Université de Lille Faculté de Pharmacie de Lille

Année universitaire 2020/2021

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 02/09/2021

Par M. Malo PENVEN

Diffusion épidémique et persistance de *Acinetobacter baumannii* chez les grands brûlés : intérêt du typage et méthodes récentes

---

Membres du jury :

Président :	**BROUSSEAU Thierry, PU-PH, Université de Lille, CHU de Lille**
Directeur de thèse :	**GAILLOT Olivier, MCU-PH, Université de Lille, CHU de Lille**
Assesseurs :	**SENDID Boualem, PU-PH, Université de Lille, CHU de Lille**
	CATTOIR Vincent, PU-PH, Université de Rennes, CHU de Rennes
	VOEDTS Sophia, CCA, Université de Lille, CHU de Lille

Université de Lille Faculté de Pharmacie de Lille

Année universitaire 2020/2021

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 02/09/2021

Par M. Malo PENVEN

Diffusion épidémique et persistance de *Acinetobacter baumannii* chez les grands brûlés : intérêt du typage et méthodes récentes

---

<u>Membres du jury</u> :

Président :	**BROUSSEAU Thierry, PU-PH, Université de Lille, CHU de Lille**
Directeur de thèse :	**GAILLOT Olivier, MCU-PH, Université de Lille, CHU de Lille**
Assesseurs :	**SENDID Boualem, PU-PH, Université de Lille, CHU de Lille**
	CATTOIR Vincent, PU-PH, Université de Rennes, CHU de Rennes
	VOEDTS Sophia, CCA, Université de Lille, CHU de Lille

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.	COURTECUISSE	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

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

http://pharmacie.univ-lille2.fr

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

REMERCIEMENTS :

À mon président de jury,

Professeur Thierry Brousseau

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Chef de pôle de Biologie Pathologie Génétique
Chef du service de Biochimie automatisée, protéines
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Je salue votre disponibilité et professionnalisme. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

À mes assesseurs,

Professeur Boualem Sendid

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Responsable de l'institut de microbiologie
Chef du service de Parasitologie-Mycologie et de Bactériologie-Hygiène
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Pour votre apprentissage en Parasitologie-Mycologie et pour m'avoir fait l'honneur de juger mon manuscrit. Merci pour votre grande disponibilité, votre efficacité et votre esprit scientifique. Soyez assuré de toute ma gratitude.

Professeur Vincent Cattoir

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Chef du service de Bactériologie-Hygiène
Centre Hospitalier Universitaire de Rennes

Je tiens à te remercier pour m'avoir accueilli, avec sympathie, humour et bienveillance à Rennes. Merci pour la qualité scientifique de tes enseignements, ta passion inspirante et ta grande disponibilité. Sans hésitation, tu m'as fait l'honneur de juger ce travail. Sois assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Docteur Sophia Voedts

Chef de clinique & assistant hospitalo-universitaire
Pôle anesthésie réanimation, service de réanimation des brûlés
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Vous me faites l'honneur de juger mon travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.

À mon directeur de thèse,

Docteur Olivier Gaillot

Maître de conférences des Universités - Praticien Hospitalier
Service de Bactériologie-Hygiène
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Je tiens à t'exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance que tu m'as accordée durant ces années. Merci pour ces conseils déterminants et pour m'avoir accompagné et aidé durant l'internat. Je tiens surtout à te remercier pour m'avoir donné goût à la microbiologie et plus largement, pour nos échanges animés et passionnants qu'ils soient scientifiques ou culturels. Sois assuré de mes plus sincères remerciements et de mon respect.

Aux personnes qui ont participé à ce projet,

Au Docteur Pauline Devauchelle pour son aide et ses conseils pertinents lors de la réalisation de ce travail. Avec sympathie, vous m'avez fait l'honneur de faire partie de mon jury, mais les évènements en ont été autrement. Soyez assurée de mon profond respect et de ma gratitude.

À Mme Laure Baumann pour son expertise en biologie moléculaire, M. Sophian Messaadi pour le traitement des données de spectrométrie de masse MALDI-ToF et Mme Laëtitia Lerat pour la production des données de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Merci pour vos conseils précieux et votre expertise durant ce travail. C'est avec disponibilité, professionnalisme et sympathie que vous m'avez aidé sur ce projet.

À toute l'équipe du laboratoire de bactériologie du CHU de Lille pour votre bonne humeur et vos conseils du quotidien qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Table des matières

Première partie : revue de la littérature **19**

I. Introduction 19
II. *Acinetobacter baumannii*, la bactérie 19
A. Microbiologie – position taxonomique 19
B. Diversité des isolats de *A. baumannii* et typage des souches 20
III. *Acinetobacter baumannii*, de l'environnement à l'infection 23
A. Colonisation et infection humaine 23
B. Facteurs de pathogénicité de *A. baumannii* 24
C. Résistances naturelles et acquises aux antibiotiques 25
IV. L'infection bactérienne du patient brûlé 31
A. Les brûlures : généralités, importance médicale et risque infectieux 31
B. *Acinetobacter baumannii* et brûlure 34

Deuxième partie : travail expérimental **35**

I. Objectifs 35
II. Matériels et méthodes 36
A. Patients, isolats clinique et culture bactérienne 36
B. Typage, approche phénotypique 38
C. Typage, approche génotypique 39
III. Résultats 41
A. Antibiotype 41
B. Typage par technique MLST 43
C. Typage par spectrométrie de masse MALDI-ToF 43
D. Typage par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier 44
E. Étude des gènes de résistance aux aminosides. 46
F. Typage par étude du *core genome* 47
G. Association entre *Acinetobacter baumannii*, brûlure et mortalité 47
V. Discussion 51
VI. Conclusion 55
VII. Références bibliographiques 57

Liste des figures :

Figure 1 : Coloration de Gram et aspect des colonies sur mileu Mueller-Hinton 19
Figure 2 : Chronologie d'apparition des différentes méthodes de typage bactérien 20
Figure 3 : Représentation eBURST des séquences types 22
Figure 4 : Mécanismes génétiques d'activation ou d'inactivation génique reliés aux séquences d'insertions 25
Figure 5: Résistance à la gentamicine médiée par la méthylase ArmA 28
Figure 6 : Chronologie de l'épidémie 36
Figure 7 : Présentations des différents phénotypes de résistances 41
Figure 8 : Phénotype de résistance isolé chez le patient 10 42
Figure 9: Évolution des profils de résistance au cours du temps 42
Figure 10 : Typage réalisé par spectrométrie de masse MALDI-ToF 44
Figure 11 : Typage par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier 45
Figure 12 : Étude génétique de la résistance aux aminosides par PCR. 46
Figure 13: Structure des isolats de Acinetobacter baumannii par l'étude du *core genome* 47
Figure 14 : Analyse des bactériémies (patients 6,16 et 17) 48
Figure 15 : Analyse des bactériémies (patient 12). 49

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Principaux enzymes inactivateurs des aminosides de A. baumannii 27
Tableau 2 : Critères de définition du sepsis 33
Tableau 3 : Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude……...……37
Tableau 4 : Amorces utilisées dans la recherche des gènes de résistances aux aminosides ... 39
Tableau 5 : Séquences types obtenues par MLST en fonction de l'antibiotype 43

Liste des abréviations :

ABSI : *Abbrevated Burn Severity Index*

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice

cgMLST : *core genome Multi Locus Sequence Typing*

IR-TF : la spectrométrie Infra-Rouge à Transformée de Fourier

MCR : *Mediated Colistin Resistance*

MLST : *Multi Locus Sequence Typing*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PGFE *: Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

PLP : Protéine Liant les Pénicillines

qSOFA : *quick Sepsis-related Organ Failure Assessment*

SRIS : Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique

ST : Séquence Type

UFC : Unité Formant Colonie

Première partie : revue de la littérature

I. Introduction

Acinetobacter baumannii est une bactérie environnementale principalement responsable d'infections opportunistes chez des patients fragilisés, notamment de pneumonies nosocomiales et de bactériémies (1). Cette espèce bactérienne présente une résistance naturelle à plusieurs antibiotiques majeurs et peut devenir rapidement multirésistante par l'acquisition d'éléments génétiques mobiles porteurs de gènes de résistance et/ou capables d'activer l'expression ou la surexpression de gènes de résistance chromosomiques (2). Les infections que ces isolats occasionnent peuvent être difficiles à prendre en charge en particulier lorsqu'ils perdent la sensibilité aux bêta-lactamines et principalement aux carbapénèmes. Les souches productrices de carbapénémase sont ainsi un problème thérapeutique majeur (3) et se trouvent sur la liste de développement prioritaire d'antibiotique de l'OMS (4). *A. baumannii* possède de plus la capacité de survivre plusieurs mois dans l'environnement ce qui lui confère un pouvoir de dissémination important en milieu hospitalier où la pression de sélection par les antibiotiques et le manuportage assurent sa persistance (5). C'est particulièrement le cas dans les unités de soins intensifs et notamment de réanimation des brûlés où la brûlure constitue un terrain favorable à la colonisation puis à l'infection par cette bactérie (perte de la barrière physique, chimique et physiologique, immunodépression, et mise en place de dispositifs invasifs) (6).

II. *Acinetobacter baumannii*, la bactérie

A. Microbiologie – position taxonomique

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont des coccobacilles à Gram négatif aérobies stricts, immobiles comme le nom l'indique. Elles appartiennent à la famille des *Moraxellaceae* au sein de la classe des gammaprotéobactéries qui comprend notamment les entérobactéries et les *Pseudomonadaceae*. Leurs principales caractéristiques biochimiques d'intérêt diagnostique sont une activité catalase, l'absence de cytochrome c oxydase et de nitrate réductase (7).

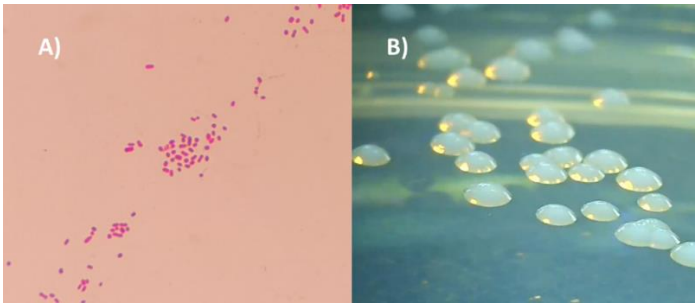

Figure 1 : Coloration de Gram (A) et aspect des colonies sur milieu Muller-Hinton (B) de A. baumannii.

Le genre *Acinetobacter* regroupe à ce jour 73 espèces validées de la *List of prokaryotic names with standing in nomenclature* (https://lpsn.dsmz.de). Parmi elles, six sont phénotypiquement similaires et génétiquement proches, regroupées au sein du groupe *calcaoceticus-baumannii*. Il s'agit de *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pitii* (anciennement *Acinetobacter sp3*) (8), *Acinetobacter nososcomialis* (anciennement *Acinetobacter sp13TU*) (8), *Acinetobacter calcaoceticus*, *Acinetobacter seifertii* (9) et *Acinetobacter dijkshoorniae/lactucae* (10,11). Leur différenciation phénotypique est délicate en pratique y compris par spectrométrie de masse MALDI-ToF ce qui peut imposer de recourir à des techniques génétiques complémentaires (*e.g.*, analyse de séquences de gènes domestiques comme *rpoB*, *recA* ou *gyrB*) (12). Au sein du groupe *calcaoceticus-baumannii*, *A. baumanni est* responsable de la quasi-totalité des infections et *A. calcaoceticus* n'est pas considéré comme pathogène (7).

B. Diversité des isolats de *A. baumannii* et typage des souches

La majorité des infections humaines sont dues à certaines sous-populations de l'espèce *A. baumannii* identifiées comme des *complexes clonaux* par les principales techniques de typage.

Le typage bactérien est un outil indispensable pour identifier les sources et les voies de propagation des bactéries au sein d'une même espèce (13). En médecine, les méthodes utilisées visent à mettre en évidence des clones infectieux, à étudier leur virulence et leur transmission afin de juguler leur dissémination.

Historiquement, des méthodes phénotypiques ont d'abord été utilisées, suppléées depuis par une grande variété de méthodes génotypiques (14) dont la chronologie est résumée dans la figure 2.

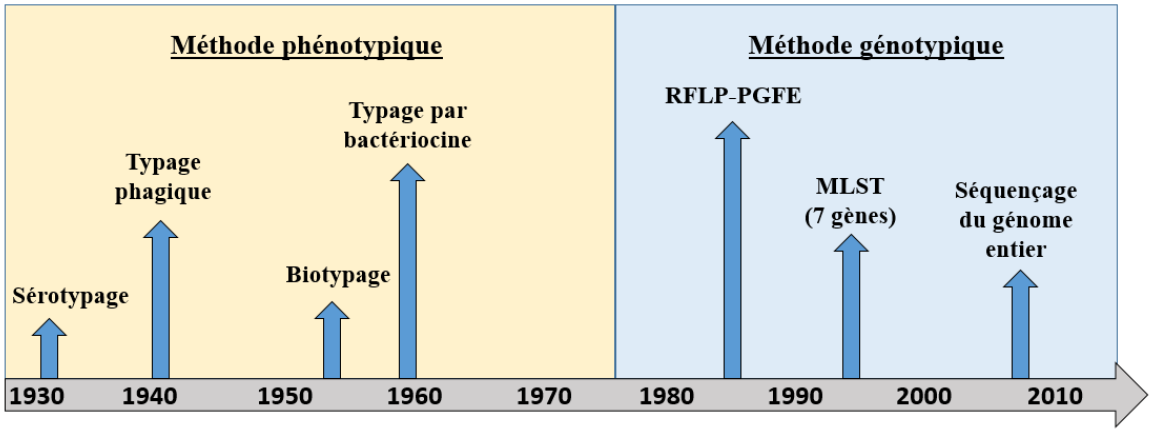

Figure 2 : Chronologie d'apparition des différentes méthodes de typage bactérien (d'après Novais et coll(14)).
Le sérotypage permet par des méthodes immunologiques de mettre en évidence des antigènes pour définir des sérovars. Le typage phagique consiste en la détermination du profil de sensibilité aux phages qui permet de différentier des clones. Le biotypage consiste à utiliser des tests biochimiques et le typage par bactériocine définit un profil de sensibilité à ces peptides.

Les techniques génotypiques applicables à *A. baumannii* ont longtemps reposées sur l'étude du polymorphisme de longueur des fragments issus du clivage de leur ADN par des endonucléases (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP), la technique de référence étant la comparaison des profils de macrorestriction obtenus après électrophorèse en champs pulsés (RFLP- PFGE [*pulsed-field gel electrophoresis*]) (15). Cet outil a été utilisé pour typer les souches et définir des pulsotypes de *A. baumannii* à partir de 1988, et trois lignées à dissémination internationale (I-III) ont ainsi été mises en évidence. Fin des années 90, une méthode simple a également été proposée en étudiant les gènes de résistance aux aminosides compte tenu de la grande variabilité de ces gènes dans les isolats cliniques (16). Au cours de la dernière décennie, grâce aux progrès du séquençage de l'ADN, cette méthode a été supplantée par des typages dits *multilocus sequence typing* (MLST), comparant des séquences de gènes indispensables à l'espèce (gènes « domestiques »). Initialement réalisée sur des concaténations de séquences de quelques gènes (7 pour le profil MLST « classique », puis 52 pour le MLST des gènes de protéines ribosomiques [r-MLST]), la méthode permet de disposer de bases de données et de schémas de typage accessibles à tous, dont le plus discriminant pour étudier la dissémination des clones de *A. baumannii* est celui de l'Institut Pasteur de Paris (17). Il permet à ce jour de distinguer 176 *sequences types* (ST) regroupés en 20 complexes clonaux dont la représentation graphique des distances génétiques est schématisée dans la figure 3 par le logiciel eBURST. Les trois principaux complexes clonaux (CC1, 2 et 3) correspondent respectivement aux lignées I, II et III initialement définies par typage RFLP-PFGE (18). Les complexes clonaux 1 et 2 prédominent en contexte médical à travers le monde. Les isolats producteurs de la carbapénémase la plus fréquente chez *A. baumannii* (OXA-23) appartiennent très majoritairement au CC2 (19). En Europe, on trouve aussi les CC3, 10, 15, 32 ainsi que les ST indépendants 25 et 52. Le ST 78 et le CC79 ont été identifiés respectivement en Italie et en Espagne (18).

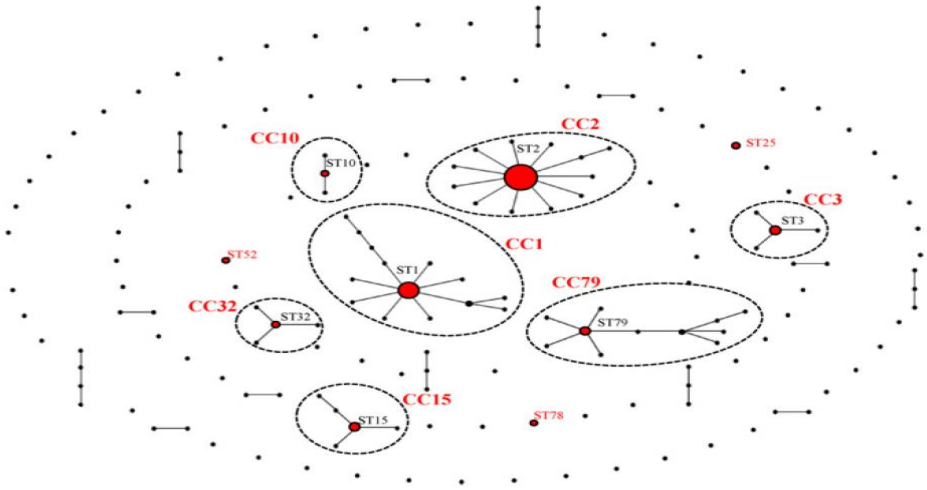

Figure 3 : Représentation eBURST des séquences types (18)). Chaque ST est représenté par un cercle. Les ST épidémiques sont représentés par un cercle rouge dont la taille est corrélée aux nombres de séquences retrouvées dans les bases de données. Les lignes entre deux ST correspondent à une variation d'un seul locus.

Par exemple, le complexe clonal (CC2) réunit le ST2 et 12 autres ST qui ne diffèrent que par une ou deux mutations au niveau d'un seul locus et sont donc génétiquement liés.

Plus récemment encore, l'avènement du séquençage de génomes entiers à coût plus accessible et l'apparition d'outils bio-informatiques performants a amélioré la précision du typage génomique qui s'appuie maintenant sur l'analyse dite cg-MLST de l'ensemble des gènes conservés à toutes les souches de l'espèce (le *core genome* [cg], constitué de plus de 2 000 gènes dans le cas de *A. baumannii*). Cette approche permet notamment de distinguer différents isolats au sein des ST précédemment définis (20).

Cependant, le temps d'analyse et le coût élevé de cette approche n'en font pas encore un outil de terrain pour l'analyse rapide des épisodes épidémiques dans le contexte hospitalier. Pour cette raison, il existe un intérêt croissant pour des méthodes de typage phénotypique innovantes, rapides et (relativement) peu onéreuses. Deux d'entre elles semblent prometteuses et accessibles à la microbiologie médicale de routine : la spectrométrie de masse MALDI-ToF et la spectrométrie infra-rouge par transformée de Fourier (IR-TF) (14), que nous avons utilisées dans la partie expérimentale de ce travail. Ces techniques reposent respectivement sur l'étude du spectre de masse des protéines totales et sur l'étude de la composition osidique de la paroi des bactéries. Le typage par IR-TF est une technique déjà ancienne qui connait un développement nouveau avec la mise sur le marché de l'automate IR-biotyper (Bruker) et de son système de traitement informatique des données spectrales. Ce dispositif a fait ses preuves pour typer rapidement des isolats de plusieurs espèces de bacilles à Gram négatif d'intérêt médical, mais semble jusqu'à présent fournir des résultats inconstants dans le cas de *A. baumanni* (21).

III. *Acinetobacter baumannii*, de l'environnement à l'infection

A. baumannii est une espèce principalement retrouvée en milieu hospitalier, plus rarement dans des échantillons telluriques, le plus souvent contaminés par des effluents hospitaliers (22). Néanmoins, une étude a démontré un portage par les chats et chiens domestiques atteignant 8,5 % des animaux étudiés dans l'île de la Réunion (23). Ce portage semble exister aussi chez l'homme au niveau cutané et est évalué entre 0,5 et 3 % de la population (7).

A. Colonisation et infection humaine

A. baumannii est une bactérie peu virulente responsable d'environ 2 % de l'ensemble des infections (24). Ces infections principalement opportunistes surviennent chez des patients fragilisés et/ou immunodéprimés dans les unités de soins intensif. Bactériémies et pneumonies nosocomiales sont les principales présentations, qui résultent du pouvoir de colonisation de la bactérie lors des soins invasifs, cathétérisme et ventilation mécanique principalement (7).

Les bactériémies sont le plus souvent secondaires à la colonisation des cathéters centraux ou à une pneumonie nosocomiale (25). La mortalité des bactériémies à *A. baumannii* est particulièrement élevée, comprise entre 34 % et 43,4 % dans les unités de soins intensifs et de 16,3 % dans les autres services hospitaliers, plaçant ce micro-organisme au 3e rang en termes de mortalité derrière *Candida spp* et *Pseudomonas aeruginosa* (7).

Les pneumonies sont étroitement liées à la ventilation mécanique bien que des pneumonies communautaires sévères aient été rapportées chez des patients présentant des comorbidités importantes (diabète, cancer, alcoolisme et tabagisme) dans des zones chaudes et humides comme l'Océanie ou l'île de la Réunion (23,25). Plus récemment, des surinfections pulmonaires ont été rapportées chez des patients atteints par la Covid-19 dans les unités de soin intensif (26). C'est néanmoins l'intubation qui est le principal facteur facilitant la contamination à partir de l'environnement immédiat des patients. La capacité de *A. baumannii* à produire un biofilm induit ensuite la persistance bactérienne. Il reste cependant difficile de différencier à quel moment la colonisation se transforme en véritable pneumonie (25).

Une 3e présentation clinique liée à la médecine de guerre et de cataclysmes a fait l'objet de multiples observations. Il s'agit d'**infections ou de surinfections de plaies et parties molles**, fréquentes chez les vétérans nord-américains blessés au Moyen-Orient ou en Afghanistan, et dans des populations touchées lors de tremblements de terre ou inondations (27–29). Des infections urinaires, méningites, endocardites, ostéomyélites ou endophtalmies sont plus rarement rapportées (25). Enfin, *A. baumannii* est aussi rencontré en médecine vétérinaire. Comme en médecine humaine, la plupart des infections sont nosocomiales et ont été rapportées

chez diverses espèces (*e.g* pyodermite canine, la fasiiste nécrosante féline, pneumonies chez le vison…) (30).

B. Facteurs de pathogénicité de *A. baumannii*

On ne connaît pas à *A. baumannii* de déterminants de virulence tels qu'une toxine sécrétée ou un facteur spécifique d'échappement immunitaire. De plus, il ne semble pas exister de différence notable de pathogénicité entre les isolats des complexes clonaux épidémiques (en dehors de leur diffusibilité) et les souches sporadiques. L'espèce est surtout caractérisée par sa capacité à persister dans des conditions défavorables à la survie des bactéries à Gram négatif, dans l'environnement des patients, puis dans leur organisme en réponse aux antibiotiques qu'ils reçoivent. La plasticité de son génome et la capacité rapide à muter lorsqu'il est confronté à un stress sont les éléments principaux expliquant son émergence (31).

Quatre principales caractéristiques concourent à cette persistance : résistance à la dessiccation, au stress oxydatif, production de biofilm, et résistance aux antibiotiques. *A. baumannii* est capable de rester viable plus de 100 jours sur des surfaces inertes, en partie grâce à la structure de sa membrane externe et à la présence d'une capsule polysaccharidique. De plus, lors de la reviviscence, la réhydratation qui induit un stress oxydatif dommageable à l'ADN est neutralisé par une augmentation de l'activité catalase/peroxydase grâce à une régulation génétique originale : il a en effet été montré que l'introduction d'un promoteur fort apporté par une copie de la séquence d'insertion IS_{Aba1} en amont du gène *katG* induit une expression 20 fois plus importante de la catalase la plus active de la bactérie, et ainsi une résistance efficace aux dommages du stress oxydatif (32).

L'organisation des bactéries en biofilm qui permet leur survie sur des surfaces biotiques (téguments lésés ou altérés par les soins par exemple) ou abiotiques (matériel médicaux invasifs notamment) contribue de façon significative à la moindre efficacité des antibiotiques et antiseptiques (33).

C. Résistances naturelles et acquises aux antibiotiques

1. Support génétique et évolution de l'antibiorésistance chez A. baumannii

À l'instar d'autres bactéries opportunistes nosocomiales comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ou *Burkholderia cepacia*, *A. baumannii* est naturellement résistant à la majorité des molécules de la principale famille d'antibiotiques utilisés en médecine, les bêta-lactamines. Si les isolats sauvages de *A. baumannii* sont naturellement sensibles aux carbapénèmes (sauf l'ertapénème), aux aminosides, aux fluoroquinolones et aux polymyxines, les dernières décennies les ont vus rapidement décliner chez les patients infectés au profit de souches multirésistantes, sans doute sélectionnées grâce à la formidable capacité d'adaptation de cette espèce face à la pression de sélection des antibiotiques (34). Deux catégories de mécanismes sont impliquées dans cette évolution. Il s'agit (i) de la dérégulation de déterminants de résistance (enzymatiques, d'efflux ou d'imperméabilité) préexistants dans les souches sauvages, mais peu ou pas exprimés, (ii) de l'acquisition de gènes étrangers (34). Chez *A. baumannii* les séquences d'insertion et principalement IS_{Aba1} semblent avoir un rôle prépondérant dans l'émergence de la multirésistance des souches contemporaines. Les séquences d'insertion (IS) sont des éléments génétiques mobiles de petite taille (< 2 500 paires de base) constitués de deux séquences inversées répétées encadrant le gène d'une transposase, enzyme qui permet la mobilité de l'IS à l'intérieur d'une même molécule d'ADN ou entre deux molécules d'ADN distinctes. Lors de leurs déplacements, les séquences d'insertion peuvent inactiver un gène en s'insérant dans ce dernier ou dans son promoteur. Elles peuvent également augmenter l'expression d'un gène en constituant un promoteur alternatif (35) ou par inactivation de son éventuel répresseur (36).

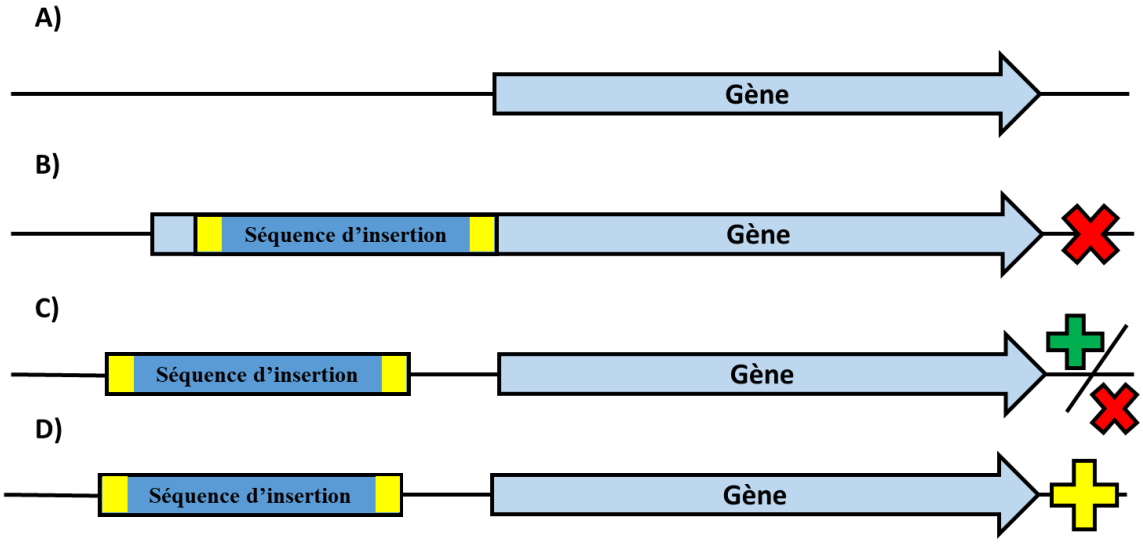

Figure 4 : Mécanismes génétiques d'activation ou d'inactivation génique reliés aux séquences d'insertions. (A) Expression normal d'un gène. (B) Inactivation génique engendrée par l'interruption de la séquence codante. (C) Inactivation génique par interruption du promoteur ou activation génique par interruption du répresseur. (D) Sélection d'un promoteur alternatif. D'après Vandecraen et coll (36).

Enfin, les IS peuvent flanquer un gène, constituant ainsi un transposon composite, capable de s'insérer et de se déplacer dans le génome bactérien. C'est ce qui se produit par exemple dans le transposon Tn*2006* formé de 2 IS_{Aba1} encadrant le gène bla_{OXA-23} de la principale carbapénémase des isolats multirésistants de *A. baumannii* (37).

2. Résistance aux bêta-lactamines

A. baumannii produit une bêta-lactamase chromosomique non inductible de classe C (ADC pour *Acinetobacter-derived cephalosporinase*) qui confère une résistance naturelle de haut niveau non inhibée par l'acide clavulanique à toutes les céphalosporines à l'exception de la ceftazidime et du céfépime peu inactivés et de niveau moindre aux amino- et uréïdopénicillines, ainsi qu'à l'aztréonam.

L'hyperproduction de ADC observée dans la plupart des souches multirésistantes est due à l'insertion de IS_{Aba1} qui augmente la force du promoteur du gène bla_{ADC} et induit ainsi sa surexpression. La ceftazidime est alors inactivée, mais ni le céfépime ni les carbapénèmes ne sont habituellement affectés. Cependant, il existe de multiples variants possibles de cette céphalosporinase (ex. ADC-33 ou -56) qui confèrent un haut niveau de résistance au céfépime (38,39).

Le génome des souches sauvages de *A. baumannii* possède également un gène de bêta-lactamase de classe D, l'oxacillinase OXA-51 peu ou pas exprimé, mais qui peut conférer une résistance de haut niveau aux ureidopénicillines, carboxypénicillines et aux carbapénèmes lorsqu'un promoteur fort est formé par insertion de IS_{Aba1} (40).

Le niveau de résistance aux bêta-lactamines peut également augmenter par surexpression d'un efflux actif naturel de la bactérie, comme celui qui met en jeu les pompes AdeABC, AdeFGH et AdeIJK de la famille RND (*resistance nodulation division*). Cette surexpression peut survenir par mutation ponctuelle d'un ou plusieurs gènes du système, ou par modification de promoteur par insertion de IS_{Aba1} (41).

La résistance aux bêta-lactamines peut également survenir par l'acquisition de gènes apportés par des éléments génétiques mobiles. C'est le cas pour les céphalosporines avec l'acquisition de diverses bêta-lactamases à spectre étendu comme VEB-1, PER-1, PER-2, SHV-12, TEM-92, TEM- 116, CTX-M-2 ou CTX-M-43 (41). En ce qui concerne l'imipénème et le méropénème, différentes carbapénémases peuvent être acquises par *A. baumannii.* Les deux principales sont l'oxacillinase OXA-23 (bêta-lactamase de classe D) et la métallo-bêta-lactamase NDM-1 (classe B). D'autres carbapénémases de classe D (OXA-40, -58, -143, -

235) (42) et de rares bêta-lactamases de classe A, KPC et GES (inactivées par l'acide clavulanique) sont plus occasionnellement retrouvées (41).

OXA-23 est largement prédominante (> 90 %) dans les isolats résistants aux carbapénèmes (43) en particulier ceux du complexe clonal 2 de dissémination mondiale (42). De plus, le niveau de résistance qu'elle confère est parfois majoré par des mécanismes d'imperméabilité surajoutés comme la perte de la porine Omp29 (44). La source de cette bêta-lactamase pourrait être, *Acinetobacter radioresistens*, une espèce voisine chez laquelle *bla*$_{\text{OXA-23}}$ semble exister à l'état naturel (45).

3. Résistance aux aminosides

A. baumannii est une naturellement sensible aux aminosides. L'acquisition de résistances est cependant fréquente, trois mécanismes pouvant y concourir : modification enzymatique, efflux et modification de la cible ribosomique.

Plusieurs **enzymes modificateurs** (acétyl-, phospho- et nucléotidyltransférases) peuvent être acquis, qui inactivent sélectivement les molécules d'intérêt thérapeutique, gentamicine, tobramycine et amikacine (tableau 1). Une étude a montré que 94 % des isolats d'importance clinique avaient acquis au moins un de ces enzymes (46), leur production simultanée aboutit à des phénotypes variés. Ainsi, une autre étude a montré que 84 % des isolats cliniques analysés possédaient de 2 à 5 gènes de résistance, pour 12 combinaisons phénotypiques possibles (47).

Tableau 1 : Principaux enzymes inactivateurs des aminosides de A. baumannii et phénotypes de résistance qui en résultent

Enzyme*	Aminoside d'intérêt thérapeutique		
	Amikacine	Gentamicine	Tobramycine
ANT(2')-Ia	sensible	**résistant**	**résistant**
APH(3′)-VIa	**résistant**	sensible	sensible
AAC(3)-Ia	sensible	**résistant**	Sensible
AAC(6')-Ib	**résistant**	sensible	**Résistant**
AAC(3)-IIa	sensible	**résistant**	**Résistant**

*ANT, *aminoglycoside nucleotidyltransferase*
APH, *aminoglycoside phosphotransferase*
AAC, *aminoglycoside acetyltransferase*

L'efflux actif qui entraîne une résistance de haut niveau aux aminosides est principalement dû à la surexpression de la pompe excrétrice AdeABC par apparition d'un promoteur fort induit par IS_{Aba1} (41).

Les modifications de la cible ribosomique des aminosides sont aujourd'hui fréquentes chez *A. baumannii*. Elles sont de deux types : mutations des protéines ribosomiques et/ou de l'ARNr, et méthylation post-transcriptionnelle de l'ARNr. Parmi les 16 méthylases de l'ARNr décrites chez les bactéries à Gram négatif (48), ArmA est prédominante chez *A. baumannii,* souvent associée à la production de OXA-23 au sein du complexe clonal 2 (49), bien que l'enzyme RmtA ait aussi été retrouvée occasionnellement (50). ArmA confère une résistance de haut niveau à la gentamicine, à la tobramycine et à l'amikacine (48), d'aspect hétérogène à l'antibiogramme, la croissance bactérienne étant perturbée par la méthylation du ribosome (51).

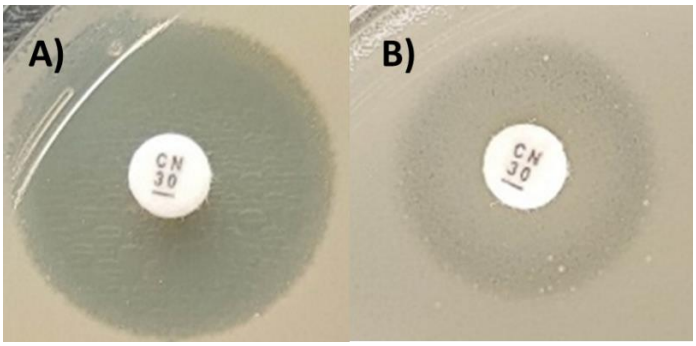

Figure 5: Résistance à la gentamicine médiée par la méthylase ArmA. A) Souche sensible à la gentamicine. B) Souche résistante.

4. Résistance aux fluoroquinolones

Le mécanisme principal est la mutation de la région QRDR (*quinolone-resistance determining region*) des gènes des topoisomérases *gyrA* et *parC* qui encodent respectivement les sous-unité A de l'ADN gyrase et de la topoisomérase de type IV (52), cibles des quinolones. De nombreux isolats cliniques du complexe clonal 2 producteurs de OXA-23 et ArmA sont aussi résistants aux fluoroquinolones par mutation des régions QRDR (53)

La résistance aux fluoroquinolones peut être également causée par la surexpression de l'efflux des pompes AdeABC et AdeM. Plus rarement, l'acquisition du gène plasmidique *qnr* encode une protéine aux motifs pentapeptidiques répétés qui protège les topoisomérases de l'action de ces antibiotiques (54).

5. Résistance aux polymyxines

En dépit de sa toxicité rénale et neurologique, la colistine est utilisée, lorsqu'elle est active in vitro, dans le traitement des infections à *A. baumannii* résistant aux carbapénèmes, aminosides et quinolones. Disponible en aérosol, elle est utilisée en nébulisation dans la prise en charge des pneumonies, avec une moindre toxicité (25). Le traitement des bactériémies associe souvent la colistine à un autre antibiotique comme les carbapénèmes sur la base de données *in vitro*, en dépit de l'inactivité de ces derniers (55). *In vivo*, il apparaît que ces associations n'améliorent pas de manière significative la réponse clinique par rapport aux monothérapies (56,57). Cependant, l'association surprenante de colistine et de vancomycine ou teicoplanine (pourtant sans activité sur *Acinetobacter*) aurait montré une efficacité *in vivo* et une moindre mortalité des patients traités, sans majoration de la toxicité rénale (58).

A. baumannii peut perdre sa sensibilité à la colistine par modification ou disparition du lipide A, constituant essentiel du lipopolysaccharide et cible d'attachement des polymyxines à la bactérie. Deux mécanismes principaux ont été décrits, (i) l'inactivation par insertion de IS_{Aba1} des gènes *lpxA et lpxC* de synthèse du lipideA (59), (ii) l'acquisition ou la surproduction d'enzymes qui modifient le lipide A, le rendant moins réceptif à la colistine. Dans ce cas, la dérégulation est due à des mutations du système à deux composants PrmA/PmrB qui favorisent l'adjonction de phosphoéthanolamine au lipide A (60), ou à l'acquisition d'un gène plasmidique Mcr (*mobilized colistin resistance*) encodant une phosphoéthanolamine-transférase exogène. La résistance plasmidique lié aux gènes *Mcr* semblait être restreinte aux *Enterobactérales* (60). Toutefois, en 2019 la première souche porteuse de *Mcr1* a été décrite au Pakistan (61). Puis, une étude rétrospective portant sur des souches isolées en Iraq entre 2016 et 2018 à mise en évidence une proportion très élevée des gènes *Mcr1*, *Mcr2* et *Mcr3* au sein d'isolats résistants à la colistine (62).

6. Résistance aux antibiotiques alternatifs actifs *in vitro*

Lorsque les bêta-lactamines classiques, les aminosides, les fluoroquinolones, voire les polymyxines, sont inactifs, le traitement des infections peut éventuellement s'appuyer sur quelques rares molécules encore actives, comme des cyclines, le sulbactam ou le céfidérocol.

La minocycline est la tétracycline la plus active *in vitro*, et 70 % souches y demeurent sensibles, avec une CMI $\leq$ 4 µg/ml (63). *In vivo*, lorsqu'elle est administrée par voie intraveineuse, cette molécule semble avoir une activité intéressante (64). Néanmoins, des

mutants résistant existent par protection de la cible ribosomique via l'acquisition du gène de la protéine Tet(B), ou par efflux actif *via* la pompe AdeABC (65). Une glycylcycline, **la tigécycline**, peut en théorie, être utilisée sur les isolats avec des CMI ≤ 2 µg/ml. Son activité clinique est toutefois sujette à caution, certaines études rétrospectives ayant montré que son utilisation était associée à une augmentation de la durée d'hospitalisation, voire de la mortalité, et une diminution de l'éradication bactérienne (66). Plus récemment, une fluorocycline, **l'éravacycline**, pourrait présenter un intérêt dans le traitement des infections (67), bien que des résistances aient déjà été identifiées chez *A. baumanni*, par surexpression de la pompe d'efflux AdeABC ou par acquisition de la protéine Tet(X5), empêchant l'accès au ribosome de cet antibiotique (68,69).

Le sulbactam est une bêta-lactamine inhibitrice des bêta-lactamases de classe A, mais qui possède une activité antibiotique contre *A. baumannii* dont il inhibe les transpeptidases PLP1 et PLP3 (70). La sensibilité des isolats cliniques au sulbactam est de 30 % à 47 % (63), la résistance survenant par mutation des PLP3 (70). Enfin, **le céfidérocol**, céphalosporine couplée à un sidérophore peut être active *in vitro* (67). Là encore, des mutants résistants ont déjà été identifiés par diminution de l'expression du gène *pirA* qui encode le récepteur membranaire du sidérophore, ou par mutation de la PLP3 (71).

Devant l'inefficacité croissante de tous les antibiotiques, d'autres options thérapeutiques sont à l'étude, et pourraient constituer de nouvelles stratégies anti-infectieuses. Ainsi, la phagothérapie (utilisation de phages ou de protéines phagiques spécifiques de *A. baumannii*), l'administration d'anticorps monoclonaux, de bactériocines, de peptides antimicrobiens ou, voire même de bactéries prédatrices de *A. baumannii* sont des pistes éventuelles pour remédier à ce problème (72), ainsi que le développement de vaccins (73). En tout cas, des approches combinées seront sans doute indispensables. Ainsi, des essais récents de phagothérapie ont malheureusement montré l'apparition de clones résistants aux phages, mais dont la sensibilité était étonnamment restaurée aux bêta-lactamines (74)

IV. L'infection bactérienne du patient brûlé

A. Les brûlures : généralités, importance médicale et risque infectieux

La peau est un organe complexe qui constitue une des premières barrières contre les agressions extérieures. Elle assure une protection mécanique, chimique, microbiologique et immunitaire aux infections. La flore commensale cutanée est un écosystème microbien complexe qui empêche l'installation de micro-organismes pathogènes, bien que certains y soient parfois représentées comme *Staphylococcus aureus*. La peau est une barrière chimique imposant un stress acide et osmotique aux micro-organismes. Les jonctions serrées entre les cellules épithéliales sont une barrière physique, mais également immunitaire en permettant la sécrétion de cytokines, de peptides antimicrobiens et de cellules présentatrices d'antigènes (75).

La brûlure entraine la destruction de cet organe, de ses fonctions ainsi qu'une partie de sa flore commensale. Les bactéries des couches les plus supérieures sont détruites alors que les bactéries situées dans les couches inférieures sont en partie préservées. Toutefois on considère la brûlure comme stérile dans les premières 48 heures. Rapidement la plaie est colonisée par les bactéries commensales cutanées puis, par les bactéries de la flore digestive, oro-pharyngée, environnementales et parfois par des levures ou des moisissures (76). Les micro-organismes colonisateurs se placent de manière préférentielle entre la zone de brûlure et la zone saine où ils trouvent un environnement propice à leurs développement (humidité, nutriments, chaleur, faible immunité) (76).

Importance médicale. Chaque année, environ 8 000 personnes sont hospitalisées en France métropolitaine à la suite d'une brûlure, soit une incidence de 12,3 pour 100 000 habitants. L'âge moyen est d'environ 30 ans avec une prédominance masculine et une incidence élevée chez les enfants de moins de 5 ans. Parmi ces brûlures, la grande majorité (93,7%) sont accidentelles. Plus rarement, les brûlures résultent de tentatives d'autolyse (4,9%) ou d'une agression par un tiers (1,4%). Les deux causes principales de brûlure sont le contact de liquides chauds (50,8%) et les flammes ou le feu (27,1%). Les brûlures sont définies comme graves (i) lorsqu'elles couvrent au moins 20 % de la surface du corps chez l'enfant de moins de 5 ans ou 30 % de la surface du corps après 5 ans, (ii) en cas d'atteinte des voies respiratoires. La gravité doit impérativement être établie dans un centre de traitement des brulés, qui prennent en charge à l'heure actuelle 40 % des patients, dont les 9,4 % (309 en 2014) sont catégorisés comme graves. En pratique, des scores pronostiques comme celui de « Abbreviated Burn Severity Index » (ABSI) sont utilisés. Ce score permet d'évaluer les chances de survie en fonction de divers paramètres, notamment l'âge du patient, le pourcentage de brûlure et le degré de brûlure (77).

La brûlure de premier degré est caractérisée par une atteinte restreinte de l'épiderme. Le deuxième degré correspond à une atteinte partielle du derme et le troisième degré à une atteinte totale. Le quatrième degré correspond à une brûlure qui s'étend au tissu graisseux sous-jacent voir aux muscles ou aux os (78). La présence de brûlure de troisième ou quatrième degrés est un marqueur de gravité. Au total, 190 patients décèdent à la suite de leurs brûlures et 50 % de ces décès surviennent en milieu hospitalier pour un taux de létalité global de 2,3% (79).

Colonisation microbienne et risque infectieux. La colonisation est définie par la présence d'une quantité de bactéries présentes sur la surface de la brûlure inférieure à 10^5 UFC par gramme de tissus. L'examen clinique doit également témoigner de l'absence d'érythème ou de cellulite. L'infection se définit biologiquement par une concentration bactérienne supérieure ou égale à 10^5 UFC par gramme de tissu à la surface de la brûlure. Cependant ce paramètre doit être interprété en corrélation étroite avec l'examen clinique où l'infection est reliée à la mise en évidence d'un érythème, d'une cellulite, d'une augmentation de la chaleur, de la douleur, d'un gonflement ou d'une induration (80).

L'infection chez les patients brûlés est la cause 51% des décès (80). Ce taux conséquent est comparable aux patients âgés de réanimation (81). L'infection de la brûlure préalablement définit s'additionne généralement de signes de sepsis. La détersion des tissus infectés est réalisée en urgence et des gestes locaux sont, en général, associés à un traitement antibiotique après prélèvement microbiologique. Le sepsis est défini par la dysfonction d'un organe engendrée par une réponse immune non adaptée liée à une infection. La mortalité associée au sepsis est proche de 10 %. Le choc septique doit être défini comme un sous-ensemble de sepsis dans lequel les atteintes circulatoires, cellulaires et métaboliques sont plus profondes et sont corrélées à une plus forte mortalité (82).

Le diagnostic du sepsis s'appuyait auparavant sur la présence d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS). Le SRIS est défini par la présence d'au moins deux critères parmi : une hypothermie < 36°C ou une hyperthermie > 38°C, une fréquence cardiaque > 90 battements par minute, une fréquence respiratoire > 32 (ou PaCO2 < 32mmHg), une leucopénie < 4G/l ou une hyperleucocytose > 12G/l ou la présence d'une myélémie supérieure ou égale à 10 %. Cependant, cette définition est remise en cause car de nombreux patients ont des SRIS de par leurs pathologies comme c'est le cas des patients souffrant de brûlures étendues. Ces critères sont à écarter pour ces patients à l'exception de ceux souffrant de brûlures de faible étendues (82). La définition du troisième consensus international sur les définitions du sepsis et du choc septique ou sepsis 3 est la plus adaptée à ce terrain (tableau 3) (83).

Tableau 2 : Critères de définition du sepsis selon le troisième consensus international ou sepsis 3 (82)

Critère de définition du sepsis (sepsis 3)		Interprétation
Quick SOFA* >2	Fréquence respiratoire > 22/minute Altération de la vigilance (score de Glasgow < 15) Pression artériel systolique ≤ 100 mm Hg	Sepsis
Associé à :	Hypotension traitée par vasopresseur et lactatémie > 2mmol/l	Choc septique

** quick Sepsis-related Organ Failure Assessment*

D'autres critères comme l'hyperthermie et la tachycardie progressive peuvent faire évoquer un signe précoce de sepsis. Chez un patient brûlé, la présence d'au moins deux critères doit faire évoquer les signes précoces de sepsis (83). En cas de perturbation de ces paramètres, il faut réaliser des prélèvements microbiologiques et considérer que toute évolution anormale d'une brûlure est d'origine infectieuse jusqu'à preuve du contraire (6).

La prise en charge de l'infection chez le grand brûlé repose dans un premier temps sur l'excision précoce des tissus nécrotiques lorsqu'elle est possible, sous une antibiothérapie probabiliste chirurgicale classique, ne ciblant pas *a priori* dans un premier temps des bactéries multirésistantes (6). En revanche, lorsque l'infection survient après la première semaine d'hospitalisation, le risque qu'elle soit due à une bactérie multirésistante doit être pris en compte. Les principaux pathogènes sont alors *S. aureus* (y compris les isolats résistants à la méticilline) ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* et une association de vancomycine et ceftazidime peut par exemple être proposée, qui devra être adaptée en fonction des résultats bactériologiques jusqu'à l'arrêt du traitement (6).

L'antibiothérapie chez le grand brûlé est compliquée par une modification profonde de la pharmacocinétique des antibiotiques. On observe une diminution de la concentration maximale atteinte (C_{max}) due à l'œdème associé à la brûlure qui augmente le volume de distribution du médicament. Cette diminution réduit l'efficacité des antibiotiques dits concentration-dépendants. Les œdèmes induisent également une hypovolémie vasculaire qui entraîne une mauvaise diffusion périphérique des antimicrobiens. Il est par conséquent nécessaire d'augmenter les doses pour les antibiotiques concentration-dépendants et d'augmenter la fréquence d'administration des antibiotiques temps-dépendants. La perfusion continue associée à des dosages fréquents permet de s'affranchir des risques de sous-dosage liés à ces perturbations (6,84).

La prise en charge non médicamenteuse de la brûlure par les soins locaux (topiques et pansements) et la chirurgie joue un rôle essentiel dans la prise en charge et la prévention des infections. Enfin, la greffe de peau ou de substituts cutanés est essentielle pour permettre la restauration d'un épiderme protecteur et prévenir l'infection (85).

B. *Acinetobacter baumannii* et brûlure

Depuis plus de 30 ans, *A. baumannii* est avec *P. aeruginosa* un pathogène prédominant des réanimations des centres de traitement des brûlés (85). Dans ces services où plus d'un tiers des décès ont une cause infectieuse, il a été rapporté que 86 % des infections mortelles étaient dues à des bactéries multirésistantes dont les plus fréquentes étaient *P. aeruginosa* (64 % des cas) et *A. baumannii* (27 % des cas) (86). *A. baumannii* est par ailleurs la bactérie la plus souvent isolée des hémocultures précédant immédiatement le décès des patients brûlés (87).

En période épidémique, **les infections** à *Acinetobacter baumannii* multirésistants ont ainsi été associées à une durée d'hospitalisation plus longue, et une augmentation de la mortalité (88). Et, les **colonisations** ont été associées à une reprise de greffe plus importante, des temps d'hospitalisation plus long et un usage majoré d'antibiotiques (89), un tiers à 98 % des isolats étant résistants aux carbapénèmes (90)

Cependant, l'analyse approfondie des données incite à relativiser le pouvoir pathogène et la létalité de *A. baumannii* chez les grands brûlés. Tout d'abord, il est parfois difficile de distinguer une infection d'une colonisation à *A. baumannii* (25). Ensuite, les patients qui contractent des infections à *A. baumannii* sont en général les plus gravement brûlés (88), caractéristique qui à elle seule est associée à un mauvais pronostic et une plus forte mortalité. Ainsi, une étude a mis en évidence que l'infection par *A. baumannii* n'est pas un facteur indépendant de mortalité, à la différence du score de gravité (91). Une autre analyse rétrospective a mis en évidence que la surface brûlée et la présence de comorbidités prédisposaient aux infections à *A. baumannii*. Dans ce travail, l'isolement de *A. baumannii* était associé à une surmortalité en analyse univariée, mais pas en analyse multivariée (92).

Deuxième partie : travail expérimental

Diffusion épidémique et persistance de *Acinetobacter baumannii* en réanimation au centre de traitement des brûlés du CHU de Lille : intérêt des méthodes récentes de typage

I. Objectifs

En septembre 2017, une patiente gravement brûlée et hospitalisée au Maroc fût transférée au centre de traitement de brûlés du CHU de Lille. À la différence d'autres structures du même type, l'unité de réanimation de 5 lits de ce service était à l'époque indemne de *A. baumannii* multirésistant depuis plus de 3 ans. En dépit des précautions prises dès l'admission et maintenues après que la patiente ait été détectée porteuse d'un isolat de *A. baumannii* OXA-23 à son arrivée, 15 autres patients sur une période de 3 ans ont été colonisés et éventuellement infectés par des isolats multirésistants porteurs d'une carbapénémase de type OXA-23.

L'objectif principal de notre travail a été le typage de tous les isolats recueillis et conservés pendant cette épidémie, avec les outils épidémiologiques conventionnels disponibles au laboratoire de Bactériologie du CHU. Au cours de l'analyse, la mise à disposition d'une technique innovante d'analyse spectroscopique infra-rouge nous a permis de comparer celle-ci aux approches phénotypiques et génotypiques initialement mises en œuvre.

L'hypothèse d'une diffusion clonale ayant été vérifiée, nous avons secondairement étudié (i) les différences de sensibilité aux aminosides des isolats épidémiques, (ii) l'incidence clinique de l'infection et/ou de la colonisation chez les différents patients.

II. Matériels et méthodes

A. Patients, isolats cliniques et culture bactérienne

L'épidémie a impliqué 16 patients du service de réanimation des brûlés du CHRU de Lille. Au total, 22 isolats cliniques ont été inclus entre septembre 2017 et décembre 2019. Parmi ces isolats, 20 étaient porteurs d'une carbapénémase de type Oxa-23. Deux isolats correspondant à des souches multisensibles isolées dans le service de réanimation des brûlés (patients 18 et 19) ont été inclus pour assurer une hétérogénéité dans les méthodes de typages. Plusieurs souches ont été incluses pour certains patients, car leurs phénotypes de résistance fluctuaient au cours du temps concernant les aminosides. Les souches des patients 4 et 5 n'ont pas été conservées et n'ont donc pas pu être incluses dans ce travail. Des prélèvements de surface ont permis de mettre en évidence qu'un coussin utilisé pour surélever des membres lors des soins a été le vecteur de transmission entre le patient 10 et le patient 12. Chez 4 de ces patients, des bactériémies isolées ou intercurrentes sont survenues durant une période allant de quelques jours à plusieurs mois. La chronologie de l'épidémie est relatée dans la figure 6.

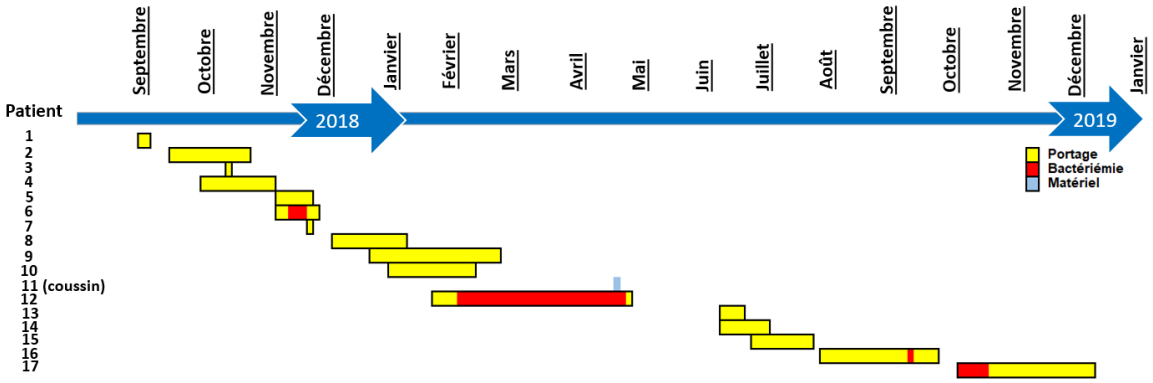

Figure 6 : Chronologie de l'épidémie

Les souches ont été isolées à partir de prélèvements cliniques (écouvillonnage rectal, aspiration trachéale, hémoculture et biopsie cutanée), mais également de prélèvements de surface réalisés par le service d'hygiène (coussin). Ces souches ont été conservées à moins 80°C en bouillon glycérolé puis cultivées sur des milieux usuels durant 18/36h à 37°C.

Les données démographiques et cliniques ont été collectées rétrospectivement à partir des logiciels sillage et ICCA « *IntelliSpace Critical Care and Anesthesia* » et sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 3 : Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude.

Le pourcentage de brûlure, le score de « Abbrevated Burn Severity Index » (ABSI), et la présence de brûlure de stade 3 ont été utilisés pour qualifier l'importance de la brûlure. Le qSOFA, le traitement par noradrénaline, et la lactatémie ont été utilisés pour évaluer la gravité à l'admission.

N°	Sexe/Âge	Circonstance	Brûlure corporelle (en %)	ABSI (% de mortalité)	Brûlure de stade 3	Quick SOFA 2	Traitement par Noradrénaline	Lactatémie (≥ 2mM)	Prélèvement positif à *A. baumannii*	Nombre de flacons d'hémoculture positifs*	Lyse de greffe	Mortalité	Temps de survenue du décès (jours)	Cause
1	F/52	Thermique	67	12 (=>90)	Présence	2	0	0	Aspiration trachéale et écouvillonage rectal	/	Absence	Décédé	10	Choc septique à *E. coli*
2	M/15	Électrique	50	6 (10-20)	Absence	1	1	1	Biopsie cutanée, écouvillonage rectal, cathéther et ECBU	/	Absence	Survie	NC	NC
3	M/25	Thermique	35	6 (10-20)	Absence	0	0	0	Écouvillonage rectal	/	Absence	Survie	NC	NC
4	F/72	thermique	21	8 (30-50)	Présence	0	0	NR	Écouvillonage rectal, cathéter et ECBU	/	Absence	Survie	NC	NC
5	M/64	Thermique	8	5 (2)	Présence	1	1	0	Écouvillonage rectale, biopsie cutanée et aspiration trachéale	/	Absence	Survie	NC	NC
6	M/19	Thermique	40	6 (10-20)	Présence	2	0	1	Écouvillonage rectal, biopsie cutanée, cathéter, ECBU et hémoculture	6	Absence	Survie	NC	NC
7	F/38	Thermique	60	11 (60-80)	Présence	3	1	1	Biopsie cutanée	/	Absence	Décédé	11	Arrêt cardiaque
8	F/50	Thermique	2	7 (10-20)	Présence	0	0	NR	Écouvillonage rectale et biopsie cutanée	/	Absence	Survie	NC	NC
9	F/83	Thermique	17	9 (30-50)	Présence	1	0	NR	Écouvillonage rectal	/	Absence	Survie	NC	NC
10	F/69	Thermique	15	7 (10-20)	NR	1	0	1	Ecouvillonage rectal, cathéter et ECBU	/	Absence	Survie	NC	NC
12	M/33	Thermique	70	10 (60-80)	Présence	1	1	1	Écouvillonage rectal, biopsie cutanée, ECBU, aspiration trachéale et hémoculture	23 (13 flacons de mycologie)	Absence	Survie	NC	NC
13	M/40	Thermique	10	3 (1)	Absence	1	0	NR	Écouvillonage rectal	/	Absence	Survie	NC	NC
14	M/68	Thermique et chimique	20	6 (10-20)	Absence	1	0	NR	Écouvillonage rectal, expectoration et biopsie cutanée	/	Présence	Survie	NC	NC
15	M/27	Électrique	30	6 (10-20)	Présence	0	0	NR	Écouvillonage rectal, expectoration et biopsie cutanée	/	Absence	Survie	NC	NC
16	F/74	Thermique	30	9 (30-50)	Présence	0	0	0	Écouvillonage rectal et cathéter	2	Absence	Survie	NC	NC
17	F/51	Thermique	23	9 (30-50)	Présence	1	1	0	Écouvillonage rectal, ECBU et hémoculture	3	Absence	Survie	NC	NC

NC : Non concerné, NR : non renseigné, *une paire d'hémoculture positive est considérée comme un seul flacon

B. Typage, approche phénotypique

1. Antibiotype

La sensibilité aux différents antibiotiques a été testée par la méthode de diffusion en suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) (93). La sensibilité à la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine et à la néthilmicine a été principalement étudiée pour établir un antibiotype. Pour la détermination de la sensibilité à la colistine, une méthode en milieu liquide a été préférée (UMIC biocentric®).

2. Typage par spectrométrie MALDI-ToF

Les souches bactériennes ont été conservées à -80 °C sur bouillon glycérolé, cultivées sur gélose Muller Hinton (Oxoid®) et incubées à 35°C durant 24h. Une extraction protéique par éthanol à 70° et par de l'acétonitrile a été réalisée. Chaque isolat a été déposé sur la microplaque en spot avec de la matrice. Le spectromètre de masse MALDI-ToF Bruker Daltonik ® a été utilisé pour le typage des souches. L'analyse s'est portée sur l'index masse sur charge avec un intervalle de poids moléculaire allant de 2000 à 20000 Dalton. Le logiciel Bruker Biotyper ® a été utilisé pour comparer des spectres et obtenir un arbre phylogénétique en utilisant les paramètres par défaut selon l'étude de la distance euclidienne.

3. Typage par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les souches bactériennes ont été cultivées dans les mêmes conditions que précédemment. Une subculture a été réalisée dans les mêmes conditions de laboratoire afin de standardiser l'analyse. Les colonies ont été inactivées par 50 µL d'éthanol à 70 % puis remisent en suspension dans 50 µL d'eau désionisée. 15 µL ont été déposés en triplicat sur une plaque de silicium avant d'être analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR biotyper – Bruker Daltonics®). Les spectres ont été obtenus pour un intervalle de 4000-400 cm^{1} et visualisé par le logiciel OPUSv7.5. Le dendrogramme a été obtenu par le logiciel Biotyper v1.5 (Bruker-Daltonics) en utilisant l'étude de la distance euclidienne et le paramétrage « moyen » de la méthode de liaison. Cette expérience a été réalisée deux fois, par deux opérateurs différents dans des lieux différents.

C. Typage, approche génotypique

1. Étude des gènes de résistances aux aminosides

L'étude des gènes de résistances aux aminosides est une méthode simple pour séparer les clones de *A. baumannii*. Cette approche a également été réalisée pour comprendre les mécanismes sous-jacents de résistance aux aminosides. Ainsi, 3 gènes de résistance ont été recherchés par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) : *armA*, *aph(3')-VIa* et *aac3-1*. Les amorces utilisées sont détaillées dans le tableau 5.

Tableau 4 : Amorces utilisées dans la recherche des gènes de résistances aux aminosides

Gène	*Amorces*	*Référence*
armA	Brin sens : TATGGGGGTCTTACTATTCTGCCTAT Brin antisens : TCTTCCATTCCCTTCTCCTTT	(94)
aac(3)-1	Brin sens : GACATAAGCCTGTTCGGTT Brin antisens : CCCGCTTTCTCGTAGCA	(95)
aph3-VI	Brin sens: CGGAAACAGCGTTTTAGA Brin antisens: TTCCTTTTGTCAGGTC	(95)

2. Typage par la technique MLST (Multi-locus-sequence typing)

La typage MLST a été réalisé en suivant le schéma de l'institut Pasteur (https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_abaumannii_pasteur_seqdef) considérant 7 gènes : *cpn60, fusA, gltA, pyrG, recA,rplB* et *rpoB.*

3. cgMLST

Les souches bactériennes ont été séquencées à l'aide de la technologie Illumina (MiSeq). Le schéma utilisé pour le cgMLST a été préalablement validé (20) et le logiciel SeqSphere+ a été utilisé (Ridom GmbH, Münster, Allemagne). Au total, 5 souches isolées dans le service des brûlés ont été incluses, 3 souches isolées du patient 1 aux profils de résistances différents (phénotype A, B et C), une souche du patient 12 (phénotype B) et une souche du patient 13 (phénotype A).

Une souche du ST1 préalablement séquencée et le génome 3 ST à dissémination européenne issue de la banque de données internationale *National Center for Biotechnology Information* ont été inclus pour augmenter la diversité de l'échantillonnage (NZ_CP022283.1 (ST25) NZ_CP015121 (ST52) et (NZ_CP009257 (ST79)).

III. Résultats

A. Antibiotype

Au décours d'une épidémie, le profil de sensibilité aux antibiotiques d'un clone épidémique ou antibiotype est un moyen rapide et peu coûteux pour mettre en évidence la dissémination d'un clone bactérien.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée pour étudier les différentes souches isolées lors de cette épidémie. Hormis, les deux souches sauvages (17 et 18) non épidémiques, l'ensemble des souches sont porteuses d'une carbapénémase de type OXA-23 et présentent un haut niveau de résistance à l'ensemble des bêta-lactamines et aux quinolones. La sensibilité aux aminosides est différente au sein de ces isolats. L'étude de la sensibilité aux aminosides a permis de définir 4 phénotypes de résistance (figure 7).

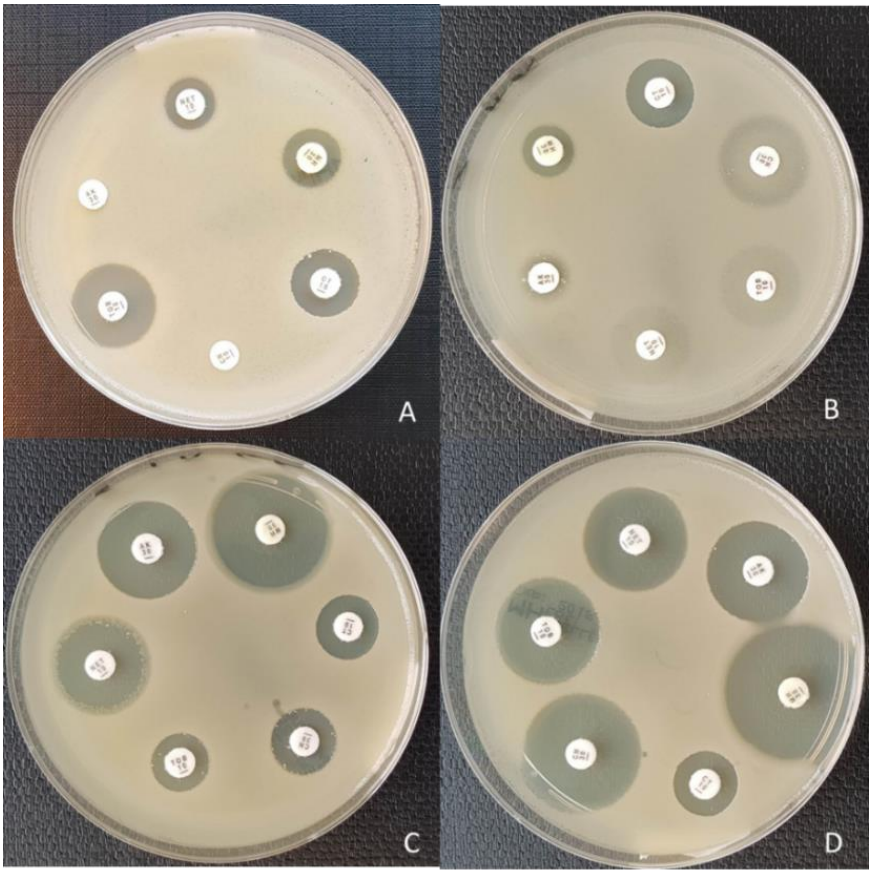

Figure 7 : Présentations des différents phénotypes de résistances. (A) : Sensibilité à la tobramycine. (B) : Résistance de haut niveau à la totalité des aminosides. (C) : Résistance à la gentamicine et à la tobramycine (D) : Sensibilité à la totalité des aminosides. Les disques utilisés correspondent : MH - minocycline, AK - amikacine, Net - néthilmicyne, Tob - tobramycine, Ct - colistine, Cn - gentamicine.

Le phénotype (A) regroupe les souches résistantes à l'amikacine et à la gentamicine. Le phénotype (B) regroupe les souches résistantes à l'ensemble des aminosides.

Le phénotype (C) est constitué d'une souche résistante à la gentamicine et à la tobramycine. Et, le phénotype (D) correspond aux souches sensibles à l'ensemble des aminosides.

Un autre phénotype a été identifié au cours de l'épidémie pour le patient 10 dont un isolat est devenu résistant à la colistine (phénotype E).

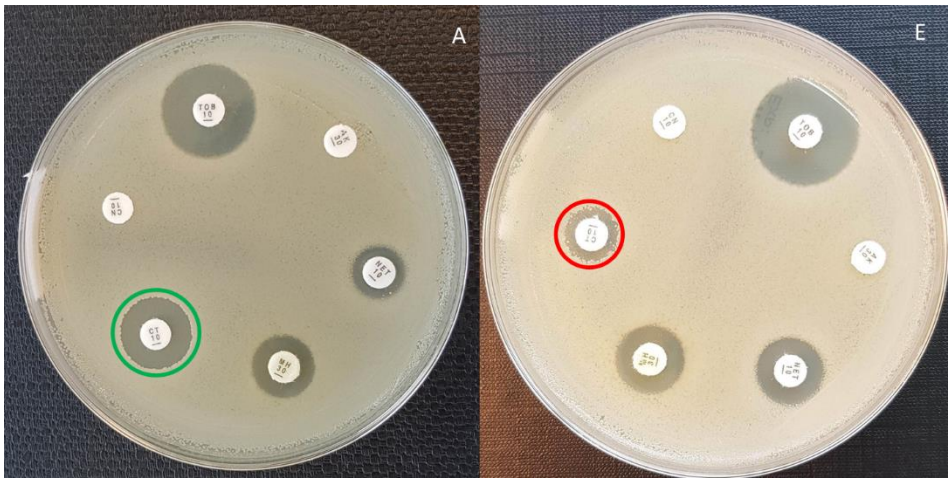

Figure 8 : Phénotype de résistance isolé chez le patient 10 : phénotype (A), CMI à la colistine =0.5mg/L et (E), CMI à la colistine ≥ 64 mg/L

Chez le patient source, les 4 phénotypes de résistance ont été retrouvés dans le même prélèvement. Par la suite, le phénotype (A) a été retrouvé de façon majoritaire et le patient 12 était porteur de souches ayant le phénotype A et B. La répartition de ces différents phénotypes au cours du temps est illustrée dans la figure 9.

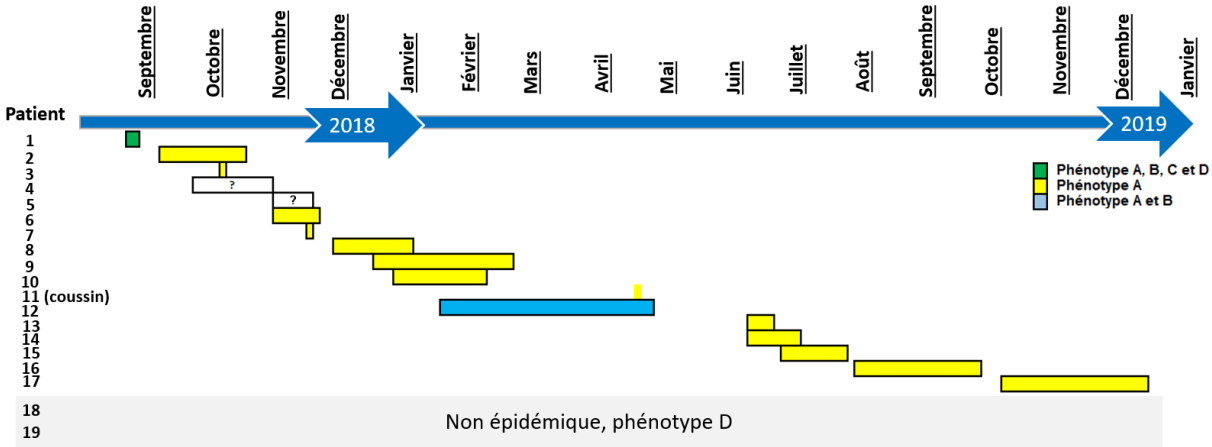

Figure 9: Évolution des profils de résistance au cours du temps

Les souches des patients 4 et 5 n'ont pas été conservées et n'ont donc pas pu être incluses dans ce travail. Cependant, l'antibiogramme fourni au service clinique témoigne de souches appartenant au phénotype (A) ce qui est cohérent avec la progression de ce clone.

B. Typage par technique MLST

Le typage par technique MLST de l'ensemble des souches a été réalisé en suivant le schéma proposé par l'Institut Pasteur a ensuite été réalisé pour l'ensemble de ces souches et correspond à la technique de référence utilisée dans ce travail. Les résultats du MLST correspondant aux différents phénotypes sont listés dans le tableau 6.

Tableau 5 : Séquences types obtenues par MLST en fonction de l'antibiotype

Phénotype	Séquence type ou ST
A (amikacine et gentamicine résistant)	**ST 2**
B (amikacine, tobramycine et gentamicine résistant)	**ST 2**
C (amikacine et tobramycine résistant)	**ST 85**
D (multi-sensible)	**ST 85**, ST 218 et ST 314

Le ST 85 a été isolé chez le patient 1 et n'a pas diffusé. Les deux souches multi-sensible et non épidémiques (patient 18 et 19) correspondent aux les ST 218 et ST 374. Les autres isolats cliniques correspondent à des souches appartenant au ST 2. Au total, 2 ST (ST 2 et ST 85) étaient présents chez la patiente source pour 4 profils de sensibilité différents aux antibiotiques.

Cette analyse nous permet de mettre en évidence que l'épidémie est reliée au clone à diffusion mondial ST 2. Cependant, cette approche ne nous permet pas de comprendre l'existence de deux profils de résistance au cours de l'épidémie (A) et (B).

C. Typage par spectrométrie de masse MALDI-ToF

Le typage par spectrométrie MALDI-ToF a ensuite été réalisé. La phylogénie obtenue a été corrélée aux séquences types et à l'antibiotype. L'arbre phylogénétique obtenu est tprésenté dans la figure 10.

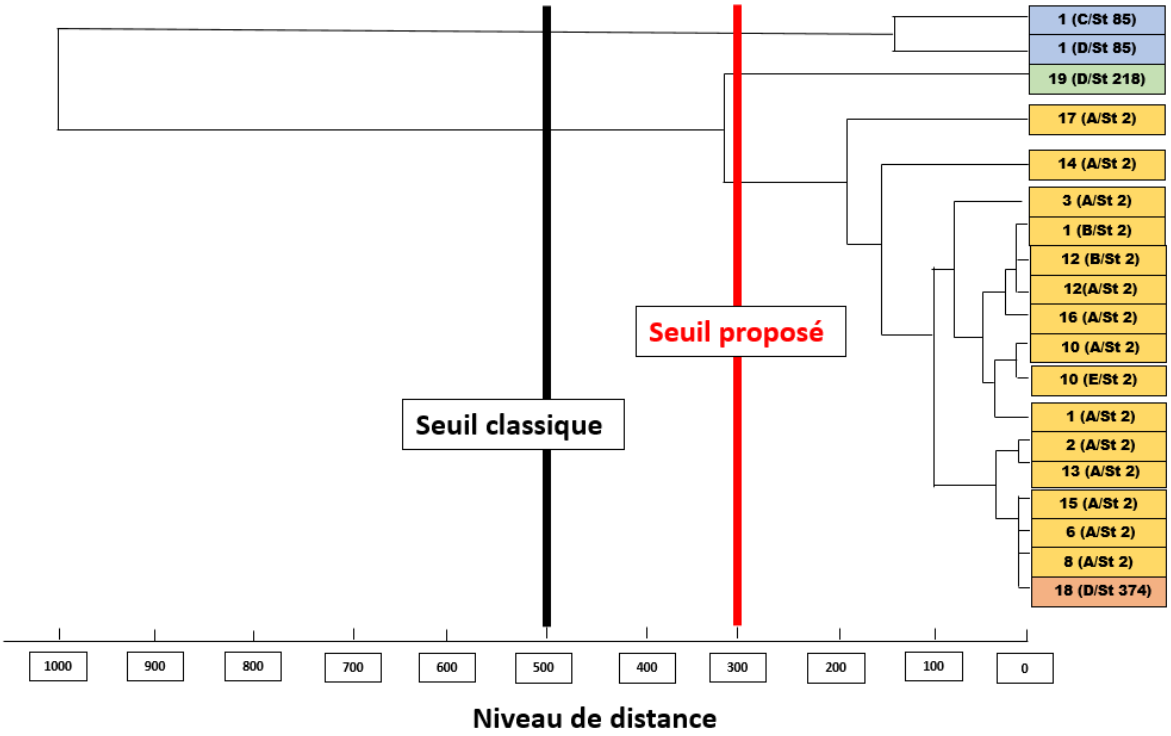

Figure 10 : Typage réalisé par spectrométrie de masse MALDI-ToF. La séparation des clades a été réalisée en utilisant la méthode des distances. Le seuil habituel correspond à une divergence de 0,5 et celui qui est proposé correspond à une divergence de 0,3. ST2 est représenté en jaune, ST85 en bleu, ST 374 en orange et ST 218 en vert. Les numéros encadrés correspondent aux numéros des patients, et les lettres A, B, C et D aux phénotypes de résistances retrouvés.

Le seuil proposé classiquement par le fournisseur est de 0,5 pour la séparation des souches et correspond au paramètre par défaut. Cependant, ce seuil ne montre pas une corrélation satisfaisante entre le séquence type et l'antibiotype. Le seuil de 0,3 permet quant à lui d'avoir une concordance avec la MLST pour 75% des souches. La discordance correspond aux clones ST 2 et ST 374 qui sont indissociables. De plus, cette technique ne permet pas de différencier les souches d'un même ST dotées de profils de résistance différents.

D. Typage par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

Le typage des différentes souches a ensuite été réalisé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. La phylogénie obtenue a également été corrélée aux séquences types et à l'antibiotype. L'arbre phylogénétique obtenu est présenté dans la figure 11.

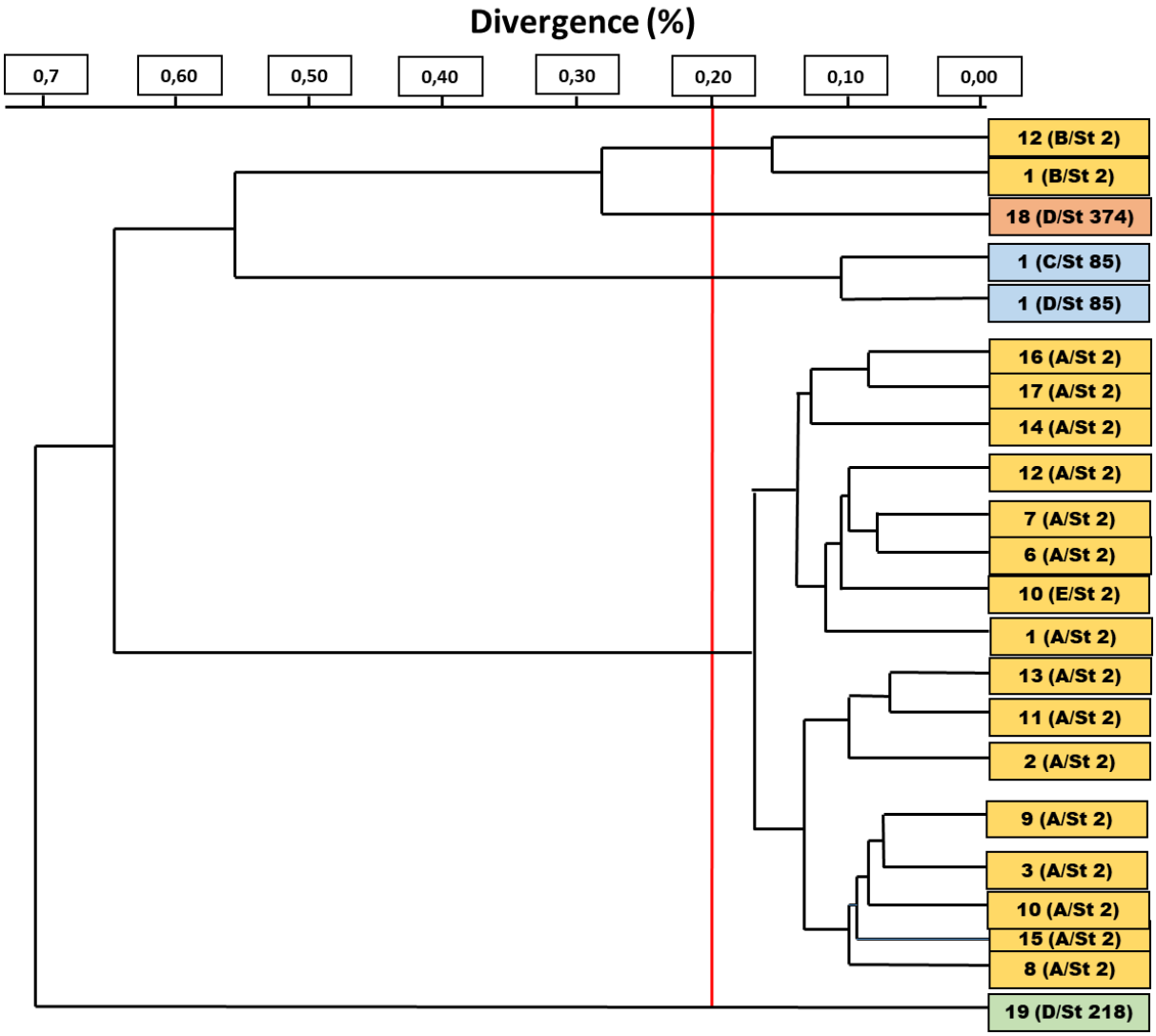

Figure 11 : Typage par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier de 22 isolats cliniques de A. baumannii. La séparation des clades a été réalisée en utilisant la distance euclidienne par la méthode de UPGMA. Le seuil choisi correspond à une divergence de 0,2. ST2 est représenté en jaune, ST85 en bleu, ST 374 en orange et ST 218 en vert. Les numéros encadrés correspondent aux isolats cliniques, et les lettres A, B, C et D aux phénotypes de résistances.

De façon arbitraire, nous avons choisi d'établir le seuil à 0,2, car il n'existe pas de seuil prédéfini pour *Acinetobacter baumannii*. Premièrement, cette technique permet de séparer l'ensemble des différents ST de façon cohérente. Cependant, la concordance avec le MLST est imparfaite, car deux souches appartenant au ST 2 forment un clade indépendant (1 (B/ST2) et 12 (B/ST2)). Toutefois, ce clade regroupe les deux souches au phénotype (B) à la différence des autres souches ST2 qui présente un phénotype (A). A ce stade, ce résultat peut correspondre à un avantage de la spectrométrie infrarouge par rapport à la technique MLST.

Enfin, la IR-TF ne sépare pas la souche du patient 10 à la sensibilité différente à la colistine (phénotype E).

E. Étude des gènes de résistance aux aminosides.

Afin d'affiner la compréhension des mécanismes de résistance entre les deux souches du même ST, mais possédant deux phénotypes différents (A) et (B), nous avons réalisé une étude génétique de 3 gènes de résistance aux aminosides. Nous avons sélectionné deux souches isolées chez le patient 12 correspondant aux phénotypes de résistance (A) et (B). Nous avons également étudié ces mêmes gènes de résistance pour une souche isolée chez le patient 18 ayant le phénotype (D) multi-sensible afin d'avoir un contrôle négatif et nous avons étudié une souche isolée chez le patient 16 au phénotype (A) comme contrôle positif. La mise en évidence des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose est présenté dans la figure 12.

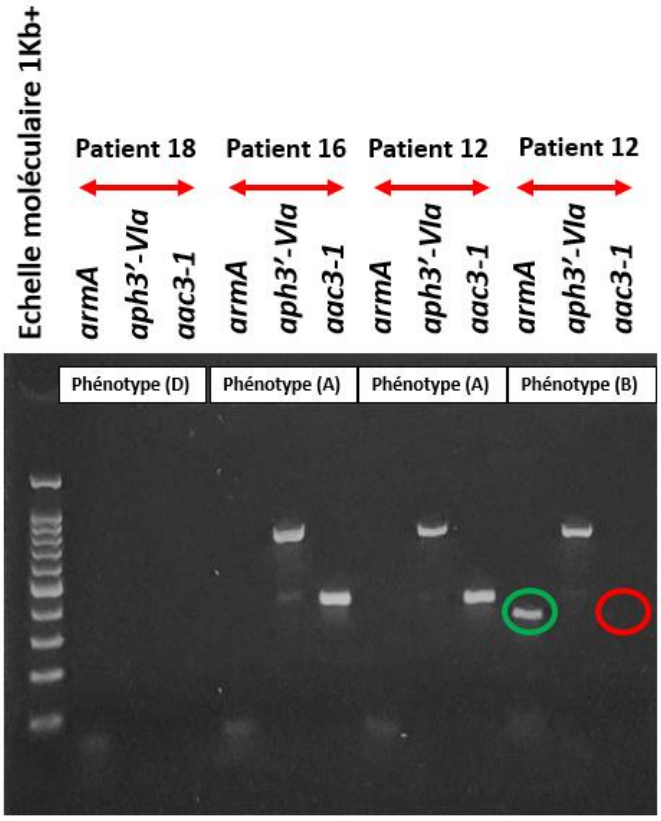

Figure 12 : Étude génétique de la résistance aux aminosides par PCR.

La souche du patient 18 au phénotype (D) ne possède aucun des gènes de résistance ce qui coïncide avec son phénotype multi-sensible. Les souches au phénotype de résistance (A) possèdent les gènes de résistance *aph3'-VIa* et *aac3-1* reliés à la résistance à l'amikacine et à la gentamicine. La présence de ces gènes explique la sensibilité conservée à la tobramycine. Et, la souche au phénotype (B) possède gènes *aph3'-Via* et *armA*. La méthylase Arm(A) est reliée à la résistance à l'ensemble des aminosides. Ainsi, cette technique met en évidence les mécanismes de résistance reliés aux phénotypes (A) et (B). De plus, cette méthode était anciennement utilisée pour le typage et suggère que ces souches aux phénotypes différents appartiennent à des clones bactériens différents.

F. Typage par étude du *core genome*

L'analyse de 2390 gènes conservés ou *core genome* a ensuite été réalisée pour affiner la séparation des souches ST 2 aux phénotypes différents. Le résultat est présenté dans la figure 13.

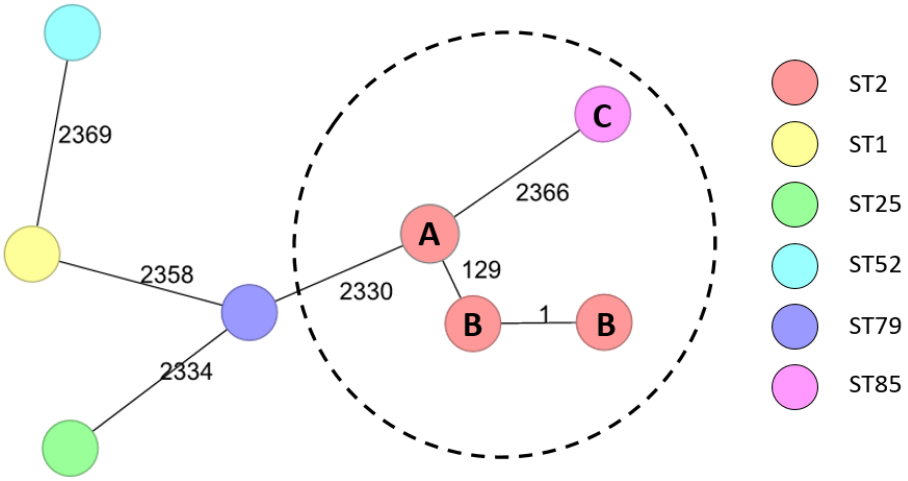

Figure 13: Structure des isolats de Acinetobacter baumannii par l'étude du core genome en fonction des différents ST. Les arêtes correspondent à la différence de locus entre les différentes entités. Le cercle noir correspond aux isolats épidémiques et les lettres A, B et C à l'intérieur des cercles correspondent aux différents phénotypes préalablement définis.

Premièrement, le cgMLST permet de distinguer (>2000 allèles différents) les ST 1, 25, 52, 79 à dissémination européenne des ST2 et ST85 isolés lors de notre épidémie. Deuxièmement, les ST2 et ST85 sont distants de 2366 allèles. Au sein du ST2, le phénotype (A) et le phénotype (B) diffèrent de 129 allèles et les deux souches au phénotype (B) isolés au début et au milieu de l'épidémie ne diffèrent que d'un allèle.

G. Association entre *Acinetobacter baumannii*, brûlure et mortalité

Le recueil de données des patients concernés par l'épidémie montre une hétérogénéité dans la gravité des patients hospitalisés dans le service de réanimation des brûlés (tableau 4). Ainsi, les patient 1, 7 et 12 présentaient l'état de gravité le plus important à l'admission avec les brûlures les plus étendues et un pronostic de mortalité de plus de 60% selon le score ABSI. Chez ces patients, deux décès sont survenus (patient 1 et 7). Ce sont les seuls décès survenus dans l'ensemble des patients et ont été déclarés respectivement à 10 et 11 jours de l'admission. La cause du décès a été imputée à un choc septique à *Escherichia coli* et à un arrêt cardiaque. Durant l'épidémie, quatre patients ont été bactériémiques de façon soutenue ou intercurrente sur une période allant de plusieurs jours à plusieurs semaines (Figure 14 et 15). Aucun, de ces patients n'est décédé et il apparait donc que ces infections n'ont pas eu d'effet direct en termes de mortalité.

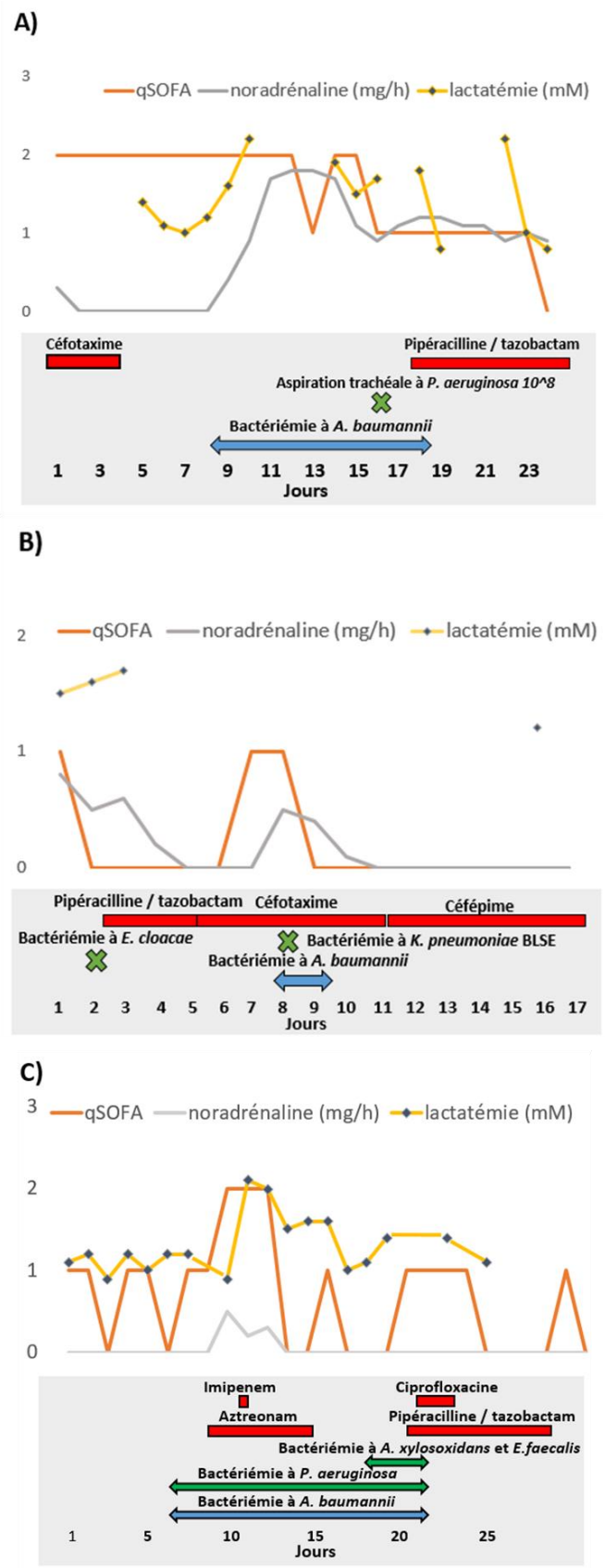

Figure 14 : Analyse des bactériémies en fonction des traitements antibiotiques et des paramètres du sepsis 3 (qSOFA, traitement par noradrénaline et lactatémie). (A) Patient 6. (B) Patient 16. (C) Patient 17. En rouge traitement antibiotique inadapté à A. baumannii. Les flèches correspondent à une période temporelle couvrant plusieurs flacons d'hémoculture. Les croix correspondent à un flacon unique d'hémoculture ou une seule paire chez un patient.

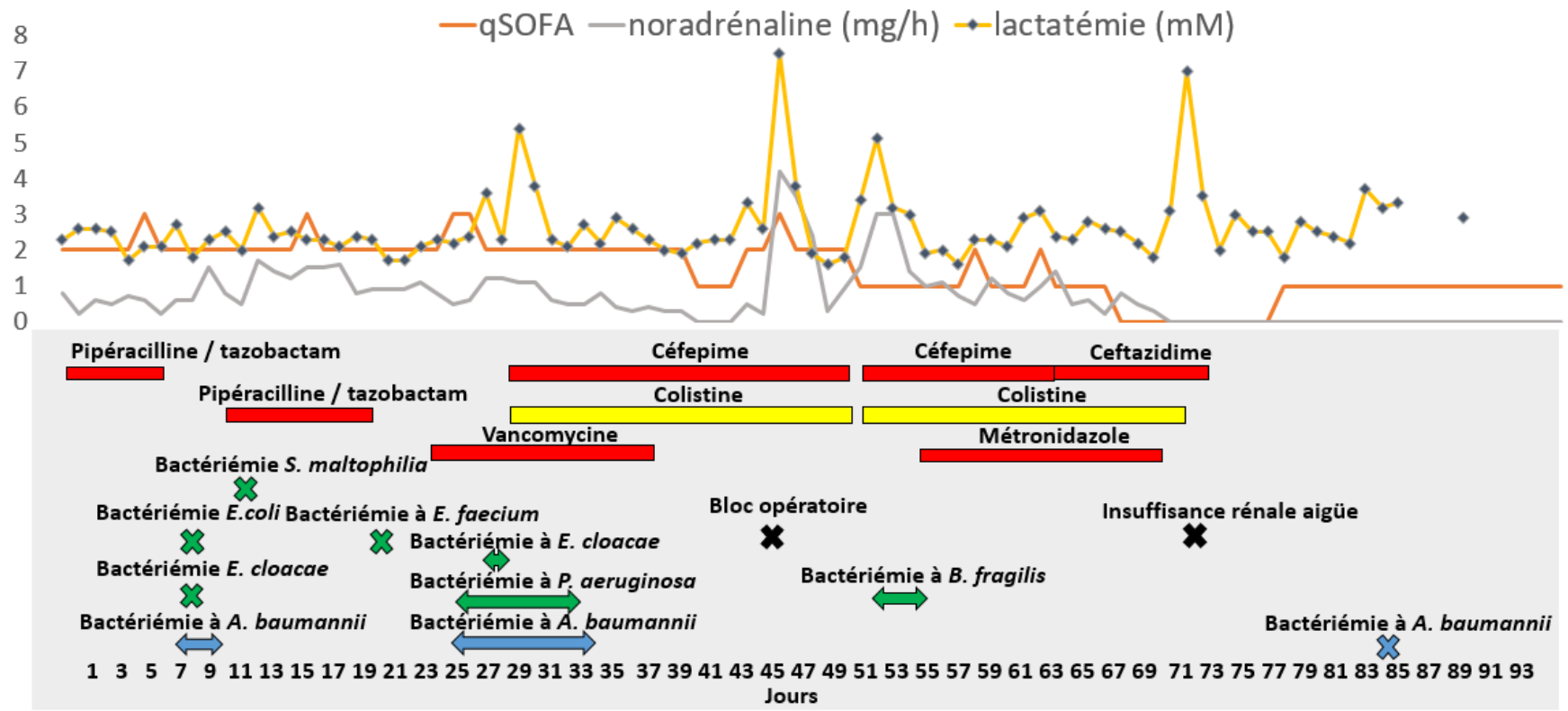

Figure 15 : Analyse des bactériémies en fonction des traitements antibiotiques et des paramètres du sepsis 3 (qSOFA, traitement par noradrénaline et lactatémie) chez le patient 12. En rouge, traitement antibiotique inadapté à A. baumannii. En jaune, traitement antibiotique adapté à A. baumannii. Les flèches correspondent à une période temporelle couvrant plusieurs flacons d'hémoculture ou paire positives à la même bactérie. Les croix correspondent à un flacon d'hémoculture ou une seule paire positive à une bactérie .

Parmi ces patients, 75 % ont présenté des bactériémies intercurrentes à d'autres bactéries durant leurs épisodes. Ces infections ont systématiquement été traitées par une antibiothérapie adaptée par le service de soin. Concernant les bactériémies à *A. baumannii*, seulement un épisode a été pris en charge de manière ciblée. Il s'agit du patient 12 qui a été traité par colistine durant plusieurs semaines. Ce traitement a par la suite été arrêté devant la survenue d'une insuffisance rénale aiguë à distance de la bactériémie. Selon les paramètres sélectionnés pour le suivi de ces épisodes, il semble que ces bactériémies non traitées ne soient pas reliées à une aggravation clinique.

V. Discussion

Typage des isolats de l'épidémie. Le premier objectif de ce travail était de déterminer si l'épidémie était liée à dissémination d'un clone unique alors que plusieurs phénotypes étaient présents chez la patiente index. La technique phénotypique de typage la plus immédiate nous a permis de mettre en évidence 4 antibiotypes dont deux étaient retrouvés au long de l'épidémie et qui différaient par leur résistance aux aminosides. Le premier typage génotypique par MLST a ensuite montré que les isolats épidémiques appartenaient au clone à dissémination mondiale ST2, suggérant la dissémination d'un clone unique. Cette hypothèse ne permettait cependant pas de comprendre la présence de 2 phénotypes de résistance aux aminosides au sein d'un même clone.

Nous avons alors analysé la diversité des isolats en spectrométrie de masse MALDI-ToF puis en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF). En dépit de conditions standardisées, la spectrométrie de masse ne nous a pas permis de différencier clairement les isolats. Néanmoins, en abaissant le seuil d'appariement des données spectrales par rapport aux recommandations du fabricant, nous pouvions obtenir des regroupements d'isolats présentant une concordance avec la MLST de 75 %. Ces résultats sont voisins de ceux de la littérature qui indiquent environ 65 % d'adéquation avec les *sequence types* du MLST (96). Cette méthode rapide et peu coûteuse semble pour l'instant inadaptée au typage d'isolats cliniques de *A. baumannii* dans le contexte d'une épidémie.

Le typage IR-TF en revanche a permis la distinction de groupes d'isolats superposables aux différents *sequence types* de MLST. Cette approche différenciait de plus les isolats ST2 de l'antibiotype A de ceux de l'antibiotype B.

Enfin, l'analyse des souches ST2 (A) et ST2 (B) par l'approche génomique globale de cgMLST a mis en évidence une différence de 129 allèles entre les isolats d'antibiotype A et B, alors que les 2 isolats B ne différaient que d'un seul. La littérature indique qu'une différence de 0 à 8 allèles est corrélable à l'appartenance à un même *pulsotype* selon la technique historique, mais encore admise comme *gold standard*, la RFLP-PFGE (15, 20). Les isolats d'antibiotype A seraient donc clonaux par cette technique de même que les B, mais ces 2 clones seraient distincts, plus de 40 allèles de différence (ici 129) indiquant l'appartenance à deux pulsotypes indépendants (20). Ainsi, le cgMLST, mais aussi l'IR-TF, ont démontré que l'épidémie impliquait deux clones distincts aux phénotypes différents, en dépit de leur appartenance à un même *sequence type* (ST2) en MLST. Ce constat confirme les observations de la littérature montrant une hétérogénéité au sein du ST2 avec une variation de plus de 800 allèles entre différent souches (97).

Le cgMLST et le typage par FT-IR ont fourni des résultats comparables pour le suivi de notre épidémie, et supérieur au MLST, incapable de distinguer les clones A et B. Ces résultats vont à l'encontre de ceux d'une précédente étude qui présentait le typage par FT-IR comme moins performant que le MLST pour le typage de *A.baumannii* (21). Dans celle-ci cependant, ne figurait pas de comparaison avec le cgMLST, et il est donc possible que, comme dans notre travail, le typage FT-IR ait été au contraire plus performant que le MLST.

Résistance hétérogène aux aminosides. La suspicion d'une résistance du clone B de type ArmA a été confirmée par amplification du gène *armA* dans ces isolats. L'hypothèse initiale de dissémination d'un seul clone bactérien A/B dont la résistance aux aminosides fluctuait au cours du temps a été écartée par les techniques de typage. Initialement, la présence de la méthylase aurait pu s'expliquer par une non-expression génique ou par l'acquisition du gène d'un réservoir environnemental. Parmi ces deux clones, le relatif insuccès épidémique du clone d'antibiotype B (détecté chez les patients 1 et 12 seulement) par rapport au clone d'antibiotype A (chez tous les patients) pourrait être dû à la seule présence de la méthylase ArmA dont on sait qu'elle peut nuire à la vitalité (*fitness*) bactérienne (51).

Impact clinique de l'épidémie. La principale observation que nous avons pu faire est qu'il apparait que les colonisations et les infections à *A. baumannii* résistants aux carbapénèmes dont les bactériémies, n'ont pas eu d'impact direct en termes de mortalité. Seuls deux patients sont décédés indépendamment de cette documentation bactériologique et une autre cause a été identifiée comme étant à l'origine des décès. Ces deux décès correspondent aux patients ayant la plus grande gravité à l'admission selon le score ABSI. Ces résultats font écho aux données de la littérature où les colonisations et les infections à *Acinetobacter baumannii* ne sont pas un facteur indépendant en termes de mortalité chez le patient brûlé (91,92).
Dans la plupart des cas, aucune antibiothérapie adaptée à la multi-résistance des souches n'a été instituée. Les réanimateurs du service semblent avoir priorisé l'évaluation clinique à la seule positivité d'un résultat bactériologique. Ceci paraît contre-intuitif étant donné que la mortalité des infections à bacille à Gram négatif augmente si le traitement antibiotique initial est inadapté (98). Cependant, chez *A. baumannii*, une série de 86 patients bactériémiques à mise en évidence qu'un traitement initial inadapté avant incrémentation n'impactait pas la mortalité (99).

Selon notre recueil de données et le suivi des paramètres retenus (qSOFA, lactatémie et traitement par noradrénaline), l'absence de traitement ne semble pas avoir conduit à une détérioration clinique ni à une surmortalité. Ces paramètres sont restés stables en l'absence d'antibiothérapie ciblée à l'exception du patient 12 où deux détériorations ont été observées

durant la période d'étude (45e et 72e jour), ces perturbations étant liées à une intervention chirurgicale et une insuffisance rénale mal tolérée. Étonnement, la positivité d'hémocultures à *A. baumannii* chez ce même patient a persisté pendant plusieurs semaines, sans détérioration de son état.

Du point de vue microbiologique, l'absence de détérioration clinique pourrait également s'expliquer par la faible virulence de *A. baumannii* par rapport à d'autres bacilles à Gram négatif. Comme évoqué en introduction, il semble bien que cette espèce se distingue par sa formidable capacité à persister dans l'environnement, de résister aux antibiotiques, et non par sa virulence (31).

VI. Conclusion

Depuis plus de 30 ans, *A. baumannii* est une menace qui pèse sur les patients des services de soins intensifs aux brûlés. Sélectionnés par des décennies d'usage d'antibiotiques à spectre de plus en plus large, des isolats formidablement résistants se sont installés dans l'environnement des patients et les infections nosocomiales qu'ils provoquent sont particulièrement difficiles à traiter. Le contrôle de leur diffusion est essentiel et l'identification rapide des clones les plus transmissibles requiert des outils épidémiologiques performants et faciles à utiliser en routine de laboratoire. Confrontés à une épidémie au long cours dans un service auparavant indemne de contamination par *A. baumannii*, nous avons pu comparer les différentes techniques disponibles pour typer les isolats. Si le séquençage génomique complet se place aujourd'hui comme l'outil de référence, son coût élevé et le délai d'obtention des résultats est encore peu compatible avec une intervention rapide en situation de soins. Nous avons montré ici que le *core genome*-MLST était plus performant que l'approche MLST, elle aussi coûteuse et lente, et devait servir à évaluer les techniques phénotypiques rapides qui apparaissent depuis quelques années. Ainsi, nous avons constaté une adéquation des résultats de cgMLST et de spectroscopie IR-TF, méthode rapide et peu onéreuse, qui nous a permis de confirmer ce qu'un antibiogramme complet avait également identifié, *i.e.* la présence de deux clones ayant colonisé ou infecté 16 patients du centre de traitement des brûlés du CHU de Lille.

Enfin, cette étude nous a permis de constater que les colonisations et infections qui sont survenues durant cette épidémie n'ont pas eu d'impact direct sur la mortalité bien que la majorité des bactériémies n'ont pas été traitées par une antibiothérapie adaptée.

VII. Références bibliographiques

1. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of Acinetobacter baumannii virulence. Nat Rev Microbiol. 18 décembre 2017;16(2):91-102.

2. Doi Y, Murray G, Peleg A. Acinetobacter baumannii: Evolution of Antimicrobial Resistance—Treatment Options. Semin Respir Crit Care Med. 2 février 2015;36(01):085-98.

3. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. Front Microbiol. 1 avril 2019;10:539.

4. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. mars 2018;18(3):318-27.

5. Wang X, Trent MS, Davies BW. Desiccation Tolerance Assays for Acinetobacter baumannii. In: Classical Topics in Complex Function. Methods Mol Biol. 2019 ;1946 : 189-94.

6. Le Floch R, Naux E, Arnould JF. L'infection bactérienne chez le patient brûlé. Ann Burns Fire Disasters. 30 juin 2015;28(2):94-104.

7. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: Emergence of a Successful Pathogen. Clin Microbiol Rev. 1 juillet 2008;21(3):538-82.

8. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJK, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the Acinetobacter calcoaceticus–Acinetobacter baumannii complex with the proposal of Acinetobacter pittii sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 3) and Acinetobacter nosocomialis sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 13TU). Res Microbiol. mai 2011;162(4):393-404.

9. Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Brisse S, Higgins PG. Acinetobacter seifertii sp. nov., a member of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex isolated from human clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol. 1 mars 2015;65(Pt 3):934-42.

10. Cosgaya C, Marí-Almirall M, Van Assche A, Fernández-Orth D, Mosqueda N, Telli M, et al. Acinetobacter dijkshoorniae sp. nov., a member of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex mainly recovered from clinical samples in different countries. Int J Syst Evol Microbiol. oct 2016;66(10):4105-11.

11. Rooney Ap, Dunlap D, Flor Weiler Lb. Acinetobacter lactucae sp. nov., isolated from iceberg lettuce (Asteraceae: Lactuca sativa). Int J Syst Evol Microbiol. 2016 Septembre;66(9):3566-3572

12. Vijayakumar S, Biswas I, Veeraraghavan B. Accurate identification of clinically important Acinetobacter spp.: an update. Future Sci OA. 1 juillet 2019;5(6):FSO395.

13. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial

epidemiology. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. oct 2007;13 Suppl 3:1-46.

14. Novais Â, Freitas AR, Rodrigues C, Peixe L. Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. mars 2019;38(3):427-48.

15. Neoh H-M, Tan X-E, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the « gold standard » for bacteria typing and current alternatives. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. octobre 2019;74:103935.

16. Noppe-Leclercq I, Wallet F, Haentjens S, Courcol R, Simonet M. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for Acinetobacter baumannii. Res Microbiol. 1 juin 1999;150(5):317-22.

17. Gaiarsa S, Batisti Biffignandi G, Esposito EP, Castelli M, Jolley KA, Brisse S, et al. Comparative Analysis of the Two Acinetobacter baumannii Multilocus Sequence Typing (MLST) Schemes. Front Microbiol. 2019; 10: 930.

18. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clonal lineages. Int J Antimicrob Agents. 1 janvier 2013;41(1):11-9.

19. Karampatakis T, Antachopoulos C, Tsakris A, Roilides E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in Greece: an extended review (2000–2015). Future Microbiol. 12 juin 2017;12(9):801-15.

20. Higgins PG, Prior K, Harmsen D, Seifert H. Development and evaluation of a core genome multilocus typing scheme for whole-genome sequence-based typing of Acinetobacter baumannii. PLoS ONE. 2017; 12(6): e0179228

21. Martak D, Valot B, Sauget M, Cholley P, Thouverez M, Bertrand X, et al. Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy Can Quickly Type Gram-Negative Bacilli Responsible for Hospital Outbreaks. Front Microbiol. 2019 Juin 26;10:1440

22. Antunes LCS, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii* : evolution of a global pathogen. Pathog Dis. août 2014;71(3):292-301.

23. Pailhoriès H, Belmonte O, Kempf M, Lemarié C, Cuziat J, Quinqueneau C, et al. Diversity of Acinetobacter baumannii strains isolated in humans, companion animals, and the environment in Reunion Island: an exploratory study. Int J Infect Dis. août 2015;37:64-9.

24. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. N Engl J Med. 27 mars 2014;370(13):1198-208.

25. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. Clin Microbiol Rev. 14 décembre 2016;30(1):/cmr/30/1/zcm409.atom.

26. Sharifipour E, Shams S, Esmkhani M, Khodadadi J, Fotouhi-Ardakani R, Koohpaei A, et al. Evaluation of bacterial co-infections of the respiratory tract in COVID-19 patients admitted to ICU. BMC Infect Dis. 1 septembre 2020;20(1):646.

27. Dallo SF, Weitao T. Insights into Acinetobacter War-Wound Infections, Biofilms, and Control. Adv Skin Wound Care. avril 2010;23(4):169-74.

28. Öncül O, Keskin Ö, Acar HV, Küçükardalı Y, Evrenkaya R, Atasoyu EM, et al. Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. J Hosp Infect. 1 mai 2002;51(1):47-51.

29. Masur H, Murray P. Tsunami disaster and infection: Beware what pathogens the transport delivers to your intensive care unit!*. Crit Care Med. mai 2005;33(5):1179-80.

30. van der Kolk JH, Endimiani A, Graubner C, Gerber V, Perreten V. Acinetobacter in veterinary medicine, with an emphasis on Acinetobacter baumannii. J Glob Antimicrob Resist. 1 mars 2019;16:59-71.

31. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of Acinetobacter baumannii virulence. Nat Rev Microbiol. février 2018;16(2):91-102.

32. Wright MS, Mountain S, Beeri K, Adams MD. Assessment of Insertion Sequence Mobilization as an Adaptive Response to Oxidative Stress in Acinetobacter baumannii Using IS-seq. J Bacteriol. 01 2017;199(9).

33. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in Acinetobacter baumannii. New Microbiol. avril 2014;37(2):119-27.

34. Doi Y, Murray G, Peleg A. Acinetobacter baumannii: Evolution of Antimicrobial Resistance—Treatment Options. Semin Respir Crit Care Med. 2 février 2015;36(01):085-98.

35. Segal H, Garny S, Elisha BG. Is ISABA-1 customized for Acinetobacter? FEMS Microbiol Lett. 1 févr 2005;243(2):425-9.

36. Vandecraen J, Chandler M, Aertsen A, Houdt RV. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. Crit Rev Microbiol. 2 nov 2017;43(6):709-30.

37. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide Dissemination of the blaOXA-23 Carbapenemase Gene of Acinetobacter baumannii1. Emerg Infect Dis. janvier 2010;16(1):35-40.

38. Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in Acinetobacter baumannii. Clin Microbiol Infect. 1 février 2006;12(2):123-30.

39. Rodríguez-Martínez J-M, Nordmann P, Ronco E, Poirel L. Extended-Spectrum Cephalosporinase in Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. août 2010;54(8):3484-8.

40. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in Acinetobacter baumannii. FEMS Microbiol Lett. mai 2006;258(1):72-7.

41. Lee C-R, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. Front Cell Infect Microbiol. Microbiol., 13 Mars 2017

42. Doi Y, Murray G, Peleg A. Acinetobacter baumannii: Evolution of Antimicrobial Resistance—Treatment Options. Semin Respir Crit Care Med. 2 février 2015;36(01):085-98.

43. Akers KS, Chaney C, Barsoumian A, Beckius M, Zera W, Yu X, et al. Aminoglycoside Resistance and Susceptibility Testing Errors in Acinetobacter baumannii-calcoaceticus Complex. J Clin Microbiol. 1 avril 2010;48(4):1132-8.

44. Jeong HW, Cheong HJ, Kim WJ, Kim MJ, Song K-J, Song J-W, et al. Loss of the 29-kilodalton outer membrane protein in the presence of OXA-51-like enzymes in Acinetobacter baumannii is associated with decreased imipenem susceptibility. Microb Drug Resist Larchmt N. septembre 2009;15(3):151-8.

45. Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P. Acinetobacter radioresistens as a Silent Source of Carbapenem Resistance for Acinetobacter spp. Antimicrob Agents Chemother. avril 2008;52(4):1252-6.

46. Sheikhalizadeh V, Hasani A, Ahangarzadeh Rezaee M, Rahmati-yamchi M, Hasani A, Ghotaslou R, et al. Comprehensive study to investigate the role of various aminoglycoside resistance mechanisms in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. J Infect Chemother. 1 février 2017;23(2):74-9.

47. Nemec A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European Acinetobacter baumannii clones. J Med Microbiol. 2004;53(12):1233-40.

48. Doi Y, Wachino J-I, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. Infect Dis Clin North Am. 2016;30(2):523-37.

49. Nafplioti K, Galani I, Angelidis E, Adamou P, Moraitou E, Giannopoulou P, et al. Dissemination of International Clone II Acinetobacter baumannii Strains Coproducing OXA-23 Carbapenemase and 16S rRNA Methylase ArmA in Athens, Greece. Microb Drug Resist. 8 août 2019;26(1):9-13.

50. Gholami M, Haghshenas M, Moshiri M, Razavi S, Pournajaf A, Irajian G, et al. Frequency of 16S rRNA Methylase and Aminoglycoside-Modifying Enzyme Genes among Clinical Isolates of Acinetobacter baumannii in Iran. Iran J Pathol. 2017;12(4):329-38.

51. Lioy VS, Goussard S, Guerineau V, Yoon E-J, Courvalin P, Galimand M, et al. Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host. RNA. mars 2014;20(3):382-91.

52. Chopra S, Galande A. A fluoroquinolone-resistant Acinetobacter baumannii without the quinolone resistance-determining region mutations. J Antimicrob Chemother. 1 nov 2011;66(11):2668-70.

53. Shen M, Luan G, Wang Y, Chang Y, Zhang C, Yang J, et al. Coexistence of blaOXA-23 with armA in quinolone-resistant Acinetobacter baumannii from a Chinese university hospital. Diagn Microbiol Infect Dis. 1 mars 2016;84(3):230-1.

54. Touati A, Brasme L, Benallaoua S, Gharout A, Madoux J, De Champs C. First report of qnrB-producing Enterobacter cloacae and qnrA-producing Acinetobacter baumannii

recovered from Algerian hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis. 1 mars 2008;60(3):287-90.

55. Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple synergistic activities of Polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. mars 2004;48(3):753-7.

56. Chen Z, Chen Y, Fang Y, Wang X, Chen Y, Qi Q, et al. Meta-analysis of colistin for the treatment of Acinetobacter baumannii infection. Sci Rep. 24 nov 2015;5(1):17091.

57. Vardakas KZ, Mavroudis AD, Georgiou M, Falagas ME. Intravenous colistin combination antimicrobial treatment vs. monotherapy: a systematic review and meta-analysis. Int J Antimicrob Agents. avril 2018;51(4):535-47.

58. Petrosillo N, Giannella M, Antonelli M, Antonini M, Barsic B, Belancic L, et al. Clinical Experience of Colistin-Glycopeptide Combination in Critically Ill Patients Infected with Gram-Negative Bacteria. Antimicrob Agents Chemother. février 2014;58(2):851-8.

59. Moffatt JH, Harper M, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. Insertion sequence ISAba11 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. juin 2011;55(6):3022-4.

60. Trebosc V, Gartenmann S, Tötzl M, Lucchini V, Schellhorn B, Pieren M, et al. Dissecting Colistin Resistance Mechanisms in Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii Clinical Isolates. mBio. 10(4):e01083-19.

61. Hameed F, Khan MA, Muhammad H, Sarwar T, Bilal H, Rehman TU. Plasmid-mediated mcr-1 gene in Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa: first report from Pakistan. Rev Soc Bras Med Trop. 5 septembre 2019;52:e20190237.

62. Al-Kadmy IMS, Ibrahim SA, Al-Saryi N, Aziz SN, Besinis A, Hetta HF. Prevalence of Genes Involved in Colistin Resistance in Acinetobacter baumannii: First Report from Iraq. Microb Drug Resist. 1 juin 2020;26(6):616-22.

63. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. Clin Microbiol Rev. 14 décembre 2016;30(1):/cmr/30/1/zcm409.atom.

64. Greig SL, Scott LJ. Intravenous Minocycline: A Review in Acinetobacter Infections. Drugs. 1 octobre 2016;76(15):1467-76.

65. Yang Y-S, Lee Y, Tseng K-C, Huang W-C, Chuang M-F, Kuo S-C, et al. In Vivo and In Vitro Efficacy of Minocycline-Based Combination Therapy for Minocycline-Resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. juillet 2016;60(7):4047-54.

66. Ni W, Han Y, Zhao J, Wei C, Cui J, Wang R, et al. Tigecycline treatment experience against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections: a systematic review and meta-analysis. Int J Antimicrob Agents. 1 février 2016;47(2):107-16.

67. Bassetti M, Labate L, Russo C, Vena A, Giacobbe DR. Therapeutic options for difficult-to-treat Acinetobacter baumannii infections: a 2020 perspective. Expert Opin Pharmacother. 22 janvier 2021;22(2):167-77.

68. Wang L, Liu D, Lv Y, Cui L, Li Y, Li T, et al. Novel Plasmid-Mediated tet(X5) Gene Conferring Resistance to Tigecycline, Eravacycline, and Omadacycline in a Clinical

Acinetobacter baumannii Isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2020 janvier; 64(1): e01326-19/

69. Shi Y, Hua X, Xu Q, Yang Y, Zhang L, He J, et al. Mechanism of eravacycline resistance in Acinetobacter baumannii mediated by a deletion mutation in the sensor kinase adeS, leading to elevated expression of the efflux pump AdeABC. Infect Genet Evol. 1 juin 2020;80:104185.

70. Penwell WF, Shapiro AB, Giacobbe RA, Gu R-F, Gao N, Thresher J, et al. Molecular Mechanisms of Sulbactam Antibacterial Activity and Resistance Determinants in Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. mars 2015;59(3):1680-9.

71. Malik S, Kaminski M, Landman D, Quale J. Cefiderocol Resistance in Acinetobacter baumannii: Roles of β-Lactamases, Siderophore Receptors, and Penicillin Binding Protein 3. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Oct 20;64(11):e01221-20

72. Cattoir V, Felden B. Future Antibacterial Strategies: From Basic Concepts to Clinical Challenges. J Infect Dis. 2 juillet 2019;220(3):350-60.

73. Ma C, Chen W. Where are we and how far is there to go in the development of an Acinetobacter vaccine? Expert Rev Vaccines. 4 mars 2021;20(3):281-95.

74. Gordillo Altamirano F, Forsyth JH, Patwa R, Kostoulias X, Trim M, Subedi D, et al. Bacteriophage-resistant Acinetobacter baumannii are resensitized to antimicrobials. Nat Microbiol. février 2021;6(2):157-61.

75. Eyerich S, Eyerich K, Traidl-Hoffmann C, Biedermann T. Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. Trends Immunol. 1 avril 2018;39(4):315-27.

76. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn Wound Infections. Clin Microbiol Rev. avril 2006;19(2):403-34.

77. Tobiasen J, Hiebert JM, Edlich RF. The abbreviated burn severity index. Ann Emerg Med. mai 1982;11(5):260-2.

78. Walker NJ, King KC. Acute and Chronic Thermal Burn Evaluation and Management. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls-2021

79. Louis-Marie Paget et Bertrand Thélot. Les victimes de brûlure hospitalisées en France métropolitaine en 2014 et évolution depuis 2009. Rapport de santé publique France

80. Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, Jeschke MG, Finnerty CC. Infection in Burns. Surg Infect. 1 avril 2016;17(2):250-5.

81. Mann EA, Baun MM, Meininger JC, Wade CE. Comparison of mortality associated with sepsis in the burn, trauma, and general intensive care unit patient: a systematic review of the literature. Shock Augusta Ga. janvier 2012;37(1):4-16.

82. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 23 février 2016;315(8):801-10.

83. Yan J, Hill WF, Rehou S, Pinto R, Shahrokhi S, Jeschke MG. Sepsis criteria versus clinical diagnosis of sepsis in burn patients: A validation of current sepsis scores. Surgery. 1 décembre 2018;164(6):1241-5.

84. Udy AA, Roberts JA, Lipman J, Blot S. The effects of major burn related pathophysiological changes on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drug use: An appraisal utilizing antibiotics. Adv Drug Deliv Rev. 1 janvier 2018;123:65-74.

85. Wang Y, Beekman J, Hew J, Jackson S, Issler-Fisher AC, Parungao R, et al. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. Adv Drug Deliv Rev. 1 janvier 2018;123:3-17.

86. Williams FN, Herndon DN, Hawkins HK, Lee JO, Cox RA, Kulp GA, et al. The leading causes of death after burn injury in a single pediatric burn center. Crit Care. 2009;13(6):R183.

87. Glik J, Kawecki M, Gaździk T, Nowak M. The impact of the types of microorganisms isolated from blood and wounds on the results of treatment in burn patients with sepsis. Pol Przegl Chir. 1 janvier 2012;84(1):6-16.

88. Munier A-L, Biard L, Legrand M, Rousseau C, Lafaurie M, Donay J-L, et al. Incidence, risk factors and outcome of multi-drug resistant Acinetobacter baumannii nosocomial infections during an outbreak in a burn unit. Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis. février 2019;79:179-84.

89. Munier A-L, Biard L, Rousseau C, Legrand M, Lafaurie M, Lomont A, et al. Incidence, risk factors, and outcome of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii acquisition during an outbreak in a burns unit. J Hosp Infect. 1 nov 2017;97(3):226-33.

90. Shoja S, Moosavian M, Rostami S, Farahani A, Peymani A, Ahmadi K, et al. Dissemination of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in patients with burn injuries. J Chin Med Assoc. 1 avril 2017;80(4):245-52.

91. Wong TH, Tan BH, Ling ML, Song C. Multi-resistant Acinetobacter baumannii on a burns unit--clinical risk factors and prognosis. Burns J Int Soc Burn Inj. juin 2002;28(4):349-57.

92. Albrecht MA, Griffith ME, Murray CK, Chung KK, Horvath EE, Ward JA, et al. Impact of Acinetobacter Infection on the Mortality of Burn Patients. J Am Coll Surg. 1 octobre 2006;203(4):546-50.

93. CASFM / EUCAST AVRIL 2021. Société Française de Microbiologie. (https://www.sfm-microbiologie.org/2021/04/23/casfm-avril-2021-v1-0/)

94. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of Methyltransferases Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. Antimicrob Agents Chemother. mai 2008;52(5):1843-5.

95. Akers KS, Chaney C, Barsoumian A, Beckius M, Zera W, Yu X, et al. Aminoglycoside Resistance and Susceptibility Testing Errors in Acinetobacter baumannii-calcoaceticus Complex. J Clin Microbiol. 1 avril 2010;48(4):1132-8.

96. Sousa C, Botelho J, Grosso F, Silva L, Lopes J, Peixe L. Unsuitability of MALDI-TOF MS to discriminate Acinetobacter baumannii clones under routine experimental conditions. Front Microbiol. Front. Microbiol., 19 Mai 2015

97. Galac MR, Snesrud E, Lebreton F, Stam J, Julius M, Ong AC, et al. A Diverse Panel of Clinical Acinetobacter baumannii for Research and Development. Antimicrob Agents Chemother 2020 Octobre; 64(10): e00840-20

98. Raman G, Avendano E, Berger S, Menon V. Appropriate initial antibiotic therapy in hospitalized patients with gram-negative infections: systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis. 30 septembre 2015;15(1):395.

99. Munoz-Price LS, Zembower T, Penugonda S, Schreckenberger P, Lavin MA, Welbel S, et al. Clinical Outcomes of Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii Bloodstream Infections: Study of a 2-State Monoclonal Outbreak. Infect Control Hosp Epidemiol. oct 2010;31(10):1057-62.

Université de Lille
FACULTÉ DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLÔMÉ D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année universitaire 2020/2021

Nom : PENVEN Prénom : Malo

Titre de la thèse : Diffusion épidémique et persistance de *Acinetobacter baumannii* chez les grands brûlés : Intérêt du typage et méthodes récentes

Mots-clés : *Acinetobacter baumannii*, épidémie, typage bactérien, IR-TF, brûlure

---

Introduction : La diffusion de *A. baumannii* dans les hôpitaux et notamment dans les unités de soins intensifs comme ceux de réanimation des brûlés apparait comme une menace au vu de la proportion importante des souches multirésistantes. Le typage épidémiologique bactérien est un outil efficace pour juguler la dissémination de ces clones. L'étude d'une épidémie survenue dans le service de réanimation des brûlés du CHRU de Lille entre 2017 et 2019 nous a permis d'évaluer les nouvelles méthodes de typage et d'appréhender l'impact associé aux colonisations et infections à *A. baumannii* en termes de mortalité.

Matériel et méthodes : Au cours de l'épidémie, 16 patients ont été colonisés et/ou infectés avec des souches de *A. baumannii* porteur d'une carbapénémase de type Oxa-23 dont le phénotype de résistance aux aminosides fluctuait au cours du temps. Nous avons évalué différentes méthodes de typage : l'antibiotype, la MLST, la spectrométrie de masse MALDI-ToF, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) et la cgMLST. Les gènes de résistance aux aminosides ont été recherchés et le recueil des données cliniques a également été réalisé.

Résultats : Au total, l'antibiotype a mis en évidence 4 profils de résistance différents dont 2 ont diffusé au cours du temps. Ces clones sont regroupés au sein du ST 2 selon la technique MLST. Cependant, le typage par spectroscopie infrarouge et le cgMLST mettent en évidence que ces clones sont indépendants et que l'épidémie est reliée à deux clones distincts. Les données cliniques mettent en évidence que les infections dont les bactériémies ne sont pas reliées à une surmortalité bien que la plupart n'ont pas été traitées de manière adaptée.

Conclusion : La IR-TF montre d'excellents résultats pour le typage bactérien de façon comparable à l'étude du *core genome*. Ces techniques apparaissent comme des méthodes d'avenir au détriment du typage par MLST et par spectrométrie de masse MALDI-ToF qui sont moins performants. Chez le patient brûlé, les infections dont les bactériémies à *A. baumannii* ne semblent pas induire une surmortalité même en cas de traitement non ciblé.

<u>Membres du jury</u> :

Président :	**BROUSSEAU, Thierry, PU-PH**
Assesseurs :	**SENDID Boualem, PU-PH**
	VOEDTS Sophia, CCA
Membre extérieur :	**CATTOIR Vincent, PU-PH**
Directeur de thèse :	**GAILLOT Olivier, MCU-PH**