jayol A, Poirel L, Megraud F, Nordmann P, Dubois V. Prevalence of faecal carriage of colistin-resistant Gram-negative rods in a university hospital in western France, 2016. J Med Microbiol. 1 juin 2017;66(6):842‑3.

95. Jayol A, Nordmann P, André C, Poirel L, Dubois V. Evaluation of three broth microdilution systems to determine colistin susceptibility of Gram-negative bacilli. J Antimicrob Chemother. 1 mai 2018;73(5):1272‑8.

96. Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, et al. Silent dissemination of colistin-resistant Escherichia coli in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 28 avr 2016;21(17).

97. Chew KL, La M-V, Lin RTP, Teo JWP. Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and *mcr* -Positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. Munson E, éditeur. J Clin Microbiol. sept 2017;55(9):2609‑16.

98. Karvanen M, Malmberg C, Lagerbäck P, Friberg LE, Cars O. Colistin Is Extensively Lost during Standard In Vitro Experimental Conditions. Antimicrob Agents Chemother. nov 2017;61(11).

99. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. A Universal Culture Medium for Screening Polymyxin-Resistant Gram-Negative Isolates. Forbes BA, éditeur. J Clin Microbiol. mai 2016;54(5):1395‑9.

100. Jayol A, Poirel L, André C, Dubois V, Nordmann P. Detection of colistin-resistant Gram-negative rods by using the SuperPolymyxin medium. Diagn Microbiol Infect Dis. mai 2018 [cité 26 juill 2018];

101. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. juin 2016;22(6):1038‑43.

102. Poirel L, Larpin Y, Dobias J, Stephan R, Decousser J-W, Madec J-Y, et al. Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the mcr-1/mcr-2 genes. Diagn Microbiol Infect Dis. janv 2018;90(1):7‑10.

103. Jayol A, Dubois V, Poirel L, Nordmann P. Rapid Detection of Polymyxin-Resistant Enterobacteriaceae from Blood Cultures. J Clin Microbiol. 2016;54(9):2273‑7.

104. Volland H. A multicentric validation of a rapid detection test for mcr-1 producing bacteria. 2018 Avril; ECCMID 2018.

105. Dortet L. Rapid detection and discrimination of plasmid- and chromosome-mediated resistance to polymyxins in Enterobacteriaceae using MALDI-TOF. 2017 Avril; ECCMID 2017.

106. Wang X, Liu Y, Qi X, Wang R, Jin L, Zhao M, et al. Molecular epidemiology of colistin-resistant Enterobacteriaceae in inpatient and avian isolates from China: high prevalence of mcr-negative Klebsiella pneumoniae. Int J Antimicrob Agents. oct 2017;50(4):536‑41.

107. Wise MG, Estabrook MA, Sahm DF, Stone GG, Kazmierczak KM. Prevalence of mcr-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. PloS One. 2018;13(4):e0195281.

108. Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques - Rapport d’activité 2017 [Internet]. Disponible sur : www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Rapport_CNR_2017_VF.pdf

109. Kontopoulou K, Protonotariou E, Vasilakos K, Kriti M, Koteli A, Antoniadou E, et al. Hospital outbreak caused by Klebsiella pneumoniae producing KPC-2 β-lactamase resistant to colistin. J Hosp Infect. sept 2010;76(1):70‑3.

110. Tóth A, Damjanova I, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, et al. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae ST258 clone in Hungary. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. juill 2010;29(7):765‑9.

111. Antonelli A, D'Andrea MM, Giani T, Rossolini GM. Plasmid-mediated or chromosomally mediated colistin resistance in Klebsiella pneumoniae? Lancet Infect Dis. 2017;17(1):26‑7.

112. Jayol A, Nordmann P, Desroches M, Decousser J-W, Poirel L. Acquisition of Broad-Spectrum Cephalosporin Resistance Leading to Colistin Resistance in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(5):3199‑201.

113. Quan J, Li X, Chen Y, Jiang Y, Zhou Z, Zhang H, et al. Prevalence of mcr-1 in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae recovered from bloodstream infections in China: a multicentre longitudinal study. Lancet Infect Dis. avr 2017;17(4):400‑10.

114. Tietgen M, Semmler T, Riedel-Christ S, Kempf VAJ, Molinaro A, Ewers C, et al. Impact of the colistin resistance gene mcr-1 on bacterial fitness. Int J Antimicrob Agents. avr 2018;51(4):554‑61.

115. Hayakawa K, Marchaim D, Divine GW, Pogue JM, Kumar S, Lephart P, et al. Growing prevalence of Providencia stuartii associated with the increased usage of colistin at a tertiary health care center. Int J Infect Dis. sept 2012;16(9):e646‑8.

116. Samonis G, Korbila IP, Maraki S, Michailidou I, Vardakas KZ, Kofteridis D, et al. Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin Enterobacteriaceae and association with colistin use in a tertiary hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. sept 2014;33(9):1505‑10.

117. European Medicines Agency (EMA). Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union : development of resistance and possible impact on human and animal health. Mai 2016. [Internet].

118. Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, et al. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? Int J Antimicrob Agents. nov 2013;42(5):379‑83.

119. Avis de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la saisine n°2016-SA-0160 concernant l'utilisation de la colistine en médecine vétérinaire (Anses). Octobre 2016. [Internet].

120. Zhang P, Shen Z, Zhang C, Song L, Wang B, Shang J, et al. Surveillance of antimicrobial resistance among Escherichia coli from chicken and swine, China, 2008-2015. Vet Microbiol. mai 2017;203:49‑55.

121. Walsh TR, Wu Y. China bans colistin as a feed additive for animals. Lancet Infect Dis. oct 2016;16(10):1102‑3.

122. Silvestri L, de la Cal MA, van Saene HKF. Selective decontamination of the digestive tract: the mechanism of action is control of gut overgrowth. Intensive Care Med. nov 2012;38(11):1738‑50.

123. Kesecioglu J, Eggimann P. What is new in selective decontamination of the digestive tract? Intensive Care Med. août 2016;42(8):1270‑5.

124. Haenni M, Métayer V, Gay E, Madec J-Y. Increasing Trends in mcr-1 Prevalence among Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Escherichia coli Isolates from French Calves despite Decreasing Exposure to Colistin. Antimicrob Agents Chemother. oct 2016;60(10):6433‑4.

125. Lei L, Wang Y, Schwarz S, Walsh TR, Ou Y, Wu Y, et al. mcr-1 in Enterobacteriaceae from Companion Animals, Beijing, China, 2012–2016. Emerg Infect Dis. avr 2017;23(4):710‑1.

126. Olaitan AO, Thongmalayvong B, Akkhavong K, Somphavong S, Paboriboune P, Khounsy S, et al. Clonal transmission of a colistin-resistant Escherichia coli from a domesticated pig to a human in Laos. J Antimicrob Chemother. déc 2015;70(12):3402‑4.

127. Hu Y, Liu F, Lin IYC, Gao GF, Zhu B. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. Lancet Infect Dis. févr 2016;16(2):146‑7.

128. Zhi C, Lv L, Yu L-F, Doi Y, Liu J-H. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. Lancet Infect Dis. mars 2016;16(3):292‑3.

129. Zhang R, Huang Y, Chan EW, Zhou H, Chen S. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. Lancet Infect Dis. mars 2016;16(3):291‑2.

130. Lentz SA, de Lima-Morales D, Cuppertino VM, Nunes L de S, da Motta AS, Zavascki AP, et al. Letter to the editor: Escherichia coli harbouring mcr-1 gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 30 2016;21(26).

131. Ovejero CM, Delgado-Blas JF, Calero-Caceres W, Muniesa M, Gonzalez-Zorn B. Spread of mcr-1-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. J Antimicrob Chemother. 01 2017;72(4):1050‑3.

132. Zurfuh K, Poirel L, Nordmann P, Nüesch-Inderbinen M, Hächler H, Stephan R. Occurrence of the Plasmid-Borne mcr-1 Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. Antimicrob Agents Chemother. avr 2016;60(4):2594‑5.

133. Vaara M, Vaara T, Vingsbo Lundberg C. Polymyxin derivatives NAB739 and NAB815 are more effective than polymyxin B in murine Escherichia coli pyelonephritis. J Antimicrob Chemother. 1 févr 2018;73(2):452‑5.

134. Gordon NC, Png K, Wareham DW. Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. déc 2010;54(12):5316‑22.

135. Petrosillo N, Ioannidou E, Falagas ME. Colistin monotherapy vs. combination therapy: evidence from microbiological, animal and clinical studies. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. sept 2008;14(9):816‑27.

136. Brennan-Krohn T, Pironti A, Kirby JE. Synergistic Activity of Colistin-Containing Combinations against Colistin-Resistant Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 30 juill 2018;

137. Al Atya AK, Abriouel H, Kempf I, Jouy E, Auclair E, Vachée A, et al. Effects of Colistin and Bacteriocins Combinations on the In Vitro Growth of Escherichia coli Strains from Swine Origin. Probiotics Antimicrob Proteins. déc 2016;8(4):183‑90.

138. Zhou Y, Wang T, Guo Y, Liu S, Wang J, Shen Y, et al. In Vitro/Vivo Activity of Potential MCR-1 Inhibitor in Combination With Colistin Againsts mcr-1-Positive Klebsiella pneumonia. Front Microbiol. 2018;9:1615.

ANNEXE 1 : **FEUILLES DE TRAVAIL : SENSITITRE CUSTOM PLATE FORMAT** ***(Plate Code : FRCOL)***

Numéro de lot de la plaque : _____ Date de la plaque : ___/___/___

Patient A : _____ N° souche : _____
CMI COL Vitek/E-test : ___ CMI COL Sensititre : ___
Patient B : _____ N° souche : _____
CMI COL Vitek/E-test : ___ CMI COL Sensititre : ___
Patient C : _____ N° souche : _____
CMI COL Vitek/E-test : ___ CMI COL Sensititre : ___
Patient D : _____ N° souche : _____
CMI COL Vitek/E-test : ___ CMI COL Sensititre : ___
Patient E : _____ N° souche : _____
CMI COL Vitek/E-test : ___ CMI COL Sensititre : ___
Patient F : _____ N° souche : _____
CMI COL Vitek/E-test : ___ CMI COL Sensititre : ___
Patient G : _____ N° souche : _____
CMI COL Vitek/E-test : ___ CMI COL Sensititre : ___
Patient H : _____ N° souche : _____
CMI COL Vitek/E-test : ___ CMI COL Sensititre : ___

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
B	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
C	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
D	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
E	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
F	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
G	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON
H	COL 0.12	COL 0.25	COL 0.5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	COL 32	COL 64	COL 128	POS CON

Faculté de Pharmacie
de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
http://pharmacie.univ-lille2.fr/

Université de Lille

11 JUIL.

DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : ...COUSINE...Anne-Gaëlle.....INE : 090204049774...

Date, heure et lieu de soutenance : 28/09/2018

Le 28 / 09 / 2018 (jour / mois / année) à 18...h15... Amphithéâtre ou salle : Pauling.....

Avis du conseiller (directeur) de thèse
Nom : ...VACHEE..... Prénom : ...Anne.....

☒ Favorable

☐ Défavorable

Motif de l'avis défavorable :.....

.....

.....

Date : 16/5/17
Signature:

Avis du Président de Jury
Nom : ..FOLIGNE..... Prénom : ..Benoît.....

☒ Favorable

☐ Défavorable

Motif de l'avis défavorable :.....

.....

.....

Date : 23/5/18
Signature: B. Foligné

Décision de Monsieur le Doyen

☒ Favorable

☐ Défavorable

Le Doyen
D. DÉCAUDIN

NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

NAV 2018

Université de Lille 2
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2017/2018

Nom : CAUCHIE
Prénom : Anne-Gaëlle

Titre de la thèse : Résistance des entérobactéries à la colistine : évaluation d'une méthode de CMI en microdilution, prévalence des souches *mcr-1* et description de la population.

Mots-clés : Colistine ; Entérobactéries ; Sensibilité ; *mcr-1*

Résumé : Ces dernières années, les EPC représentent un risque croissant en clinique. La colistine, un antibiotique dit d'ancienne génération mais dont l'intérêt thérapeutique a été redémontré, est l'un des rares antibiotiques encore actif sur ces souches. En 2015, la toute première résistance plasmidique *mcr-1* a été découverte. Son émergence et sa diffusion représentent un problème majeur de santé publique en raison notamment du risque accru de mortalité. Cette résistance, hautement transférable, reste rare chez l'homme et cela justifie la nécessité de savoir la détecter afin de limiter sa diffusion. Les tests de sensibilité sont techniquement difficiles et seule la méthode de microdilution en milieu liquide est recommandée. L'objectif de cette étude est d'évaluer la performance d'une technique de microdilution en milieu liquide (Sensititre®, Thermo Fischer) et d'étudier la prévalence des souches *mcr-1*.
De janvier 2016 à octobre 2017, 121 souches d'entérobactéries ont été étudiées dont 95 sont résistantes à la colistine (en méthode VITEK 2® ou E-test®), incluant 5 EPC. Le taux de corrélation des CMI entre les techniques est de 96,6%. Parmi les souches confirmées résistantes, 76% sont des *K. pneumoniae*. En revanche, concernant la résistance associée à *mcr-1*, *E. coli* représente l'espèce prédominante (33% parmi l'ensemble des souches résistantes d'*E. coli* contre 10% pour *K. peumoniae*). Aucun cas d'EPC *mcr-1* n'a été observé mais plus de 80% des souches *mcr-1* possédaient également une BLSE.
La détection de la sensibilité à la colistine est complexe du fait de liaisons non-spécifiques, d'apparition de souches hétérorésistantes… De plus, la résistance plasmidique est principalement de bas niveau ce qui rend sa détection difficile et augmente le risque de diffusion. La technique Sensititre® a montré une bonne performance pour la détection des souches résistantes. Cette méthode, facilement utilisable en routine et donnant des résultats en 18-24h peut être applicable au laboratoire. La prévalence de *mcr-1* est faible et la plupart des résistances à la colistine seraient probablement dues à des résistances chromosomiques.

Membres du jury :
Président : Monsieur le Professeur Benoît FOLIGNE, PU Faculté de Pharmacie de Lille
Directeur de thèse : Madame le Docteur Anne VACHEE, PH au CH de Roubaix
Assesseurs : Madame le Professeur Karine FAURE, PU-PH Faculté de Médecine de Lille
Madame le Docteur Caroline LOIEZ, PH au CHU de Lille
Madame le Docteur Dominique DESCAMPS, PH au CH de Béthune