

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

**Soutenu publiquement le 09 octobre 2020
Par M. Régère Alexandre**

**Résistance à la témocilline chez des souches d'*Escherichia coli*
rendues sensibles aux autres bêta-lactamines par le Vitek®2 de
Biomérieux : vérification par approche phénotypique**

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Anne Goffard,
Université de Lille, CHU Lille

Directeur de thèse : Madame le Docteur Anne Vachée, CH Roubaix

Assesseur(s) : Madame le Docteur Caroline Loïez, CHU Lille
Monsieur le Docteur Christian Cattoen, CH Valenciennes



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 :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
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 aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL

M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique

M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques

Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques

M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

REMERCIEMENTS

Aux membres de mon jury :

A **Madame le Professeur Anne Goffard**, je vous remercie de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Je vous remercie également pour les enseignements que vous apportez au cours des études de pharmacie et pour la qualité de la préparation au concours de l'internat. Je vous remercie également pour les renseignements que vous m'aviez apportés pour la recherche d'un stage hors cursus que j'ai pu effectuer. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A **Madame le Docteur Caroline Loïez**, je vous remercie d'être membre du jury évaluant la qualité de mon travail. Je vous remercie également pour les conseils avisés que vous prodiguez en microbiologie au cours de l'internat.

A **Monsieur le Docteur Christian Cattoen**, je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à ce travail et pour avoir accepté ma demande de membre de ce jury. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

A **Madame le Docteur Anne Vachée**, je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordé pour la réalisation de ce travail et de m'avoir fait l'honneur de diriger. Je tiens à vous remercier pour tout le temps que vous avez pu me consacrer. Je souhaite encore vous remercier pour m'avoir fait partager votre passion pour la biologie, et plus particulièrement pour la microbiologie, et de m'avoir montré ce qu'est la biologie clinique. Veuillez-vous assurer de ma sincère gratitude et de ma plus profonde admiration.

Je tiens également à remercier :

L'ensemble des personnes impliquées dans les différents laboratoires qui ont participé au recueil et à l'envoi des souches pour la réalisation de ce travail.

Frédéric Wallet pour les conseils de rédaction et pour connaître PubMed par cœur.

Olivier Gaillot pour sa passion pour la bactériologie, ses photos de bactéries et ses schémas sur les paillasses.

Caroline Laurans, ainsi que l'ensemble de l'équipe de l'UGRI, pour l'intérêt pour l'hygiène hospitalière, les chocolats et les moments passés durant cette crise Covid.

L'ensemble des personnes des équipes de l'Institut de Microbiologie du CHU de Lille avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et qui ont participé à ma formation et à mon développement professionnel.

L'équipe de bactériologie du CH de Roubaix, pour votre bonne humeur et les enseignements que vous m'avez apportés.

Je souhaite dédier ce travail :

A ma famille, je vous remercie d'avoir toujours été présents depuis ma naissance, pour l'aide, les conseils et les encouragements que vous avez su m'apporter durant ces longues années.

A Pharmacie-Si la famille (Alizée, Anthime, Chloé, Clarinette, Gobiche, Huchette, Mathis, Maury, Medhi, Memeye, Merlin, Nieloud, Thomy, Tristan) pour tous les moments partagés ensemble depuis la deuxième année d'études de Pharmacie et tous ceux à venir durant les prochaines années ! Vous êtes une seconde famille pour moi.

A toute l'équipe du bureau 2018-2019 de la FNSIP-BM (Aurélié, Bérénice, Charlotte, Clémence, Guillaume, Jean-David, Juliette, Louis, Lucas, Marion, Moïse, Quentin et Romain) pour toutes nos réunions, nos galères, mais aussi nos conversations, nos fous rires, nos soirées et nos AG.

Aux membres des bureaux 2017-2018 et 2018-2019 de l'AIPBL pour les belles choses qu'on a pu réaliser pour les internes lillois, et plus particulièrement aux membres du bureau 2019-2020 de l'AIPBL pour me supporter en qualité de président.

A Marie, pour m'avoir fait confiance et m'avoir poussé à m'investir davantage dans l'associatif.

A Angèle, pour notre amitié qui a débuté dès le premier jour de notre l'internat et pour ta perpétuelle franchise.

A JD, pour cette amitié tissée au sein du bureau national, pour l'importance de la traçabilité et tes photomontages de génie.

A Olivier, pour toujours répondre et m'apporter des éléments pertinents pour représenter les internes.

A David, pour ton honnêteté et notre amitié qui ne change pas depuis bientôt 10 ans.

A Simon, pour tes conseils et tes aides en statistiques et manipulation de R.

A ma soi-disant co-interne de parasitologie, Pauline, pour les quelques journées pendant lesquelles on se croise durant ce semestre !

A tous mes amis de fac, pour tous les moments partagés sur les bancs, en cafétéria, et en dehors de la faculté.

A Sébastien, pour tous les bons moments passés ensemble à Darty durant mon contrat étudiant.

A ma belle-famille, pour m'avoir accueilli si chaleureusement au sein de votre famille.

Enfin, à ma chérie, Sixtine, pour tous nos moments du quotidien. Pour toujours me soutenir, me remotiver dans mes moments de fatigue. Pour tout l'amour que tu me donnes depuis bientôt deux ans.

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.

Préface

Fabriquée dans les années 1980 pour le traitement des pyélonéphrites, la témocilline fut très vite abandonnée à cause d'une inactivité vis-à-vis de nombreuses espèces bactériennes.

Face à la constante augmentation de résistances aux bêta-lactamines chez les *Enterobacteriaceae* par des bêta-lactamases de type BLSE et céphalosporinase, l'utilisation excessive des carbapénèmes dans le monde a provoqué l'émergence d'entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC). Ces EPC sont devenues un problème majeur de Santé Publique auquel une des stratégies est d'épargner la prescription de carbapénèmes par l'utilisation d'alternatives.

Grâce à ses propriétés physico-chimiques, la témocilline constitue une alternative à l'utilisation des carbapénèmes. Sa structure lui confère une activité vis-à-vis des BLSE et céphalosporinases, ce qui lui permet d'obtenir un regain d'intérêt dans les années 2000. Elle obtint alors une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France en 2014 dans le traitement des infections urinaires compliquées chez l'adulte et chez l'enfant, des voies respiratoires basses, des bactériémies et des plaies.

Pour catégoriser la sensibilité d'une souche bactérienne à un antibiotique, des sociétés savantes de microbiologie établissent des breakpoints permettant de faciliter l'interprétation des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Celles concernant la témocilline sont débattues depuis des années et selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie d'avril 2020 (CA-SFM) une souche est définie résistante si sa CMI est supérieure à 8 mg/L.

Chez les entérobactéries, la résistance acquise à la témocilline se fait majoritairement par l'acquisition de carbapénémases, entraînant alors une résistance ayant un spectre d'activité touchant l'ensemble des autres bêta-lactamines. Cependant, certaines souches sont rendues résistantes à la témocilline par le Vitek®2 alors qu'elles sont sensibles à l'ensemble des autres bêta-lactamines : notre étude a pour objectif de confirmer par l'utilisation de méthodes phénotypiques, la CMI de ces souches pour vérifier leur résistance à la témocilline.

Sommaire

LISTE DES TABLEAUX.....	21
LISTE DES FIGURES	23
LISTE DES ABREVIATIONS	25
PREMIÈRE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	27
I/ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , UNE BACTERIE AUX MULTIPLES FACETTES.....	27
A/ <i>Généralités sur Escherichia coli</i>	27
1. Taxonomie	27
2. Antigènes.....	27
a) Antigène somatique O.....	27
b) Antigène flagellaire H.....	28
c) Antigène capsulaire K.....	28
3. Modes de transmission.....	28
B/ <i>Pathogénicité des souches d'E. coli</i>	29
1. Infections à E. coli uropathogènes.....	30
2. Infections intestinales à E. coli.....	32
3. Autres infections à E. coli.....	37
a) Sepsis.....	37
b) Méningite.....	37
c) Autres infections.....	38
C/ <i>Sensibilité d'E. coli aux β-lactamines</i>	38
II/ METHODES DE DETECTION DE LA SENSIBILITE AUX ATB	43
A/ <i>Méthodes phénotypiques</i>	43
1. Méthodes en milieu liquide	43
2. E-test®.....	45
3. Méthode de diffusion en milieu gélosé.....	46
4. Tests de synergie	46
5. Milieux sélectifs.....	47
6. Méthodes chromogéniques.....	47
B/ <i>Méthodes immunologiques</i>	47
C/ <i>Méthodes basées sur la spectrométrie de masse</i>	48
1. Identification de clones résistants par spectrométrie de masse globale .	48
2. Détection de la croissance bactérienne en présence d'antibiotique	49
3. Détection de la dégradation d'un antibiotique	49
4. Détection de protéines responsables de la résistance.....	50
D/ <i>Méthodes moléculaires et génomiques</i>	50
III/ LA TEMOCILLINE.....	53
A/ <i>Histoire de la témocilline</i>	53
B/ <i>Indications thérapeutiques</i>	54
<i>La témocilline est un médicament à prescription hospitalière. Elle est indiquée par voie parentérale chez les adultes et chez les enfants pour le traitement des infections des voies urinaires compliquées (incluant les pyélonéphrites), des voies respiratoires basses, des bactériémies et des infections des plaies (96).</i>	54
C/ <i>Mécanisme d'action</i>	54
D/ <i>Spectre d'action de la témocilline</i>	56
E/ <i>Tolérance et impact sur le microbiote intestinal</i>	56
F/ <i>Pharmacocinétique</i>	57
G/ <i>Posologie et administration</i>	58

DEUXIÈME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS.....	59
I/ OBJECTIFS	59
II/ MATERIEL ET METHODES.....	61
<i>A/ Isolats bactériens</i>	<i>61</i>
<i>B/ Préparation des souches</i>	<i>61</i>
<i>C/ Détermination de la CMI de la témocilline par méthode E-test®.....</i>	<i>62</i>
<i>D/ Détermination des CMI de la témocilline par méthode Sensititre®.....</i>	<i>63</i>
1. Description de la méthode	63
2. Préparation des plaques.....	64
3. Lecture des CMI	65
<i>E/ Analyses statistiques.....</i>	<i>65</i>
III/ RESULTATS	67
<i>A/ Caractéristiques des souches</i>	<i>67</i>
<i>B/ Résultats des CMI en E-test®.....</i>	<i>69</i>
<i>C/ Résultats des CMI en Sensititre®.....</i>	<i>71</i>
<i>D/ Concordance entre les deux méthodes</i>	<i>72</i>
IV/ DISCUSSION.....	75
<i>A/ Comparaison des trois méthodes.....</i>	<i>75</i>
<i>B/ Répartition des CMI / breakpoints.....</i>	<i>75</i>
<i>C/ Evolution des concentrations critiques de la témocilline</i>	<i>79</i>
<i>D/ Mécanismes de résistance à la témocilline.....</i>	<i>81</i>
VI/ CONCLUSION ET PERSPECTIVES D'ETUDES	85
BIBLIOGRAPHIE	87
ANNEXE I.....	103

Liste des tableaux

Tableau 1. Mécanismes de pathogénicité et syndrome clinique associé selon le pathovar d' <i>E.coli</i> intestinal	33
Tableau 2. Regroupement des entérobactéries selon leur phénotype de résistance naturelle.....	39
Tableau 3. Les différents groupes d'entérobactéries	39
Tableau 4. Classification des carbapénémases	42
Tableau 5. Spectre d'action de la témocilline vis-à-vis de différentes espèces bactériennes	56
Tableau 6. Nombre de souches recueillies par établissement.....	67
Tableau 7. Nombre de souches recueillies par type de service.....	68
Tableau 8. Résistances autres associées à celle de la témocilline	68
Tableau 10. Tableau de contingence ente les variables "résistance à la témocilline" et "co-résistances associées"	70
Tableau 11. Répartition des souches résistantes à la témocilline en fonction du laboratoire d'origine	71
Tableau 12. Tableau de contingence des CMI des 37 souches analysées par les méthodes E-test® et Sensititre®	73
Tableau 13. Différents breakpoints de la témocilline	77
Tableau 14. Nouveaux breakpoints de la témocilline définis par l'EUCAST en avril 2020.....	79

Liste des figures

Figure 1. Répartition des germes les plus fréquemment impliqués dans les infections urinaires.....	30
Figure 2. Physiopathologie des différents pathovars d' <i>E.coli</i> intestinaux. Image de JB Kaper and al. (36).....	37
Figure 3. Transmission de matériel génétique chez les bactéries	40
Figure 4. Classification d'Ambler des différents types de β -lactamases	41
Figure 5. Détermination par analyse multidimensionnelle d'une CMI par le Vitek®2	45
Figure 6. Structure chimique des différentes sous-classes de β -lactamines	54
Figure 7. Structure chimique de la témocilline	55
Figure 8. Photo de deux bandelettes E-test® sur une gélose Mueller-Hinton ensemencée par deux souches d' <i>E.coli</i>	63
Figure 9. Photo d'une plaque Sensititre®	63
Figure 10. Schéma de la plaque Sensititre® FRAM2GN.....	64
Figure 11. Répartition des CMI par méthode E-test®.....	69
Figure 12. Répartition des CMI par méthode Sensititre®	72
Figure 13. Distribution des CMI des souches ATCC 25922 recueillies à partir de différentes sources, zones géographiques et périodes	78
Figure 14. Distribution des CMI des souches ATCC 35218 recueillies à partir de différentes sources, zones géographiques et périodes	78

Liste des abréviations

ACdeBMR : Alliance Contre le développement des Bactéries Multi-Résistantes
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
BCP : BromoCrésol Pourpre
BLSE : Bêta-Lactamase à Spectre Etendu
BSAC : British Society for Antimicrobial Chemotherapy
C1G : Céphalosporine de 1^{ère} Génération
C2G : Céphalosporine de 2^{ème} Génération
C3G : Céphalosporine de 3^{ème} Génération
CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CNF1 : Facteur Cytotoxique Nécrosant 1
CNR : Centre National de Référence
CTX-M : Céfotaximase
DAEC : Diffusely-adhering *Escherichia coli*
EAEC : Enteroaggregative *Escherichia coli*
EBLSE : Entérobactéries productrices de BLSE
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
EHEC : Enterohemorrhagic *Escherichia coli*
EIEC : Enteroinvasive *Escherichia coli*
EPC : Entérobactérie productrice de carbapénémase
EPEC : Enteropathogenic *Escherichia coli*
ETEC : Enterotoxine *Escherichia coli*
EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GES : Guyana extended-spectrum bêta-lactamase
I β L : Inhibiteur de β -Lactamase
IM : Intra-Musculaire
IMP : Actif sur l'imipénème
ITU : Infection du Tractus Urinaire
IV : Intra-veineux
KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
LEE : Locus of Enterocyte Effacement
MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight)
MAT : MicroAngiopathie Thrombotique
NMEC : Neonatal Meningitidis *Escherichia coli*
OXA : Oxacillinase
PLP : Protéines Liant les Pénicillines
SARM : Staphylococcus Aureus Résistant à la Méricilline
SAT : Secreted Autotransporter Toxin
SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique
SHV : Sulfhydryl Variable
SM : Spectrométrie de masse
STEC : Shiga-Toxine *Escherichia coli*
TEM : Temoneira
TRI : TEM résistant aux inhibiteurs
UPEC : Uropathogenic *Escherichia coli*
VAT : Vacuolating Autotransporter Toxin
VEB : Vietnam extended-spectrum bêta-lactamase
VIM : Verona integron-encoded metallo-bêta-lactamase
VTEC : Vero-Toxine *Escherichia coli*
WCMS : Whole-Cell Mass Spectrometry

PREMIÈRE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I/ *Escherichia coli*, une bactérie aux multiples facettes

A/ Généralités sur *Escherichia coli*

1. Taxonomie

Escherichia coli (*E.coli*) appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les entérobactéries sont des bactéries de type bacillaire à coloration de Gram négative, parfois capsulées, non sporulées, ayant un système respiratoire de type anaérobie facultatif, possédant une nitrate réductase et dépourvues d'oxydase.

E.coli a été la première bactérie du genre *Escherichia* décrite par Castellani et Chambers en 1919, bien qu'elle fut mise en cause pour la première fois par Théodore Escherich en 1885 dans l'étiologie de l'entérite infantile. 4 autres espèces du genre *Escherichia* ont par la suite été décrites : *Escherichia hermannii* et *Escherichia vulneris* en 1983, *Escherichia fergusonii* en 1985, puis *Escherichia albertii* en 2003.

Bien qu'*E.coli* soit principalement une bactérie commensale des êtres humains et des animaux, la niche écologique étant le tube digestif et plus particulièrement le côlon, celle-ci peut être à l'origine de nombreuses pathologies selon son sérotype, pouvant aller d'une banale diarrhée à des infections systémiques létales. Le sérotype d'*E.coli* concerne des marqueurs de surface qui sont l'antigène somatique O et l'antigène flagellaire H. L'antigène capsulaire K n'est pas présent de manière constante. En 1944, Kauffman établit une méthode de sérotypage utilisant ces antigènes. Il existe une grande variabilité de chacun de ces antigènes, et certaines combinaisons de ces antigènes, à l'origine de sérotypes particuliers, sont plus à même de provoquer certaines pathologies. La caractérisation de ces sérotypes permet le suivi de l'épidémiologie de ces souches plus particulières.

2. Antigènes

a) Antigène somatique O

L'antigène somatique O, définissant le sérogroupe, fait partie du lipopolysaccharide de la membrane externe d'*E.coli*. L'antigène O signifie « Ohne Kapsel » qui signifie « sans capsule », car celui-ci est détectable lorsque la bactérie ne possède pas de capsule ou lorsque celle-ci est détruite. Cet antigène est composé d'unités répétitives d'un ou plusieurs sucres lui permettant de présenter une diversité remarquable d'antigènes. Un peu moins de 200 antigènes O sont actuellement différenciés de part des variations dans les combinaisons, les positions, la

stéréochimie, les liens entre les sucres, et la présence ou non d'entités non glucidiques, faisant de lui la région la plus variable de la cellule (1). Le sérogroupage peut être réalisé à l'aide d'un immun sérum du fait du pouvoir agglutinant de ces antigènes. Si l'antigène O est absent, le sérogroupage est alors impossible, mais l'identification reste possible par des techniques moléculaires. Le cluster de gènes « *rfb* » regroupe les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse de l'antigène O (2).

b) Antigène flagellaire H

L'antigène flagellaire H est un antigène de nature protéique qui fait partie du flagelle bactérien permettant la mobilité de la bactérie. Il existe 53 antigènes H, de H1 à H56 (H13, H22 et H50 n'existant plus), se différenciant par des sous-unités de flagellines constituant le flagelle par polymérisation (3). Le sérotypage peut être réalisé par séro-agglutination dans certains laboratoires spécialisés.

De la même manière que pour l'antigène O, des méthodes de caractérisations moléculaires ont été développées, identifiant le gène « *fliC* » qui code pour l'antigène H et permettant ainsi le typage (4,5).

Les *E.coli* immobiles possèdent également un flagelle mais celui n'est pas fonctionnel.

c) Antigène capsulaire K

L'antigène K est un antigène de surface qui n'est pas toujours présent. Il s'agit d'un antigène de capsule. Lorsqu'il est exprimé par la bactérie, celui-ci bloque alors l'agglutinabilité de l'antigène O. Il existe plus de 80 antigènes K classés en 4 groupes de capsules qui diffèrent par les voies de polymérisation (6).

Lorsqu'il est présent, l'antigène capsulaire K permet à la bactérie qui le possède d'échapper plus facilement au système immunitaire qu'une souche n'en possédant pas par un mécanisme d'échappement à la phagocytose (7).

3. Modes de transmission

E.coli niche au sein du tube digestif, plus particulièrement au niveau du côlon où elle est l'espèce prédominante du microbiote aérobie. De manière générale, son réservoir naturel est l'Homme, ainsi que tous les animaux à sang chaud. *E.coli* représente à lui seul 80% de la flore bactérienne aérobie de l'intestin. La colonisation

du tube digestif par *E.coli* se fait dès la naissance, à partir du microbiote maternel chez le nouveau-né, puis par voie orale principalement à partir de l'alimentation.

Sur le plan génétique, *E.coli* est l'une des espèces bactériennes comportant une très forte variabilité. Elle effectue un cycle dans lequel elle est capable de s'adapter entre son habitat primaire, c'est-à-dire l'intestin des vertébrés où elle y vit à l'état commensal (8), et son habitat secondaire que sont l'eau, le sol et les sédiments (9). Bien qu'une grande partie des *E.coli* soient des bactéries commensales du tube digestif nous protégeant de l'implantation de bactéries pathogènes, certaines souches provoquent des infections chez leurs hôtes ; ces souches sont alors dites « pathogènes ».

B/ Pathogénicité des souches d'*E.coli*

Certaines souches d'*E.coli*, dites pathogènes, peuvent provoquer chez l'hôte des infections que l'on peut diviser en deux catégories : les infections intestinales (10) et les infections dites extra-intestinales (11). Les infections extra-intestinales à *E.coli* vont regrouper notamment les infections urinaires, les bactériémies, les méningites néonatales. La diversité des pathologies à *E.coli* s'explique par ses diversités génétiques. Les souches pathogènes expriment des gènes codant pour des « facteurs de virulence ». Parmi ces facteurs de virulence, on retrouve des adhésines, des toxines, des systèmes de capture du fer (ce sont des éléments indispensables à sa survie dans l'urine ou le sang), des antigènes de surface protégeant la bactérie du système immunitaire, des capsules. Ainsi, les souches d'*E.coli* pathogènes peuvent être regroupées en 8 principaux pathovars (12).

Concernant les *E.coli* pathogènes responsables d'infections intestinales, ce groupe rassemble 6 des 8 pathovars majeurs. Ces pathovars ont en commun la capacité de se multiplier dans l'intestin de leurs hôtes, mais seront cependant à l'origine de diverses pathologies intestinales en fonction de leurs facteurs de virulence. On retrouve ainsi les ETEC (*E.coli* entérotoxinogènes), les EHEC (*E.coli* entérohémorragiques), les EAEC (*E.coli* entéroagrégatifs), les EIEC (*E.coli* entéroinvasifs), les EPEC (*E.coli* entéropathogènes) et les DAEC (*E.coli* à adhérence diffuse).

Concernant les *E.coli* pathogènes de maladies extra-intestinales, il s'agit de souches capables de se propager dans l'organisme grâce à l'acquisition d'un système s'affranchissant du système immunitaire de l'hôte (13). Parmi ces infections extra-intestinales, on retrouve notamment les infections du tractus urinaire (ITU) provoquées par les UPEC (*E.coli* uropathogènes), les méningites néonatales dues aux NMEC

(neonatal meningitidis *E.coli*), et les septicémies pouvant être causées aussi bien par des UPEC que par des NMEC.

1. Infections à *E.coli* uropathogènes

Les ITU représentent la deuxième cause d'infection communautaire après les infections des voies respiratoires, et elles représentent la première cause des infections associées aux soins.

Parmi les germes retrouvés, *E.coli* est le principal germe en cause, aussi bien dans les infections communautaires que dans celles associées aux soins (Figure1).

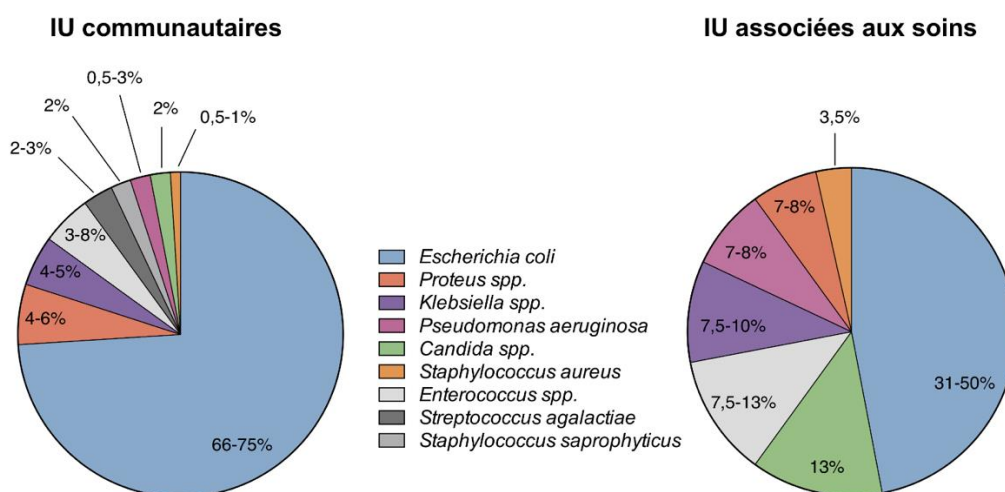


Figure 1. Répartition des germes les plus fréquemment impliqués dans les infections urinaires (Fiche SFM2019)

Ces infections urinaires sont causées par des souches uropathogènes d'*E.coli*, les UPEC. Ces souches sont différentes des souches commensales de la flore intestinale par l'expression de différents facteurs de virulence leur permettant d'adhérer et d'infecter l'appareil urogénital. Parmi ces facteurs de virulence, on retrouve des facteurs de virulence de surface et des facteurs de virulence sécrétés.

a) Les facteurs de virulence de surface

Les fimbriae, notamment les fimbriae de type 1 et les fimbriae de type P ou PAP (Pyelonephritis Associated Pili), sont les facteurs de virulence de surface les plus communs. D'autres fimbriae tels que les fimbriae F1C et fimbriae S peuvent être retrouvés.

Ces fimbriae jouent un rôle important dans l'adhésion à la surface des cellules hôtes de l'épithélium urogénital, étape importante de la pathogénicité des ITU (14,15). Ils

sont codés par le chromosome bactérien. Chaque souche peut exprimer différents types de fimbriae en fonction de son génome et des phases dans lesquelles se situe la bactérie (16).

- Les fimbriae de type 1 permettent l'adhésion d'*E.coli* à des glycoprotéines mannolysées présentes dans la vessie. Ils jouent un rôle plus important dans les cystites que les pyélonéphrites.
- Les fimbriae de type P permettent l'adhésion à des récepteurs spécifiques portant un doublet galactose présents sur les cellules rénales, favorisant leur migration le long des uretères. Ces fimbriae sont donc plus souvent associés à l'invasion de la partie supérieure du tractus urinaire et les UPEC les exprimant provoquent plus facilement des pyélonéphrites.
- Les fimbriae de type F1C participent à la formation de biofilms et à l'adhérences des souches les exprimant aux surfaces biotiques et abiotiques. Ils possèdent une grande homologie de séquence avec les fimbriae de type S (17).
- Les fimbriae de type S sont souvent présents chez les *E.coli* extra-intestinaux causant des méningites et septicémies chez les nouveau-nés et sont présents chez 50% des UPEC (18).

Les flagelles, associés au chimiotactisme, contribuent à la virulence des UPEC en leur permettant d'échapper aux réponses immunes de l'hôte et de migrer vers d'autres sites du tractus urinaire (19).

La capsule lipopolysaccharidique joue un rôle dans la stratégie d'échappement au système immunitaire de la bactérie. En effet, la majorité des *E.coli* extra-intestinaux, dont les UPEC, produisent des capsules de groupe II. Ces types capsulaires constituent un groupe hétérogène dont les divers glycoconjugués trouvés ressemblent à ceux des hôtes vertébrés, ce qui explique la faculté d'échappement au système immunitaire (20).

b) Les facteurs de virulence sécrétés

Parmi les facteurs de virulence sécrétés, les sidérophores sont l'un des éléments fondamentaux pour permettre à la bactérie de se diviser. En effet, il s'agit de système d'acquisition du fer dans le milieu nécessaire, ressource nutritive nécessaire au développement bactérien. Les sidérophores sont des molécules chélatrices du fer permettant le transport du fer à l'intérieur de la cellule bactérienne via l'expression par

la bactérie de récepteurs spécifiques reconnaissant le complexe sidérophores-fer et entraînant ensuite la libération du fer dans l'espace périplasmique de la cellule bactérienne (21).

Parmi les autres facteurs de virulences pouvant être sécrétés par les UPEC, les plus connus et mieux étudiés sont l'hémolysine a, le facteur cytotoxique nécrosant 1 (CNF1) et les toxines Sat et Vat :

- L'hémolysine a, d'origine chromosomique, est codée par le cluster de gènes *hly*. Son principal rôle consiste en la formation de pores dans la membrane des cellules infectées, provoquant une fuite ionique responsable d'une lyse cellulaire.
- Le CNF1 est une toxine qui va agir sur les cellules infectées. Il est capable de réorganiser le cytosquelette des cellules infectées et ainsi faciliter la survie des UPEC pendant la réponse inflammatoire en modulant l'activité des polynucléaires et leur fonction phagocytaire.
- Les facteurs Sat (« secreted autotransporter toxin ») et Vat (« vacuolating autotransporter toxin ») sont des toxines entraînant une altération de l'épithélium rénal lors d'infections ascendantes d'ITU (22,23).

2. Infections intestinales à *E.coli*

Il existe différentes présentations d'infections intestinales provoquées par *E.coli*. Ces différences s'expliquent par l'existence de 6 pathovars intestinaux décrits principalement en fonction des signes cliniques engendrés et des facteurs de pathogénicité exprimés.

Ces pathovars peuvent se différencier selon deux grands mécanismes dans la survenue des diarrhées infectieuses :

- Le mécanisme toxinique ou toxinogène : il correspond à la production d'une toxine par le micro-organisme après sa fixation à la surface de l'épithélium digestif. La toxine libérée agit principalement au niveau de l'intestin grêle et provoque une sécrétion active d'électrolytes et d'eau par les cellules de l'épithélium digestif responsable de la symptomatologie ;
- Le mécanisme entéro-invasif : il se présente selon 2 syndromes cliniques différents.
 - Le premier est le syndrome dysentérique secondaire à la pénétration des germes dans la paroi intestinale. Les bactéries vont alors envahir les cellules épithéliales et s'y multiplier jusqu'à leur destruction.

- Le second est le syndrome gastro-entéritique dans lequel les bactéries vont traverser la muqueuse intestinale sans détruire les cellules mais en provoquant une altération de celles-ci.

Le tableau 1 montre le syndrome clinique et le mécanisme de pathogénicité selon le type d'*E.coli* intestinal.

Pathovar	Syndrome clinique	Mécanismes de pathogénicité
ETEC	Syndrome cholérimforme	Mécanisme toxinique, sécrétoire
EHEC	Syndrome dysentérique	Mécanisme entéro-invasif
EAEC		
EIEC		
EPEC	Syndrome gastro-entéritique	
DAEC		

Tableau 1. Mécanismes de pathogénicité et syndrome clinique associé selon le pathovar d'E.coli intestinal

La contamination par ces souches se fait selon deux types de transmission :

- Une transmission indirecte à partir d'aliments contaminés, d'eau souillée
- Une transmission directe à partir d'une personne malade (contamination liée au péril féco-oral)

• **EPEC**

L'EPEC est le premier pathovar intestinal d'*E.coli* étudié dans les selles. La survenue de l'infection par les EPEC est brusque, avec l'émission de selles aqueuses abondantes généralement ni sanglantes, ni mucoïdes. D'autres symptômes tels que de la fièvre, des vomissements et des malaises peuvent survenir.

On distingue deux groupes d'EPEC, les EPEC typiques et les EPEC atypiques. Les EPEC typiques sont l'une des principales causes de diarrhée infantile dans les pays en développement, responsables de 30 à 40% des diarrhées infantiles notamment chez les enfants de moins de 2 ans. Les souches typiques sont rares dans les pays

industrialisés, là où les souches atypiques semblent être une cause plus fréquente de diarrhée et causent la maladie chez une plus large tranche d'âges. Les typiques et les atypiques diffèrent selon des caractéristiques génétiques, des sérotypes et des propriétés de virulence (24,25).

La pathogénicité des EPEC s'explique par leur capacité d'adhérence aux entérocytes. Elle est liée à l'expression du gène *eae* (« *E.coli* attaching and effacing ») qui code pour une protéine appelée l'intimine jouant un rôle dans le contact entre la bactérie et la cellule hôte. L'ensemble des gènes permettant le phénomène d'attachement-effacement est regroupé sur le LEE (« Locus of Enterocyte Effacement ») (26).

- **ETEC**

Les diarrhées provoquées par les souches ETEC sont les plus couramment provoquées par les souches pathogènes d'*E.coli*. Il y aurait plus de 650 millions de cas chaque année de diarrhées provoquées par des ETEC. Elles ont principalement lieu dans les pays en développement où l'accès à l'eau potable est difficile, touchant principalement les enfants, avec des pics d'incidence durant les saisons chaudes et humides. La transmission se fait par l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. Ces souches sont rarement incriminées dans les pays développés (27).

Après la colonisation des entérocytes au niveau de l'intestin grêle grâce à des facteurs d'adhésion appelés CFA « Colonization Factor Antigen », ces souches vont sécréter des toxines cytotoxiques (appelées entérotoxines) qui vont alors entraîner une fuite d'électrolytes et d'eau, responsable d'une diarrhée liquidienne aiguë, de douleurs abdominales et de nausées, parfois accompagnées de fièvre (28,29).

Plusieurs études ont montré que 20 à 60% des voyageurs venant de pays développés sont atteints de diarrhée lorsqu'ils se rendent dans des régions où l'infection par ETEC est endémique (30). Ainsi, cette maladie est connue sous le nom de « diarrhée des voyageurs », plus couramment appelée « turista ».

- **EHEC**

Les souches d'EHEC sont également appelées STEC (*E.coli* producteurs de shigatoxines) ou VTEC (*E.coli* producteurs de vérotoxines). Elles secrètent des exotoxines, appelées shigatoxines en raison de leur homologie avec la toxine produite par *Shigella dysenteriae*, ou également appelées vérotoxines pour leur activité de mort cellulaire sur les cellules Vero en culture. Ces souches sont responsables d'un

syndrome dysentérique à l'origine de diarrhées sanglantes qui peuvent être épidémiques ou sporadiques.

La contamination est majoritairement indirecte, d'origine alimentaire par l'ingestion de viande de bœuf contaminée insuffisamment cuite, de produits laitiers non pasteurisés, de fruits et légumes souillés par des selles, ou par voie hydrique à partir d'eau de boisson contaminée ; la contamination peut également se faire de manière interhumaine par contact avec une personne malade.

Principalement chez les enfants, ces souches peuvent être à l'origine d'une microangiopathie thrombotique (MAT) associée à des défaillances d'organes, notamment une défaillance rénale : c'est ce qu'on appelle le syndrome hémolytique et urémique (SHU). Ce SHU peut ensuite entraîner des défaillances d'autres organes tels que le foie, le pancréas, le système nerveux central ou encore le cœur.

Les premiers cas furent décrits aux Etats-Unis et au Canada en 1982 et mirent en évidence un sérotype particulier, le sérotype O157 : H7 qui contaminait la viande de hamburger (31,32). Ce sérotype particulier est le principal responsable de SHU parmi les EHEC (33). En plus de la production de deux types de shigatoxines (Stx1 et Stx2), ces souches possèdent de nombreux facteurs de virulence tels que le *LEE* comprenant le gène *eae*, mais aussi d'autres facteurs de virulence tels qu'une entérohémolysine responsable d'une lyse des cellules consécutive due à la formation de pores dans la membrane cytoplasmique, une sérine protéase capable de cliver le facteur V de la coagulation et qui contribuerait au développement des colites hémorragiques (34).

Ces souches représentent une préoccupation en santé publique, notamment chez les enfants de moins de 3 ans. La prévention de ces infections passe par des règles hygiéno-diététiques simples.

- **EAEC**

Ces souches furent les plus récentes décrites des *E.coli* intestinaux. Elles ont été décrites pour la première fois en 1987 à partir de leur phénotype d'adhérence agrégatif distinct en forme de briques à la surface de cellules Hep-2 (35). Cette propriété est tout d'abord due à la présence d'un facteur d'adhésion agrégatif (AAF), d'origine plasmidique, puis après fixation, à la production d'un mucus formant un biofilm à la surface des entérocytes qui protégera les bactéries et leur permettra de relarguer des toxines responsables de la symptomatologie (36). Des études épidémiologiques travaillant sur des souches d'EAEC ont montré que leur virulence est complexe,

hétérogène et dépendante de nombreux facteurs bactériens et du statut immunitaire de l'hôte (37).

Elles sont responsables de diarrhées du nourrisson et des jeunes enfants, principalement dans les pays émergents. La transmission de ces souches est également liée au péril fécal.

- **EIEC**

Ces souches sont à l'origine de syndromes dysentériques aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte. Sur les plans biochimiques, génétiques et pathogéniques, elles sont étroitement liées avec les bactéries du genre *Shigella*. Des études de pathogénie montrent que les caractéristiques de pathogénicité sont identiques à celles de *Shigella spp.* (38,39).

Les EIEC pénètrent la muqueuse intestinale et engendrent une inflammation de la muqueuse à l'origine d'une diarrhée aqueuse, de fièvre et crampes abdominales, la manifestation la plus grave de l'infection étant la dysenterie bacillaire.

Les EIEC sont endémiques dans la plupart des pays en développement et peuvent parfois causer des épidémies sporadiques dans des pays industrialisés (40).

- **DAEC**

Ces souches appartiennent à une catégorie d'*E.coli* qui produit une adhérence diffuse en culture sur cellules Hep-2. Cette adhésion est possible grâce à l'expression d'un fimbriae appelé F1845 (41). Leur pouvoir pathogène est controversé dans la littérature (42,43). Des études montrent un lien entre DAEC et diarrhées (44,45) ; tandis que d'autres non (46,47).

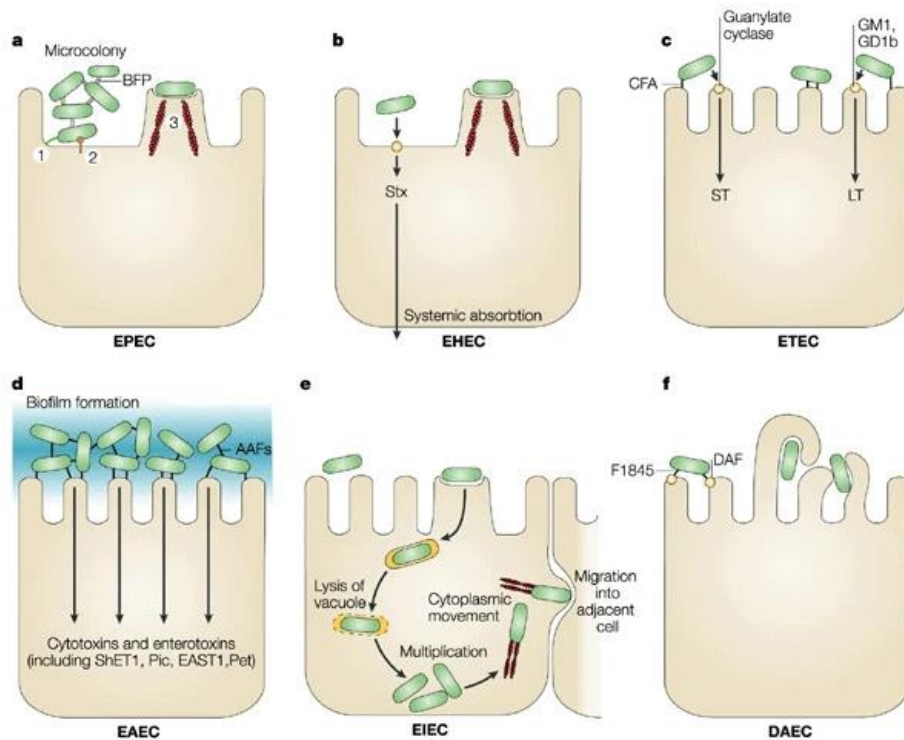


Figure 2. Physiopathologie des différents pathovars d'*E.coli* intestinaux. Image de JB Kaper and al. (39)

3. Autres infections à *E.coli*

a) Sepsis

Les sepsis sont l'une des infections invasives bactériennes les plus courantes indépendamment de l'âge, mais sont plus fréquentes chez les nouveau-nés et nourrissons du fait de la naïveté de leur système immunitaire.

Différentes études ont typé les souches d'*E.coli* responsables de sepsis. Dans le cas de sepsis chez l'adulte, les antigènes O les plus fréquents dans chacune de ces études sont les antigènes O2, O4, O6, O16, O18 et O75 (48–50). Chez les nouveau-nés, les sérogroupes les plus rencontrés par ordre de fréquence semblent être O16, O4, O7 et O18 (51). Ces antigènes O sont également les plus isolés d'infections urinaires, l'un des sites les plus fréquents de bactériémie.

Les souches d'*E.coli* isolées dans le cas de bactériémie néonatales diffèrent par une plus grande proportion de souches comportant l'antigène capsulaire K1 (51).

b) Méningite

E.coli est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les cas de méningites chez les prématurés et la seconde impliquée dans les méningites des nouveau-nés (52). L'incidence globale des méningites est estimée à 5,3 pour 100 000 naissances,

avec une fréquence 7 fois plus élevée chez les prématurés que chez les nouveau-nés (53). Les méningites néonatales sont plus couramment associées à des séquelles importantes, en particulier à des incapacités neuromotrices et à des troubles épileptiques, que la méningite après l'âge d'un mois (54).

Dans les cas de méningite, la majorité des souches présente l'antigène capsulaire K1; il semble être présent dans plus de 80% des cas de méningites à *E.coli* dans lesquelles la détection de celui-ci a été réalisée (53,55). Une étude française montre que sur 141 souches génétiquement caractérisées par le Centre National de Référence (CNR) des *E.coli*, le sérotype O1 est prédominant (27,7%), suivi des sérotypes O18 (19,1%), O45 (11,3%), et O7 (6,4%). La répartition des sérotypes varie d'une région à une autre du monde avec une prédominance mondiale de l'antigène somatique O18 associé à l'antigène K1 (55).

c) Autres infections

E.coli peut être à l'origine d'autres pathologies, de manière moins fréquente, selon son sérotype, l'expression de facteurs de virulence et le terrain physiopathologique des personnes (56). Certaines souches peuvent être rencontrées dans des infections de la peau et des tissus mous, telles que des abcès, des cas de fasciites nécrosantes ou de cellulite, pouvant nécessiter des hospitalisations (57). D'autres souches peuvent provoquer la formation de grandes quantités de gaz pouvant être à l'origine d'infections emphysemateuses (58,59). De même, certaines souches peuvent être à l'origine d'endocardites chez des personnes présentant des co-morbidités (60).

E.coli est également le principal bacille à Gram négatif responsable de péritonites dans un contexte de dialyses péritonéales (61). Pour finir, *E.coli* est également le principal germe identifié dans le cas d'infection biliaire (62).

C/ Sensibilité d'*E.coli* aux β -lactamines

- **Résistance naturelle**

Les entérobactéries sont classées en différents groupes en fonction de leur résistance naturelle aux β -lactamines (tableau 2). Ces résistances naturelles caractérisent l'ensemble des souches d'une même espèce, c'est ce qu'on appelle le phénotype sauvage. Ce phénotype sauvage s'explique par la présence de gènes d'origine chromosomique codant pour différentes β -lactamases qui permettent en outre cette classification. Ainsi, ces résistances sont toujours transmises à la

descendance (= transmission verticale), alors que la transmission entre deux espèces de manière horizontale est très rare. *E. coli* fait partie du groupe 1 des entérobactéries.

	BACTERIES	MECANISME DE RESISTANCE NATURELLE
GROUPE 0	<i>Salmonella spp, Proteus mirabilis</i>	Absence de β -lactamase
GROUPE 1	<i>Shigella spp, E.coli</i>	Céphalosporinase de bas niveau
GROUPE 2	<i>Klebsiella pneumonia, K. oxytoca, E. hermanii, Citrobacter koseri, C. amalonaticus</i>	Pénicillinase de bas niveau
GROUPE 3	<i>P.rettgeri, P.stuartii, Hafnia alvei, Enterobacter cloacae, E. aerogenes, C. freundii, S. marcescens, Morganella morgani</i>	Céphalosporinase de bas niveau
GROUPE 4	<i>Yersinia enterocolitica, Serratia fonticola</i>	Céphalosporinase + pénicillinase
GROUPE 5	<i>P. vulgaris, P. penneri</i>	Céfuroximase
GROUPE 6	<i>K. ascorbata, K. cryocrescens, K. georgiana, Rahnella aquatilis, C. sedlakii, E. persicina</i>	BLSE chromosomique

Tableau 2. Regroupement des entérobactéries selon leur phénotype de résistance naturelle

Le phénotype sauvage de résistance selon le groupe auquel appartient une entérobactérie confère des profils de sensibilité variés aux β -lactamines. *E.coli*, comme l'ensemble des entérobactéries, est naturellement résistante aux pénicillines G (benzylpénicilline) et M (mécicilline, oxacilline, cloxacilline) mais sera sensible à l'ensemble des autres β -lactamines (tableau 3).

GROUPE	0	1	2	3	4	5	6
AMINOPENICILLINES + INHIBITEUR DE B-LACTAMASES (IBL)	S	S/I	R	R	R	R	I/R
CARBOXYPENICILLINES + IBL	S	S	R	S	R	S	R/I
UREIDOPENCILLINES + IBL	S	S	S	S	S	S	S
C1G	S	S/I	S	R	R	R	R/I
C2G	S	S	S	S/I/R	R	R	R/I
C3G	S	S	S	S	S	S	S/I
CEFEPIME	S	S	S	S	S	S	S/I
AZTREONAM	S	S	S	S	S	S	S/I
CARBAPENEMES	S	S	S	S	S	S	S

Tableau 3. Les différents groupes d'entérobactéries

- **Résistances acquises**

Les entérobactéries sont capables d'acquérir des résistances supplémentaires à leur résistance naturelle. Ces résistances peuvent être apportées par des mutations chromosomiques, par l'acquisition de matériel génétique supplémentaire à type de transposons ou d'intégrons, mais majoritairement par l'acquisition de plasmides contenant des gènes codant pour différents types de résistances. Le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries est l'acquisition de gène codant pour des β -lactamases. Ces résistances, dites acquises, vont se transmettre à la fois de manière horizontale et à la fois de manière verticale (figure 3).

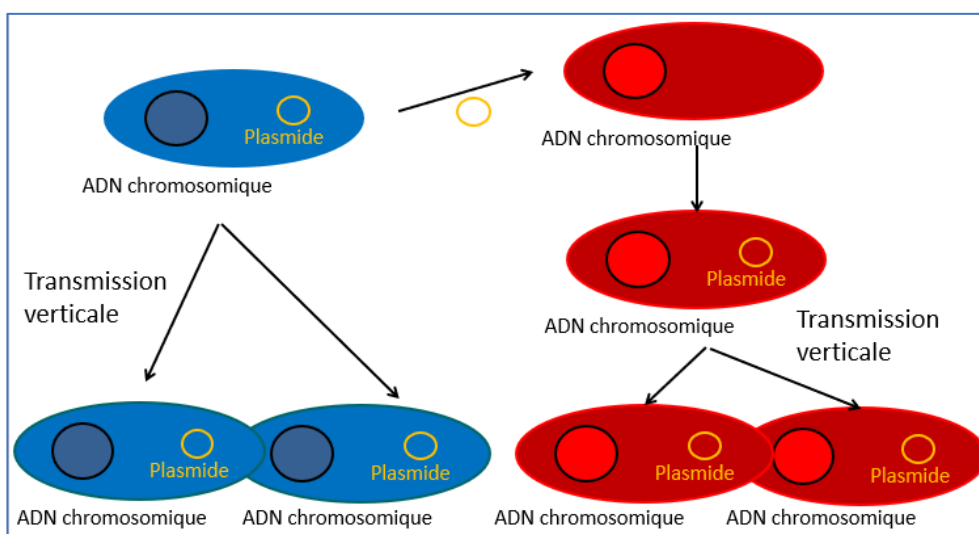


Figure 3. Transmission de matériel génétique chez les bactéries

Il existe deux classifications des β -lactamases en fonction de leur structure et de leur spectre de résistance conféré : celle de Bush et celle d'Ambler (63,64). La plus simple et plus utilisée est celle d'Ambler qui classe les β -lactamases en 4 classes distinctes (figure 4).

A	<ul style="list-style-type: none"> • Pénicillinases de type TEM, SHV, TRI • BLSE de type TEM, SHV, CTX-M, GES, PER, VES, VEB • Carbapénémases de type sérine-protéases KPC, GES, ...
B	<ul style="list-style-type: none"> • Métallo-bêta-lactamases de type VIM, NDM, IMP
C	<ul style="list-style-type: none"> • Céphalosporinases (AmpC)
D	<ul style="list-style-type: none"> • Oxacillinases (OXA) • BLSE de type OXA • Oxa-carbapénémases (OXA-48 et variants)

Figure 4. Classification d'Ambler des différents types de β -lactamases

Selon le type de β -lactamases, le profil de sensibilité aux β -lactamines varie.

- **Les pénicillinases**

Les pénicillinases sont des β -lactamases conférant une résistance, à des niveaux variables selon l'enzyme impliqué (TEM-1, TEM-2, SHV-1, ..), aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines, parfois aux uréidopénicillines. L'association d'un inhibiteur de β -lactamases permet de récupérer la sensibilité à ces antibiotiques. En cas de forte expression, ces pénicillinases peuvent conférer une résistance de bas niveau aux C1G, C2G et aux inhibiteurs de β -lactamases.

Parmi les pénicillinases, certaines peuvent posséder une vraie résistance aux inhibiteurs de β -lactamases. Il s'agit majoritairement des TRI (TEM résistants aux inhibiteurs) qui sont des dérivés de TEM-1 et TEM-2.

- **Les BLSE**

Les premières BLSE ont été décrites en 1983 et sont des BLSE dérivées de pénicillinases de type TEM et SHV(65). D'autres types de BLSE sont apparus au cours des années 1990, non dérivées de pénicillinases, ce sont les CTX-M (céfotaximases), dont la première fut découverte en France en 1991 (66). Ces BLSE proviennent du chromosome de bactéries de l'environnement du genre *Kluyvera* qui les expriment à très bas niveau. Des éléments génétiques suggèrent la mobilisation du gène *bla*_{CTX-M} depuis le chromosome de *Kluyvera spp.* vers d'autres espèces bactériennes via leur insertion dans des plasmides qui ont ainsi permis leur transmission (67). Il existe d'autres rares types de BLSE non dérivées de TEM et SHV tels que les types GES, VEB et PER (68–70).

Le spectre d'hydrolyse des BLSE concerne l'ensemble des β -lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes, l'hydrolyse des C3G, C4G et C5G étant dépendante du type d'enzyme et de la souche concernée. La majorité des BLSE est sensible à l'action d'inhibiteurs de β -lactamases.

- **Les céphalosporinases**

Les entérobactéries peuvent recevoir un plasmide contenant des gènes codant l'expression de céphalosporinases.

Chez *E.coli* et chez les entérobactéries de groupe 3, à la suite de phénomènes de mutations génétiques ou de duplications de gènes, il peut y avoir une surproduction de céphalosporinase constitutive chromosomique, on parle alors de mutants dérégulés. Cette hyperproduction entraîne une résistance à l'ensemble des β -lactamines à l'exception des carbapénèmes et du céfépime.

- **Les carbapénémases**

Problème majeur de santé publique, l'acquisition de carbapénémases par les entérobactéries leur confère une résistance de très large spectre aux β -lactamines. Ces enzymes possèdent une forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes, antibiotiques de la famille des β -lactamines de dernier recours, et compromettent l'efficacité de la majorité des β -lactamines.

Le spectre d'activité hydrolytique vis-à-vis des β -lactamines est dépendant du type de β -lactamases. Selon leurs propriétés, les carbapénémases sont classées dans 3 des 4 catégories de la classification d'Ambler (tableau 4).

	Classe A (KPC)	Classe B (VIM, NDM, IMP)	Classe D (OXA)
Spectre	Toutes les β -lactamines	Toutes les β -lactamines sauf l'aztréonam	Restreint : pas d'activité sur les C3G
Matériel génétique	Plasmide/transposons	Plasmide/transposons	Plasmide/transposons
Epidémiologie	Dans le monde entier	NDM : Inde, Pakistan IMP : Chine, Italie, Canada	Pourtour méditerranéen (Egypte, Turquie, Liban), Inde
Particularités	Sensibilité aux inhibiteurs de β -lactamases	Résistance inhibée par l'association avec de l'EDTA ou de l'acide dipicolinique	Résistance à la témocilline

Tableau 4. Classification des carbapénémases

II/ Méthodes de détection de la sensibilité aux ATB

La détection de la sensibilité aux antibiotiques présente deux principaux intérêts : un intérêt thérapeutique et un intérêt épidémiologique. Dans l'intérêt thérapeutique, les buts sont d'évaluer la sensibilité d'une souche bactérienne à différents antibiotiques et de dépister certains mécanismes de résistance afin d'ajuster le traitement antibiotique en fonction du germe et de ses sensibilités aux antibiotiques d'intérêt. L'intérêt épidémiologique porte importance à l'évolution des spectres de résistance aux antibiotiques des principaux germes pathogènes afin d'adapter l'antibiothérapie probabiliste.

Afin de détecter la sensibilité aux antibiotiques, il existe une panoplie de techniques. Il existe des méthodes permettant de déterminer de manière directe ou indirecte une CMI, des méthodes permettant la détection de mécanismes enzymatiques, des méthodes permettant de dépister des protéines bactériennes d'intérêt et des méthodes permettant de révéler des gènes de résistance.

A/ Méthodes phénotypiques

1. Méthodes en milieu liquide

Les méthodes de dilution permettent d'obtenir une mesure directe de la CMI. Celles-ci peuvent aussi bien être réalisées en milieu solide qu'en milieu liquide. La méthode de dilution en milieu liquide, méthode de référence, consiste à réaliser une gamme de concentrations de l'antibiotique à tester en raison géométrique de base 2 passant par 1 (par exemple 0,25 – 0,5 – 1 – 2 – 4 – 8). Dans chaque dilution est ajouté un inoculum bactérien standardisé, puis après 18 à 24 heures d'incubation la lecture de la CMI est réalisée à l'œil nu. La CMI correspond à la première dilution pour laquelle l'inoculum bactérien ne s'est pas développé. Cette méthode requiert une quantité importante de tubes à manipuler, environ 100 tubes pour une dizaine d'antibiotiques à tester, et ne s'utilise donc plus en routine au laboratoire de biologie médicale. Des variantes de cette méthode ont été développées, variantes qui consistent à utiliser des microcupules en plaques au lieu de tubes : il s'agit des microméthodes en milieu liquide. Des méthodes automatisées de microplaques ont été développées afin d'améliorer la prise en charge des examens microbiologiques dans les laboratoires, telles que les méthodes Sensititre® et Microscan® par exemples (71,72). Une autre méthode automatisée en milieu liquide utilise des cassettes sur lesquelles des séries de puits réactionnels répartissent différentes dilutions d'antibiotiques : c'est le système Vitek®2 (bioMérieux).

Le Vitek®2 est un automate permettant de réaliser des tests d'identification et d'antibiogramme, de manière rapide et précise à partir d'un inoculum préalablement standardisé. L'automate utilise des cassettes (ou cartes unitaires) d'antibiogramme prêtes à l'emploi qui sont uniques et propres à chaque isolat.

Ces cartes AST contiennent différents puits dont la concentration en antibiotiques est croissante dans le bouillon de culture et au moins un puits de contrôle positif qui est un bouillon sans antibiotique.

Après avoir réparti dans chacun des puits la solution contenant l'inoculum bactérien, le Vitek®2 va contrôler la croissance dans tous les puits de manière continue toutes les 15 minutes, de sorte que la croissance dans le puits positif dépasse un seuil minimal prédéfini de croissance bactérienne détecté par turbidimétrie, ce qui permet de montrer que l'isolat de test est viable et qu'il croît à vitesse appropriée pour débiter l'analyse des différents puits contenant les antibiotiques.

La CMI est déterminée en comparant la croissance de l'isolat bactérien à celle d'isolats de référence. Le Vitek®2 va comparer la croissance dans les puits contenant des antibiotiques et le puits contrôle, résultats qu'il va exprimer en pourcentages. Ces pourcentages, ou valeurs de changement de croissance des organismes, permettent au Vitek®2 de déterminer des CMI précises par une analyse multidimensionnelle à partir de quelques concentrations antimicrobiennes (figure 5). De ce fait, en utilisant 3 concentrations antimicrobiennes, le Vitek® 2 est capable de rendre 6 CMI différentes.

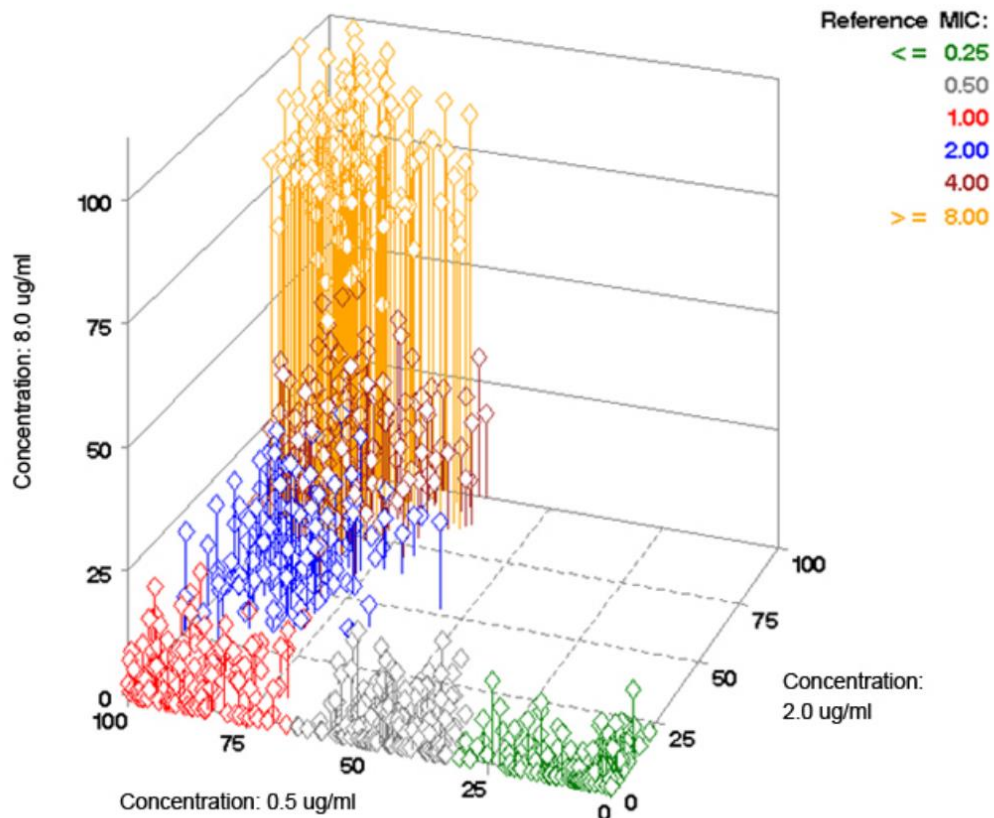


Figure 5. Détermination par analyse multidimensionnelle d'une CMI par le Vitek®2

Les CMI sont ainsi déterminées par la cinétique de l'activité des microorganismes et par le temps d'incubation nécessaire pour un organisme au sein du système Vitek®2. L'automate est alors capable d'utiliser un temps d'incubation relativement court pour la plupart des microorganismes car le logiciel peut définir le temps d'incubation approprié en fonction de la croissance de chaque microorganisme.

2. E-test®

Très rapidement utilisée en routine dans les laboratoires de biologie médicale, la méthode E-test® est une méthode de diffusion en milieu gélosé apparue dans les années 1990. Il s'agit d'une méthode simple, rapide, et d'intérêt pour déterminer la sensibilité de germes à certains antibiotiques (73). Cette méthode permet d'obtenir la mesure directe de la CMI. Le principe consiste à déposer sur une gélose préalablementensemencée une bandelette contenant l'antibiotique à tester, mettre en incubation selon les besoins du micro-organisme à identifier pendant 24 à 48 heures, puis de lire la CMI correspondant au point d'intersection entre l'ellipse d'inhibition de la culture bactérienne dessinée autour de la bandelette et la CMI.

En plus de guider l'antibiothérapie, certaines bandelettes permettent la détection de mécanismes de résistances enzymatiques en contenant des inhibiteurs des mécanismes de résistance recherchés en plus de l'antibiotique d'intérêt (74).

3. Méthode de diffusion en milieu gélosé

Cette méthode de détection de la sensibilité aux antibiotiques est la plus simple, il s'agit de la méthode des disques. Le principe consiste à déposer des disques de papier buvard contenant un antibiotique à une certaine concentration sur une gélose préalablementensemencée. L'antibiotique déposé va établir par diffusion de manière uniforme un gradient de concentration suite à sa solubilisation par l'humidité du milieu gélosé. Après 18 à 24 heures de culture, la mesure des diamètres d'inhibition autour de chacun des antibiotiques testés et selon l'espèce permet de déterminer la sensibilité en fonction des valeurs critiques de chaque couple antibiotique-espèce définies par les sociétés savantes. Ces zones peuvent être lues de manière visuelle ou à l'aide d'automates réalisant à la fois la lecture et l'interprétation.

La principale limite de cette méthode est l'obtention au préalable d'un inoculum bien standardisé permettant la bonne lecture de l'antibiogramme.

4. Tests de synergie

Il existe différents tests de synergie permettant la mise en évidence des phénotypes de résistance comme :

- Le DD-Test : il s'agit d'un test permettant de détecter les mécanismes de BLSE par la mise en évidence d'une synergie entre un disque d'amoxicilline-acide clavulanique et une C3G. Une image couramment appelée en « bouchon de champagne » sera visible sur la gélose ensemencée si ce mécanisme est présent dans la bactérie identifiée.
- Le test de Hödge modifié : il permet de mettre en évidence une synergie d'activité enzymatique entre des souches productrices de carbapénémases (souches testées) et des souches sauvages de référence sensibles. Ce test peu coûteux présente une bonne sensibilité pour la détection des carbapénémases de type Oxa-48 et KPC, mais peut présenter des résultats faussement négatifs notamment en cas de NDM ou des résultats faussement positifs en cas de bactéries surexprimant leur céphalosporinase telles que les *Enterobacter spp.*

5. Milieux sélectifs

Les milieux sélectifs sont par définition des milieux permettant de sélectionner les micro-organismes d'intérêt. Un grand nombre de milieux permet la sélection de bactéries d'intérêt, et certains milieux permettent de sélectionner des phénotypes de résistance particuliers. Ces milieux permettent notamment d'isoler les bactéries multi-résistantes telles que les EBLSE, celles produisant des carbapénémases, les SARM, ainsi que les entérocoques résistants à la vancomycine ou aux glycopeptides de manière générale.

Ces milieux sont généralement couplés à un système chromogénique permettant une identification de la bactérie.

6. Méthodes chromogéniques

Les tests chromogéniques sont utilisés pour mettre en évidence des résistances enzymatiques aux antibiotiques. Ces tests sont basés sur le virage d'un indicateur coloré lors du changement du pH du milieu induit par l'hydrolyse de l'antibiotique par l'enzyme du micro-organisme en cause, la lecture se faisant de manière visuelle ou à l'aide d'un automate tel qu'un spectrophotomètre (75,76).

Ce sont des tests qualitatifs à réaliser sur des colonies isolées. Le temps de lecture se fait généralement entre 2 et 4 heures. Malgré leur faible coût, ce sont des tests dont la sensibilité est limitée et dont la lecture peut se révéler difficile.

Les principales indications de ces tests sont la recherche d'activité de type carbapénémase et la détection de la résistance à la colistine.

B/ Méthodes immunologiques

Les tests immunologiques sont des tests qualitatifs basés soit sur le principe de l'agglutination (test Latex), soit sur le principe de l'immunochromatographie à partir de colonies isolées.

Ce sont des tests très rapides, dont le temps varie généralement entre 5 et 30 minutes pour la lecture du résultat. Ces tests ne permettent que de rechercher les mécanismes de résistance d'intérêt, ils ne permettent pas de mettre en évidence un nouveau mécanisme.

Les principales indications de ces tests dans la recherche de résistances aux antibiotiques sont la détection de la PLP2A des SARM, et la détection de certaines carbapénémases (KPC, VIM, NDM et OXA-48).

C/ Méthodes basées sur la spectrométrie de masse

Apparue au début du XX^{ème} siècle, la spectrométrie de masse est une méthode physique permettant la détection, l'identification et la caractérisation de molécules d'intérêt. Elle est basée sur le principe de séparation de molécules chargées en phase gazeuse en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Il existe différentes sources d'ionisation permettant cette séparation, dont une est particulièrement utilisée en microbiologie depuis plusieurs années en routine dans l'identification de micro-organismes (bactéries, levures) : celle du MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight) (77). Il s'agit d'une méthode rapide et peu coûteuse.

Depuis quelques années, la spectrométrie de masse commence à être utilisée pour étudier la sensibilité aux agents anti-infectieux selon différentes méthodes :

- l'identification de clones résistants par spectrométrie de masse globale
- la détection de la croissance bactérienne en présence d'antibiotique
- la détection de la dégradation d'un antibiotique
- la détection de protéines responsables de la résistance

1. Identification de clones résistants par spectrométrie de masse globale

Couramment appelée WCMS pour Whole-Cell Mass Spectrometry, cette technique peut permettre d'identifier des clones de résistance à partir de marqueurs de résistance recherchés compris dans l'intervalle de détection par la technique. Souvent, l'intervalle de détection se situe entre 2000 et 20 000 Da, or la majorité des protéines conférant la résistance aux antibiotiques (PLP2a, bêta-lactamase, etc..) ont des poids moléculaires supérieurs à 20 000 Da. Cette méthode va le plus souvent rechercher des protéines exprimées par certains clones exprimant un mécanisme de résistance. C'est le cas par exemple pour la détection de certaines souches de SARM, certaines souches de *B. fragilis* résistants aux carbapénèmes (78–80). Ainsi, la présence du pic recherché permet d'identifier le mécanisme de résistance, mais l'absence de pic n'affirme pas l'absence de résistance puisqu'il peut s'agir d'un clone n'exprimant pas la protéine recherchée.

Pour les entérobactéries et *P. aeruginosa*, il n'y aurait pas de pic permettant de différencier les souches productrices de BLSE des souches non productrices par WCMS (81).

2. Détection de la croissance bactérienne en présence d'antibiotique

Le principe de cette méthode consiste en la détection de la croissance d'un germe par acquisition d'un spectre au MALDI-TOF après une période de temps d'incubation définie préalablement. Elle se base sur la comparaison des pics obtenus entre les cultures incubées avec et sans antibiotiques (82,83). Le nombre et l'intensité des pics varient selon la sensibilité des souches ; ainsi une souche sensible à l'antibiotique aura un spectre semblable à celui de l'étalon interne, et une souche résistante présentera des pics dérivés des protéines ribosomales bactériennes.

Une autre technique pour la détection de la croissance bactérienne par spectrométrie de masse est basée sur l'incorporation d'acide aminés non radioactifs marqués isotopiquement dans les molécules nouvellement synthétisées lors de la croissance bactérienne (84,85). L'utilisation d'isotopes entraîne un changement de masse dans les spectres obtenus, permettant de caractériser les souches de phénotype résistant à l'antibiotique testé.

Ces méthodes permettent de déterminer le phénotype de résistance ou de sensibilité à un antibiotique de manière rapide, cependant elles ne permettent pas d'identifier le mécanisme de résistance en cause. De plus elles peuvent présenter certaines limites telles que la standardisation de l'inoculum, le temps d'incubation, et l'absence de lien avec une CMI.

3. Détection de la dégradation d'un antibiotique

Une autre approche de l'analyse de la résistance bactérienne par spectrométrie de masse consiste à étudier les spectres obtenus après incubation d'un couple bactérie-antibiotique. Le principe consiste, après incubation du couple bactérie-antibiotique, à rechercher la disparition du pic correspondant à l'antibiotique testé et à rechercher ceux de ses métabolites. Cette technique permet de détecter des mécanismes impliquant la dégradation enzymatique d'antibiotiques (86,87). Cette technique peut être utilisée à partir de colonies isolées mais également à partir d'hémocultures positives (88,89).

Bien que cette méthode soit rapide, elle présente certaines limites. En effet, l'absence de dégradation de l'antibiotique ne signifie pas sensibilité à celui-ci puisque la bactérie peut posséder un autre mécanisme lui conférant une résistance. De même, l'absence de dégradation d'un antibiotique ne signifie pas que les autres molécules de sa classe pharmacologique ne le seraient pas. Il faudrait théoriquement tester tous les antibiotiques. Enfin, cette technique est sujette à une reproductibilité variable,

reproductibilité dépendant du temps d'incubation, de l'inoculum et de l'antibiotique testé.

Cette méthode est commercialisée pour la détection des carbapénémases chez les entérobactéries et *P. aeruginosa* (90)

4. Détection de protéines responsables de la résistance

Les protéines directement responsables d'une résistance aux antibiotiques ne sont généralement pas détectables sur bactéries entières par WCMS car elles se situent généralement en dehors de l'intervalle de détection utilisé. Pour les détecter, il existe une approche par SM/SM. Cette technique nécessite un pré-traitement par extraction protéique du compartiment protéique des bactéries, suivi d'une étape de digestion enzymatique puis d'une étape de séparation par chromatographie liquide avant analyse par spectrométrie de masse. Cette technique permet la détection d'enzymes (bêta-lactamases, carbapénémases, ..), des cibles spécifiques (PLP2a), et de porines conférant des résistances (91–94).

D/ Méthodes moléculaires et génomiques

• Méthodes moléculaires

Ces méthodes sont basées sur le principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction) qui a pour but d'amplifier le nombre de copies d'un segment cible d'acides nucléiques de manière à permettre sa détection. Ainsi, ces méthodes vont permettre la détection d'un mécanisme de résistance connu par amplification du gène d'intérêt ou des mutations d'intérêt. Elles présentent l'avantage d'être des tests généralement simples, rapides (délai généralement d'une heure) et sensibles par l'utilisation de cassettes contenant tous les réactifs nécessaires à la PCR. Ces méthodes peuvent être réalisées sur des cultures ou bien directement à partir de certains prélèvements permettant alors l'accélération du diagnostic des résistances. De plus, ces méthodes peuvent être multiplexées et alors permettre l'analyse simultanée de plusieurs mécanismes de résistance. Toutefois, ce sont des méthodes onéreuses et l'absence du gène de résistance ou de la mutation d'intérêt ne signifie pas que le germe en cause sera forcément sensible aux antibiotiques habituellement efficaces.

Ces méthodes sont principalement utilisées pour la recherche de SARM, d'EPC, d'ERV et pour la recherche des gènes de résistance aux antituberculeux en cas d'infection à *Mycobacterium tuberculosis*.

- **Méthodes génomiques**

Les techniques génomiques reposent sur le principe du séquençage. Ces méthodes ne sont pas utilisées en routine dans les laboratoires de biologie médicale mais dans le domaine de la recherche pour la compréhension du génome bactérien et la recherche de nouveaux gènes de résistance.

III/ La témocilline

A/ Histoire de la témocilline

La témocilline est un antibiotique bactéricide à administration parentérale exclusive. Elle a été développée dans les années 1980 par Beecham Pharmaceuticals, et commercialisée au Royaume-Uni, en Belgique et au Luxembourg, avec comme indication le traitement des pyélonéphrites aiguës. Du fait de ses propriétés pharmacodynamiques ne lui conférant pas d'action sur les bactéries à Gram positif, sur les anaérobies et sur *Pseudomonas aeruginosa*, cet antibiotique a très rapidement été abandonné puisqu'elles furent perçues comme des inconvénients majeurs (95).

Le 14 janvier 2004, la témocilline obtient le statut de médicament orphelin pour le traitement des exacerbations pulmonaires à *Burkholderia cepacia* chez les patients atteints de mucoviscidose, notamment aux Etats-Unis. En 2006, elle obtient une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) de cohorte en France pour la même utilisation.

Il faut attendre la fin des années 2000 pour que la témocilline retrouve une place dans l'arsenal thérapeutique avec l'émergence des EBLSE. Ses particularités moléculaires lui conférant une activité contre une grande variété de β -lactamases, y compris la plupart des BLSE, certaines carbapénémases, et des AmpC (96–98), elle dispose d'une AMM en France depuis 2014. Cette AMM est basée sur une procédure de reconnaissance mutuelle avec la Belgique comme état membre de référence, où elle est enregistrée depuis 1984. L'enregistrement en France de Negaban® a fait suite à la demande de différentes sociétés savantes et associations s'impliquant dans le juste usage des antibiotiques dont la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF), l'Alliance Contre le développement des Bactéries Multi-Résistantes (ACdeBMR), le Groupe de Pathologie Infectieuse de la société française de Pédiatrie (GPIP) et le Collège des enseignants de Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT). Cette demande a été adressée à l'HAS et à l'ANSM dans le but d'épargner l'utilisation des antibiotiques à large spectre, notamment les carbapénèmes, lors d'infections causées par des EBLSE sensibles à la témocilline.

En France, la témocilline (NEGABAN®) se présente sous la forme d'une poudre pour solution injectable commercialisée depuis le 15 juin 2015 par EUMEDICA SA.

Ainsi, la témocilline dispose d'une autorisation d'utilisation dans un nombre limité de pays européens (Allemagne, Belgique, France, Luxembourg et Royaume-Uni) dans lesquels elle est principalement utilisée dans le traitement d'infections causées par des entérobactéries productrices de BLSE et/ou de céphalosporinases AmpC.

B/ Indications thérapeutiques

La témocilline est un médicament à prescription hospitalière. Elle est indiquée par voie parentérale chez les adultes et chez les enfants pour le traitement des infections des voies urinaires compliquées (incluant les pyélonéphrites), des voies respiratoires basses, des bactériémies et des infections des plaies (99).

C/ Mécanisme d'action

La témocilline appartient à la famille des β -lactamines, famille comportant les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames. Ces sous-classes possèdent de manière commune un cycle β -lactame mais vont se différencier par les cycles et chaînes latérales s'ajoutant à ce cycle β -lactame, apportant alors des spécificités pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, et donc des spécificités de spectre d'action (figure 6). Leur mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane.

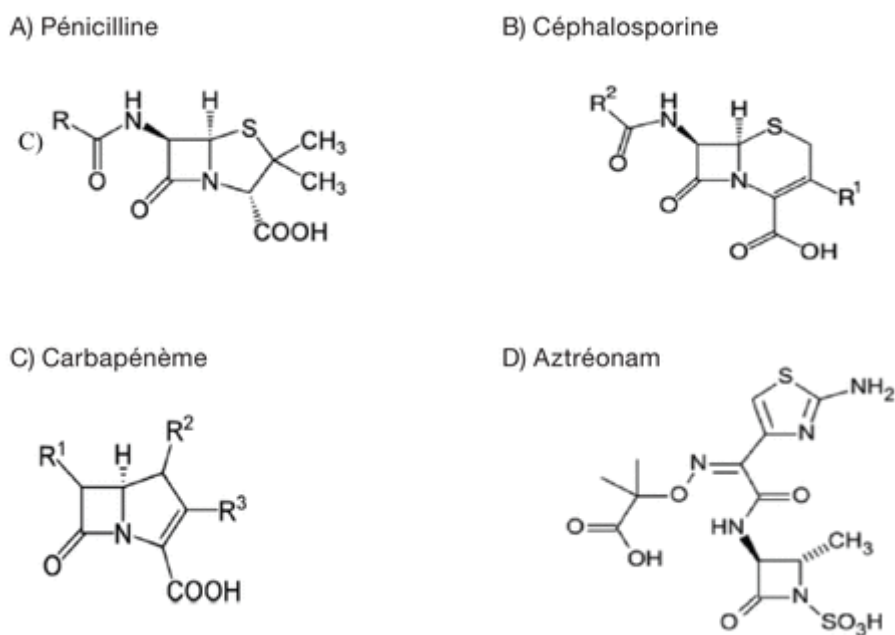


Figure 6. Structure chimique des différentes sous-classes de β -lactamines

La témocilline intervient lors de la dernière étape de synthèse du peptidoglycane au niveau périplasmique. Elle agit par inhibition compétitive irréversible des PLP (Protéines Liant les Pénicillines) nécessaires à la synthèse du peptidoglycane en mimant la structure D-ala-D-ala du pentapeptide, substrat naturel des PLP, avec pour principale cible la PLP3 chez *E.coli* (100). Ainsi, elle se fixe de manière covalente au niveau du site actif des PLP par acétylation, permettant l'ouverture de son cycle β -

lactame par rupture de la liaison amide, afin de former un complexe pénicilloïl-enzyme rendant alors les PLP inefficaces.

Cette inhibition des PLP provoque un effet bactériostatique et donc une inhibition de la croissance bactérienne. L'action bactéricide n'est pas expliquée entièrement par ce mécanisme d'action ; il y aurait une activation de la production d'autolysines bactériennes (101).

Faisant partie de la famille des β -lactamines, la témocilline est un antibiotique temps-dépendant, c'est à dire que son activité antibiotique est fonction de sa concentration durant une certaine durée d'exposition ($fT > CMI$) (102). De ce fait, il a été montré que la concentration sanguine en témocilline nécessite d'être supérieure à la CMI durant au moins 40% du temps de traitement pour être efficace (103). Concernant l'effet bactéricide de son activité sur les entérobactéries, la témocilline possède des valeurs de concentrations minimales bactéricides (CMB) proches des CMI, dont le ratio CMB/CMI est compris entre 1 et 2 (104,105).

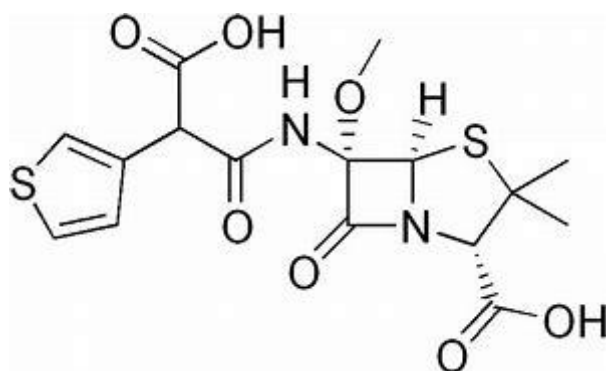


Figure 7. Structure chimique de la témocilline

La témocilline est un dérivé semi-synthétique 6- α -méthoxylé d'une carboxypénicilline, la ticarcilline (figure 7). Des modélisations moléculaires et biochimiques ont montré que le radical α -méthoxylé permet de bloquer l'entrée d'une molécule d'eau au sein de la cavité du site actif de la β -lactamase, permettant de prévenir l'activation de la sérine protéase et d'empêcher la capacité d'hydrolyse (106). Ce radical lui confère ainsi une stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse par la plupart des β -lactamases plasmidiques, y compris les BLSE. Cependant, celui-ci réduit son spectre d'activité par altération de sa capacité de fixation aux PLP de nombreuses espèces bactériennes.

La témocilline comprend également une fonction acide en position 9. Il semblerait que ce groupement permettrait sa protection vis-à-vis de l'hydrolyse par les β -lactamases de type céphalosporinases (105).

D/ Spectre d'activité de la témocilline

Le tableau 5 recense le spectre d'action de la témocilline sur les différentes espèces bactériennes.

Espèces habituellement sensibles	<i>E.coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Proteus spp</i> (indole positif), <i>P. stuartii</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Brucella abortus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i>
Espèces inconstamment sensibles (résistance acquise \geq 10% des souches)	<i>Enterobacter spp.</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
Espèces naturellement résistantes	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter spp.</i> , anaérobies, bactéries à Gram positif

Tableau 5. Spectre d'action de la témocilline vis-à-vis de différentes espèces bactériennes

La résistance naturelle à la témocilline des cocci Gram positifs (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium difficile*...) et des bacilles à Gram négatifs anaérobies (*Bacteroides spp.*) est due à la présence du groupement 6- α -méthoxylé, qui a entraîné une perte d'action vis-à-vis des PLP de ces bactéries.

Ce groupement 6- α -méthoxylé permet néanmoins d'avoir une excellente activité contre les *Enterobacteriaceae* (sauf *S. marcescens* et *Enterobacter spp.*), ainsi que les autres bactéries habituellement sensibles, y compris lors de résistances acquises aux β -lactamines. En effet, ce groupement protège la molécule de l'hydrolyse de la plupart des β -lactamases de classe A (pénicillines (TEM, SHV), BLSE (CTX-M)), et de classe C (céphalosporinases chromosomiques de type AmpC). Néanmoins, elle reste hydrolysable par les bêta-lactamases de classe B (métallo-enzymes type NDM, VIM, IMP), et certaines de classe D (oxacillinase, notamment OXA-48).

E/ Tolérance et impact sur le microbiote intestinal

Selon le RCP en vigueur, la témocilline pourrait entraîner comme pour l'ensemble des β -lactamines, des affections du système immunitaire à type de réactions allergiques tels que de l'urticaire, un purpura, de la fièvre, une éosinophilie, une éruption maculo-papuleuse, parfois un œdème de Quincke, et voire plus rarement un choc anaphylactique. A fréquence indéterminée, des affections vasculaires à type

de phlébite ou thrombophlébite, des affections du système nerveux à type de convulsions en cas d'insuffisance rénale sont parfois rapportées. Occasionnellement une douleur au niveau du site d'injection peut être ressentie. Toutefois, aucune préoccupation majeure n'a été mise en évidence (107).

La témocilline ne semble pas affecter la résistance à la colonisation intestinale sur des modèles animaux, ni d'entraîner de colite post-antibiotique (108,109). Une étude menée chez des volontaires sains a montré que la prise de témocilline pendant une durée de 6 à 7 jours, à une posologie de deux fois par jour, entraînait une diminution importante des entérobactéries dans les selles, mais sans provoquer de sélection de souches résistantes à la témocilline, et tout en entraînant une augmentation de la proportion des entérocoques et des levures (110). Pour finir, le spectre étroit conféré par le groupement 6- α -méthoxylé ne modifie pas les proportions de la flore anaérobie digestive. Ainsi, la témocilline a un très faible impact sur la sélection de *C. difficile* (111).

F/ Pharmacocinétique

La pharmacocinétique de la témocilline montre qu'elle n'est pas absorbée par voie digestive et nécessite d'être administrée par voie parentérale. Elle peut être utilisée par voie intraveineuse (IV) continue ou intermittente, ou par voie intramusculaire (IM).

Distribuée sous forme de 2 épimères, l'épimère R présente une activité microbiologique environ 2 fois plus active que l'épimère S du fait d'une liaison plus faible aux protéines plasmatiques que l'épimère S. La liaison aux protéines plasmatiques semble être de l'ordre de 85% et tend à diminuer à de fortes concentrations, puis à augmenter lorsque les concentrations sériques viennent à diminuer (104,112,113).

La témocilline diffuse bien dans l'ensemble des tissus et des liquides biologiques, principalement dans la bile, mais à l'inverse elle diffuse peu dans le liquide cébrospinal (114–116).

Très peu métabolisée, la demi-vie de la témocilline est de 4,5 heures en cas d'injection par voie IV et de 5,4 heures lors d'une administration par voie IM (99). Celle-ci est principalement éliminée par voie urinaire sous forme inchangée d'où sa principale utilisation en cas d'infections urinaires (116).

G/ Posologie et administration

Le schéma thérapeutique dépend de la sévérité de l'infection, de la fonction rénale du patient et chez les enfants du poids corporel. La posologie usuelle de la témocilline chez un patient normorénal est de 2g toutes les 8 à 12 heures ou, en cas d'administration continue, d'un débit de 6g/24 heures après un bolus initial de 2g (117,118).

Chez les patients insuffisants rénaux, une augmentation de la demi-vie d'élimination et de l'exposition systémique du médicament ont été observées du fait d'une diminution de la clairance par rapport à des sujets ayant une fonction rénale normale. La posologie nécessite d'être réduite chez ces patients, ainsi que dans le cas de patients sous hémodialyse ou lors de dialyse péritonéale (119).

DEUXIÈME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

I/ Objectifs

Compte tenu de ses particularités, la témocilline est utilisée dans le cas d'infections compliquées à certaines bactéries à Gram négatif présentant des résistances aux β -lactamines de type BLSE ou céphalosporinases.

Bien qu'elle ne soit présente uniquement que sur les cartes antibiogrammes urinaires de Vitek®2, il semblerait qu'il soit observé une augmentation de la fréquence des souches d'*E.coli* résistantes à la témocilline, alors que ces souches sont rendues sensibles à l'ensemble des autres β -lactamines par le Vitek®2.

La molécule n'étant pas indiquée dans le cas d'infections urinaires causées par des souches d'*E.coli* multi-sensibles, cette résistance est dans la plupart du temps cachée de l'antibiogramme du fait d'une incompréhension la concernant. L'intérêt de connaître la sensibilité à la témocilline se fait notamment en cas de résistances de type BLSE ou céphalosporinase dans le but d'épargner l'utilisation d'antibiotiques de type carbapénèmes.

Ainsi, dans un monde où les résistances aux antibiotiques se développent progressivement et engendrent parfois des impasses thérapeutiques par une accumulation de mécanismes de résistance chez certaines souches, il apparaît alors intéressant de vérifier la justesse du résultat rendu par le Vitek®2.

Le but de ce travail est de vérifier par des approches phénotypiques le résultat de la résistance à la témocilline de souches d'*E.coli* rendues sensibles à toutes les autres β -lactamines par le Vitek®2, afin de confirmer ou non la présence d'une résistance acquise chez ces souches.

II/ Matériel et Méthodes

A/ Isolats bactériens

Il s'agit d'une étude multicentrique dont les souches d'*E.coli* sensibles à l'ensemble des β -lactamines, hormis à la témocilline, ont été recueillies de manière prospective durant la période de juillet à octobre 2019 sur 10 centres hospitaliers de la région des Hauts-de-France. Les centres hospitaliers ayant participé à cette étude sont les hôpitaux d'Armentières, Arras, Cambrai, Douai, Dunkerque, Lens, Lille, Roubaix, Valenciennes et Tourcoing.

L'identification des souches a été réalisée dans les laboratoires des hôpitaux correspondant selon leur technique habituelle d'identification. Les antibiogrammes de ces souches ont été obtenus en utilisant l'automate Vitek®2 (bioMérieux). Les souches d'intérêt ont ensuite été piquées dans des tubes Leminor® pour conservation, et envoyées au laboratoire du CH de Roubaix pour l'étude.

Le recueil des souches d'intérêt s'est effectué sur des prélèvements urinaires étant donné que la témocilline n'est présente que sur la cassette antibiogramme des entérobactéries (cassette AST-N372) sur des prélèvements urinaires et rendues pour les souches identifiées comme étant des souches d'*E.coli*.

Le recueil des souches comportait des informations concernant les patients (date de naissance, âge), la date du prélèvement, le service prescripteur de l'ECBU, la durée d'hospitalisation (supérieure à 48h ou non), la présence de résistances à d'autres antibiotiques que la témocilline et la CMI obtenue pour la témocilline par le Vitek®2.

B/ Préparation des souches

Afin de récupérer les souches conservées dans les tubes Leminor®, celles-ci ont été mises en suspension à l'aide d'un millilitre (ml) de bouillon brain-heart. Après l'ajout du bouillon, le tube a été vortexé pendant plusieurs secondes afin de mettre en suspension les bactéries. Les bactéries ont été isolées sur un milieu de culture non spécifique permettant l'isolement des souches d'*E.coli* (milieu au pourpre de bromocrésol, dénommé BCP) à partir du bouillon en utilisant une anse de 10 microlitres (μ L). Les géloses ont ensuite été mises en incubation à 35°C pendant une durée de 18 à 24h afin de permettre la réalisation des tests phénotypiques comportant les méthodes E-test® et Sensititre®.

L'utilisation de ces deux techniques a nécessité de réaliser au préalable des inocula standardisés de chacune des souches en prélevant des colonies mises ensuite en

suspension en milieu liquide salé à partir de colonies isolées la veille. Chacune de ces suspensions devait être ajustée à 0,5 McFarland à l'aide d'un densitomètre DensiCHEK™ selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) de mai 2019 (120).

C/ Détermination de la CMI de la témocilline par méthode E-test®

La méthode E-test® est une technique de diffusion en milieu gélosé permettant de mesurer la CMI d'un antibiotique pour une bactérie d'intérêt.

Après la réalisation de la suspension bactérienne ajustée au 0,5 McFarland, celle-ci est ensuiteensemencée à l'aide d'un écouvillon stérile sur une gélose Mueller-Hinton (milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens). L'ensemencement est réalisé en trois fois en faisant tourner la gélose d'un tiers à chaque fois pour permettre une répartition homogène de l'inoculum. Une fois la soucheensemencée sur la gélose, une bandelette de témocilline est déposée à l'aide d'une pince en appuyant légèrement sur la gélose pour éviter la formation de bulles d'air, avant d'être mise en incubation pendant 18 à 24h dans une étuve à 35°C en aérobiose. L'antibiotique, alors contenu dans une extrémité, va se répartir selon un gradient de concentration très précis variant de 0,064 à 1024 mg/L. La lecture de la CMI se fera de manière visuelle après la période d'incubation. La CMI se lit au niveau de l'intersection entre la culture bactérienne et la bandelette en fonction de l'ellipse d'inhibition de culture obtenue. Lorsque l'intersection s'effectue entre 2 graduations, la valeur supérieure de CMI doit être lue. Jusqu'à 2 souches différentes ont étéensemencées sur une même boîte, chacune sur une moitié de boîte (figure 8).

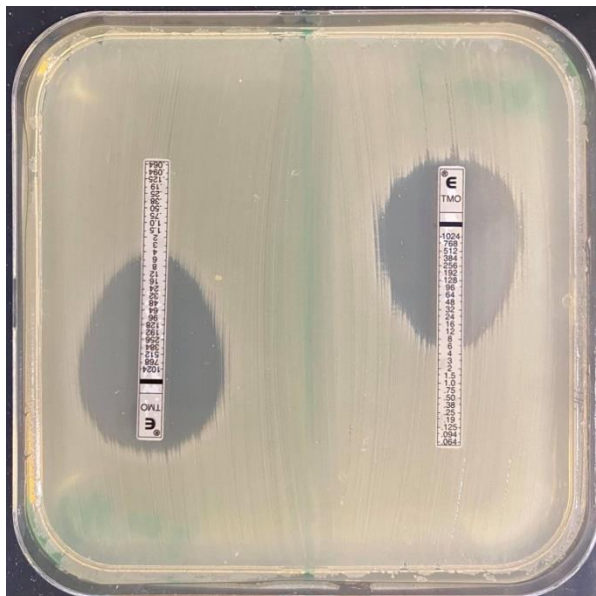


Figure 8. Photo de deux bandelettes E-test® sur une gélose Mueller-Hinton ensemencée par deux souches d'E.coli

L'interprétation de la sensibilité des souches à la témocilline s'est effectuée en comparant les CMI lues avec les concentrations critiques définies par le CA-SFM 2019, permettant ainsi de catégoriser les souches bactériennes en « sensibles » ou « résistantes » (120).

D/ Détermination des CMI de la témocilline par méthode Sensititre®

1. Description de la méthode

Le système de sensibilité Sensititre® en CMI et concentrations critiques est un produit de diagnostic *in vitro* pour déterminer la sensibilité clinique d'isolats. Les plaques Sensititre® sont composées de 96 puits permettant d'étudier la sensibilité à différents agents antimicrobiens à des dilutions appropriées (figure 9).



Figure 9. Photo d'une plaque Sensititre®

Les plaques Sensititre® pour les bactéries à Gram négatif de référence FRAM2GN de Thermo Fisher Scientific ont été utilisées. Une plaque permet de tester la sensibilité à différents antibiotiques d'une seule souche, dont celle de la témocilline selon un gradient allant de 4 à 32 mg/L (4, 8, 16 et 32 mg/L).

Chaque plaque contient un puits de contrôle positif ne contenant aucun antibiotique ni aucun inhibiteur permettant de vérifier la viabilité de la souche (figure 10).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GEN 1	MERO 0.12	CZA 0.5/4	C/T 0.5/4	TAZ 0.5	AZT 1	IMI 0.5	P/T4 2/4	CIP 0.25	AMI 1	COL 0.25	FEP 0.5
B	GEN 2	MERO 0.25	CZA 1/4	C/T 1/4	TAZ 1	AZT 2	IMI 1	P/T4 4/4	CIP 0.5	AMI 2	COL 0.5	FEP 1
C	GEN 4	MERO 0.5	CZA 2/4	C/T 2/4	TAZ 2	AZT 4	IMI 2	P/T4 8/4	CIP 1	AMI 4	COL 1	FEP 2
D	GEN 8	MERO 1	CZA 4/4	C/T 4/4	TAZ 4	AZT 8	IMI 4	P/T4 16/4	CIP 2	AMI 8	COL 2	FEP 4
E	TRM 4	MERO 2	CZA 8/4	C/T 8/4	TAZ 8	AZT 16	IMI 8	P/T4 32/4	CIP 4	AMI 16	COL 4	FEP 8
F	TRM 8	MERO 4	CZA 16/4	C/T 16/4	TAZ 16	AZT 32	IMI 16	P/T4 64/4	CIP 8	AMI 32	COL 8	FEP 16
G	TRM 16	MERO 8	CZA 32/4	C/T 32/4	TAZ 32	TGC 0.25	TGC 0.5	TGC 1	TGC 2	TGC 4	COL 16	FEP 32
H	TRM 32	MERO 16	ETP 0.06	ETP 0.12	ETP 0.25	ETP 0.5	ETP 1	SXT 1/19	SXT 2/38	SXT 4/76	SXT 8/152	POS

Figure 10. Schéma de la plaque Sensititre® FRAM2GN. GEN : gentamicine, TRM : témocilline, MERO : méropénème, CZA : ceftazidime/avibactam, ETP : ertapénème, C/T : ceftolozane/tazobactam constant 4, TAZ : ceftazidime, AZT : aztréonam, TGC : tigécycline, IMI : imipénème, P/T4 : pipéracilline/tazobactam constant 4, SXT : sulfaméthoxazole/triméthoprime, CIP : ciprofloxacine, AMI : amikacine, COL : colistine, FEP : céfépime, POS : contrôle positif

2. Préparation des plaques

A partir des suspensions ajustées au 0,5 McFarland pour chacune des souches, 10 µL ont été prélevés puis transférés dans un tube de 11 ml de bouillon Mueller-Hinton dont la concentration en cations a été ajustée avec un tampon TES. Après avoir été bien homogénéisé par une vingtaine de retournements, le bouillon a ensuite été versé dans une cuve d'ensemencement stérile puis 50 µL de suspension a été transféré dans chacun des puits de la plaque dans les 30 minutes suivant la préparation.

Pour chaque plaque, un test de pureté a été réalisé. Pour cela, 10 μL de chacune des suspensions ont été ensemencés sur une gélose BCP en parallèle des plaques.

De plus, un contrôle de la densité de l'inoculum bactérien a dû être effectué pour chacune des plaques. Pour ce faire, un échantillon de la cupule du contrôle positif a été prélevé immédiatement après l'ensemencement d'une plaque, à l'aide d'une anse de 1 μL , et ensemencé sur une gélose au sang. Puis à l'aide d'une autre anse de 1 μL , il a fallu faire de même en diluant au préalable l'échantillon au 1/50^{ème} dans de l'eau stérile.

Toutes les cupules ont ensuite été recouvertes à l'aide d'une feuille adhésive puis incubées dans une étuve à 35°C sans CO₂ pendant 24h, ainsi que l'ensemble des 3 géloses de contrôle de chacune des plaques.

3. Lecture des CMI

Afin de lire les résultats des plaques, il est nécessaire de vérifier les contrôles de pureté et de densité réalisés pour chacune des plaques. Les résultats d'une souche ne sont pas valides si une culture mixte est présente sur la gélose BCP associée ou si l'inoculum bactérien ne se situe pas dans les recommandations du fabricant. Le nombre de colonies sur les géloses au sang permettant de valider la densité des inocula doit être compris entre 50 et 500 pour les souches ensemencées directement à partir du 1 μL du bouillon, et entre 1 et 10 pour celles provenant de la dilution au 1/50^{ème}.

Une fois les contrôles vérifiés, la lecture des CMI a été effectuée de manière manuelle. La présence d'un dépôt ou d'un trouble dans un puits était le témoin d'une croissance. Chaque contrôle positif devait être lu en premier et devait montrer un dépôt, témoin de la croissance de chacune des souches.

La CMI est définie comme la plus faible concentration antimicrobienne inhibant la croissance visible.

E/ Analyses statistiques

Les tests statistiques ont été menés en utilisant le logiciel R studio (version 1.3.1056). Un test d'indépendance du Khi-deux a été réalisé pour évaluer

l'indépendance entre la présence d'une résistance à la témocilline (CMI \geq 16 mg/L) et le type d'infection (communautaire ou nosocomial) et deux tests de Fisher ont été conduits, un pour tester l'égalité entre le taux de résistance en cas d'infection communautaire et celui en cas d'infection nosocomiale, l'autre pour tester l'égalité entre le taux de résistance à la témocilline chez les souches multi-sensibles et celui chez les souches présentant des co-résistances à la témocilline. Tous les tests ont été réalisés en utilisant un risque α de 5%.

III/ Résultats

A/ Caractéristiques des souches

Pour cette étude multicentrique, 100 souches d'*E.coli* sensibles à l'ensemble des β -lactamines hormis à la témocilline ont été recueillies à partir de 10 laboratoires de centres hospitaliers de la région des Hauts-de-France. Le tableau 6 présente le nombre de souches par laboratoire des différents centres hospitaliers.

Laboratoires hospitaliers	Nombre de souches reçues
Armentières	12
Arras	14
Cambrai	10
Douai	9
Dunkerque	6
Lens	6
Lille	10
Roubaix	12
Valenciennes	13
Tourcoing	8

Tableau 6. Nombre de souches recueillies par établissement

Ces souches proviennent de 24 types de services différents, avec une prédominance des services des urgences. Le tableau 7 récapitule les types de services dont proviennent les souches par ordre de fréquence.

Type de service	Nombre de souches
Urgences	43
Médecine interne	6
EHPAD	5
Gériatrie	5
Consultations externes	3
Consultations gynécologiques-obstétriques	3
Diabétologie	3
Neurologie	3
Soins obstétriques	3
SSR	3
Cardiologie	2
Consultation néphrologie	2
Traumatologie	2
Urgences pédiatriques	2
Urologie	2
Chirurgie vasculaire	1
Maladie de l'appareil digestif	1
Néonatalogie	1
Néphrologie	1
Plaie-cicatrisation	1
Soins intensifs	1
ULSD	1
Urgences gynéco-obstétriques	1
Non renseigné	5

Tableau 7. Nombre de souches recueillies par type de service

Sur l'ensemble des 100 souches, 97 ont une CMI rendue à 16 mg/L par le Vitek®2, tandis que 3 autres présentent une CMI > 16 mg/L.

Sur ces 100 souches, 77 souches proviennent d'infections urinaires communautaires (temps d'hospitalisation < 48h), 20 proviennent d'infections nosocomiales dont le temps d'hospitalisation des patients est supérieur à 48h, et pour 3 souches l'information n'a pas été renseignée.

De même, 15 des 100 souches présentent des résistances à d'autres antibiotiques (tableau 8).

Résistances autres	Nombre de souches
Fluoroquinolones	10
Sulfaméthoxazole-Triméthoprime	3
Aminosides	2
Nitrofurantoïne	1
Fosfomycine	1

Tableau 8. Résistances autres associées à celle de la témocilline

Les caractéristiques détaillées par laboratoire sont décrites dans l'annexe 1.

Lors du réisolement des souches à partir des tubes Leminor®, chacune des cultures ensemencées était pure et ne contenait que la souche d'*E.coli* d'intérêt permettant l'analyse de celles-ci.

B/ Résultats des CMI en E-test®

L'analyse des CMI par la méthode E-test® a pu être réalisée sur l'ensemble des 100 souches recueillies par l'étude. Les recommandations du CA-SFM 2019 catégorise une souche sensible à la témocilline quand celle-ci est inférieure ou égale à 8 mg/L et catégorise une souche résistante quand la CMI est strictement supérieure à 8 mg/L (120). Parmi les 100 souches analysées par la méthode E-test®, 80 souches ont été catégorisées en sensibles contre 20 catégorisées en résistantes.

La répartition des CMI lues par la méthode E-test® est représentée sur la figure 11.

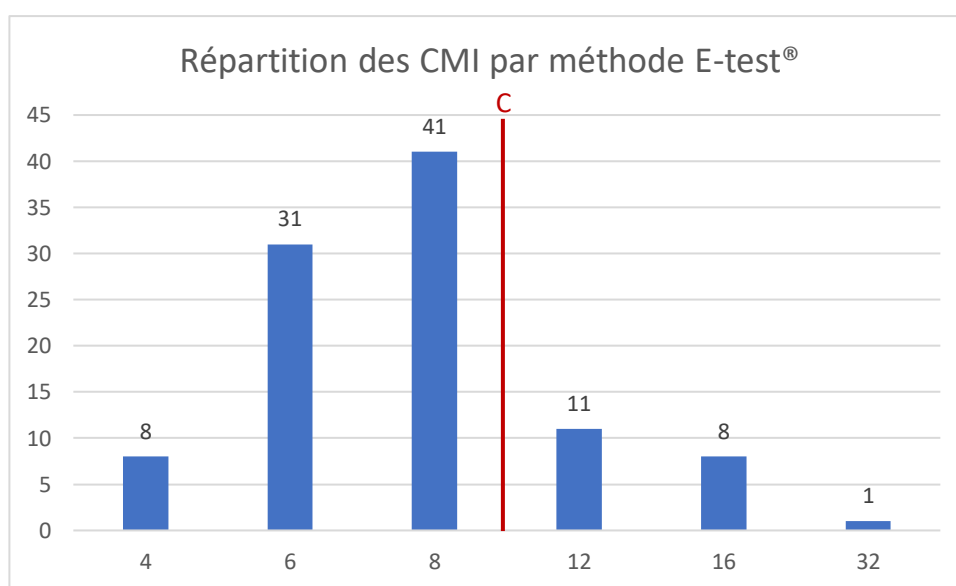


Figure 11. Répartition des CMI par méthode E-test®. C : Concentration critique.

Le test du Khi-deux n'a pas montré de liaison entre le type d'infection (infection nosocomiale contre infection communautaire) et la présence d'une résistance à la témocilline au risque $\alpha = 0.05$ ($X^2_c = 0.05$, p-value = 0.82).

Le test de Fisher ne montre pas de différence entre le taux de résistance à la témocilline en cas d'infection communautaire et celui en cas d'infection nosocomiale au risque $\alpha = 0.05$ (OR = 1.37 IC_{95%}[0.34-4.85], p-value = 0.55).

Ces deux analyses ont été réalisées à l'aide des valeurs présentées dans le tableau 9.

	Infection nosocomiale	Infection communautaire
Résistance à la témocilline	5	15
Sensibilité à la témocilline	15	62

Tableau 9. Tableau de contingence entre les variables "résistance à la témocilline" et "type d'infection"

Le second test de Fisher ne montre pas de différence entre le taux de résistance à la témocilline chez les souches multi-sensibles et celui des souches présentant des co-résistances à la témocilline au risque $\alpha = 0.05$ (OR = 1 IC_{95%}[0.16-4.32], p-value = 1). L'analyse a été réalisée selon les valeurs du tableau 10.

	Co-résistances associées	Souches multi-sensibles
Résistance à la témocilline	3	15
Sensibilité à la témocilline	12	62

Tableau 10. Tableau de contingence entre les variables "résistance à la témocilline" et "co-résistances associées"

La répartition des souches résistantes montre une hétérogénéité des taux de résistance en fonction des laboratoires desquels proviennent les souches. Aucune souche des laboratoires de Dunkerque et de Roubaix ne présente de résistance à la témocilline. Les laboratoires de Lille et d'Arras comptabilisent la moitié des souches présentant une CMI ≥ 16 mg/L pour un total de 24 souches à eux deux, contre l'autre moitié des souches résistantes pour un total de 76 souches (tableau 11).

Laboratoire	Nombre de souches résistantes par la méthode E-test®	Total des souches par laboratoire
Dunkerque	0	6
Roubaix	0	12
Valenciennes	1	13
Armentières	1	12
Douai	1	9
Arras	5	14
Cambrai	2	10
Lille	5	10
Tourcoing	3	8
Lens	2	6

Tableau 11. Répartition des souches résistantes à la témocilline en fonction du laboratoire d'origine

C/ Résultats des CMI en Sensititre®

L'analyse des CMI par la méthode Sensititre® n'a pu être testée que pour 37 souches recueillies. Parmi les souches testées par cette méthode, 6 proviennent de l'hôpital de Dunkerque, 10 d'Armentières, 10 de Valenciennes, et 11 de Roubaix. Sur les cupules d'intérêt, ceux de la témocilline, aucune contamination, aucun saut ni aucune culture mixte n'ont été observés.

Toujours selon les recommandations du CA-SFM 2019, 32 des 37 souches testées ont été catégorisées comme sensibles à la témocilline, et 5 d'entre elles résistantes (figure 12).

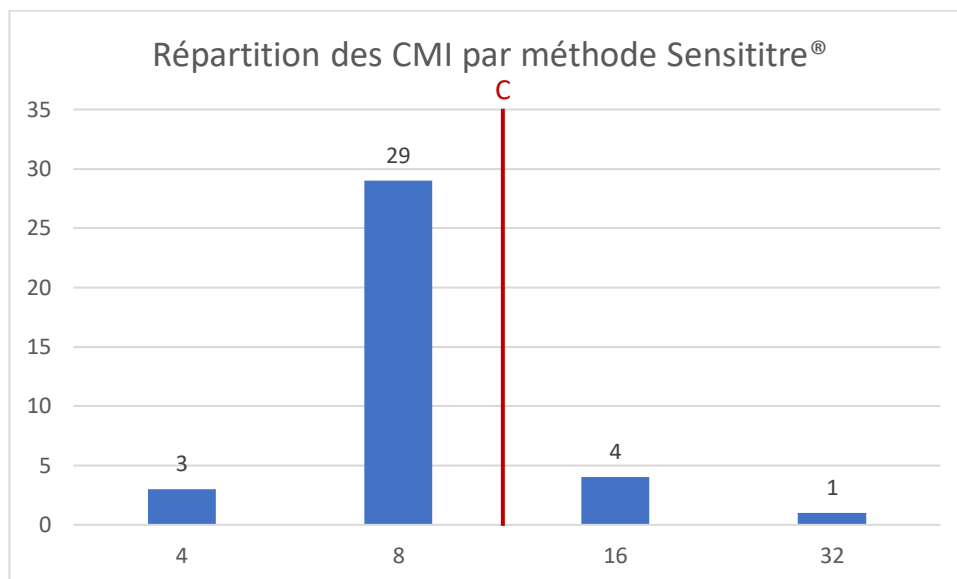


Figure 12. Répartition des CMI par méthode Sensititre®

D/ Concordance entre les deux méthodes

La méthode Sensititre® possède une gamme de concentrations plus petite que celle de la méthode E-test®, la lecture des CMI se faisant pour 4, 8, 16 et 32 mg/L. Ainsi, une souche dont la CMI est lue à 6 mg/L par la méthode E-test® est censée être lue à 8 mg/L par la méthode Sensititre®.

L'analyse des discordances entre les deux méthodes montre que 34 des 37 souches analysées par les deux méthodes sont concordantes. Cette analyse montre que 32 souches sont correctement catégorisées comme sensibles à la témocilline, que 2 souches sont correctement catégorisées comme résistantes, et que 3 souches présentent une CMI discordante entre les deux méthodes (tableau 12). Les CMI des trois souches discordantes ont été vérifiées une seconde fois par méthode Sensititre®, confirmant les CMI obtenues.

		CMI obtenues par méthode Sensititre®			
		4	8	16	32
CMI obtenues par méthode E-test®	4	3	0	0	1
	6	0	9	0	0
	8	0	20	2	0
	12	0	0	1	0
	16	0	0	1	0
	32	0	0	0	0

Tableau 12. Tableau de contingence des CMI des 37 souches analysées par les méthodes E-test® et Sensititre®

IV/ Discussion

A/ Comparaison des trois méthodes

Les résultats obtenus avec les méthodes E-test® et Sensititre® montrent des discordances avec ceux obtenus par le Vitek®2 de bioMérieux. En effet, toutes les souches testées ont été rendues résistantes par le Vitek®2, donnant une CMI \geq 16 mg/L pour ces souches, tandis que seulement 20% d'entre elles sont rendues résistantes par la méthode de diffusion en milieu gélosé par E-test®.

Des discordances de sensibilité à la témocilline rendues par le Vitek®2 ont été mises en évidence dans une évaluation expérimentale des concentrations critiques de la témocilline vis-à-vis de souches d'entérobactéries. Sur 658 souches d'*E.coli*, 33 souches ont été rendues résistantes à la témocilline par le Vitek 2, alors que les autres méthodes testées n'en ont montré que 3 résistantes (121). Tandis que leurs résultats montrent une concordance de résistance de 9%, nos résultats en montrent une de 20%. Cette étude permet également d'affirmer la fiabilité des résultats obtenus par la méthode E-test®.

Malgré le faible effectif testé par la méthode en microdilution (n= 37), les résultats obtenus semblent concordants avec ceux obtenus par la méthode E-test®. Seules 3 souches présentent des CMI discordantes entre les deux méthodes. Deux d'entre elles présentent une discordance d'une dilution d'écart de CMI (8mg/L en E-test® et 16mg/L en Sensititre®) tandis que la troisième présente une discordance importante, passant de 4mg/L en E-test® à 32 mg/L en Sensititre® (ce qui correspond à 3 dilutions d'écart, la CMI ayant été vérifiée une seconde fois en Sensititre®). Cette discordance importante reste inexpiquée.

Ainsi, selon le breakpoint de la témocilline à 8 mg/L du CA-SFM d'avril 2020, ces 80 souches en fait sensibles à la témocilline sont donc mal catégorisées du fait d'une CMI rendue supérieure au breakpoint par le Vitek®2. Toutefois 20 souches restent catégorisées résistantes à la témocilline bien qu'elles soient sensibles à l'ensemble des autres β -lactamines.

B/ Répartition des CMI / breakpoints

L'épidémiologie des résistances et l'interprétation des CMI est en perpétuelle évolution. Depuis le 15 juillet 2018, les définitions des catégories de tests de

susceptibilité aux antibiotiques ont été redéfinies par l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (122) ; on parle de catégorie :

- « S » pour « sensible » lorsqu'il y a une forte probabilité de succès thérapeutique en utilisant un schéma posologique standard de l'agent antimicrobien,
- « I » pour « sensible à fortes doses » (anciennement appelé « intermédiaire ») lorsqu'il y a une forte probabilité de succès thérapeutique par suite d'une augmentation de l'exposition à l'agent antimicrobien en ajustant le schéma posologique ou sa concentration au site infecté,
- « R » pour « résistante » lorsqu'il y a une forte probabilité d'échec thérapeutique en augmentant la posologie du schéma thérapeutique standard de l'agent antimicrobien.

Ainsi, on dit qu'une souche est résistante à un antibiotique lorsque la CMI associée à l'antibiotique d'intérêt est supérieure au « cut-off » ou « breakpoint » ou « concentration critique » correspondant. Un breakpoint est une concentration choisie (en mg/L) d'un antibiotique qui définit si une espèce de bactérie est sensible ou résistante à l'antibiotique. Cependant, les breakpoints ne sont pas définis de manière consensuelle et peuvent varier d'une société savante à une autre.

Le breakpoint de la témocilline a souvent été débattu, le premier ayant été proposé en 1985 pour une CMI à 16 mg/L par Fuchs *et al.* (123). Puis en Angleterre, la British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) a défini en 2013 deux breakpoints en fonction de la situation clinique, tandis que le CA-SFM n'en définit qu'un depuis 2015 (tableau 13).

	Concentrations critiques (mg/L)	
	Espèces sensibles	Espèces résistantes
CA-SFM 2020 (V.1.1 Avril)	8	8
Publication de Fuchs 1985	16	16
BSAC Angleterre 2015 Infections urinaires non	32	32
BSAC Angleterre 2015 Infections systémiques	8	8
EUCAST v 10.0 (01.01.2020)	« Breakpoints still under consideration »	

Tableau 13. Différents breakpoints de la témocilline

La détermination d'un breakpoint implique différents facteurs tels que l'espèce concernée, la distribution des CMI des souches sauvages et résistantes, les résultats d'études in vitro, les paramètres PK/PD, les résultats d'études animales et les résultats d'études cliniques, ce qui explique des différences de breakpoints entre des sociétés savantes.

Les distributions des CMI des souches de contrôle d'*E.coli* établies par l'EUCAST, ATCC 25922 et ATCC 35218, ne facilitent pas la détermination des breakpoints. Concernant la souche ATCC 25922 qui est multi-sensible, on observe une distribution des CMI allant de 4 à 32 mg/L pour laquelle on définirait le breakpoint à 16mg/L (figure 13), tandis que pour la souche ATCC 35218 productrice d'une β -lactamase de type TEM-1 aucune CMI ne dépasse les 8 mg/L (figure 14).

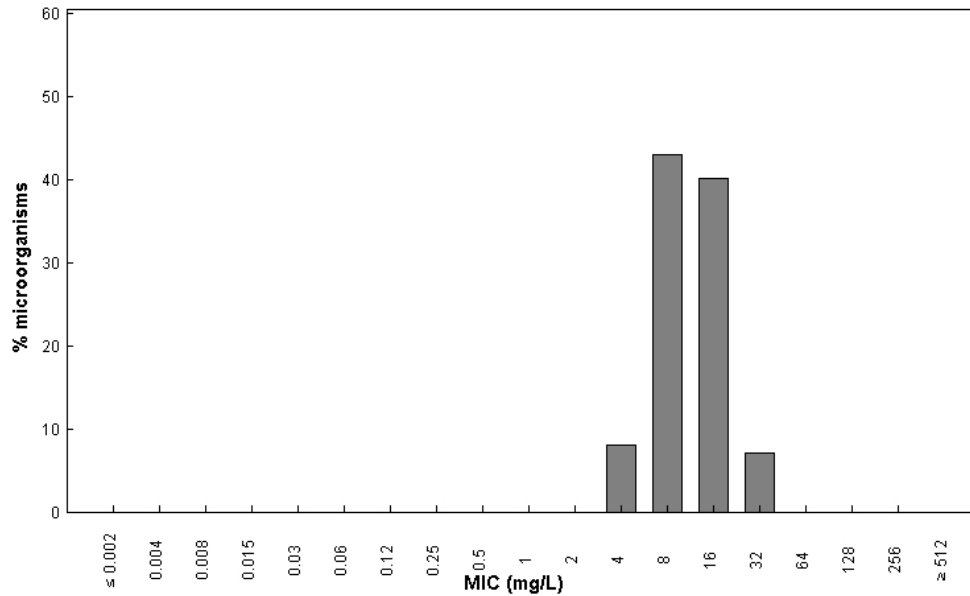


Figure 13. Distribution des CMI des souches ATCC 25922 recueillies à partir de différentes sources, zones géographiques et périodes (données de l'EUCAST)

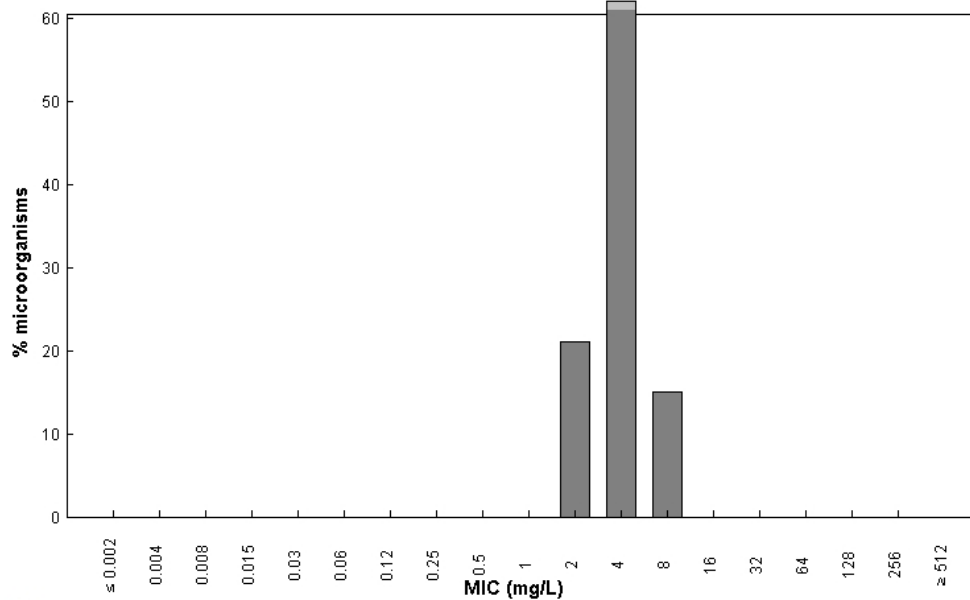


Figure 14. Distribution des CMI des souches ATCC 35218 recueillies à partir de différentes sources, zones géographiques et périodes (données de l'EUCAST)

Dans le cas de la témocilline, la plupart des essais cliniques ont été réalisés au moment de son développement (124,125). Dans les essais cliniques les plus récents, la témocilline est soit utilisée en association avec de l'amoxicilline (111), soit les études comportent bien trop peu de patients (126,127). Toutefois, une étude anglaise multicentrique comportant 92 infections par des entérobactéries traitées par témocilline (42 ITU, 42 bactériémies et 8 pneumonies nosocomiales) montre une bonne efficacité de celle-ci avec un taux de rémission clinique total de 86% et

d'efficacité *in vitro* de 84%, ces résultats étant probablement minorés de par l'utilisation de posologie trop faibles à 2g par jour dans certains cas (118).

Concernant les études animales, elles portent principalement sur des cas d'infections urinaires ne permettant pas d'étudier l'efficacité de la témocilline dans d'autres types d'infections. En 2016, une étude animale s'est intéressée à l'activité de la témocilline dans le cas d'infections intra-abdominales à des souches d'*E.coli* produisant des carbapénémases de type KPC. Celle-ci montre l'efficacité de la témocilline dans le cas d'infections intra-abdominales chez des souches présentant des CMI ≤ 16 mg/L à une posologie de 6g par jour (128). Une étude animale plus récente montre une synergie d'action *in vitro* et *in vivo* entre la témocilline et la fosfomycine dans le cas de péritonites causées par des souches d'*E.coli* sauvages ou produisant soit une KPC-3 ou une OXA-48. La fosfomycine permet ainsi de récupérer la sensibilité à la témocilline sur les souches produisant une KPC-3, la CMI passant alors de 32mg/L pour la témocilline seule à 2mg/L en association avec 0.25 mg/L de fosfomycine (129).

L'absence de définition d'un breakpoint par l'EUCAST pour la témocilline jusqu'à sa version v10.0 a été conditionnée par le faible nombre d'études animales et cliniques publiées sur ce sujet (130).

C/ Evolution des concentrations critiques de la témocilline

Le rôle de l'EUCAST porte sur l'uniformisation des concentrations critiques en Europe. Le 21 avril 2020, l'EUCAST a ajouté un addendum à sa table des breakpoints pour la témocilline par suite d'une consultation générale durant la fin de l'année 2019. Ces nouveaux breakpoints s'appliquent pour des isolats d'infections urinaires sévères ou compliquées (prostatites, épидидymites), comprenant l'urosepsis, mais ne sont pas applicables en cas d'infections respiratoires basses, d'infections des tissus mous, de septicémie et de choc septique du fait d'un manque d'études cliniques quant à l'efficacité de la témocilline dans ces types d'infections (tableau 14).

Micro-organismes	Breakpoints (mg/L)	
	S \leq	R >
Entérobactéries (seulement <i>E.coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> (except <i>K. aerogenes</i>), <i>P. mirabilis</i>)	0.001	16

Tableau 14. Nouveaux breakpoints de la témocilline définis par l'EUCAST en avril 2020

Ces nouveaux breakpoints permettent de catégoriser toute souche présentant une CMI ≤ 16 mg/L comme étant « sensibles à fortes doses » (« I »). L'application de ces breakpoints implique d'utiliser la témocilline à forte dose dans le cas d'infections urinaires compliquées et sévères aux germes cités en cas de CMI ≤ 16 mg/L. Les données de la littérature rapportent une très bonne efficacité de la témocilline à forte posologie de 6g/24h dans les cas d'infections urinaires sévères et compliquées (131).

Ces éléments témoignent à quel point le consensus de définition des breakpoints pour la témocilline est compliquée car cela vient à supprimer toute catégorisation des souches en sensibles à posologie standard. De plus, la témocilline n'est plus que recommandée dans le cas d'infections urinaires sévères et compliquées à *E.coli*, *Klebsiella spp.* (excluant *K. aerogenes*) et *Proteus mirabilis*. Ces breakpoints auraient certainement pu être appliqués pour l'ensemble des entérobactéries, la témocilline ayant montré une très bonne efficacité dans le cas d'ITU d'une étude où *E.coli* ne représente que 55% de l'ensemble des souches, avec une proportion de 16% de souches d'*Enterobacter spp.* (118).

Selon les nouveaux breakpoints de l'EUCAST, sur nos 100 souches initialement catégorisées résistantes par le Vitek®2, 3 sont désormais catégorisées comme résistantes. Concernant les 20 souches de notre étude pour lesquelles nous trouvons une CMI ≥ 16 mg/L comme l'indiquait le Vitek®2, deux souches seulement peuvent être considérées comme résistantes. En effet, une présente une CMI à 32 mg/L en E-test®, et l'autre 32 mg/L en Sensititre® (bien qu'en E-test® la CMI vaut 4mg/L pour cette souche). Ces souches ne présentant aucune autre résistance aux antibiotiques habituellement sensibles, on peut alors très certainement exclure une résistance d'origine enzymatique. Il pourrait s'agir ici de souches présentant une diminution de la perméabilité à la témocilline tel qu'ont pu le montrer Cavaco *et al.* (132).

Concernant les 18 autres souches présentant une CMI à 16 mg/L, dans le cas d'infections respiratoires basses, de bactériémies et d'infections des plaies, celles-ci seraient peut-être catégorisées résistantes si des études cliniques venaient à permettre la définition de breakpoints en cas de telles situations cliniques. Ces CMI à 16 mg/L sont plus facilement observées chez les souches présentant des mécanismes de résistance aux β -lactamines que chez celles dépourvues de tout mécanisme de résistance. On peut alors se demander si ces souches sensibles à tout autre

antibiotique habituellement efficace ne présenteraient pas également une diminution de la perméabilité à la témocilline.

D/ Mécanismes de résistance à la témocilline

Il existe de multiples mécanismes de résistance aux antibiotiques dont la fréquence varie en fonction du type de germes et des antibiotiques concernés :

- Des mécanismes enzymatiques d'origine chromosomique ou plasmidique entraînant une altération de l'antibiotique et modifiant son activité vis-à-vis de sa cible d'action,
- Des mécanismes bloquant l'entrée des antibiotiques dans les bactéries par des altérations qualitatives ou quantitatives des porines qui permettent l'entrée des antibiotiques,
- Des mécanismes favorisant la sortie des antibiotiques en dehors de la cellule bactérienne par une hyperexpression des pompes à efflux due à des mutations génétiques des gènes correspondants,
- Des modifications des protéines cibles des antibiotiques modifiant l'affinité de celles-ci.

La témocilline présente une activité faible et même une inactivité sur les bactéries à Gram positif avec des CMI importantes (CMI > 128 mg/L) qui s'explique par une trop faible affinité des PLP chez ces bactéries (100,133).

Bien que la témocilline soit active sur des souches d'entérobactéries possédant des β -lactamases à type de BLSE ou céphalosporinases de type AmpC, le principal mécanisme de résistance à celle-ci chez les entérobactéries est procurée par certains types de β -lactamases, les β -lactamases de classe B et D : c'est le cas notamment de souches productrices de carbapénémases. Différents types de carbapénémases vont conférer des résistances avec des CMI élevées dépassant les 128 mg/L. Les principales carbapénémases incriminées sont de type OXA-48, VIM, IMP et NDM avec des plages de CMI s'étendant de 128 à ≥ 512 mg/L pour les souches d'*E.coli* exprimant les gènes *bla*_{OXA-48} et *bla*_{VIM}, et des plages plus larges de 16 à ≥ 512 mg/L pour celles exprimant les gènes *bla*_{IMP} et *bla*_{NDM} (132,134,135).

Certains variants de carbapénémases de classe A, tels que les KPC, peuvent présenter des CMI plus élevées en fonction du variant impliqué. Par exemple, des souches produisant une carbapénémase KPC de type 3 présenteront des CMI de

l'ordre de 32mg/L, tandis que celles produisant une KPC de type 2 présenteront des CMI de l'ordre de 16mg/L (128).

A des niveaux moindres de résistance, certaines souches productrices de BLSE de type CTX-M de groupe 1 ou de type TEM de groupe 1 peuvent également présenter des CMI plus élevées que chez d'autres souches exprimant d'autres types de BLSE ou exprimant ces mêmes types de BLSE. Ces différents niveaux de résistance peuvent être expliqués par des mécanismes de résistance secondaires. Des mutations au niveau du gène *envZ* qui joue un rôle de régulation de l'expression des gènes *ompC* et *ompF*, et au niveau des gènes *ompC* et *ompF* codant pour des porines ont été retrouvées chez des souches d'*E.coli* présentant ces CMI plus élevées entraînant alors une diminution de la perméabilité des porines aux molécules de témocilline (132). Chez certaines espèces de bacilles à Gram négatif telles que *P. aeruginosa*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* et *Enterobacter spp.* la résistance n'est pas due à des mécanismes de résistance enzymatique comme majoritairement observée chez les entérobactéries. La résistance à la témocilline s'explique par un échec d'entrée de la molécule au sein de la cellule bactérienne, qui peut être récupérée en associant de l'EDTA qui supprime certains lipopolysaccharides de la membrane cellulaire (105). Elle s'explique par la présence de pompes à efflux favorisant la sortie des molécules de témocilline en dehors des de ces bactéries (136). Une étude montre une sensibilité acquise à la témocilline chez des souches de *P. aeruginosa* par des mutations sur les gènes codants ces pompes à efflux et ne permettant plus la sortie de la témocilline en dehors de la bactérie (137).

L'acquisition de résistance de souches cliniques exposées à la témocilline est rare avec une fréquence de mutations estimée de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-10} (104,129). De plus, la témocilline ne sélectionne pas de mutants déréprimés chez les espèces productrices d'une AmpC inductible contrairement aux céphalosporines (138). Pour finir, une étude montre que les souches d'*E.coli* présentant une résistance à la témocilline possèdent également des résistances aux autres β -lactamines, aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones (139).

Au vu des connaissances actuelles des mécanismes de résistance à la témocilline, nous pouvons exclure tout mécanisme enzymatique de résistance chez les souches non sensibles à la témocilline et sensibles à l'ensemble des autres β -

lactamines, principal mécanisme chez les entérobactéries. L'hypothèse d'un mécanisme d'imperméabilité reste toutefois possible.

Dans l'étude de Cavaco *and al.*, parmi leurs souches présentant des modifications de porines, une de ces souches était de phénotype sauvage avec une résistance à la témocilline (132). Une autre étude montre qu'une sous-expression de *OmpF*, par des mutations dans le gène *ramR* chez *Enterobacter hormaechei*, était à l'origine d'une diminution significative des CMI pour la témocilline (140). Ces études permettent de supposer une résistance à la témocilline via une diminution de l'expression des porines *OmpF*.

V/ Conclusion et perspectives d'études

Sur l'ensemble des 100 souches étudiées, le Vitek®2 a surestimé la CMI de 80 souches d'au moins une dilution de CMI, les catégorisant ainsi résistantes selon le breakpoint défini par le CA-SFM d'avril 2020.

L'établissement consensuel de breakpoints n'étant pas chose simple et nécessitant de nombreuses données scientifiques, finalement avec les nouvelles définitions de sensibilité aux agents antimicrobiens et les breakpoints émis pour la témocilline par l'EUCAST, sur ces 100 souches initialement rendues résistantes à la témocilline par le Vitek®2 dans le cas d'infections urinaires, 98 d'entre elles peuvent désormais être rendues « sensibles à forte dose » et non plus « résistantes » à la témocilline sur les antibiogrammes. Cependant, ces nouveaux breakpoints ne permettent pas de catégoriser les souches sensibles ou résistantes en cas d'infections autres qu'urinaires.

Toutefois, 20 des 100 souches présentent une CMI ≥ 16 mg/L, ce qui les rendait résistantes à la témocilline avant la définition de breakpoints par l'EUCAST. On peut alors se demander s'il s'agit réellement de souches sauvages dépourvues de tout mécanisme de résistance ou si elles possèdent un mécanisme de résistance à bas niveau. La témocilline étant la seule des bêta-lactamines impactée, l'explication la plus rationnelle serait alors une diminution de la perméabilité de ces souches à la témocilline.

Ces 20 souches ont été conservées à la suite de l'étude. Il pourrait être intéressant d'effectuer des analyses de biologie moléculaire afin d'étudier leurs gènes, notamment les gènes *envZ*, *ompC* et *ompF* qui peuvent altérer la perméabilité des souches pour la témocilline.

BIBLIOGRAPHIE

1. DebRoy C, Fratamico PM, Yan X, Baranzoni G, Liu Y, Needleman DS, et al. Comparison of O-Antigen Gene Clusters of All O-Serogroups of *Escherichia coli* and Proposal for Adopting a New Nomenclature for O-Typing. PLoS ONE [Internet]. 2016 Jan 29 [cited 2020 Jul 27];11(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4732683/>
2. Coimbra RS, Grimont F, Lenormand P, Burguière P, Beutin L, Grimont PA. Identification of *Escherichia coli* O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (rfb-RFLP). Res Microbiol. 2000 Oct;151(8):639–54.
3. Cheng K, She Y-M, Chui H, Domish L, Sloan A, Hernandez D, et al. Mass Spectrometry-Based *Escherichia coli* H Antigen/Flagella Typing: Validation and Comparison with Traditional Serotyping. Clin Chem. 2016 Jun;62(6):839–47.
4. Machado J, Grimont F, Grimont PA. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified fliC gene. Res Microbiol. 2000 Sep;151(7):535–46.
5. Botelho BA, Bando SY, Trabulsi LR, Moreira-Filho CA. Identification of EPEC and non-EPEC serotypes in the EPEC O serogroups by PCR-RFLP analysis of the fliC gene. J Microbiol Methods. 2003 Jul;54(1):87–93.
6. Yang S, Xi D, Jing F, Kong D, Wu J, Feng L, et al. Genetic diversity of K-antigen gene clusters of *Escherichia coli* and their molecular typing using a suspension array. Can J Microbiol. 2018 Apr;64(4):231–41.
7. Van Dijk WC, Verbrugh HA, van der Tol ME, Peters R, Verhoef J. Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonization. Infect Immun. 1979 Aug;25(2):603–9.
8. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2010 Mar;8(3):207–17.
9. Savageau MA. *Escherichia coli* Habitats, Cell Types, and Molecular Mechanisms of Gene Control. Am Nat. 1983 Dec 1;122(6):732–44.
10. Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. Epidemiol Rev. 1984;6:31–51.

11. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.* 2000 May;181(5):1753–4.
12. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(1):26–38.
13. Johnson JR, Russo TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol IJMM.* 2005 Oct;295(6–7):383–404.
14. Roberts JA, Marklund BI, Ilver D, Haslam D, Kaack MB, Baskin G, et al. The Gal(alpha 1-4)Gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Dec 6;91(25):11889–93.
15. Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Märd S, Svanborg C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 3;93(18):9827–32.
16. High NJ, Hales BA, Jann K, Boulnois GJ. A block of urovirulence genes encoding multiple fimbriae and hemolysin in *Escherichia coli* O4:K12:H-. *Infect Immun.* 1988 Feb;56(2):513–7.
17. Khan AS, Kniep B, Oelschlaeger TA, Van Die I, Korhonen T, Hacker J. Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2000 Jun;68(6):3541–7.
18. Antão E-M, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog.* 2009 Dec 10;1(1):22.
19. Lane MC, Lockett V, Monterosso G, Lamphier D, Weinert J, Hebel JR, et al. Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infect Immun.* 2005 Nov;73(11):7644–56.
20. Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:39–68.
21. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev.* 1991 Jan;4(1):80–128.

22. Guyer DM, Radulovic S, Jones F-E, Mobley HLT. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect Immun*. 2002 Aug;70(8):4539–46.
23. Welch RA. Uropathogenic *Escherichia coli*-associated exotoxins. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016 Jun [cited 2020 Sep 19];4(3).
24. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 2002 May;8(5):508–13.
25. Vieira MA, Dias RCB, Dos Santos LF, Rall VLM, Gomes TAT, Hernandez RT. Diversity of strategies used by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to induce attaching and effacing lesion in epithelial cells. *J Med Microbiol*. 2019 Jun;68(6):940–51.
26. Moxley RA, Smith DR. Attaching-effacing *Escherichia coli* Infections in Cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2010 Mar;26(1):29–56.
27. Qadri F, Svennerholm A-M, Faruque ASG, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Jul;18(3):465–83.
28. Gaastra W, Svennerholm A-M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol*. 1996 Nov 1;4(11):444–52.
29. Turner SM, Scott-Tucker A, Cooper LM, Henderson IR. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 Oct 1;263(1):10–20.
30. Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev*. 2006 May 1;30(3):382–403.
31. O'Brien AO, Lively TA, Chen ME, Rothman SW, Formal SB. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet Lond Engl*. 1983 Mar 26;1(8326 Pt 1):702.
32. Johnson WM, Lior H, Bezanson GS. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet Lond Engl*. 1983 Jan 1;1(8314–5):76.

33. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) - Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *EFSA J.* 2007;5(11):579.
34. Mariani-Kurkdjian P, Bingen É. Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines. *Réanimation.* 2012 May;21(3):268–79.
35. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J.* 1987 Sep;6(9):829–31.
36. Huang DB, Mohanty A, DuPont HL, Okhuysen PC, Chiang T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 2006 Oct;55(Pt 10):1303–11.
37. Nataro JP, Deng Y, Cookson S, Cravioto A, Savarino SJ, Guers LD, et al. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis.* 1995 Feb;171(2):465–8.
38. Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB, Reeves PR. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect Immun.* 2004 Sep;72(9):5080–8.
39. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Feb;2(2):123–40.
40. Hsu B-M, Wu S-F, Huang S-W, Tseng Y-J, Ji D-D, Chen J-S, et al. Differentiation and identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* in environmental waters by a molecular method and biochemical test. *Water Res.* 2010 Feb;44(3):949–55.
41. Kerneis S, Bilge SS, Fourel V, Chauviere G, Coconnier MH, Servin AL. Use of purified F1845 fimbrial adhesin to study localization and expression of receptors for diffusely adhering *Escherichia coli* during enterocytic differentiation of human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2 in culture. *Infect Immun.* 1991 Nov;59(11):4013–8.

42. Poitrineau P, Forestier C, Meyer M, Jallat C, Rich C, Malpuech G, et al. Retrospective case-control study of diffusely adhering *Escherichia coli* and clinical features in children with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul;33(7):1961–2.
43. Tanimoto Y, Tamai S, Matsuzaki T, Takeuchi N, Noju T, Yanagida S, et al. Diffusely Adherent *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy Carriers Suppress Cytokine Secretions of Epithelial Cells Stimulated by Inflammatory Substances. *Infect Immun.* 2019;87(1).
44. Girón JA, Jones T, Millán-Velasco F, Castro-Muñoz E, Zárata L, Fry J, et al. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. *J Infect Dis.* 1991 Mar;163(3):507–13.
45. Levine MM, Ferreccio C, Prado V, Cayazzo M, Abrego P, Martinez J, et al. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am J Epidemiol.* 1993 Nov 15;138(10):849–69.
46. Germani Y, Bégaud E, Duval P, Le Bouguéne C. Prevalence of enteropathogenic, enteroaggregative, and diffusely adherent *Escherichia coli* among isolates from children with diarrhea in new Caledonia. *J Infect Dis.* 1996 Nov;174(5):1124–6.
47. Scaletsky ICA, Fabbricotti SH, Carvalho RLB, Nunes CR, Maranhão HS, Morais MB, et al. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. *J Clin Microbiol.* 2002 Feb;40(2):645–8.
48. Vosti KL, Randall E. Sensitivity of serologically classified strains of *Escherichia coli* of human origin to the serum bactericidal system. *Am J Med Sci.* 1970 Feb;259(2):114–9.
49. Maiztegui JI, Biegeleisen JZ, Cherry WB, Kass EH. Bacteremia due to gram-negative rods. A clinical, bacteriologic, serologic and immunofluorescent study. *N Engl J Med.* 1965 Feb 4;272:222–9.
50. Orskov F, Orskov I. *Escherichia coli* O:H serotypes isolated from human blood. Prevalence of the K1 antigen with technical details of O and H antigenic determination. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl.* 1975 Dec;83(6):595–600.

51. McCabe WR, Kaijser B, Olling S, Uwaydah M, Hanson LA. Escherichia coli in bacteremia: K and O antigens and serum sensitivity of strains from adults and neonates. *J Infect Dis.* 1978 Jul;138(1):33–41.
52. Bundy LM, Noor A. Neonatal Meningitis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cited 2020 Jul 27].
53. Basmaci R, Bonacorsi S, Bidet P, Biran V, Aujard Y, Bingen E, et al. Escherichia Coli Meningitis Features in 325 Children From 2001 to 2013 in France. *Clin Infect Dis.* 2015 Sep 1;61(5):779–86.
54. Bedford H, de Louvois J, Halket S, Peckham C, Hurley R, Harvey D. Meningitis in infancy in England and Wales: follow up at age 5 years. *BMJ.* 2001 Sep 8;323(7312):533–6.
55. Bonacorsi S, Clermont O, Houdouin V, Cordevant C, Brahimi N, Marecat A, et al. Molecular analysis and experimental virulence of French and North American Escherichia coli neonatal meningitis isolates: identification of a new virulent clone. *J Infect Dis.* 2003 Jun 15;187(12):1895–906.
56. Čurová K, Slobodníková R, Kmeťová M, Hrabovský V, Maruniak M, Liptáková E, et al. Virulence, phylogenetic background and antimicrobial resistance in Escherichia coli associated with extraintestinal infections. *J Infect Public Health.* 2020 Jul 17;
57. Malheiro LF, Magano R, Ferreira A, Sarmiento A, Santos L. Skin and soft tissue infections in the intensive care unit: a retrospective study in a tertiary care center. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2017;29(2):195–205.
58. Song Y, Shen X. Diabetic ketoacidosis complicated by emphysematous pyelonephritis: a case report and literature review. *BMC Urol.* 2020 Jan 29;20(1):6.
59. Sung S, Lee BH, Kim J-H, Park Y, Ha JW, Moon S-H, et al. Emphysematous osteomyelitis of the spine: A rare case report. *Medicine (Baltimore).* 2020 Jul 10;99(28):e21113.
60. Law D, Thomas M. Escherichia coli emphysematous endocarditis. *Lancet Infect Dis.* 2020 Mar 1;20(3):381.

61. Wh L, Cc T, Ab W, Yt C, Th K, Jy C, et al. Clinical and microbiological characteristics of peritoneal dialysis-related peritonitis caused by *Escherichia coli* in southern Taiwan [Internet]. Vol. 37, *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*: official publication of the European Society of Clinical Microbiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 2018 [cited 2020 Aug 30]. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ressources-electroniques.univ-lille.fr/29931659/>
62. Razaghi M, Tajeddin E, Ganji L, Alebouyeh M, Alizadeh AHM, Sadeghi A, et al. Colonization, resistance to bile, and virulence properties of *Escherichia coli* strains: Unusual characteristics associated with biliary tract diseases. *Microb Pathog*. 2017 Oct;111:262–8.
63. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980 May 16;289(1036):321–31.
64. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jun;39(6):1211–33.
65. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct;14(4):933–51, table of contents.
66. Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R. A novel plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother*. 1992 May 1;29(5):590–2.
67. Poirel L, Decousser J-W, Nordmann P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Sep;47(9):2938–45.
68. Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, et al. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol*. 2001 Jan;39(1):175–82.
69. Tzelepi E, Magana C, Platsouka E, Sofianou D, Paniara O, Legakis NJ, et al. Extended-spectrum beta-lactamase types in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in two Greek hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. 2003 Mar;21(3):285–8.

70. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Aug;47(8):2385–92.
71. Chapin KC, Musgnug MC. Evaluation of Sensititre automated reading and incubation system for automated reading of Sensititre broth microdilution susceptibility plates. *J Clin Microbiol*. 2004 Feb;42(2):909–11.
72. Baker CN, Stocker SA, Rhoden DL, Thornsberry C. Evaluation of the MicroScan antimicrobial susceptibility system with the autoSCAN-4 automated reader. *J Clin Microbiol*. 1986 Jan;23(1):143–8.
73. Joly-Guillou M-L. Intérêt du E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Réanimation*. 2006 Jun 1;15(3):237–40.
74. Lee K, Yong D, Yum JH, Lim YS, Bolmström A, Qwärnström A, et al. Evaluation of Etest MBL for Detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 Allele-Positive Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*. 2005 Feb 1;43(2):942–4.
75. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec;56(12):6437–40.
76. Surre J, Canard I, Bourne-Branchu P, Courbiere E, Franceschi C, Chatellier S, et al. Enhanced detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by an optimized phenol red assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018 Jan;90(1):11–7.
77. Krishnamurthy T, Ross PL, Rajamani U. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM*. 1996;10(8):883–8.
78. Josten M, Dischinger J, Szekat C, Reif M, Al-Sabti N, Sahl H-G, et al. Identification of agr-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Med Microbiol IJMM*. 2014 Nov;304(8):1018–23.

79. Rhoads DD, Wang H, Karichu J, Richter SS. The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016 Nov;86(3):257–61.
80. Nagy E, Becker S, Sóki J, Urbán E, Kostrzewa M. Differentiation of division I (cfiA-negative) and division II (cfiA-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2011 Nov;60(Pt 11):1584–90.
81. Schaumann R, Knoop N, Genzel GH, Losensky K, Rosenkranz C, Stîngu CS, et al. A step towards the discrimination of beta-lactamase-producing clinical isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2012 Sep 1;18(9):MT71–7.
82. Lange C, Schubert S, Jung J, Kostrzewa M, Sparbier K. Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol*. 2014 Dec;52(12):4155–62.
83. Jung JS, Hamacher C, Gross B, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, et al. Evaluation of a Semiquantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Method for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing of Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol*. 2016 Nov 1;54(11):2820–4.
84. Demirev PA, Hagan NS, Antoine MD, Lin JS, Feldman AB. Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2013 Aug;24(8):1194–201.
85. Sparbier K, Lange C, Jung J, Wieser A, Schubert S, Kostrzewa M. MALDI Biotyper-Based Rapid Resistance Detection by Stable-Isotope Labeling. *J Clin Microbiol*. 2013 Nov;51(11):3741–8.
86. Burckhardt I, Zimmermann S. Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry To Detect Carbapenem Resistance within 1 to 2.5 Hours. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep 1;49(9):3321–4.
87. Hooff GP, van Kampen JJA, Meesters RJW, van Belkum A, Goessens WHF, Luidert TM. Characterization of β -Lactamase Enzyme Activity in Bacterial Lysates using MALDI-Mass Spectrometry. *J Proteome Res*. 2012 Jan 1;11(1):79–84.

88. Oviaño M, Fernández B, Fernández A, Barba MJ, Mouriño C, Bou G. Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Nov;20(11):1146–57.
89. Ghebremedhin B, Halstenbach A, Smiljanic M, Kaase M, Ahmad-Nejad P. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. *Ann Clin Microbiol Antimicrob [Internet]*. 2016 Feb 2 [cited 2020 Feb 12];15.
90. Rapp E, Samuelsen Ø, Sundqvist M. Detection of carbapenemases with a newly developed commercial assay using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *J Microbiol Methods*. 2018;146:37–9.
91. Hart PJ, Wey E, McHugh TD, Balakrishnan I, Belgacem O. A method for the detection of antibiotic resistance markers in clinical strains of *Escherichia coli* using MALDI mass spectrometry. *J Microbiol Methods*. 2015 Apr 1;111:1–8.
92. Charretier Y, Dauwalder O, Franceschi C, Degout-Charmette E, Zambardi G, Cecchini T, et al. Rapid Bacterial Identification, Resistance, Virulence and Type Profiling using Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *Sci Rep [Internet]*. 2015 Sep 9 [cited 2020 Feb 12];5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4563557/>
93. Charretier Y, Köhler T, Cecchini T, Bardet C, Cherkaoui A, Llanes C, et al. Label-free SRM-based relative quantification of antibiotic resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Front Microbiol [Internet]*. 2015 [cited 2020 Feb 12];6.
94. Cecchini T, Yoon E-J, Charretier Y, Bardet C, Beaulieu C, Lacoux X, et al. Deciphering Multifactorial Resistance Phenotypes in *Acinetobacter baumannii* by Genomics and Targeted Label-free Proteomics. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2018 Mar;17(3):442–56.
95. Livermore DM, Tulkens PM. Temocillin revived. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Feb;63(2):243–5.

96. Rodriguez-Villalobos H, Malaviolle V, Frankard J, Mendonça R de, Nonhoff C, Struelens MJ. In vitro activity of temocillin against extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Apr 1;57(4):771–4.
97. Glupczynski Y, Huang T-D, Berhin C, Claeys G, Delmée M, Ide L, et al. In vitro activity of temocillin against prevalent extended-spectrum beta-lactamases producing Enterobacteriaceae from Belgian intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Nov 1;26(11):777–83.
98. Livermore DM, Hope R, Fagan EJ, Warner M, Woodford N, Potz N. Activity of temocillin against prevalent ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from south-east England. *J Antimicrob Chemother*. 2006 May;57(5):1012–4.
99. Résumé des caractéristiques du produit - NEGABAN 1 g, poudre pour solution injectable/pour perfusion - Base de données publique des médicaments
100. Labia R, Baron P, Masson JM, Hill G, Cole M. Affinity of temocillin for *Escherichia coli* K-12 penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1984 Sep;26(3):335–8.
101. Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 1998 Dec;62(4):1371–414.
102. Craig WA. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of beta-lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infect Dis Clin North Am*. 2003 Sep;17(3):479–501.
103. De Jongh R, Hens R, Basma V, Mouton JW, Tulkens PM, Carryn S. Continuous versus intermittent infusion of temocillin, a directed spectrum penicillin for intensive care patients with nosocomial pneumonia: stability, compatibility, population pharmacokinetic studies and breakpoint selection. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Feb;61(2):382–8.
104. Slocombe B, Basker MJ, Bentley PH, Clayton JP, Cole M, Comber KR, et al. BRL 17421, a novel beta-lactam antibiotic, highly resistant to beta-lactamases, giving high and prolonged serum levels in humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 1981 Jul;20(1):38–46.

105. Jules K, Neu HC. Antibacterial activity and beta-lactamase stability of temocillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982 Sep;22(3):453–60.
106. Matagne A, Lamotte-Brasseur J, Dive G, Knox JR, Frère JM. Interactions between active-site-serine beta-lactamases and compounds bearing a methoxy side chain on the alpha-face of the beta-lactam ring: kinetic and molecular modelling studies. *Biochem J.* 1993 Aug 1;293 (Pt 3):607–11.
107. Haute Autorité de Santé. Commission de la Transparence. NEGABAN. Avis du 1er avril 2015.
108. De Vries-Hospers HG, Hofstra W, Welling GW, Van der Waaij D. Influence of temocillin on colonisation resistance and consequences for therapy. *Drugs.* 1985;29 Suppl 5:227–33.
109. Boon RJ, Beale AS. Studies with temocillin in a hamster model of antibiotic-associated colitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985 Jun;27(6):980–1.
110. Mittermayer HW. Influence of temocillin on human bowel flora. *Drugs.* 1985;29 Suppl 5:43–8.
111. Habayeb H, Sajin B, Patel K, Grundy C, Al-Dujaili A, Van de Velde S. Amoxicillin plus temocillin as an alternative empiric therapy for the treatment of severe hospital-acquired pneumonia: results from a retrospective audit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2015 Aug;34(8):1693–9.
112. Guest EA, Horton R, Mellows G, Slocombe B, Swaisland AJ, Tasker TC. Human pharmacokinetics of temocillin (BRL 17421) side chain epimers. *J Antimicrob Chemother.* 1985 Mar;15(3):327–36.
113. Overbosch D, van Gulpen C, Mattie H. Renal clearance of temocillin in volunteers. *Drugs.* 1985;29 Suppl 5:128–34.
114. Legge JS, Reid TM, Palmer JB. Clinical efficacy, tolerance and pharmacokinetics of temocillin in patients with respiratory tract infections. *Drugs.* 1985;29 Suppl 5:118–21.
115. Wittke RR, Adam D, Klein HE. Therapeutic results and tissue concentrations of temocillin in surgical patients. *Drugs.* 1985;29 Suppl 5:221–6.

116. Soubirou J-F. Témocilline, une alternative aux carbapénèmes pour traiter les infections à entérobactéries résistantes aux C3G ? *J Anti-Infect.* 2013 Jun 1;15(2):60–70.
117. Laterre P-F, Wittebole X, Van de Velde S, Muller AE, Mouton JW, Carryn S, et al. Temocillin (6 g daily) in critically ill patients: continuous infusion versus three times daily administration. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Mar;70(3):891–8.
118. Balakrishnan I, Awad-El-Kariem FM, Aali A, Kumari P, Mulla R, Tan B, et al. Temocillin use in England: clinical and microbiological efficacies in infections caused by extended-spectrum and/or derepressed AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Nov;66(11):2628–31.
119. Boelaert J, Daneels R, Schurgers M, Mellows G, Swaisland AJ, Lambert AM, et al. Effect of renal function and dialysis on temocillin pharmacokinetics. *Drugs.* 1985;29 Suppl 5:109–13.
120. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2019. V.2.0 Mai.
121. Alexandre K, Réveillon-Istin M, Fabre R, Delbos V, Etienne M, Pestel-Caron M, et al. Temocillin against Enterobacteriaceae isolates from community-acquired urinary tract infections: low rate of resistance and good accuracy of routine susceptibility testing methods. *J Antimicrob Chemother.* 2018 01;73(7):1848–53.
122. EUCAST. Susceptibility testing categories S, I and R have been redefined by EUCAST and are now related to exposure of the infecting organism at the site of infection. 15 July, 2018.
123. Fuchs PC, Barry AL, Thornsberry C, Jones RN. Interpretive criteria for temocillin disk diffusion susceptibility testing. *Eur J Clin Microbiol.* 1985 Feb;4(1):30–3.
124. Schulze B, Heilmann HD. Treatment of severe infections with temocillin. Clinical and bacteriological evaluation. *Drugs.* 1985;29 Suppl 5:207–9.
125. Verboven M, Lauwers S, Pintens H. Temocillin in the treatment of pyelonephritis in children. *Drugs Exp Clin Res.* 1987;13(3):171–3.
126. Barton E, Flanagan P, Hill S. Spinal infection caused by ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* treated with temocillin. *J Infect.* 2008 Oct;57(4):347–9.

127. Gupta ND, Smith RE, Balakrishnan I. Clinical efficacy of temocillin. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Aug;64(2):431–3.
128. Alexandre K, Chau F, Guérin F, Massias L, Lefort A, Cattoir V, et al. Activity of temocillin in a lethal murine model of infection of intra-abdominal origin due to KPC-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(7):1899–904.
129. Berleur M, Guérin F, Massias L, Chau F, Poujade J, Cattoir V, et al. Activity of fosfomycin alone or combined with temocillin in vitro and in a murine model of peritonitis due to KPC-3- or OXA-48-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2018 01;73(11):3074–80.
130. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, valid from 2020-01-01.
131. Vallée M, Bruyère F, Roblot F, Brureau L. Place de la témocilline dans le traitement des infections urinaires. *Prog En Urol.* 2017 Oct 1;27(12):609–17.
132. Cavaco LM, Hansen F, Mushtaq S, Hill RLR, Woodford N, Le Hello S, et al. Evaluation of temocillin for phenotypic carbapenemase screening of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates in relation to the presence of genes encoding ESBLs and carbapenemase production. *J Antimicrob Chemother.* 2019 01;74(3):639–44.
133. Georgopapadakou NH, Liu FY. Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*: relation to antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980 Nov 1;18(5):834–6.
134. Woodford N, Pike R, Meunier D, Loy R, Hill R, Hopkins KL. In vitro activity of temocillin against multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp., and evaluation of high-level temocillin resistance as a diagnostic marker for OXA-48 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Feb 1;69(2):564–7.
135. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents.* 2011 May;37(5):415–9.

136. Buyck JM, Guénard S, Plésiat P, Tulkens PM, Van Bambeke F. Role of MexAB-OprM in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to temocillin and impact on the susceptibility of strains isolated from patients suffering from cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Mar;67(3):771–5.
137. Chalhoub H, Pletzer D, Weingart H, Braun Y, Tunney MM, Elborn JS, et al. Mechanisms of intrinsic resistance and acquired susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients to temocillin, a revived antibiotic. *Sci Rep.* 2017 16;7:40208.
138. Stapleton P, Shannon K, Phillips I. The ability of beta-lactam antibiotics to select mutants with derepressed beta-lactamase synthesis from *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother.* 1995 Sep;36(3):483–96.
139. Duployez C, Loïez C, Cattoen C, Wallet F, Vachée A. In vitro activity of temocillin against extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from urinary tract infections in France. *Med Mal Infect.* 2019 Feb;49(1):47–53.
140. Gravey F, Cattoir V, Ethuin F, Fabre L, Beyrouthy R, Bonnet R, et al. ramR deletion in an *Enterobacter hormaechei* isolate as a consequence of therapeutic failure to key antibiotics in a long-term hospitalized patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Aug 10;

ANNEXE I

Hôpital	Nombre de souches	Souches provenant d'IC	Souches provenant d'IN	Résistances associées				
				Fluoroquinolones	Sulfaméthoxazole -Triméthoprim	Aminosides	Nitrofurantoïne	Fosfomycine
Armentières	12	11	1	2	1	0	0	0
Arras	14	10	4	2	1	2	0	0
Cambrai	10	8	2	2	1	0	1	0
Douai	9	6	3	0	0	0	0	1
Dunkerque	6	6	0	1	0	0	0	0
Lens	6	4	2	0	0	0	0	0
Lille	10	9	1	0	0	0	0	0
Roubaix	12	10	2	1	0	0	0	0
Valenciennes	13	8	2	2	0	0	0	0
Tourcoing	8	5	3	0	0	0	0	0

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2019/2020

Nom : Réguème
Prénom : Alexandre

Titre du mémoire / thèse : Résistance à la témocilline chez des souches d'*Escherichia coli* rendues sensibles aux autres bêta-lactamines par le Vitek®2 de Biomérieux : vérification par approche phénotypique

Mots-clés : Témocilline, résistance, Vitek®2, E-test®, Sensititre®

Résumé

Introduction : Certaines souches d'*Escherichia coli* sensibles à l'ensemble des β -lactamines apparaissent comme résistantes à la témocilline par la méthode automatisée Vitek®2 (bioMérieux). La témocilline étant une bêta-lactamine principalement utilisée en cas de résistances à type de BLSE ou céphalosporinase, il semble étonnant de voir des souches résistantes uniquement à la témocilline. Le but de ce travail est de vérifier par des approches phénotypiques la concentration minimale inhibitrice (CMI) à la témocilline de souches d'*E.coli* rendues sensibles à l'ensemble des β -lactamines à l'exception de la témocilline par le Vitek®2.

Méthodes : 100 souches d'*E.coli* résistantes à la témocilline (CMI \geq 16 mg/L) et sensibles à l'ensemble des β -lactamines sur Vitek®2 (carte AST N372) ont été recueillies de manière multicentrique à partir de 10 laboratoires hospitaliers de la région des Hauts-de-France. Les CMI ont été vérifiées par E-test® et pour 37 de ces souches par méthode Sensititre® avec un contrôle de qualité en parallèle. L'interprétation a été faite selon les recommandations du CA-SFM 2019. Des tests statistiques ont été réalisés via le logiciel R en prenant un risque $\alpha = 0.05$.

Résultats : Parmi les 100 souches, 80 souches présentent une CMI \leq 8 mg/L par la méthode E-test®. La présence d'une résistance n'a donc été confirmée que pour 20 souches. Il n'y a pas de liaison entre le type d'infection (communautaire ou nosocomiale) et la présence d'une résistance ($X^2c = 0.05$, p-value = 0.82), ni entre le taux de résistance à la témocilline en cas d'infection communautaire et celui en cas d'infection nosocomiale au risque $\alpha = 0.05$ (OR = 1.37 IC_{95%}[0.34-4.85], p-value = 0.55). Ces données ont été confirmées par la méthode Sensititre® à l'exception de 3 souches qui présentent des CMI supérieures de 1 à 3 dilutions par la méthode Sensititre®.

Conclusion : Les résultats montrent qu'une résistance isolée à la témocilline est dans 80% des cas liée à une surestimation de la CMI par le Vitek2®. Malgré tout, 20 des 100 souches présentent une CMI \geq 16 mg/L supposant un mécanisme de résistance indépendant aux autres β -lactamines qui reste à explorer.

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Anne Goffard,
Université de Lille, CHU Lille

Assesseur(s) : Madame le Docteur Caroline Loïez, CHU Lille
Monsieur le Docteur Christian Cattoen, CH Valenciennes

Directeur de thèse : Madame le Docteur Anne Vachée, CH Roubaix