

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 12 Octobre 2018  
Par Mme NADJI Safia**

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

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

---

**Evaluation de méthodes rapides de détection  
du portage digestif des bactéries productrices de  
carbapénémases**

---

**Membres du jury :**

**Président :** Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU  
Université de Lille, CHU de Lille

**Assesseur(s) :** Madame le Docteur Nadine LEMAITRE  
Université de Lille, CHU de Lille

Monsieur le Professeur Saad NSEIR  
Université de Lille, CHU de Lille

Monsieur le Docteur Nourredine LOUKILI  
CHU de Lille

Madame le Docteur Anne VACHEE  
CH de Roubaix





## Faculté de Pharmacie de Lille

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 FRANJIE
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.	COURTECUISSÉ	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.	SERGHÉRAERT	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

***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.**

# Remerciements

A mon président de jury :

**Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU**

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et je vous en remercie. Je vous suis également reconnaissante pour la qualité de votre enseignement durant les études pharmaceutiques et pour votre disponibilité. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mon plus grand respect.

A mes juges :

**Monsieur le Professeur Saad NSEIR**

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Recevez ici le témoignage de mon profond respect et de toute ma considération.

**Monsieur le Docteur Nourredine LOUKILI**

Vous avez accepté avec bienveillance d'évaluer cette thèse. Merci pour votre aide au cours de ce travail. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

**Madame le Docteur Anne VACHEE**

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Je vous remercie pour votre présence. Soyez assurée de tout mon respect et de ma gratitude.

A ma directrice de thèse :

**Madame le Docteur Nadine LEMAITRE**

Vous m'avez fait l'honneur d'encadrer ce travail avec disponibilité et bonne humeur. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et pour vos précieux conseils. Votre implication dans ce travail m'a poussée à donner le meilleur de moi-même. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments les plus sincères.

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX.....	8
REVUE DE LA LITTERATURE .....	10
I.  LES B-LACTAMINES .....	10
1.  Historique.....	10
2.  Structures et propriétés.....	11
3.  Mode d'action .....	11
4.  Structure et propriétés des carbapénèmes.....	16
II.  LES CARBAPÉNEMASES.....	18
1.  Classification.....	18
2.  Spectre d'hydrolyse .....	22
3.  Support génétique de la résistance bactérienne.....	25
4.  Epidémiologie des EPC .....	27
III.  LES METHODES DE DEPISTAGE DES EPC.....	32
1.  Recommandations de dépistage .....	32
2.  Méthodes de détection .....	32
a.  Méthodes phénotypiques.....	32
Tests colorimétriques.....	33
Spectrométrie de masse.....	33
Tests immunochromatographiques .....	33
b.  Méthodes génotypiques.....	34
OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	35
MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	36
1.  Patients et écouvillons rectaux .....	36
2.  Méthode de référence par culture et test de sensibilité aux antibiotiques .....	37
3.  Détection directe des EPC par PCR Amplidiag® avec le kit CarbaR+VRE.....	37
4.  Détection des EPC par technique ICT Resist-3 O.K.N. K-SeT®.....	39
5.  Analyse statistique .....	40
6.  Analyse des discordances .....	40
RESULTATS.....	41
1.  Répartition des écouvillons et des carbapénémases selon les services cliniques ...	41
2.  Performances des méthodes Amplidiag® CarbaR+VRE et ICT Resist-3 O.K.N. K-SeT®.....	42
3.  Coût et délai de rendu du résultat.....	45
DISCUSSION .....	46
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	50
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	51

# LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1 : Chronologie d'introduction de nouvelles $\beta$ -lactamines suite .....	10
Figure 2 : Structure des $\beta$ -lactamines .....	11
Figure 3 : Analogie structurale de la pénicilline avec le dipeptide D-Ala-D-Ala [7] .....	12
Figure 4 : Structure et assemblage du peptidoglycane .....	12
Figure 5 : Schéma de synthèse du peptidoglycane [8] .....	13
Figure 6 : Représentation de la paroi des bactéries à Gram négatif .....	14
Figure 7 : Représentation des 3 classes de PLP [9] .....	14
Figure 8 : Hydrolyse des carbapénèmes par une enzyme de type sérine-transférase (A) et par une métalloenzyme (B) [16] .....	18
Figure 9 : Représentation des différentes mutations du gène bla <sub>NDM-1</sub> au sein du transposon Tn125 à l'origine des variants de NDM [17] .....	20
Figure 10 : Arbre phylogénétique des carbapénémases de classe A, B et D [18] .....	21
Figure 11 : Représentation des transposons Tn 4401 et Tn125 .....	25
Figure 12 : Représentation du transposons Tn1999 [25] .....	26
Figure 13 : Représentation d'un intégron de classe I, contenant bla <sub>VIM</sub> .....	26
Figure 14 : Distribution géographique des carbapénémases .....	28
Figure 15 : Répartition des EPC de 38 pays européens, .....	29
Figure 16 : Evolution des infections à EPC en France de 2009 à 2015 [34] .....	30
Figure 17 : Evolution du nombre de souches EPC adressées au CNR par espèces [36] .....	31
Figure 18 : Test immunochromatographique positif à carbapénémases .....	33
Figure 19 : Algorithme décisionnel proposé pour la détection des bactéries productrices de carbapénémases .....	49
Tableau 1 : Interaction des PLP avec les $\beta$ -lactamines .....	15
Tableau 2 : Relations structure-activité des carbapénèmes .....	16
Tableau 3 : Classification d'ambler simplifiée .....	19
Tableau 4 : Spectre d'hydrolyse des principales carbapénémases .....	22
Tableau 5 : Paramètres cinétiques (Kcat, Km, Kcat/Km) mesurés des carbapénémases KPC <sub>1-3</sub> , NDM <sub>1,4</sub> et OXA-48 .....	24
Tableau 6 : Mélanges contenant les amorces des gènes d'intérêt, ainsi qu'un contrôle interne d'amplification .....	38
Tableau 7 : Variants détectés par le test Resist-3 O.K.N K-set® .....	39
Tableau 8 : Répartition du nombre d'écouvillons rectaux positifs à EPC en milieu chromogène selon la catégorie de services cliniques .....	41
Tableau 9 : Résultats discordants obtenus avec la PCR Amplidiag® CarbaR+VRE .....	43
Tableau 10 : Résultats obtenus avec les méthodes ICT Resist-3 O.K.N. K-set® et Amplidiag® carbaR+VRE .....	43
Tableau 11 : Performances des tests ICT Resist-3 O.K.N. K-set® et PCR Amplidiag® carbaR+VRE comparées à la méthode de référence .....	44

# INTRODUCTION

La résistance des bactéries aux antibiotiques est en constante augmentation et constitue un problème mondial de santé publique.

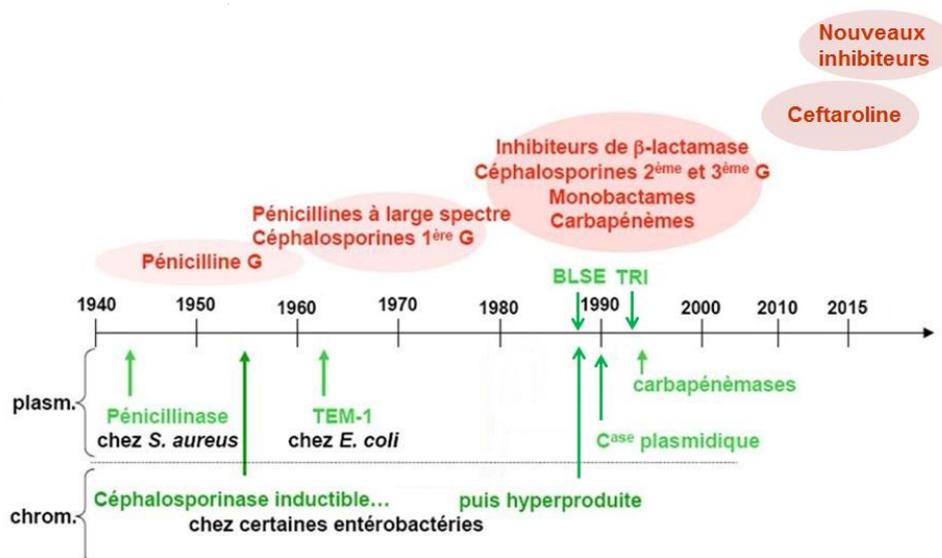
En Février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a établi un classement des principaux pathogènes bactériens résistants aux antibiotiques pour lesquels la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques sont prioritaires en raison du risque d'impasse thérapeutique [1]. Parmi ces pathogènes, les bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes, impliqués aussi bien dans les infections nosocomiales (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp...*) que communautaires (*Escherichia coli*), sont la première priorité. En effet, au cours de ces dix dernières années, l'émergence et la propagation des entérobactéries et, en particulier de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes, sont devenues mondiales [2]. La résistance aux carbapénèmes, antibiotiques considérés comme de dernier recours, est préoccupante du fait de son ampleur dans certains pays et de la vitesse de transmission du mécanisme de résistance (carbapénémase) à différentes espèces bactériennes, via des éléments génétiques mobiles (plasmides, intégrons et transposons). Les bactéries productrices de carbapénémase sont non seulement résistantes aux carbapénèmes mais également, aux autres  $\beta$ -lactamines car le spectre d'hydrolyse des carbapénémases n'est pas limité aux seuls carbapénèmes. De plus, la présence sur les éléments génétiques mobiles de gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques et/ou l'intégration de ces éléments dans des souches ayant déjà acquis des mécanismes de résistance se traduit par un phénotype de multi (MDR) ou d'ultra-résistance (XDR) avec un risque plus élevé de mortalité chez les patients fragilisés (patients de réanimation, transplantés par exemple) en cas d'infection [3]. C'est pourquoi, une des principales mesures pour prévenir la diffusion des souches productrices de carbapénémase repose sur l'identification rapide de leur portage digestif chez les patients asymptomatiques et la mise en isolement de ces patients. L'objectif de ce travail est d'évaluer des méthodes d'identification permettant de détecter, le jour même du dépistage, les entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) car notre hôpital est régulièrement confronté à ces épidémies de souches.

# REVUE DE LA LITTÉRATURE

## I. Les $\beta$ -lactamines

### 1. Historique

La première des  $\beta$ -lactamines, la pénicilline G, fut découverte fortuitement en 1928 par Alexander Fleming en identifiant une moisissure, *Penicillium notatum* contaminant une boîte de culture de *Staphylococcus aureus*. En 1940, la pénicilline G fut purifiée et stabilisée à des fins thérapeutiques. L'émergence de la résistance à la pénicilline G chez *S. aureus*, par production de pénicillinase, stimula la recherche et le développement de nouvelles pénicillines (Méticilline, 1960 ; Oxacilline, 1962). Puis, suite à la diffusion de pénicillinase chez *E. coli* rendant cette espèce résistante aux pénicillines A (amoxicilline, ampicilline) et aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération (Céfalotine, 1962), les pénicillines à large spectre et les céphalosporines avec un spectre étendu aux entérobactéries ont été développées. Au début des années 80, les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (Céfotaxime) et les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase (acide clavulanique) actifs sur les bactéries résistantes aux pénicillines A, céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération et céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération ont été mis sur le marché. Mais, l'émergence des premières  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) et des céphalosporinases hyperproduites rendant les souches résistantes à ces antibiotiques a conduit au développement des carbapénèmes (Imipénème, 1986) [4] (Figure 1). Hélas, les 1<sup>ère</sup> carbapénémases acquises ont été observées dans les années 1990 soit moins de 10 années après la mise sur le marché des carbapénèmes [5].



**Figure 1** : Chronologie d'introduction de nouvelles  $\beta$ -lactamines suite à l'apparition des résistances [6]

## 2. Structures et propriétés

Les  $\beta$ -lactamines constituent une classe d'antibiotiques caractérisée par la présence d'un noyau  $\beta$ -lactame, indispensable à l'activité antibiotique. Il existe plusieurs groupes selon la structure de l'hétérocycle associé au cycle  $\beta$ -lactame (Figure 2).

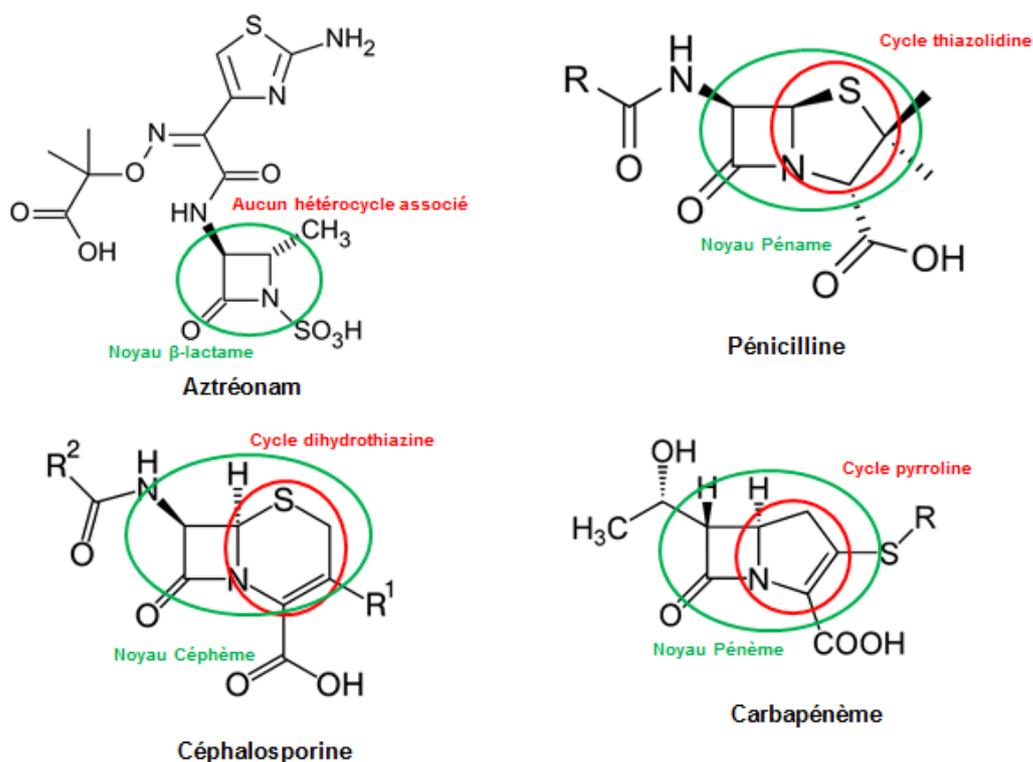
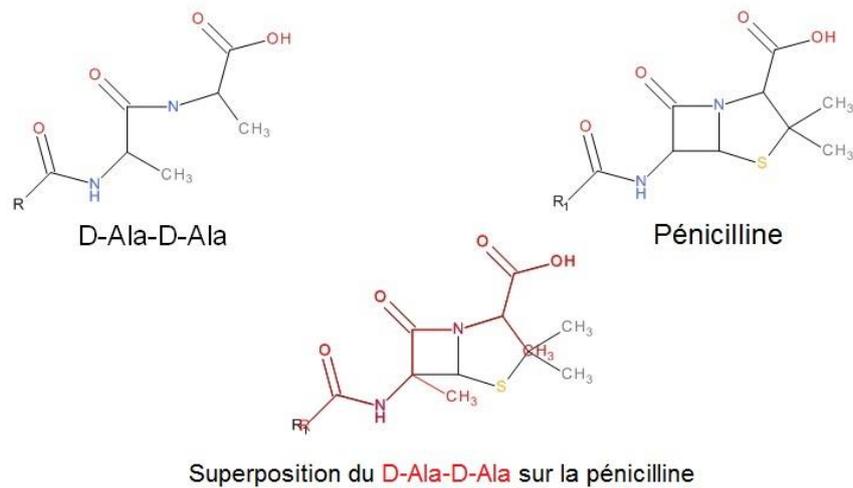


Figure 2 : Structure des  $\beta$ -lactamines

Les différentes substitutions confèrent à la molécule des propriétés pharmacocinétiques et une activité antibactérienne variable. Les différences de structure entre molécules ont pour effet de modifier la diffusion à travers la paroi bactérienne, l'activité antibactérienne, la stabilité à l'hydrolyse, les propriétés pharmacocinétiques et enfin la tolérance des molécules.

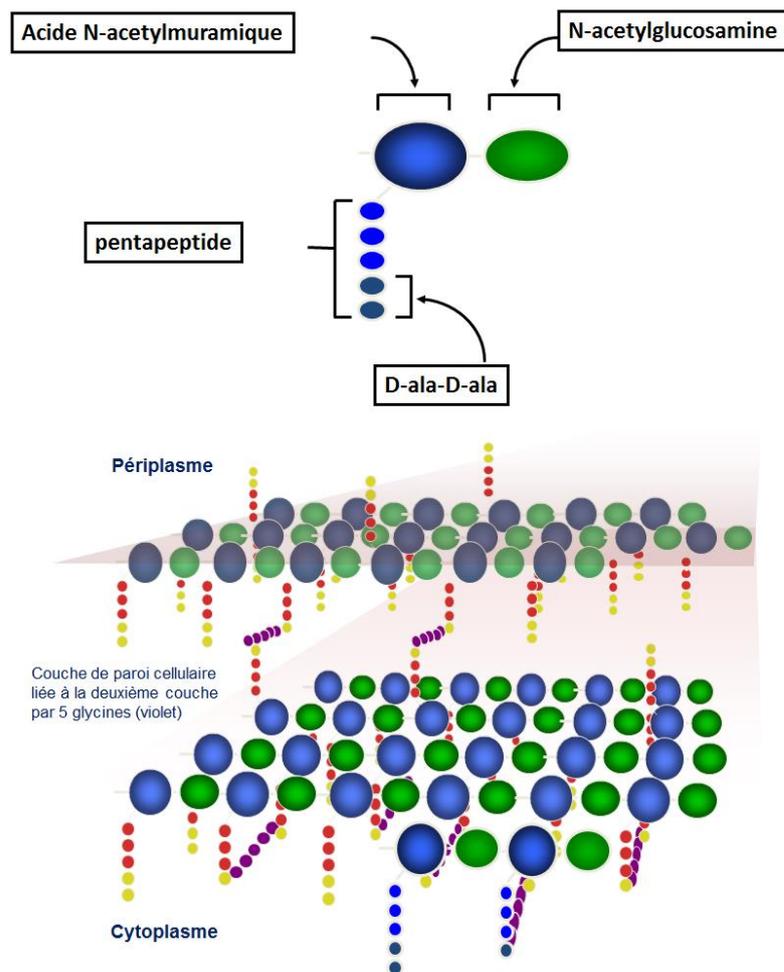
## 3. Mode d'action

Les  $\beta$ -lactamines sont des molécules actives sur la paroi bactérienne, elles se fixent aux protéines liant les pénicillines (PLP) par analogie structurale avec le dipeptide D-Ala-D-Ala et inhibent de façon compétitive l'action des transpeptidases et carboxypeptidases, enzymes de synthèse et de remaniement du peptidoglycane (Figure 3).



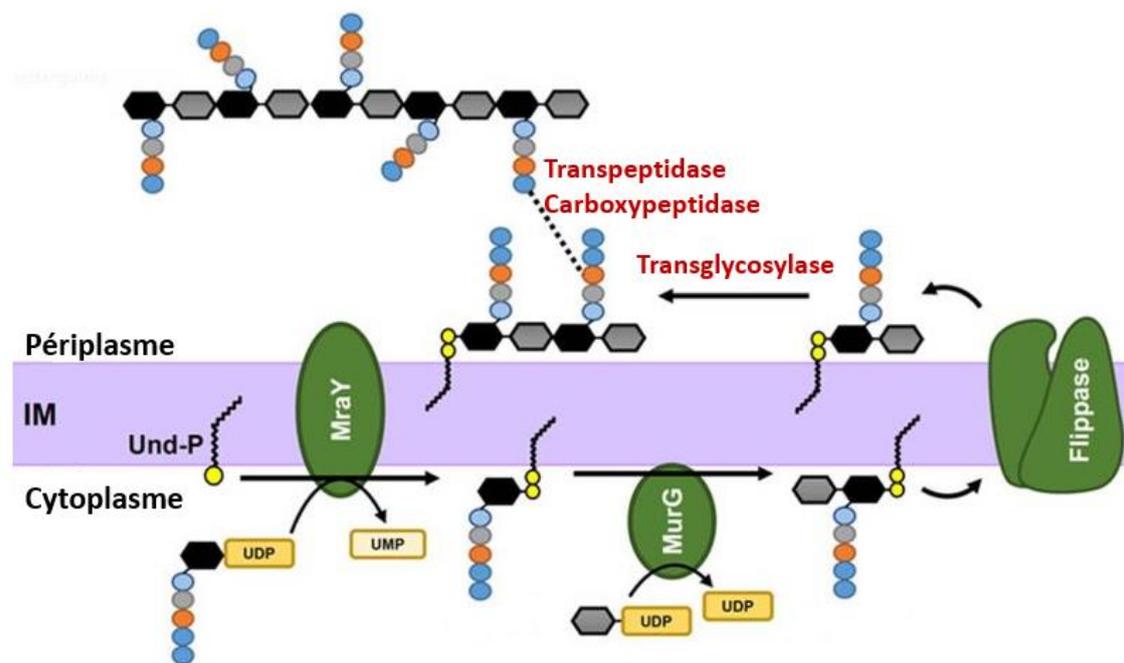
**Figure 3 :** Analogie structurale de la pénicilline avec le dipeptide D-Ala-D-Ala [7]

Le peptidoglycane est un polymère de chaînes polyosiques linéaires alternant des molécules de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Ces chaînes sont assemblées entre elles par de courtes chaînes de pentapeptides qui se terminent par le D-Ala-D-Ala (Figure 4) [4].



**Figure 4 :** Structure et assemblage du peptidoglycane

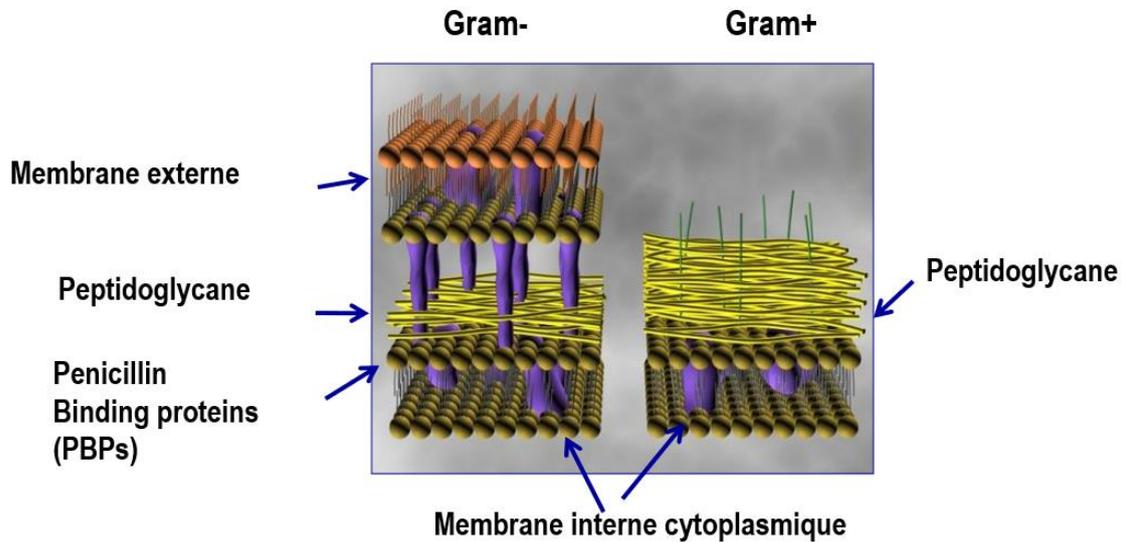
Le précurseur du peptidoglycane (UDP-NAMP) est synthétisé dans le cytoplasme puis traverse la membrane cytoplasmique par un transporteur membranaire et s'associe au NAG. Un disaccharide pentapeptide est obtenu et se lie au peptidoglycane existant. La transglycosylase permet l'ajout du disaccharide pentapeptide à la chaîne polysaccharidique existante. La transpeptidase unit les différentes chaînes entre elles par pontage entre l'avant dernier D-Alanine d'une chaîne et le 3<sup>ème</sup> acide aminé d'une autre chaîne, un m-DAP pour les bactéries à Gram négatif et une lysine chez les bactéries à Gram positif. La carboxypeptidase fait la coupure entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> D-Alanine, régulant ainsi l'épaisseur du peptidoglycane (Figure 5). La transpeptidase et la carboxypeptidase appartiennent à des protéines ancrées dans la membrane cytoplasmique, les protéines liant la pénicilline (PLP ou PBP en anglais), appelées ainsi car cibles des  $\beta$ -lactamines.



**Figure 5** : Schéma de synthèse du peptidoglycane [8]

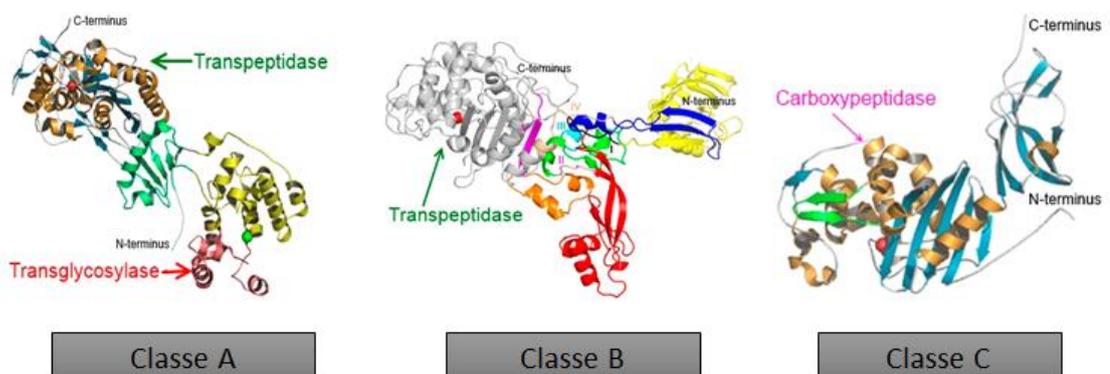
Chez les bactéries à Gram positif, les  $\beta$ -lactamines traversent facilement le peptidoglycane pour atteindre les protéines liant la pénicilline (PLP).

Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe agit comme une barrière hydrophobe et rend plus difficile le passage des  $\beta$ -lactamines (Figure 6). Ce passage se fait à travers les porines pour les molécules hydrophiles, comme c'est le cas pour les  $\beta$ -lactamines.



**Figure 6** : Représentation de la paroi des bactéries à Gram négatif et de la paroi des bactéries à Gram positif

Les PLP sont classées selon leur poids moléculaire et divisées en 3 classes : A, B et C en fonction de leur activité enzymatique (transpeptidase, transglycosylase et carboxypeptidase) (Figure 7). Ces classes sont subdivisées en différents types en fonction de leur poids moléculaire : 1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 [9]. Le nombre (2000 pour *E. coli*, 20 000 pour *S. pneumoniae*) et la nature (7 types pour *E. coli*, 5 types pour *S. pneumoniae*) des PLP varient selon les espèces bactériennes [10].



**Figure 7** : Représentation des 3 classes de PLP [9]

L'affinité des PLP n'est pas la même pour toutes les molécules de  $\beta$ -lactamines et diffère selon l'espèce bactérienne (Tableau 1). Mais l'action d'une  $\beta$ -lactamine varie aussi selon la concentration en antibiotique. Par exemple, à faible concentration les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération inhibent fortement les PLP3, alors qu'à plus forte concentration, elles inhibent préférentiellement les PLP1a et PLP1b.

**Tableau 1** : Interaction des PLP avec les  $\beta$ -lactamines  
chez *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* [4]

PLP	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<b>1a</b>	AMX, <b>IMP</b> , nombreuses céphalosporines (CF, CTX, CRO, FEP)	carboxypénicillines, uréidopénicillines, FEP, CPO, <b>IMP</b>	pénicilline G, pénicilline V, pénicilline M, pénicilline A, CF, CTX, <b>carbapénèmes</b>
<b>1b</b>	AMX, CTX, CRO, FEP	FEP, CPO, MEM	
<b>2</b>	AM, acide clavulanique, CRO, FEP, <b>IMP</b> , <b>MEM</b> , MEC	carboxypénicillines, <b>IMP</b> , <b>MEM</b>	pénicillines G, pénicilline V, pénicilline M, pénicilline A, CF, CTX, <b>carbapénèmes</b>
<b>3</b>	AM, uréidopénicillines, ATM, CRO, CTX, CAZ, FEP	carboxypénicillines, uréidopénicillines, CFS, CAZ, FEP, CPO, <b>carbapénèmes</b>	pénicillines G, pénicilline V, pénicilline M, pénicilline A, CF, <b>carbapénèmes</b>
<b>4</b>	AM, <b>carbapénèmes</b>	<b>IMP</b>	<b>carbapénèmes</b>
<b>5/6</b>	CTX	-	-

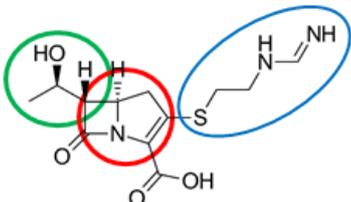
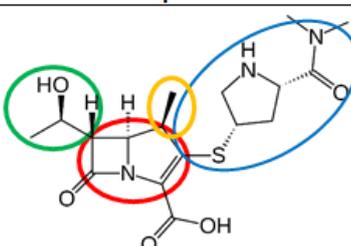
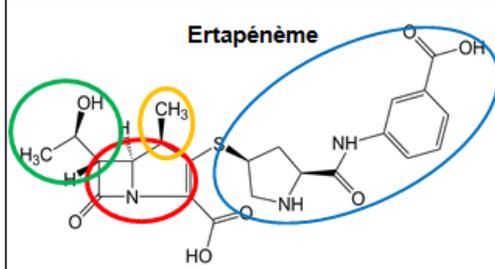
AM: ampicilline, AMX: amoxicilline ATM: aztréonam, CAZ: ceftazidime, CPO: céfpirome, CF: céfalotine, CRO: ceftriaxone, CFS: cefsulodine, CTX: céfotaxime, FEP: céfépime, IMP: imipénème, MEM: méropénème

#### 4. Structure et propriétés des carbapénèmes

Caractérisés par le noyau pénème, ils dérivent de la thiénamycine, produite naturellement par *Streptomyces cattleya*, une bactérie à Gram positif [3]. Le remplacement de l'atome de soufre par un carbone renforce la fixation aux PLP, principalement à la PLP2. Le groupement hydroxyéthyl en position 6 confère une grande stabilité aux  $\beta$ -lactamases y compris celles hydrolysant les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ( $\beta$ -lactamase à spectre étendu et céphalosporinase hyperproduite).

L'imipénème fut le premier carbapénème mis sur le marché en France en 1986. Inactivé par la déhydropeptidase rénale, il est commercialisé en association avec la cilastatine, inhibiteur de cette enzyme. Le méropénème fut la seconde molécule à obtenir son autorisation de mise sur le marché en 1997 suivi de l'ertapénème en 2002 puis, du doripénème en 2008 [11]. Mais, ce dernier a été retiré du marché en 2014. Le méropénème et l'ertapénème contiennent un groupement méthyl en position 1 qui les protège de l'action de la déhydropeptidase rénale (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Relations structure-activité des carbapénèmes

Structure	Fonction	Conséquence
 <p><b>Imipénème</b></p>	<p><b>Noyau pénème</b></p> <p>R1 = groupement hydroxyéthyle</p> <p>R2 = Chaîne thioalcoyle</p>	<p><b>Augmente le spectre antibactérien</b></p> <p>Augmente la stabilité vis-à-vis des <math>\beta</math>-lactamases</p> <p>Renforce l'activité sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>
 <p><b>Méropénème</b></p>	<p><b>Noyau pénème</b></p> <p>R1 = groupement hydroxyéthyle</p> <p>Groupement 1-<math>\beta</math>-méthyl</p> <p>R2 = groupement contenant un cycle pyrrolidine</p>	<p><b>Augmente le spectre antibactérien</b></p> <p>Augmente la stabilité vis-à-vis des <math>\beta</math>-lactamases</p> <p>Protection vis-à-vis de la déhydropeptidase rénale</p> <p>Gain d'activité sur les bacilles à Gram négatifs, en particulier <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>
 <p><b>Ertapénème</b></p>	<p><b>Noyau pénème</b></p> <p>R1 = groupement hydroxyéthyle</p> <p>Groupement 1-<math>\beta</math>-méthyl</p> <p>R2 = groupement contenant un cycle benzoate</p>	<p><b>Augmente le spectre antibactérien</b></p> <p>Augmente la stabilité vis-à-vis des <math>\beta</math>-lactamases</p> <p>Protection vis-à-vis de la déhydropeptidase rénale</p> <p>Modifie la charge et augmente le pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques : responsable d'une demi-vie plus longue et d'un spectre plus étroit</p>

Les différents carbapénèmes ont des spectres d'activité très proches. Ils sont tous actifs sur les bactéries à Gram positif à l'exception des staphylocoques résistants à la méticilline et des entérocoques résistants à l'ampicilline (par faible affinité pour la PLP2a et la PLP5, respectivement) ce qui confère une résistance croisée à toutes les  $\beta$ -lactamines.

Les entérobactéries sont sensibles à tous les carbapénèmes, mais l'imipénème a une activité plus faible que le méropénème. L'ertapénème a un spectre plus étroit et n'inclut pas les bacilles à Gram négatif non fermentants tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *Burkholderia cepacia*. Ceci est dû à la taille, à la charge globale négative de cette molécule et à sa diffusion plus lente à travers la paroi des bacilles à Gram négatif non fermentants. Le méropénème contient un groupement pyrrolidine qui lui confère une meilleure activité sur *Pseudomonas aeruginosa* [12].

Toutefois, certaines espèces de bacilles à Gram négatif non fermentants sont naturellement résistants aux carbapénèmes comme *Stenotrophomonas maltophilia* par production d'une carbapénémase chromosomique Bla<sub>L1/L2</sub>.

Les carbapénèmes sont très actifs également sur les bactéries anaérobies à Gram négatif mais ont une plus faible activité sur *Clostridium spp.*

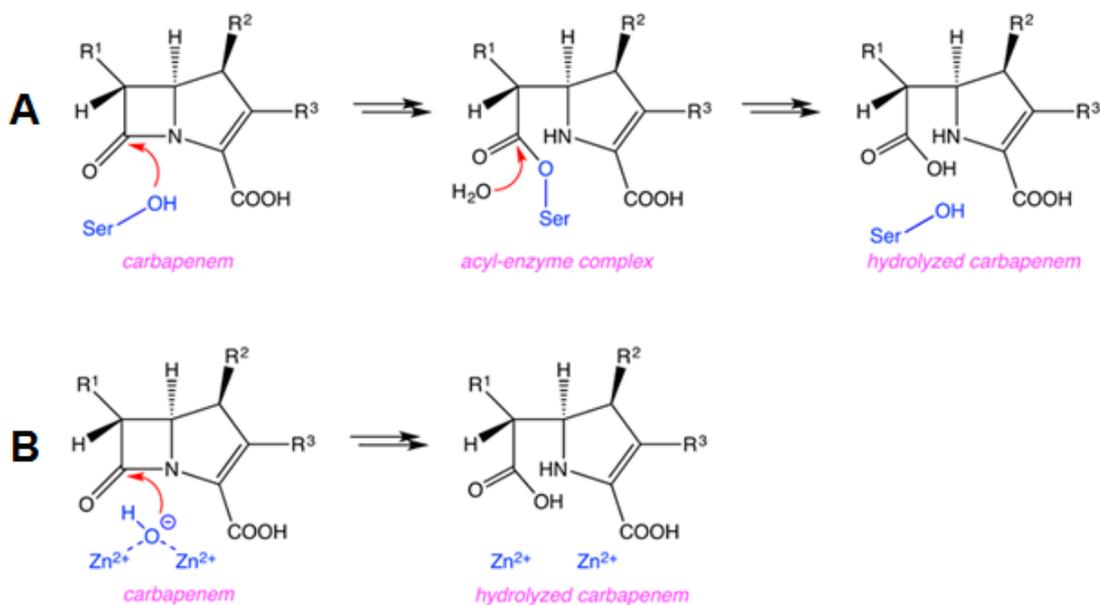
Malgré leur spectre large d'activité, y compris sur les espèces ayant acquis des résistances aux  $\beta$ -lactamines, l'utilisation massive des carbapénèmes est responsable de l'émergence de souches résistantes. Trois principaux mécanismes sont incriminés :

- **Surexpression des pompes à efflux** de nature protéique qui chez les bacilles à Gram négatif sont pour l'essentiel des pompes tri-partites RND destinées à limiter l'accumulation de toxiques. La surexpression des pompes à efflux, liée à des mutations dans les gènes régulateurs, aboutit à un rejet actif de l'antibiotique qui n'est plus en concentration suffisante pour inhiber sa cible. Il en résulte une résistance croisée modérée aux classes d'antibiotiques qui sont les substrats de ces pompes [13].
- **L'imperméabilité par perte de porine** (voie de passage des carbapénèmes à travers la membrane externe des bacilles à Gram négatif).  
Ce mécanisme seul a peu d'impact sur l'activité des carbapénèmes chez les entérobactéries sauf quand il est associé à une  $\beta$ -lactamase de type céphalosporinase ou  $\beta$ -lactamase à spectre étendu [14].
- **L'inactivation enzymatique par des  $\beta$ -lactamases**. C'est le mécanisme actuel le plus préoccupant car il est diffusible du fait d'un support génétique mobile.

## II. Les carbapénémases

### 1. Classification

Les souches ayant acquis une carbapénémase sont définies par le Haut Comité de Santé Publique (HCSP) comme des Bactéries Hautement Résistantes émergentes (BHRE) [15]. Les carbapénémases sont des  $\beta$ -lactamases, enzymes hydrolysant le cycle  $\beta$ -lactame. Cette hydrolyse conduit à l'ouverture du cycle et donc à une molécule plane ne pouvant plus interagir avec la cible (Figure 8).



**Figure 8 :** Hydrolyse des carbapénèmes par une enzyme de type sérine-transférase (A) et par une métalloenzyme (B) [16]

Plusieurs familles de  $\beta$ -lactamases existent ce qui a donné lieu à des **classifications fonctionnelles**, basées sur le phénotype de résistance, les profils de substrats et d'inhibition (classifications de Sawai, Richmond and Sykes, Mathew et Bush-Jacoby-Medeiros) ou des **classifications moléculaires**, basées sur la séquence nucléo-peptidique de l'enzyme (Amblar).

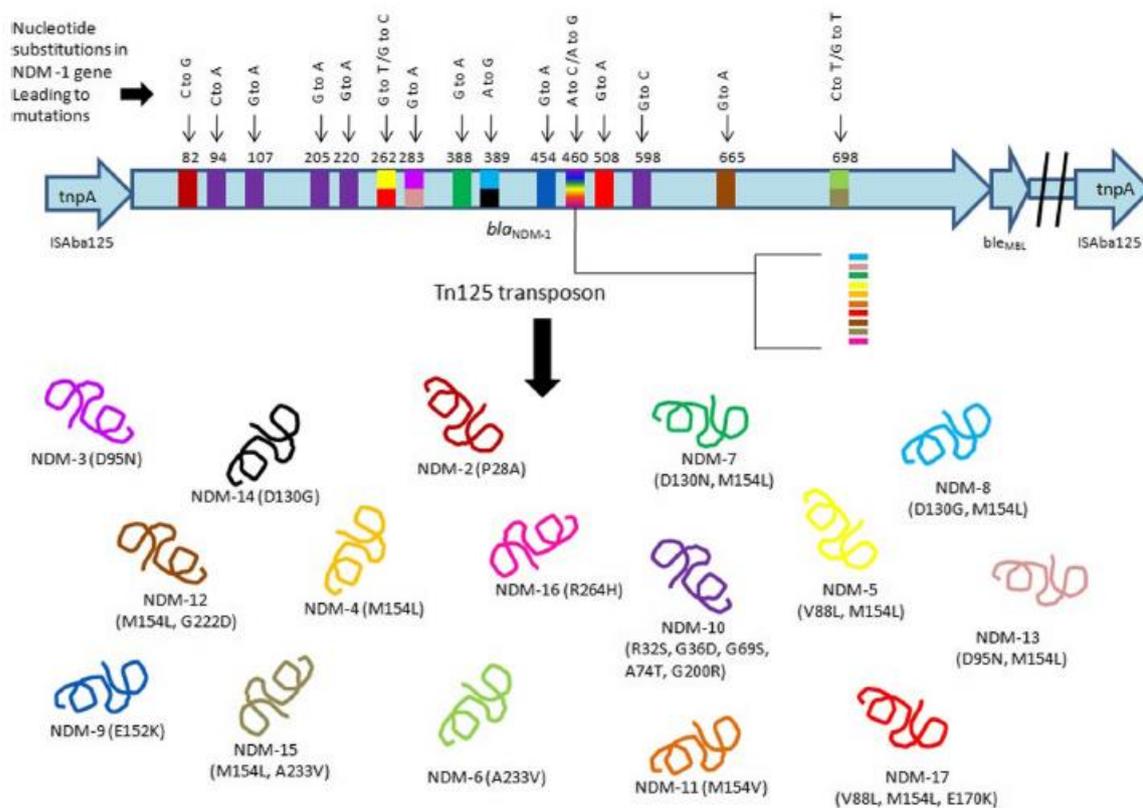
La classification d'Amblar, apparue en 1980, est la plus utilisée (Tableau 3). Elle est basée sur des identités de séquence en acides aminés (en particulier celle du site actif) et définit quatre classes. Les classes A, C et D sont des sérines-transférases alors que la classe B correspond à des métalloenzymes nécessitant un ou plusieurs ion(s) Zinc dans leur site actif. Les carbapénémases sont réparties dans les groupes A, B et D. Au sein des différentes classes de carbapénémases, 5 (dénommées les « big five ») sont fréquemment observées chez les entérobactéries (KPC, NDM, VIM, IMP et OXA-48).

**Tableau 3** : Classification d'Amblar simplifiée

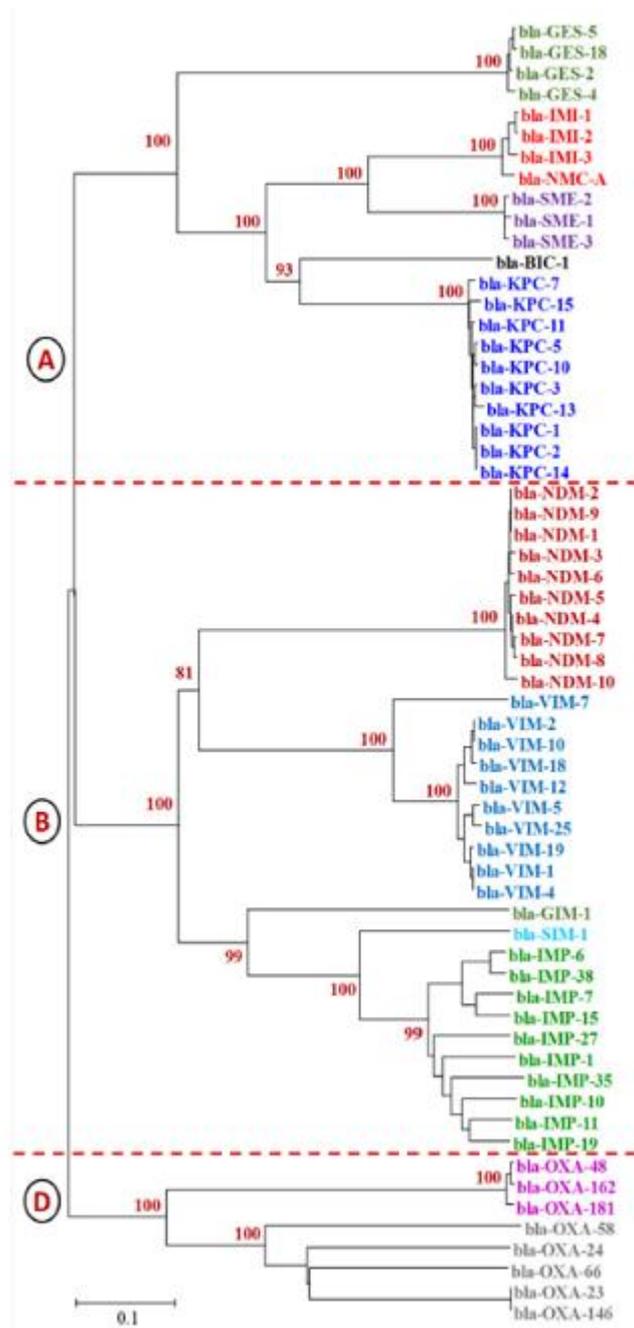
<b>Ambler</b>	<b>Enzymes</b>	<b>Inhibition</b>	<b>Exemple</b>
<b>A</b>	Pénicillinase	Acide clavulanique	TEM, SHV
	BLSE	Acide clavulanique	CTX-M, SHV
	Carbapénémase	Acide clavulanique	GES, KPC, SME, IMI, NMC-A
<b>B</b>	Carbapénémase	EDTA	NDM, VIM, IMP, SIM, GIM
<b>C</b>	Céphalosporinase	Cloxacilline	AmpC
<b>D</b>	Oxacillinase	Ion Cl <sup>-</sup>	OXA-1
	Carbapénémase	Ion Cl <sup>-</sup>	OXA-23, OXA-48

TEM : Temoneira ; SHV :Sulphydryl Variable ; CTX-M : Céfotaximase-Munich ; GES: Guyana Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase; KPC: Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase ; SME: Serratia Marcescens Enzyme ; IMI : Imipenemase ; NCML-A : Non-metallo-carbapenemase A ; NDM : New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase ; VIM : Verona Integron-encoded Metallo- $\beta$ -lactamase ; IMP : Imipenemase Metallo- $\beta$ -lactamase ; SIM: Seoul Imipenemase ; GIM : German Imipenemase ; AmpC: gène codant la céphalosporinase; OXA-1: Oxacillinase de type 1; OXA-23: Oxacillinase de type 23; OXA-48: Oxacillinase de type 48

En France, les trois carbapénémases les plus représentées chez les entérobactéries sont **KPC** pour la classe A, **NDM** pour la classe B et **OXA-48** pour la classe D. Au cours de l'évolution et de la dissémination des carbapénémases, de nouveaux variants de carbapénémases consécutifs à des mutations ponctuelles de la séquence des gènes sont apparus (Figures 9 et 10).



**Figure 9 :** Représentation des différentes mutations du gène *bla*<sub>NDM-1</sub> au sein du transposon Tn125 à l'origine des variants de NDM [17]



**Figure 10** : Arbre phylogénétique des carbapénémases de classe A, B et D [18]

## 2. Spectre d'hydrolyse

Les classes de carbapénémases ont des spectres d'hydrolyse différents vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines. Ces différences d'hydrolyse résultent des variations d'affinité de l'enzyme pour les substrats  $\beta$ -lactamines. En particulier, le niveau de résistance aux carbapénèmes est différent entre les classes de carbapénémase comme le montre le tableau 4 et même entre différents variants d'une même carbapénémase [19].

Ainsi, la classe A hydrolyse les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames.

La classe B a pour particularité d'épargner l'aztréonam alors que la classe D n'hydrolyse pas ou peu les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et de 4<sup>ème</sup> génération et ont une activité carbapénémase plus faible.

**Tableau 4** : Spectre d'hydrolyse des principales carbapénémases des entérobactéries

	Classe A		Classe B	Classe D
	KPC	GES	IMP / NDM / VIM	OXA-48
<b>Pénicilline</b>	+	+	+	+
<b>Aztréonam</b>	+	-	-	-
<b>Céphalosporines de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération</b>	+	+	+	+
<b>Céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération</b>	+	+	+	-
<b>Imipénème</b>	+	+/-	+	+/-
<b>Méropénème</b>	+	+/-	+	+/-
<b>Ertapénème</b>	+	+/-	+	+/-

+ : hydrolyse

- : Pas d'hydrolyse

+/- : hydrolyse variable

Les carbapénémases de type KPC ont classiquement une meilleure affinité pour le méropénème ( $K_{m\text{méropénème}} < K_{m\text{imipénème}}$ ) [20]. Généralement, elles hydrolysent beaucoup plus rapidement le céfotaxime et presque deux fois plus efficacement l'ertapénème et le méropénème que l'imipénème (Tableau 5). Ces paramètres diffèrent selon les variants. Par exemple, KPC-6 a la même efficacité catalytique pour l'imipénème et le méropénème [21]. Les carbapénémases de type NDM hydrolysent très bien les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et les carbapénèmes mais pas l'aztréonam. Mais les paramètres enzymatiques de ces carbapénémases sont, eux aussi, très différents selon les variants. Par exemple, NDM-4 hydrolyse l'imipénème à un niveau plus élevé que NDM-1. De même, l'activité catalytique de NDM-4 est légèrement supérieure à celle de NDM-1 pour le méropénème [22].

L'OXA-48 est la carbapénémase ayant la plus faible activité catalytique vis-à-vis du méropénème et de l'ertapénème ( $K_{cat}/K_m < 1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Néanmoins, elle hydrolyse l'imipénème plus rapidement et plus efficacement que l'ertapénème et le méropénème [23].

Le phénotype de résistance dépend donc des paramètres enzymatiques mais, ils ne permettent pas, seuls, de prédire le spectre d'hydrolyse. Il faut également prendre en compte l'accessibilité à la cible et la quantité d'enzyme produite.

**Tableau 5** : Paramètres cinétiques (Kcat, Km, Kcat/Km) mesurés des carbapénémases KPC<sub>1-3</sub>, NDM<sub>1,4</sub> et OXA-48

Substrat	Imipénème			Méropénème			Ertapénème			Céfotaxime			Aztréonam			Références	
	Kcat	Km	Kcat / Km	Kcat	Km	Kcat / Km	Kcat	Km	Kcat / Km	Kcat	Km	Kcat / Km	Kcat	Km	Kcat / Km		
<b>KPC (variants 1 à 3)</b>	12	80	0,15	3	12	0,25	2,8	10	0,28	14	160	0,087	20	310	0,065	[20], [21]	
<b>NDM</b>	1	64	35	1,8	75	80	0,9	ND	ND	ND	20	14	1,43	NH	NH	NH	[22]
	4	20	94	0.2	12	49	0.2	26	74	0,350	6	10	0.6	NH	NH	NH	
<b>OXA-48</b>	4,8	13	0,37	0,007	11	0,0006	0,13	100	0,0013	>9	>900	0,01	ND	ND	ND	[24]	

Kcat en s<sup>-1</sup>, Km en μM et Kcat/Km en μM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>

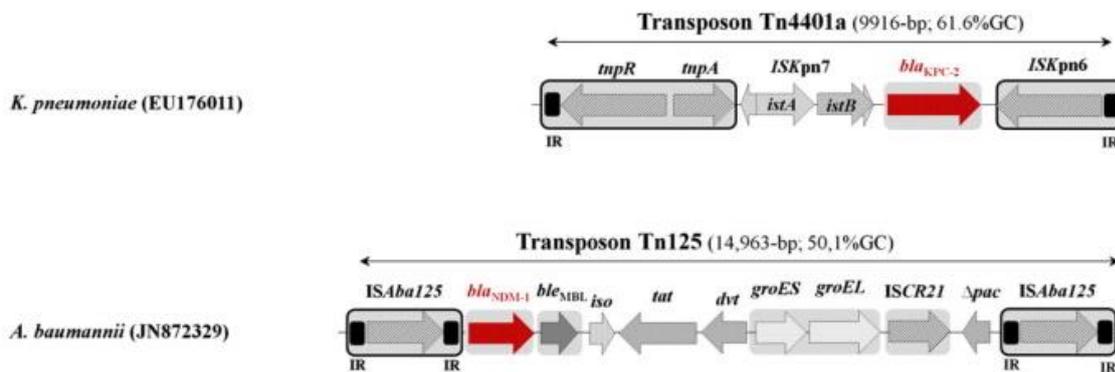
ND : Non déterminé

NH : Non hydrolysé

### 3. Support génétique de la résistance bactérienne

Le support génétique de la résistance acquise aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif comprend 3 éléments génétiques mobiles bactériens : les plasmides, les transposons et les intégrons. Les transposons, eux-même portés sur des plasmides conjugatifs, sont responsables de la transmission de la majorité des carbapénémases produites par les entérobactéries.

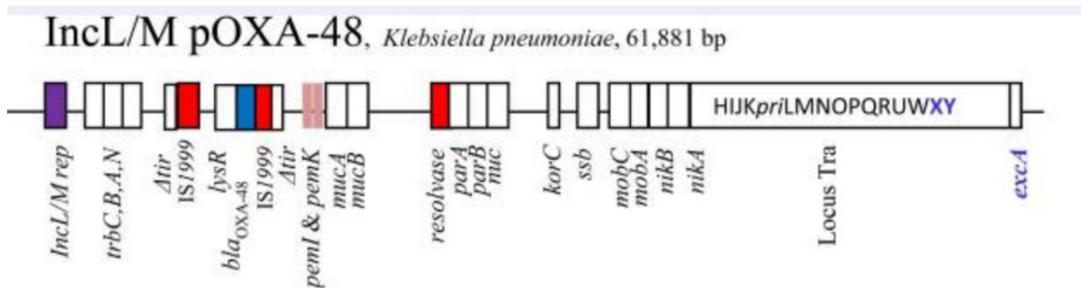
Le transposon Tn4401 est à l'origine de la diffusion des gènes de KPC. Plusieurs isoformes (n=5) associées à différentes familles de plasmides ont été décrites et ont diffusées dans différentes régions géographiques. Le transposon Tn125 est responsable de la dissémination de *bla*<sub>NDM-1</sub> d'*Acinetobacter spp.* aux entérobactéries (Figure 11).



**Figure 11** : Représentation des transposons Tn 4401 et Tn125

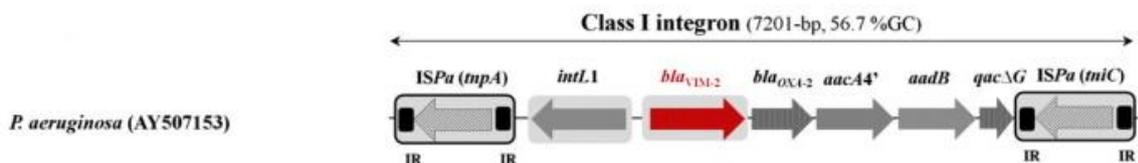
Un autre transposon Tn3000 est impliqué dans la diffusion des gènes NDM parmi les entérobactéries. La coexistence de *bla*<sub>NDM</sub> avec d'autres gènes de résistance est avérée, en particulier avec des gènes de résistance aux aminosides, d'autres gènes codant des carbapénémases (*bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, etc.) et/ou des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu voire même, des gènes impliqués dans la résistance à la colistine, dernière molécule encore active sur ces souches ultrarésistantes.

Pour les gènes codant les carbapénémases de la famille des OXA-48, là encore, ils sont majoritairement portés par des transposons composites (Tn1999) (Figure 12). Il a été démontré que lorsque ce transposon s'insère dans une protéine inhibitrice de transfert située sur le plasmide, il augmente considérablement la fréquence de transfert du plasmide de résistance ( $3,3 \cdot 10^3$ ) lors de la conjugaison [25].



**Figure 12** : Représentation du transposons Tn1999 [25]

Les intégrons de classe I jouent un rôle majeur dans la dissémination des métallo-protéases VIM entre *Pseudomonas spp.* et les entérobactéries. Contrairement aux transposons, ils ne peuvent pas se mobiliser de plasmide à chromosome ou de plasmide à plasmide, ils s'insèrent donc dans des transposons ou dans des plasmides conjugatifs ou mobilisables. Ils ont la particularité d'accumuler les gènes de résistance (ou cassette de résistance). Par ailleurs, *bla<sub>VIM</sub>* est pratiquement toujours associé au gène responsable de la résistance à l'amikacine et à d'autres gènes impliqués dans la résistance aux β-lactamines (Figure 13). Cette association de cassettes de résistance pose le problème de la co-sélection de la résistance aux carbapénèmes lors de l'administration d'un autre antibiotique.



**Figure 13** : Représentation d'un intégron de classe I, contenant *bla<sub>VIM</sub>*

Ces différentes cassettes sont sous la dépendance de deux promoteurs (P1 et P2) plus ou moins forts. Ainsi, selon le degré de proximité de la cassette de résistance avec les promoteurs, la résistance est plus au moins exprimée. De plus, sous l'effet de la pression de sélection antibiotique, une cassette de résistance faiblement exprimée peut être mobilisée par recombinaison près du promoteur pour être plus fortement transcrite [26].

La mobilité de ces différents éléments génétiques est à l'origine de la dissémination horizontale des gènes de carbapénémases entre les différentes espèces d'entérobactéries et de bacilles à Gram négatif non fermentants (*Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*) et assure ainsi, la dispersion de la résistance au sein des communautés bactériennes. Cet échange a lieu principalement dans les flores

commensales, en particulier digestive qui est caractérisée par son abondance ( $10^{11-12}$  bactéries/gr de selles) et par sa diversité, apportée entre autres, par l'ingestion des bactéries d'origine animale et environnementale.

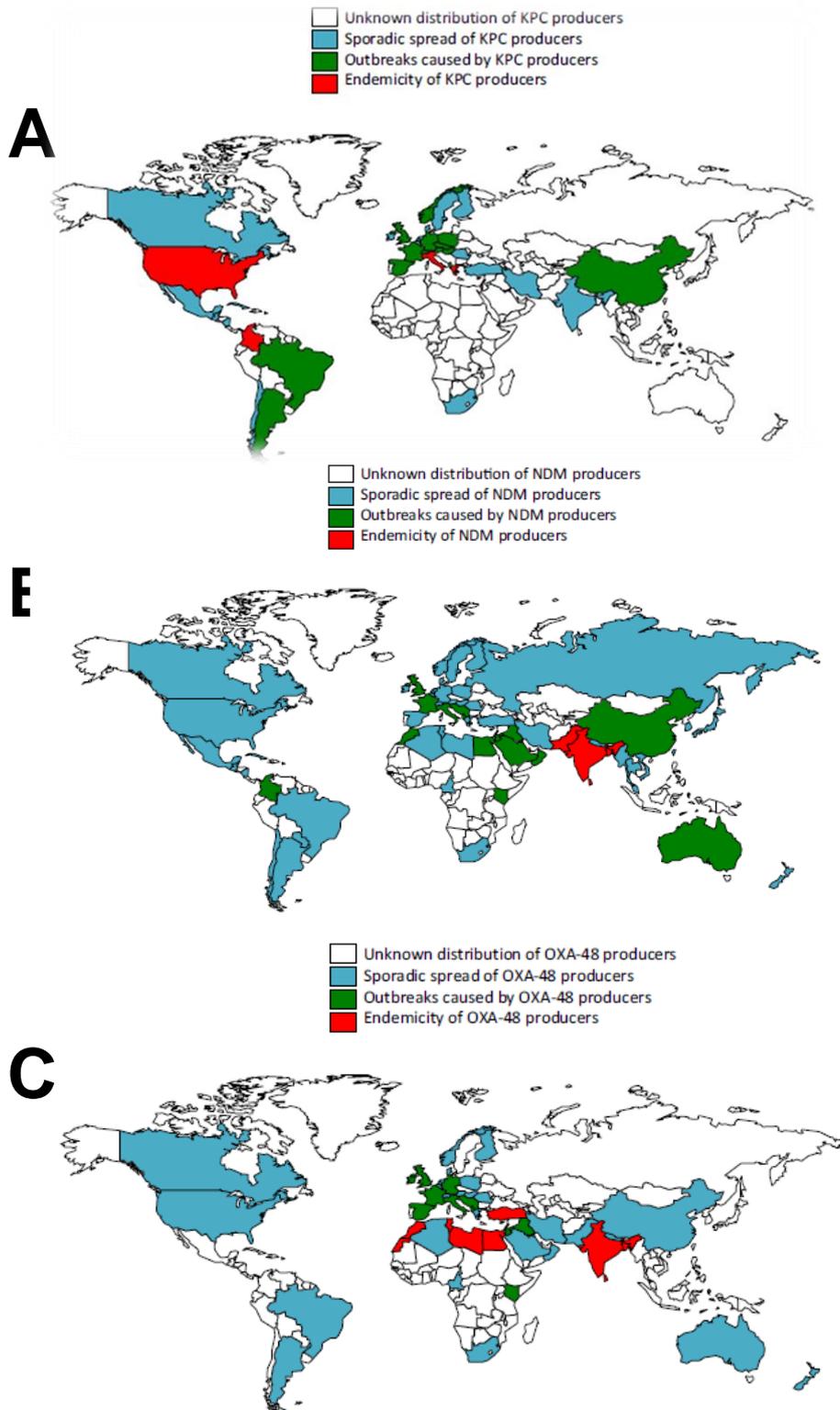
#### 4. Epidémiologie des EPC

En une dizaine d'années, la propagation des EPC a été mondiale (Figure 14). Concernant la classe A de la classification d'Ambler, la carbapénémase *bla*<sub>KPC</sub>, est la plus fréquente. Elle a été identifiée pour la première fois dans les hôpitaux de la côte Est des Etats-Unis en 1996, puis, très rapidement elle a diffusé à l'ensemble des États-Unis et a été responsable d'épidémies nosocomiales dans d'autres pays à l'occasion de transferts de patients [27]. Des foyers d'endémie prédominent aux États-Unis, Amérique latine, Grèce, Italie et Israël. Parmi les clones de KPC, le clone ST258 a une diffusion mondiale.

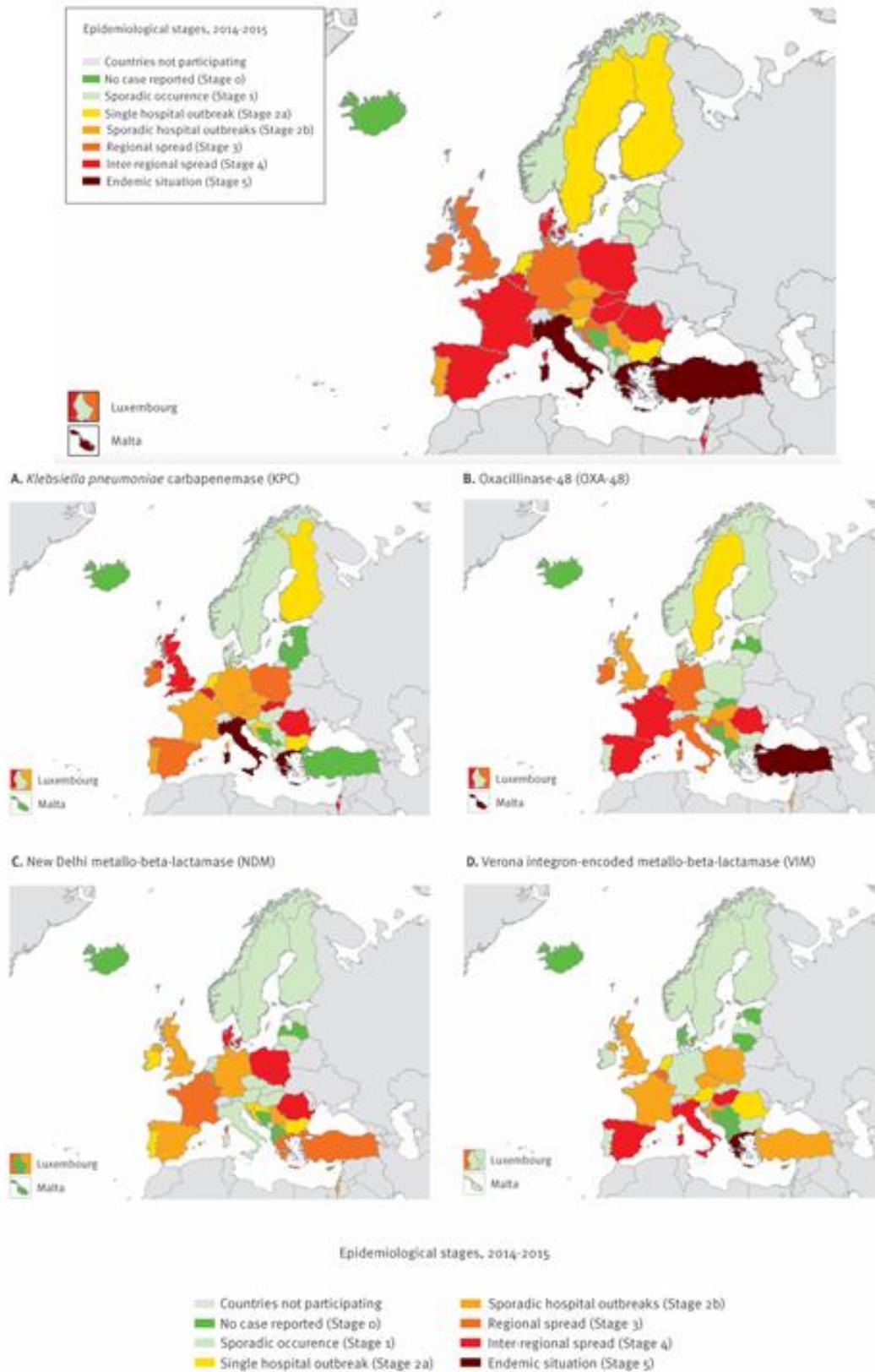
Parmi la classe B correspondant aux métallob- $\beta$ -lactamases, IMP fût découverte à Okazaki en 1993 chez *Serratia marcescens* [28], elle est endémique au Japon et Taiwan et il existe des cas sporadiques dans le monde. NDM a été identifiée la première fois en Inde en 2008 chez *Klebsiella pneumoniae* [29]. Depuis, elle est endémique sur le continent indien et dans les pays des Balkans et, il existe des cas sporadiques dans le reste du monde. La carbapénémase VIM a été décrite la première fois à Vérone en Italie (VIM-1) et à Marseille (VIM-2) chez *Pseudomonas aeruginosa* [30], [31]. Depuis, *bla*<sub>VIM</sub> a transféré chez les entérobactéries. VIM-1 est endémique en Grèce chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.

Quant à la classe D, OXA-48 et ses variants sont les représentants majoritaires chez les entérobactéries. Découverte en Turquie en 2001 [32] chez *Klebsiella pneumoniae*, *bla*<sub>OXA-48</sub> est endémique dans ce pays, dans les pays du Maghreb, en Egypte, dans la péninsule arabique, en Inde et dans plusieurs pays africains. Des épidémies hospitalières ont été rapportées en Espagne, Suisse, Allemagne, France et Royaume-Uni.

De fortes disparités géographiques sont observées en Europe (Figure 15). D'après les résultats de l'enquête européenne EuSCAPE de 2014-2015, quatre pays sont en situation endémique (stade 5) : la Grèce, l'Italie, Malte et la Turquie [33]. KPC est surtout présente en Italie et en Grèce. OXA-48 est majoritaire en France, en Espagne, en Roumanie et en Turquie. Quant à VIM, elle est endémique en Grèce, en Italie, en Hongrie et en Espagne. Enfin, la production de NDM est plus répandue en Europe centrale et orientale [34].

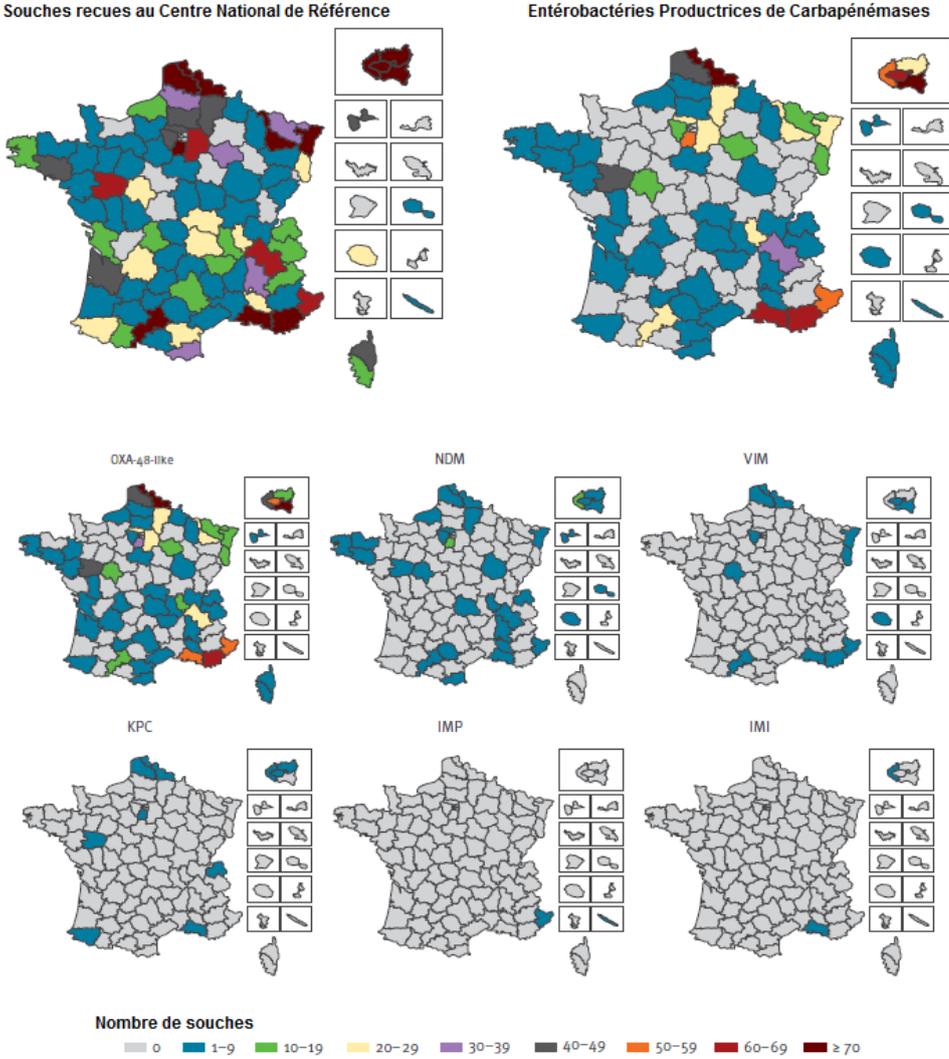


**Figure 14** : Distribution géographique des carbapénémases de type KPC (A), NDM (B) et OXA-48 (C) [2]



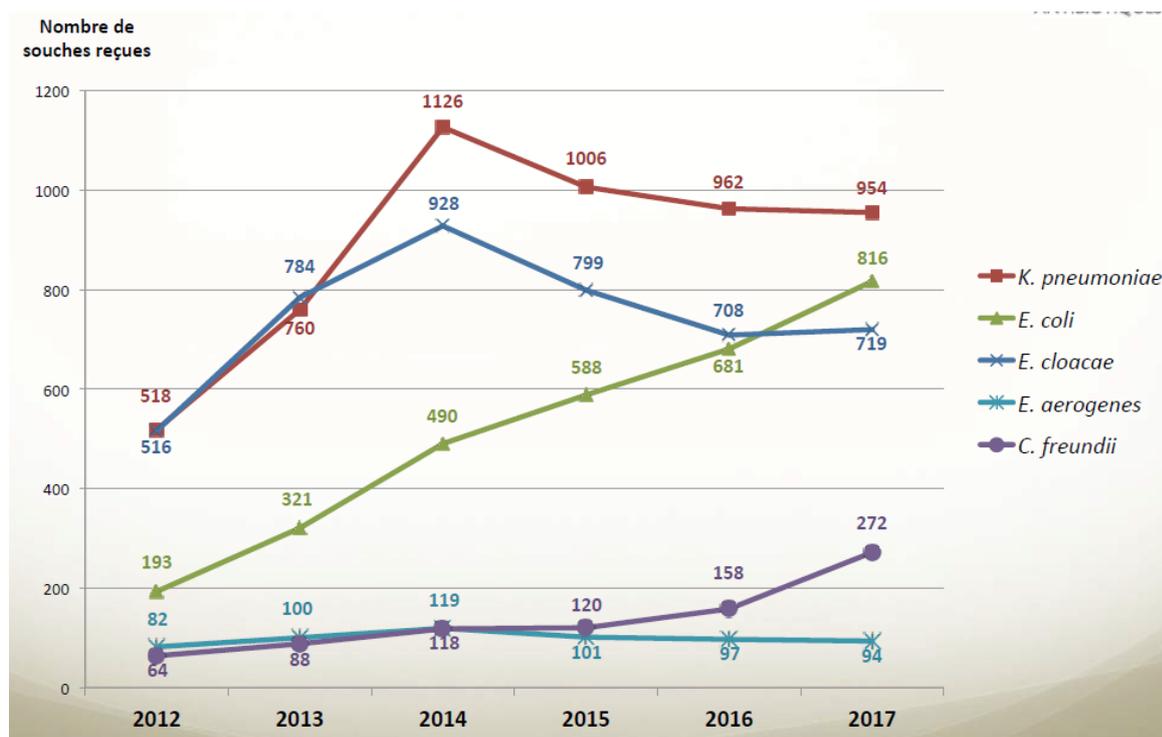
**Figure 15** : Répartition des EPC de 38 pays européens, selon la classification de l'étude EuSCAPE de l'ECDC, 2014-2015 [33]

En France, le 1<sup>er</sup> cas d'EPC a été décrit en 2004. Il s'agissait d'une souche productrice d'OXA-48. Depuis, le nombre de cas d'EPC ne cesse de progresser passant de moins de 10 épisodes par an à environ 1000 en 2015 [35]. Le nombre de souche d'EPC adressées au CNR des antibiotiques a été multiplié par 6 entre 2012 et 2017. La majorité des souches (deux tiers) sont isolées d'écouvillons de dépistage et le tiers restant, des prélèvements à visée diagnostique, essentiellement des urines. La France comme la Belgique, l'Espagne et la Pologne sont considérées en situation pré-endémique (stade 4) d'après l'enquête EuSCAPE. Par ordre décroissant de fréquence, les carbapénémases les plus fréquentes sont OXA-48 (75%), NDM (14,5%), VIM (5,3%) et KPC (2,3%). C'est la région Nord – Pas-de-Calais qui est la plus touchée par l'épidémie suivie des régions Ile de France et PACA (Figure 16).



**Figure 16 :** Evolution des infections à EPC en France de 2009 à 2015 [34]

Parmi, les espèces productrices de carbapénémases, *Klebsiella spp.* est majoritaire. Mais, la progression constante d'*E. coli*, commensal du tube digestif, est très préoccupante car elle fait craindre un passage de l'épidémie de carbapénémases de l'hôpital à la communauté comme actuellement en Grèce et comme cela s'est produit avec les *E. coli* producteurs de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (Figure 17).



**Figure 17** : Evolution du nombre de souches EPC adressées au CNR par espèces [36]

Au CHU de Lille, le nombre de patients ayant un écouvillon rectal et/ou un prélèvement à visée diagnostique positif à EPC a quadruplé entre 2015 et 2016, passant de 34 à 127 prélèvements. En 2017, la progression continue mais elle est moins forte (+30%). Malgré ce taux élevé d'EPC, il s'agit essentiellement de colonisations à EPC et le nombre d'infections réelles reste encore faible (<1%). La répartition des carbapénémases au CHU de Lille est identique à celle retrouvée au niveau national. Certains services de médecine et de chirurgie sont davantage confrontés à des épidémies que les services de réanimation.

### III. Les méthodes de dépistage des EPC

#### 1. Recommandations de dépistage

Devant l'ampleur de l'épidémie, le HCSP a émis des recommandations concernant les mesures de prévention de la diffusion des EPC [15]. Ces mesures sont basées sur le dépistage précoce et l'isolement rapide des patients porteurs. Le dépistage par écouvillonnage rectal est recommandé pour les patients hospitalisés dans les services à haut risque (réanimation, unités de soins intensifs et soins de suite et de réadaptation et de longs séjours) et pour les patients à haut risque de colonisation par EPC (patient revenant d'une zone d'endémie, transférés ou ayant des antécédents d'admission dans des établissements de santé ayant eu des épidémies à EPC au cours de l'année précédente).

#### 2. Méthodes de détection

Les méthodes de détection des EPC reposent sur 2 groupes de méthodes, les méthodes phénotypiques et les méthodes génotypiques (biologie moléculaire).

##### a. Méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques nécessitent une étape de culture préalable et donc, le portage d'EPC ne peut être suspecté qu'à la 24<sup>ème</sup> heure (après obtention de colonies bactériennes). La plupart des laboratoires utilisent, pour la mise en culture des écouvillons de dépistage, des milieux chromogènes sélectifs (contenant des carbapénèmes). Ils permettent la différenciation entre *Escherichia coli*, les bactéries du groupe KESC (*Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.* et *Citrobacter spp.*) et les *Proteae* (*Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella spp.*) et inhibent la croissance des bactéries à Gram positif et des levures [37]. Mais ces milieux ne sont pas spécifiques car ils ne permettent pas de discerner la production de carbapénémase des autres mécanismes de résistance aux carbapénèmes. A l'issue de la culture, la confirmation de la production de carbapénémase doit être faite par différentes méthodes : tests colorimétriques, spectrométrie de masse, tests immunochromatographiques.

### Tests colorimétriques

Les tests colorimétriques reposent sur la diminution de pH du milieu réactionnel provoqué par l'hydrolyse enzymatique du cycle  $\beta$ -lactame d'un carbapénème. L'acidification du milieu est détectée par un changement de couleur de l'indicateur de pH. Ces tests révèlent la présence d'une carbapénémase en moins de 2 heures.

### Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse MALDI-TOF identifie la différence de spectre entre le substrat initial, c'est-à-dire le carbapénème mis en présence de la bactérie, et le produit issu de l'hydrolyse du carbapénème [38].

### Tests immunochromatographiques

Les tests immunochromatographiques basés sur une réaction antigène-anticorps ont récemment été mis sur le marché (Figure 18). Ils permettent une détection facile et rapide (15 minutes) des carbapénémases à partir d'une culture [39]. Ces tests sont actuellement disponibles pour la recherche d'OXA-48, KPC, NDM et VIM.



**Figure 18** : Test immunochromatographique positif à carbapénémases OXA-48 et NDM

## **b. Méthodes génotypiques**

La PCR permet la détection du gène codant la carbapénémase [40]. Elle peut cibler un seul gène ou être multiplex et amplifier plusieurs cibles [41]. Pour des besoins épidémiologiques, elle peut être suivie d'un séquençage pour donner une identification précise des variants.

Les méthodes basées sur la détection de l'hydrolyse du carbapénème ne permettent pas de différencier le type de carbapénémase. Seules les techniques immunochromatographiques et moléculaires sont capables de préciser la classe des carbapénémases et éventuellement le type de variant. Les méthodes de biologie moléculaire ont l'avantage d'être suffisamment sensibles pour détecter directement dans l'échantillon, les gènes codant les différentes carbapénémases. Néanmoins, les tests immunochromatographiques et moléculaires limitent la détection des carbapénémases à celles présentes dans leur panel d'analyse mais, ne peuvent pas détecter de nouvelles enzymes.

## OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif de ce travail est d'évaluer des méthodes d'identification permettant de détecter, le jour même du dépistage, les entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) car notre hôpital est régulièrement confronté à ces épidémies de souches.

# MATERIELS ET METHODES

## 1. Patients et écouvillons rectaux

De Novembre 2017 à Février 2018, 2187 écouvillons rectaux de dépistage, isolés de 1622 patients hospitalisés au CHU de Lille ont été analysés prospectivement, conformément aux recommandations du Centre de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN) concernant la prévention de la diffusion des EPC au sein de l'établissement.

Les écouvillons rectaux de dépistage provenaient des patients :

- hospitalisés dans des services à haut risque d'acquisition de bactéries multirésistantes (réanimation médicale et chirurgicale, services des brûlés, hématologie adulte, soins de suite et de réadaptation et gériatrie),
- hospitalisés dans les services pour lesquels un cas de colonisation et/ou d'infection à EPC avait été identifié durant la période d'étude (dépistages autour d'un cas),
- transférés d'un autre hôpital ou ayant des antécédents de colonisation à EPC.

Le premier écouvillon a été prélevé le jour de l'admission puis de façon hebdomadaire jusqu'à la sortie des patients. Les écouvillons utilisés étaient des écouvillons doubles (Transwab, Sigma®) conservés dans un liquide Amies et ont étéensemencés sur gélose sélective chromogène, dans les 24 heures suivant la réception au laboratoire.

La **culture** a été comparée :

- (i) à une **PCR multiplex** en temps réel Amplidiag® CarbaR+VRE (Mobidiag Ltd., Finlande) réalisée directement sur l'écouvillon
- (ii) ou à un **test immunochromatographique** (ICT) Resist-3 O.K.N. K-SeT® (Coris Bioconcept, Gembloux, Belgique) réalisé sur la culture de l'écouvillon obtenue en bouillon d'enrichissement après 4 heures d'incubation.

## **2. Méthode de référence par culture et test de sensibilité aux antibiotiques**

Pour la détection des EPC, les écouvillons ont été mis en culture sur une gélose bi-compartiment sélective chromogène ChromID® CARBA SMART (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) permettant d'un côté la détection des EPC et de l'autre celle des souches productrices d'OXA-48. Les colonies suspectes ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker Biotyper). La détection de la production des carbapénèmes OXA-48, KPC et NDM a été réalisée sur colonies, à l'aide du test immunochromatographique (ICT) Resist-3 O.K.N. K-SeT® (Coris Bioconcept, Gembloux, Belgique). La détection des carbapénèmes VIM et IMP a été faite par PCR Xpert Carba-R (Cepheid®, Sunnyvale).

Un antibiogramme était systématiquement réalisé (mais non communiqué) en utilisant le système automatisé Vitek 2® (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des carbapénèmes ont été déterminées par la méthode E-test® (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et interprétées conformément aux recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

## **3. Détection directe des EPC par PCR Amplidiag® avec le kit CarbaR+VRE**

Le jour de la réception de l'écouvillon, après l'ensemencement sur milieu chromogène, 300 µL du liquide de transport dans lequel est conservé l'écouvillon ont été mis en suspension dans des tubes eNATs™ (Copan Italia SpA, Brescia, Italie) et incubés pendant 30 minutes à température ambiante. Les tubes eNATs™ ont ensuite été chargés sur la plate-forme moléculaire Amplidiag® Easy pour la réalisation d'une extraction automatisée qui a été suivie d'une amplification par PCR en temps réel des gènes d'intérêt (Tableau 6), à l'aide du kit Amplidiag® CarbaR+VRE, selon les instructions du fabricant. Le kit Amplidiag® CarbaR+VRE permet la détection des OXA-48 like (OXA-162, OXA-181, OXA-204, OXA-232 et OXA-244), KPC, NDM, VIM et IMP et tous leurs variants connus. Il est à noter que le kit permet aussi la détection des principales oxacillinases impliquées dans la résistance des *Acinetobacter spp.* (OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143, ISAbal OXA-51) et de la résistance acquise aux glycopeptides des entérocoques (gènes *vanA* et *vanB*). Quarante-huit échantillons peuvent être analysés lors d'une série de PCR réalisée sur des plaques à 96 puits.

**Tableau 6** : Mélanges contenant les amorces des gènes d'intérêt, ainsi qu'un contrôle interne d'amplification

Mélange 1	Mélange 2	Mélange 3
IAC	IAC	IAC
Ac OXA	VanA	NDM
OXA-48	VanB	IMP
KPC	VIM	

IAC : contrôle interne d'amplification

Ac OXA : oxacillinases des *Acinetobacter spp.*

Différents contrôles sont utilisés au cours de la PCR dans la plateforme Amplidiag® easy :

- un contrôle de l'ensemble du processus automatisé : mélange, extraction PCR et rendu de résultat,
- des contrôles négatif et positif de chacun des gènes amplifiés pour chaque plaque de 96 puits,
- un contrôle interne d'amplification (IAC), inclus dans chaque réaction de PCR qui permet de valider la réaction PCR pour chaque échantillon.

Les résultats obtenus après 3 heures (1h30 d'extraction et 1h45 d'amplification) sont interprétés par le logiciel d'analyse Amplidiag® Analyzer (Mobidiag Ltd., Finlande).

#### 4. Détection des EPC par technique ICT Resist-3 O.K.N. K-Set®

Le jour de la réception de l'échantillon ou après congélation des écouvillons à -20°C, 1 mL du liquide de transport Amies dans lequel est conservé l'écouvillon ont été mis en suspension dans 3 mL de bouillon trypticase soja (TSB) additionné de 0,25 µg/mL de méropénème.

Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 4 heures à 37°C sous agitation.

Après incubation, les tubes ont été centrifugés pendant 10 minutes à 3500 rpm.

Le culot bactérien a été analysé avec le kit Resist-3 O.K.N. K-Set® selon les recommandations du fabricant.

La lecture a été faite après 15 minutes d'incubation à température ambiante.

Le test Resist-3 O.K.N K-Set® permet la détection des carbapénémases OXA-48 et de ses 11 variants, de 5 variants de KPC et de 7 variants de NDM (Tableau 7).

**Tableau 7** : Variants détectés par le test Resist-3 O.K.N K-Set®

	<b>OXA-48</b>	<b>OXA-163</b>	<b>KPC</b>	<b>NDM</b>
Variants	OXA-48	OXA-163	KPC-1	NDM-1
	OXA-162	OXA-247	KPC-2	NDM-2
	OXA-181	OXA-438	KPC-3	NDM-4
	OXA-204		KPC-4	NDM-5
	OXA-232		KPC-9	NDM-6
	OXA-244			NDM-7
	OXA-245			NDM- 9
	OXA-436			
	OXA-484			

## **5. Analyse statistique**

Les performances (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives négative et positive) des méthodes de PCR quantitative Amplidiag® CarbaR+VRE et d'ICT Resist-3 O.K.N. K-SeT® ont été calculées à l'aide d'un tableau de contingence utilisant la croissance des EPC sur milieu sélectif chromogène avec confirmation de la production de carbapénémases comme test de référence.

- Un vrai positif a été défini comme un échantillon ayant un résultat PCR ou ICT positif avec la même carbapénémase que celle détectée avec la méthode de référence.
- Un vrai négatif était un échantillon PCR négatif ou ICT négatif et négatif avec la méthode de référence.
- Un faux positif était un échantillon positif en PCR ou en ICT mais négatif par la méthode de référence.
- Le faux négatif était un échantillon PCR négatif ou ICT négatif mais positif avec la méthode de référence.

## **6. Analyse des discordances**

Les faux positifs et négatifs obtenus avec la technique de PCR quantitative Amplidiag® CarbaR+VRE ont été vérifiés par une amplification par PCR simplex en utilisant les amorces du kit Amplidiag® CarbaR+VRE.

Les produits PCR obtenus ont été ensuite séquencés à l'aide d'un séquenceur d'ADN ABI3730xl (Applied Biosystems).

# RESULTATS

## 1. Répartition des écouvillons et des carbapénémases selon les services cliniques

Durant la période d'étude de novembre 2017 à février 2018, parmi les 5040 écouvillons de dépistage adressés au laboratoire, 2187 écouvillons rectaux ont été analysés par méthode ICT Resist-3 O.K.N. K-SeT® ou Amplidiag® CarbaR+VRE. La répartition des écouvillons était comme suit : 32% provenaient des services de réanimation médicale et chirurgicale (Pôle Huriez), 40,5% des services de médecine (maladie de l'appareil digestif, maladies du sang, endocrinologie, pneumologie, cardiologie, neurologie, néphrologie), 14% des services de chirurgie, 10% des services de soins de suite et gériatrie et 3,5% des services de pédiatrie (Tableau 8). Parmi les 2187 écouvillons rectaux inclus durant la période de l'étude, 363 (326 malades) et 1824 (1296 malades) ont été analysés respectivement avec la méthode ICT Resist-3 O.K.N. K-SeT® et Amplidiag® CarbaR+VRE.

Quatre-vingt-quatre étaient carbapénémase positif selon la méthode de référence de culture sur milieu chromogène. La carbapénémase majoritaire (62/84, 74%) était OXA-48 suivie de KPC, NDM et VIM (Tableau 8).

**Tableau 8** : Répartition du nombre d'écouvillons rectaux positifs à EPC en milieu chromogène selon la catégorie de services cliniques

Services cliniques	Milieu chromogène	Classe de carbapénémase			
		OXA-48	KPC	VIM	NDM
Réanimation	19	9	6	4	0
Médecine	34	31	2	0	1
Chirurgie	13	10	0	0	3
Long et moyen séjour SSR	18	12	4	0	2
Pédiatrie	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>62</b>	<b>12</b>	<b>4</b>	<b>6</b>

## 2. Performances des méthodes Amplidiag<sup>®</sup> CarbaR+VRE et ICT Resist-3 O.K.N. K-SeT<sup>®</sup>

Parmi les 1824 écouvillons rectaux analysés avec la méthode PCR Amplidiag<sup>®</sup> CarbaR+VRE, 62 des 63 échantillons EPC positifs avec la méthode de référence étaient positifs. L'unique test faux négatif avec la méthode PCR Amplidiag<sup>®</sup> CarbaR+VRE correspondait à une culture positive à OXA-48 sur milieu chromogène (Tableau 9).

Parmi les 1761 EPC négatifs en culture avec la méthode de référence, 25 ont été détectés positifs (faux positifs) avec la méthode PCR et correspondaient à 13 OXA-48, 5 VIM, 4 NDM, 2 IMP et 1 KPC.

Au total, 26 résultats discordants avec le résultat de la culture (faux négatif, n =1 et faux positifs, n =25) ont été obtenus avec la méthode PCR Amplidiag<sup>®</sup> CarbaR+VRE. Les échantillons correspondants ont donc été repris et analysés par une amplification par PCR simplex du gène détecté lors de la PCR multiplex Amplidiag<sup>®</sup> CarbaR+VRE, suivi d'un séquençage de l'amplicon. Parmi les 25 faux positifs, 18 ont été confirmés par la PCR simplex suivi du séquençage. Sept échantillons détectés positifs par la méthode multiplex (OXA-48, n=3 ; IMP, n = 2 ; KPC, n = 1 ; VIM, n = 1) étaient négatifs avec la méthode simplex et ont été considérés comme définitivement négatifs. Trois positifs avec les deux techniques moléculaires mais négatifs en culture provenaient de patients pour lesquels une culture positive avait été obtenue précédemment (OXA-48, n= 2 ; NDM, n = 1) et ont été considérés comme vrais positifs.

Parmi les 363 écouvillons rectaux réalisés avec le test ICT, 13 ont été retirés de l'étude car ils avaient été réalisés après congélation. En effet, initialement, afin de s'assurer de la conservation des échantillons, treize écouvillons reconnus comme positifs en culture sur milieu chromogène avaient été congelés à -20°C préalablement à la réalisation du test ICT. Ces 13 écouvillons s'étaient avérés EPC négatif avec le test ICT. Ceci nous a donc conduit à ne plus conserver les écouvillons à -20°C mais à tester cette méthode sur des écouvillons arrivés le jour même ou conservés à 4°C pendant moins de 24 heures.

Parmi les 350 écouvillons rectaux réalisés avec le test ICT, 21 étaient EPC positifs (19 OXA-48 et 2 KPC) avec la méthode de référence, 18 étaient positifs (vrai positif) avec la méthode ICT et 3 (2 OXA-48 et une KPC) n'ont pas été détectées (faux négatifs). En revanche, 2 des 329 écouvillons négatifs avec la méthode de référence, étaient positifs (faux positifs) avec le test ICT et correspondait à 2 OXA-48 (Tableau 10). Un test était invalide parmi les 329 EPC négatifs (pas de migration sur la membrane de nitrocellulose).

**Tableau 9** : Résultats discordants obtenus avec la PCR Amplidiag® CarbaR+VRE

Patient	Résultat de culture	Résultat PCR Amplidiag®	Résultat du séquençage
1	OXA48	Négative	Négatif
2	Négative	IMP	Négatif
3	Négative	IMP	Négatif
4	Négative	KPC	Négatif
12	Négative	OXA-48/181	Négatif
15	Négative	OXA-48/181	Négatif
16	Négative	OXA-48/181	Négatif
25	Négative	VIM	Négatif
5	Négative	NDM	NDM
6	Négative	NDM	NDM
7	Négative	NDM	NDM
8	Négative	NDM	NDM
9	Négative	OXA-48/181	OXA-48
10	Négative	OXA-48/181	OXA-48
11	Négative	OXA-48/181	OXA-48
13	Négative	OXA-48/181	OXA-48
14	Négative	OXA-48/181	OXA-48
17	Négative	OXA-48/181	OXA-48
18	Négative	OXA-48/181	OXA-48
19	Négative	OXA-48/181	OXA-48/181
20	Négative	OXA-48/181	OXA-48/181
21	Négative	OXA-48/181	OXA-48/181
22	Négative	VIM	VIM
23	Négative	VIM	VIM
24	Négative	VIM	VIM
26	Négative	VIM	VIM

**Tableau 10** : Résultats obtenus avec les méthodes ICT Resist-3 O.K.N. K-SeT® et Amplidiag® CarbaR+VRE

Culture sur milieu chromogène	PCR Amplidiag CarbaR+VRE®		Resist-3 O.K.N. K-SeT®		
	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Ininterprétable
<b>Positif</b>	62	1	18	3	0
<b>Négatif</b>	25	1736	2	326	1
<b>Total</b>	87	1737	20	329	1

Après résolution des discordances, les valeurs de sensibilité, spécificité, prédictive positive (VPP) et négative (VPN) ont été calculées pour chaque méthode, en tenant compte des antécédents des patients (Tableau 11).

La sensibilité de la méthode PCR Amplidiag® CarbaR+VRE était supérieure à celle la méthode ICT Resist-3 O.K.N.K-SeT® (98,4 vs 85,7%, respectivement).

Les valeurs de spécificité et prédictive négative étaient comparables avec les 2 méthodes, proche de 100%. En revanche, la valeur prédictive positive était plus faible avec la méthode PCR Amplidiag® CarbaR+VRE.

**Tableau 11** : Performances des tests ICT Resist-3 O.K.N. K-SeT® et PCR Amplidiag® CarbaR+VRE comparées à la méthode de référence

	<b>Sensibilité (%)</b>	<b>Spécificité (%)</b>	<b>VPP (%)</b>	<b>VPN (%)</b>
<b>ICT Resist-3 O.K.N. K-SeT®</b>	85,7	99,4	90	99,1
<b>PCR Amplidiag® CarbaR+VRE</b> (données brutes)	98,4	98,8	74,7	99,4
<b>PCR Amplidiag® CarbaR+VRE</b> (après séquençage)	98,5	99,2	81,3	99,9

### **3. Coût et délai de rendu du résultat**

Le coût moyen du dépistage des EPC par culture sur milieu chromogène est évalué à 8,70 euros par échantillon. Ce coût inclut le matériel de mise en culture, d'identification et la confirmation de la carbapénémase.

Le coût moyen d'un test Resist-3 O.K.N. K-Set<sup>®</sup> est le même que celui d'un échantillon analysé par PCR Amplidiag<sup>®</sup> CarbaR+VRE, soit environ 11 euros pour un échantillon.

Le délai moyen de détection d'une carbapénémase de culture en milieu chromogène est d'environ 29 heures (temps minimal d'incubation d'environ 18 h), 5 heures avec le test ICT (pour une série de 20 échantillons) et d'environ 5 heures pour 48 échantillons avec la technique de PCR Amplidiag<sup>®</sup> CarbaR+VRE. Ainsi, les résultats des écouvillons rectaux reçus dans la matinée peuvent être adressés aux services cliniques dans l'après-midi même.

## DISCUSSION

L'émergence et la diffusion des EPC, considérées comme des Bactéries Hautement Résistantes Emergentes (BHRe) est préoccupante. En France, depuis 2009, le nombre d'épisodes impliquant des EPC est en constante augmentation : 1223 épisodes d'EPC en 2016 vs 10 en 2009 [42]. Bien que le nombre d'infections reste limité, la France est passée en 2 ans du stade 3 (épidémies régionales) au stade 4 (pré-endémique) d'après l'enquête européenne EuSCAPE [33]. La même progression épidémique a été observée au CHRU de Lille puisque le nombre de cas a été multiplié par 5 entre 2014 et 2017.

Comme à l'échelon national, la carbapénémase OXA-48 est prépondérante au CHU de Lille et les services majoritairement concernés sont les services de médecine (neurologie, maladies du sang et maladie de l'appareil digestif) et non pas les services de réanimation [34], [43]. Ce constat s'explique probablement par une moindre sensibilisation du personnel soignant aux mesures d'hygiène et par le manque de formation dans la gestion d'un cas de patient colonisé.

Cette augmentation régulière du nombre d'épisodes a conduit le HCSP en 2013 a proposé une stratégie de prévention de la transmission croisée des EPC. Cette stratégie fait appel, en plus des précautions d'hygiène spécifiques (précautions complémentaires de type contact et réorganisation des soins), au dépistage du portage digestif des patients à risque (rapatriement sanitaire, antécédents d'hospitalisation à l'étranger, porteurs réhospitalisés et contacts avec un porteur). Cette politique de dépistage a pris une grande ampleur au CHRU car le nombre de prélèvements a doublé entre 2014 et 2016. Actuellement, le laboratoire reçoit environ 300 écouvillons rectaux par semaine comme en témoigne le nombre (5040) d'écouvillons traités durant la période de cette étude.

Pour être efficace, la détection du portage d'EPC doit être faite dans les 48 h. Au-delà, le risque de transmission est élevé [44]. La détection du portage des EPC repose sur la mise en culture des écouvillons de dépistage sur des milieux chromogènes [45]. Les inconvénients de cette méthode est la durée d'incubation de 24 h, la longueur du temps technique nécessaire à l'ensemencement et la lecture des cultures en l'absence de chaîne automatisée. C'est pourquoi, l'objectif de ce travail était d'évaluer les performances et la faisabilité de deux méthodes de détection des carbapénémases permettant la notification des résultats le jour de réception de l'écouvillon. L'une était une méthode semi-automatisée de biologie moléculaire (PCR Amplidiag® CarbaR+VRE) et l'autre une méthode de culture après enrichissement faisant appel à un test ICT (ICT Resist-3 O.K.N. K-set®).

Les deux méthodes se sont avérées très spécifiques (spécificité comprise entre 98 et 99%) et avaient une excellente valeur prédictive négative (environ 99%) ce qui suggère que le diagnostic de portage d'EPC pourrait être exclu le jour même de réception de l'écouvillon et, en conséquence, le niveau de précautions complémentaires de type contact prises par les services en cas de suspicion de portage d'EPC pourrait être allégé. Cette valeur prédictive négative élevée s'explique par le faible nombre de faux négatifs générés par ces 2 méthodes. L'absence de détection de trois carbapénémases (2 OXA-48 et une KPC), en particulier des OXA-48, par le test ICT pourraient résulter de leur faible activité d'hydrolyse vis-à-vis du méropénème contenu dans le bouillon d'enrichissement ou d'un faible niveau de production de carbapénémase. L'OXA-48 détectée en culture sur milieu chromogène mais pas par la PCR Amplidiag® CarbaR+VRE indique la présence possible d'un variant d'OXA-48. En effet, le test ICT, réalisé sur colonies pour confirmer la suspicion de carbapénémase obtenue sur milieu chromogène, est capable d'identifier des variants d'OXA-48 (OXA-163 et OXA-405) qui ne sont pas amplifiés par la PCR Amplidiag® CarbaR+VRE [46].

La sensibilité de la PCR Amplidiag® CarbaR+VRE était supérieure (98 %) à celle du test ICT (86%) après enrichissement car il s'agit d'une méthode génotypique dont le résultat est indépendant de la quantité de carbapénémase produite et de la concentration du carbapénème ajouté dans le milieu de culture. La PCR Amplidiag® CarbaR+VRE est vraisemblablement plus sensible que la culture compte-tenu du nombre élevé (n=18) de faux positifs confirmés par une 2<sup>ème</sup> PCR simplexe suivie d'un séquençage. Cette plus grande sensibilité peut s'expliquer par une prise d'essai supérieure pour la PCR Amplidiag® CarbaR+VRE (300 µl) que pour la culture en milieu chromogène (10 µl). La limite de détection des carbapénémases OXA-48 sur le milieu ChromID OXA-48 a été estimée à 10<sup>5</sup> CFU/mL [47]. Dans une autre étude, la limite de détection d'un PCR multiplexe était comprise entre 10<sup>2</sup> et 10<sup>3</sup> CFU/ml [48]. Il est donc crucial que l'écouvillon rectal soit suffisamment chargé en matières fécales pour que les EPC soient détectables en culture. La méthode d'enrichissement sur bouillon pendant 4 h permettrait de pallier en partie à la faible sensibilité de la culture. Enfin, le variant OXA-244 fréquemment isolé de *E. coli* et ayant une faible activité carbapénémase ne croît pratiquement pas sur le milieu CarbaSmart que nous utilisons en routine alors qu'il est détecté par la PCR Amplidiag® CarbaR+VRE [49]. Il n'est donc pas exclu qu'un certain nombre de faux positifs OXA-48 soit lié à la présence de ce variant. Enfin, ce taux élevé de faux positifs à l'origine d'une plus faible valeur prédictive positive de la PCR Amplidiag® CarbaR+VRE, peut aussi résulter de la détection de gènes de carbapénémase présents chez d'autres espèces bactériennes appartenant à la flore digestive transitoire. En effet, *Schewanella sp.* est à l'origine de la

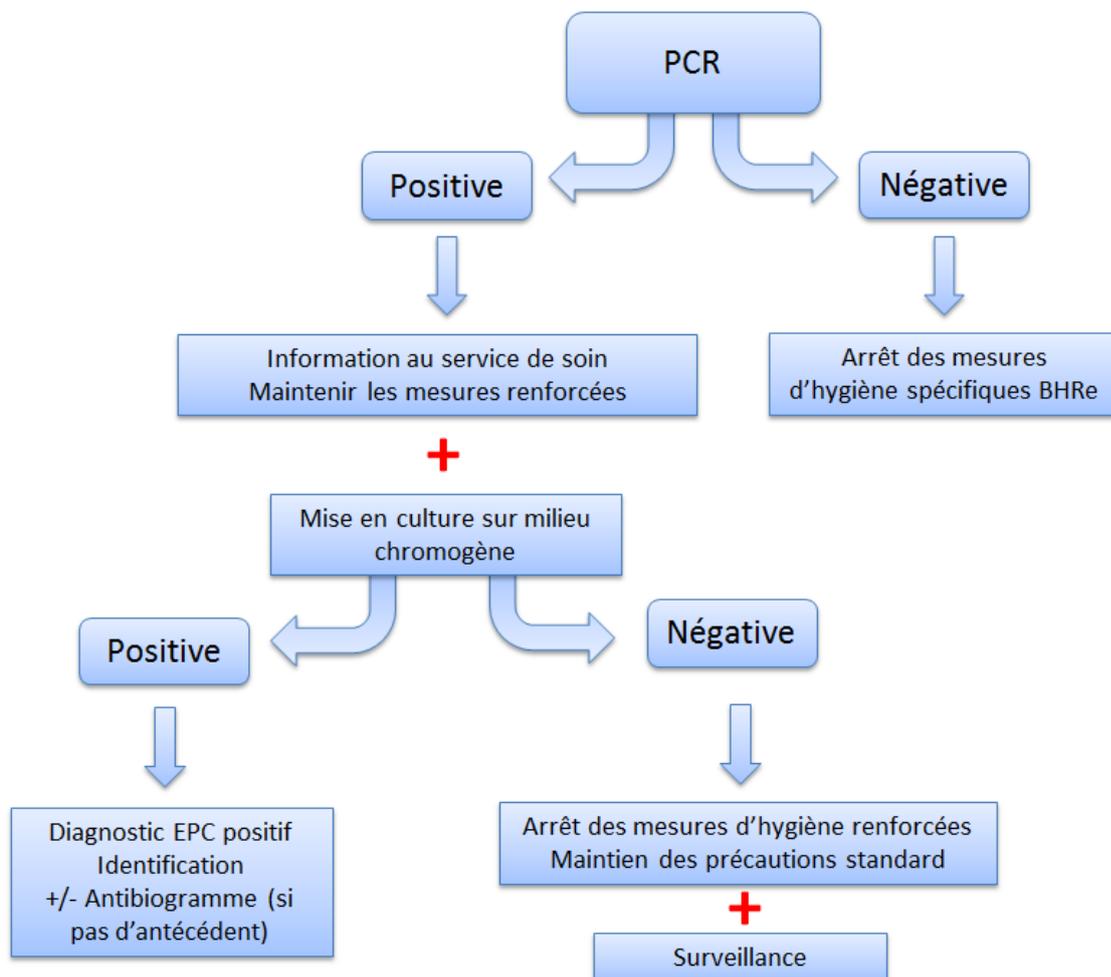
dissémination de l'OXA-48 chez les entérobactéries et plusieurs épidémies hospitalières à *Pseudomonas putida* VIM-2 ont été décrites [25], [50].

Les deux méthodes évaluées dans ce travail ont l'inconvénient de détecter uniquement les carbapénémases incluses dans leur panel et ne peuvent donc pas identifier de nouveaux variants ou de nouvelles carbapénémases. Aussi, le choix du panel des carbapénémases explorées doit être choisi en fonction de l'épidémiologie locale. Dans notre étude, la PCR Amplidiag® CarbaR+VRE a permis de détecter 98% des EPC. Elle présente un panel plus large que celui de l'ICT, comprenant la carbapénémase IMP isolées chez les entérobactéries et aussi celles fréquemment isolées des bacilles à Gram négatif non fermentants. Néanmoins, il reste difficile de mettre en place des précautions d'hygiène renforcées sur la base d'un résultat positif en PCR. Dans ce cas de figure, le CNR de la résistance aux antibiotiques recommande de ne pas considérer les patients comme porteurs d'EPC mais, de maintenir les précautions d'hygiène standards et de surveiller les patients par des dépistages réguliers, en particulier s'ils reçoivent une antibiothérapie [51]. De plus, la PCR Amplidiag® CarbaR+VRE a comme autre inconvénient l'impossibilité d'identifier l'espèce productrice de carbapénémase, de réaliser l'antibiogramme et le typage épidémiologique de la souche. En effet, l'étape d'extraction de l'ADN nécessite au préalable une étape d'inactivation bactérienne dans les tubes eNATs. Pour l'obtention d'une culture bactérienne, il faudrait pouvoir ensemercer sur milieu chromogène une partie intacte de l'échantillon détecté positif par la PCR.

La méthode Amplidiag® CarbaR+VRE est une technique semi-automatisée, adaptée à de grande série d'échantillons (48 échantillons par série) avec un transfert manuel de l'échantillon dans les tubes eNATs. Ce temps de préparation est de l'ordre de 20 minutes auxquels s'ajoutent 20 minutes de chargement des réactifs et des échantillons sur la plateforme automatisée. Une distribution automatique de l'échantillon dans les tubes eNATs permettrait un gain de temps technique et limiterait le risque d'erreur de pipetage ou d'identité patient. De plus, une partie de l'échantillon pourrait être laissé intact pour être ultérieurement ensemercé en cas de PCR positive (Figure 19). La méthode ICT Resist-3 O.K.N. K-set® est une méthode manuelle encore « artisanale » qui nécessite un temps de préparation évalué à 30 minutes pour une vingtaine d'échantillons. La commercialisation d'un bouillon prêt à l'emploi pouvant être distribué dans les services de soins réduirait ce temps technique.

Concernant le coût des réactifs, ces deux méthodes sont plus coûteuses (~12 euros par test) que la culture sur milieux chromogènes (~ 9 euros par test). Mais, l'ensemencement des milieux uniquement en cas de recherche d'EPC positive (5%) réduirait

considérablement le coût en personnel. De plus, la rapidité du diagnostic, le jour même de la réception de l'écouvillon permettrait de réduire le coût médian des mesures de prévention prises autour d'un patient colonisé grâce à une meilleure gestion autour d'un cas. Ce coût a été estimé à 4443 € et à 11445 € si le cas est détecté en moins et en plus de 48 h, respectivement [52]. Une étude a montré que les coûts réactifs du laboratoire étaient plus élevés en cas d'utilisation d'une méthode moléculaire de dépistage. Néanmoins, les coûts associés aux mesures de prévention de la diffusion des BHRé et le temps personnel soignant étaient environ cinquante fois plus élevés en utilisant la stratégie basée sur la culture que celle utilisant la méthode de PCR [47].



**Figure 19** : Algorithme décisionnel proposé pour la détection des bactéries productrices de carbapénémases

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a démontré les bonnes performances du test ICT Resist-3 O.K.N. K-set<sup>®</sup> et de la méthode de PCR Amplidiag<sup>®</sup> CarbaR+VRE aussi bien pour détecter que pour exclure le portage d'EPC. L'avantage de ces 2 méthodes est la réduction du délai d'obtention des résultats à quelques heures, le jour même de la réception des écouvillons. L'identification rapide du statut des patients devrait mieux rationaliser la mise en œuvre des mesures d'hygiène spécifiques pour prévenir la transmission croisée des BHRé au sein des services de soin. Elle permettrait de réduire les surcoûts liés à l'arrêt des admissions dans le service concerné, aux précautions d'hygiène renforcées et aux réactifs nécessaires au dépistage des porteurs. La PCR Amplidiag<sup>®</sup> CarbaR+VRE est apparue mieux adaptée à notre routine de laboratoire car étant semi-automatisée, elle se prête mieux à la réalisation de grandes séries d'échantillons. De plus son panel de détection des gènes de carbapénémases est plus exhaustif que le test ICT Resist-3 O.K.N. K-set<sup>®</sup>. Néanmoins, le système automatisé Amplidiag<sup>®</sup> CarbaR+VRE devra être optimisé pour permettre l'ensemencement sur milieu chromogène des écouvillons détectés EPC positifs. Enfin, l'évaluation de la méthode ICT Resist-3 O.K.N. K-set<sup>®</sup> va être étendue à d'autres hôpitaux de façon à augmenter le nombre d'échantillons et la variété des EPC détectées.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] « WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics », *WHO*. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>. [Consulté le: 24-sept-2018].
- [2] P. Nordmann et L. Poirel, « The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide », *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 20, n° 9, p. 821-830, sept. 2014.
- [3] T. J. Gniadek, K. C. Carroll, et P. J. Simner, « Carbapenem-Resistant Non-Glucose-Fermenting Gram-Negative Bacilli: the Missing Piece to the Puzzle », *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 54, n° 7, p. 1700-1710, juill. 2016.
- [4] J.-D. Cavallo, R. Fabre, F. Jehl, C. Rapp, et E. Garrabé, « Bêtalactamines », *EMC - Maladies Infectieuses*, vol. 1, n° 3, p. 129-202, août 2004.
- [5] P. Nordmann et L. Poirel, « Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes », *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 8, n° 6, p. 321-331, juin 2002.
- [6] « <http://www.microbes-edu.org/mecanisme/conference/verdet2.pdf> ».
- [7] « Mécanisme d'action des bêta-lactamines. Disponible sur : [http://proteopedia.org/wiki/index.php/Sandbox\\_123](http://proteopedia.org/wiki/index.php/Sandbox_123) ».
- [8] N. Ruiz, « Lipid Flippases for Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis », *Lipid Insights*, vol. 8s1, p. LPI.S31783, janv. 2015.
- [9] E. Sauvage, F. Kerff, M. Terrak, J. A. Ayala, et P. Charlier, « The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis », *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 32, n° 2, p. 234-258, mars 2008.
- [10] L. Gutmann et R. Williamson, « Paroi bactérienne et bêta-lactamines », *médecine/sciences*, vol. 3, n° 2, p. 75, 1987.
- [11] G. G. Zhanel *et al.*, « Comparative review of the carbapenems », *Drugs*, vol. 67, n° 7, p. 1027-1052, 2007.
- [12] R. Gauzit, L. Gutmann, C. Brun-Buisson, V. Jarlier, et B. Fantin, « Recommandations de bon usage des carbapénèmes », *Antibiotiques*, vol. 12, n° 4, p. 183-189, déc. 2010.
- [13] D. Du *et al.*, « Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation », *Nature Reviews Microbiology*, vol. 16, n° 9, p. 523-539, sept. 2018.
- [14] M. Doumith, M. J. Ellington, D. M. Livermore, et N. Woodford, « Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK », *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 63, n° 4, p. 659-667, févr. 2009.
- [15] « Prévention de la transmission des BHRé ».
- [16] « Mécanisme d'hydrolyse des carbapénèmes par une sérine-transférase et par une métalloenzyme ».
- [17] A. U. Khan, L. Maryam, et R. Zarrilli, « Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase (NDM): a threat to public health », *BMC Microbiology*, vol. 17, n° 1, déc. 2017.
- [18] S. M. Diene et J.-M. Rolain, « Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species », *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 20, n° 9, p. 831-838, sept. 2014.
- [19] S. C. Mehta, K. Rice, et T. Palzkill, « Natural Variants of the KPC-2 Carbapenemase have Evolved Increased Catalytic Efficiency for Ceftazidime Hydrolysis at the Cost of Enzyme Stability », *PLOS Pathogens*, vol. 11, n° 6, p. e1004949, juin 2015.
- [20] J. Walther-Rasmussen et N. Høiby, « Class A carbapenemases », *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 60, n° 3, p. 470-482, sept. 2007.

- [21] T. L. Lamoureaux, H. Frase, N. T. Antunes, et S. B. Vakulenko, « Antibiotic Resistance and Substrate Profiles of the Class A Carbapenemase KPC-6 », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, n° 11, p. 6006-6008, nov. 2012.
- [22] P. Nordmann, A. E. Boulanger, et L. Poirel, « NDM-4 Metallo- $\beta$ -Lactamase with Increased Carbapenemase Activity from *Escherichia coli* », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, n° 4, p. 2184-2186, avr. 2012.
- [23] J.-D. Docquier *et al.*, « Crystal Structure of the OXA-48  $\beta$ -Lactamase Reveals Mechanistic Diversity among Class D Carbapenemases », *Chemistry & Biology*, vol. 16, n° 5, p. 540-547, mai 2009.
- [24] J.-D. Docquier *et al.*, « Crystal Structure of the OXA-48  $\beta$ -Lactamase Reveals Mechanistic Diversity among Class D Carbapenemases », *Chemistry & Biology*, vol. 16, n° 5, p. 540-547, mai 2009.
- [25] L. Poirel, R. A. Bonnin, et P. Nordmann, « Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48 », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, n° 1, p. 559-562, janv. 2012.
- [26] C. M. Collis et R. M. Hall, « Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 39, n° 1, p. 155-162, janv. 1995.
- [27] H. Yigit *et al.*, « Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae* », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 45, n° 4, p. 1151-1161, avr. 2001.
- [28] H. Ito, Y. Arakawa, S. Ohsuka, R. Wacharotayankun, N. Kato, et M. Ohta, « Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens* », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 39, n° 4, p. 824-829, avr. 1995.
- [29] D. Yong *et al.*, « Characterization of a New Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 53, n° 12, p. 5046-5054, déc. 2009.
- [30] L. Lauretti *et al.*, « Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, n° 7, p. 1584-1590, juill. 1999.
- [31] L. Poirel *et al.*, « Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, n° 4, p. 891-897, avr. 2000.
- [32] P. Nordmann, G. Cuzon, et T. Naas, « The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria », *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 9, n° 4, p. 228-236, avr. 2009.
- [33] B. Albiger, C. Glasner, M. J. Struelens, H. Grundmann, D. L. Monnet, et the European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group, « Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015 », *Eurosurveillance*, vol. 20, n° 45, nov. 2015.
- [34] L. Dortet, G. Cuzon, V. Ponties, et P. Nordmann, « Trends in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, France, 2012 to 2014 », *Eurosurveillance*, vol. 22, n° 6, févr. 2017.
- [35] P. Valerie, « Episodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases en France. », p. 19, 2015.
- [36] D. T. Naas, « Les enjeux liés aux bactéries hautement résistantes », p. 36.
- [37] J. D. Perry, « A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics », *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 30, n° 2, p. 449-479, avr. 2017.
- [38] J. Yu *et al.*, « Rapid detection of carbapenemase activity of Enterobacteriaceae isolated from positive blood cultures by MALDI-TOF MS », *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 17, n° 1, déc. 2018.

- [39] D. W. Wareham et M. H. F. Abdul Momin, « Rapid Detection of Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Evaluation of the Resist-3 O.K.N. (OXA-48, KPC, NDM) Lateral Flow Multiplexed Assay », *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 55, n° 4, p. 1223-1225, avr. 2017.
- [40] D. Hammoudi, C. Ayoub Moubareck, et D. Karam Sarkis, « How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods », *Journal of Microbiological Methods*, vol. 107, p. 106-118, déc. 2014.
- [41] L. Poirel, T. R. Walsh, V. Cuvillier, et P. Nordmann, « Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes », *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 70, n° 1, p. 119-123, mai 2011.
- [42] « Diaporama\_Bilan\_EPC\_2015.pdf ».
- [43] D. Hilliquin *et al.*, « Risk factors for acquisition of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* among contact patients: a multicentre study », *Journal of Hospital Infection*, vol. 98, n° 3, p. 253-259, mars 2018.
- [44] S. Fournier *et al.*, « Efficiency of different control measures for preventing carbapenemase-producing enterobacteria and glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks: a 6-year prospective study in a French multihospital institution, January 2010 to December 2015 », *Eurosurveillance*, vol. 23, n° 8, févr. 2018.
- [45] A. P. R. Wilson *et al.*, « Prevention and control of multi-drug-resistant Gram-negative bacteria: recommendations from a Joint Working Party », *Journal of Hospital Infection*, vol. 92, p. S1-S44, janv. 2016.
- [46] S. Oueslati, D. Girlich, L. Dortet, et T. Naas, « Evaluation of the Amplidag CarbaR+VRE Kit for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Bacteria », *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 56, n° 3, janv. 2018.
- [47] A. Dubouix-Bourandy *et al.*, « Impact of the Xpert Carba-R® assay on the management of carbapenemase screening: 1,5 years of follow-up ».
- [48] M. Lund, M. B. Petersen, A. L. Jørgensen, D. Paulmann, et M. Wang, « Rapid real-time PCR for the detection of IMP, NDM, VIM, KPC and OXA-48 carbapenemase genes in isolates and spiked stool samples », *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 92, n° 1, p. 8-12, sept. 2018.
- [49] Y. Hoyos-Mallecot *et al.*, « OXA-244-Producing *Escherichia coli* Isolates, a Challenge for Clinical Microbiology Laboratories », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 61, n° 9, sept. 2017.
- [50] J. S. Hong *et al.*, « Molecular Characterization of *Pseudomonas putida* Group Isolates Carrying blaVIM-2 Disseminated in a University Hospital in Korea », *Microbial Drug Resistance*, vol. 24, n° 5, p. 627-634, juin 2018.
- [51] Y. Hoyos-Mallecot, S. Ouzani, L. Dortet, N. Fortineau, et T. Naas, « Performance of the Xpert® Carba-R v2 in the daily workflow of a hygiene unit in a country with a low prevalence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae », *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 49, n° 6, p. 774-777, juin 2017.
- [52] G. Birgand *et al.*, « Costs associated with implementation of a strict policy for controlling spread of highly resistant microorganisms in France », *BMJ Open*, vol. 6, n° 1, p. e009029, janv. 2016.

Université de Lille  
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 : NADJI**  
**Prénom : Safia**

**Titre du mémoire / thèse :**

Evaluation de méthodes rapides de détection du portage digestif des bactéries productrices de carbapénémases

**Mots-clés :** dépistage, portage digestif, carbapénémases, PCR, test immunochromatographique

---

**Résumé :**

La prévention de la diffusion des souches d'entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC) repose sur le dépistage précoce des malades porteurs. De nombreuses méthodes de détection, basées sur une culture de l'échantillon, existent pour les dépister. Ces méthodes nécessitent un délai de 24 heures pour le rendu du résultat. Une détection de la carbapénémase par biologie moléculaire ou par test immunochromatographique (ICT), directement à partir de l'écouvillon rectal, permettraient de réduire ce délai. Nous avons, donc, analysé prospectivement au CHU de Lille 2187 écouvillons de dépistage de façon à évaluer les performances et la mise en place en routine de la PCR multiplex en temps réel du kit Amplidiag® CarbaR+VRE et du test ICT Resist-3 O.K.N K-seT®. La spécificité des deux méthodes est d'environ 99%. La sensibilité de la PCR et du test ICT est d'environ 98% et 86%, respectivement. Bien que ces méthodes soient plus coûteuses, elles permettraient de rendre 99% des résultats négatifs en quelques heures et de réduire les coûts liés à la diffusion d'une EPC dans les services de soins.

---

**Membres du jury :**

**Président :** Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU  
Université de Lille, CHU de Lille

**Assesseur(s) :** Madame le Docteur Nadine LEMAITRE  
Université de Lille, CHU de Lille

Monsieur le Professeur Saad NSEIR  
Université de Lille, CHU de Lille

Monsieur le Docteur Nourredine LOUKILI  
CHU de Lille

Madame le Docteur Anne VACHEE  
CH de Roubaix