

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

**Soutenue publiquement le 27/06/2024  
Par Mme Virginie MEURILLON**

---

**L'utilisation des tests diagnostiques dans la lutte contre la résistance  
aux antibiotiques**

---



**Membres du jury :**

**Président :** Nicolas Willand, PU, Faculté de Pharmacie, Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

**Directeur, conseiller de thèse :** Marion Flipo, MCU, Faculté de Pharmacie, Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

**Assesseurs :**

Julie Demaret, MCU-PH, Faculté de Pharmacie, CHU de Lille  
Nicolas Blondiaux, Pharmacien Biologiste, Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier de Tourcoing

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
FACULTE DE PHARMACIE	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2023-2024	Version 2.2 Applicable au 02/01/2022
Document transversal		Page 3/104

REDACTION	VERIFICATION	APPROBATION
<b>Audrey Hennebelle</b> Assistante de direction	<b>Cyrille Porta</b> Responsable des Services	<b>Delphine Allorge</b> Doyen

### Université de Lille

Président  
Premier Vice-président  
Vice-présidente Formation  
Vice-président Recherche  
Vice-président Ressources humaines  
Directrice Générale des Services

Régis BORDET  
Bertrand DÉCAUDIN  
Corinne ROBACZEWSKI  
Olivier COLOT  
Jean-Philippe TRICOIT  
Anne-Valérie CHIRIS-FABRE

### UFR3S



Doyen  
Premier Vice-Doyen, Vice-Doyen RH, SI et Qualité  
Vice-Doyenne Recherche  
Vice-Doyen Finances et Patrimoine  
Vice-Doyen International  
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires  
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie  
Vice-Doyen Territoire-Partenariats  
Vice-Doyen Santé numérique et Communication  
Vice-Doyenne Vie de Campus  
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX  
Hervé HUBERT  
Karine FAURE  
Damien CUNY  
Vincent DERAMECOURT  
Sébastien D'HARANCY  
Caroline LANIER  
Thomas MORGENROTH  
Vincent SOBANSKI  
Anne-Laure BARBOTIN  
Valentin ROUSSEL

### Faculté de Pharmacie

Doyen  
Premier Assesseur et  
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement  
Assesseur à la Vie de la Faculté et  
Assesseur aux Ressources et Personnels  
Responsable des Services  
Représentant étudiant  
Chargé de mission 1er cycle  
Chargée de mission 2eme cycle  
Chargé de mission Accompagnement et Formation à la Recherche  
Chargé de mission Relations Internationales  
Chargée de Mission Qualité  
Chargé de mission dossier HCERES

Delphine ALLORGE  
  
Anne GARAT  
  
Emmanuelle LIPKA  
Cyrille PORTA  
Honoré GUISE  
Philippe GERVOIS  
Héloïse HENRY  
Nicolas WILLAND  
Christophe FURMAN  
Marie-Françoise ODOU  
Réjane LESTRELIN



 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
FACULTE DE PHARMACIE	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2023-2024	Version 2.2 Applicable au 02/01/2022
Document transversal		Page 4/104

### Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)



Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

### Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BERLARBI	Karim	Physiologie	86
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
FACULTE DE PHARMACIE	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2023-2024	Version 2.2 Applicable au 02/01/2022
Document transversal		Page 5/104

M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
FACULTE DE PHARMACIE	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2023-2024	Version 2.2 Applicable au 02/01/2022
Document transversal		Page 6/104



M.	SERGHARAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

#### Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)



Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

#### Maîtres de Conférences des Universités (MCU)



Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
FACULTE DE PHARMACIE	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2023-2024	Version 2.2 Applicable au 02/01/2022
Document transversal		Page 7/104

M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
Mme	BOU KARROUM	Nour	Chimie bioinorganique	
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FRULEUX	Alexandre	Sciences végétales et fongiques	
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
FACULTE DE PHARMACIE	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2023-2024	Version 2.2 Applicable au 02/01/2022
Document transversal		Page 8/104

Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	LIBERELLE	Maxime	Biophysique - RMN	
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MENETREY	Quentin	Bactériologie - Virologie	
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
FACULTE DE PHARMACIE	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2023-2024	Version 2.2 Applicable au 02/01/2022
Document transversal		Page 9/104

Mme	ROGEL	Anne	Immunologie	
M.	ROSA	Mickaël	Hématologie	
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85



#### Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mme	KUBIK	Laurence	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

#### Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86



 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
FACULTE DE PHARMACIE	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2023-2024	Version 2.2 Applicable au 02/01/2022
Document transversal		Page 10/104

### Maîtres de Conférences Associés



Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	COUSEIN	Etienne	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86

### Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BOUDRY	Augustin	Biomathématiques	
Mme	DERAMOUDT	Laure	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
Mme	GILLIOT	Sixtine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
M.	GISH	Alexandr	Toxicologie et Santé publique	
Mme	NEGRIER	Laura	Chimie analytique	

### Hospitalo-Universitaire (PHU)

	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DESVAGES	Maximilien	Hématologie	
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
FACULTE DE PHARMACIE	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2023-2024	Version 2.2 Applicable au 02/01/2022
Document transversal		Page 11/104

#### Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	BERNARD	Lucie	Physiologie	
Mme	BARBIER	Emeline	Toxicologie	
Mme	COMPAGNE	Nina	Chimie Organique	
Mme	COULON	Audrey	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
M.	DUFOSSEZ	Robin	Chimie physique	
Mme	KOUAGOU	Yolène	Sciences végétales et fongiques	
M.	MACKIN MOHAMOUR	Synthia	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	

#### Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	NDIAYE-BOIDIN	Maguette	Anglais
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques



## ***UFR3S-Pharmacie***

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





## Remerciements

### **Au Professeur Nicolas Willand,**

Merci d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je vous remercie également pour tous vos enseignements, conseils et votre accompagnement tout le long de mon parcours académique.

### **Au Docteur Marion Flipo,**

Je te remercie d'avoir accepté d'être ma (double) directrice de thèse, c'était évident pour moi de te le demander. Un grand merci pour tout le temps que tu m'as accordé, tes conseils, ton écoute et pour ta bienveillance au quotidien.

### **Au Docteur Julie Demaret,**

Je vous remercie pour votre présence au sein du jury et vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de relire ce manuscrit.

### **Au Docteur Nicolas Blondiaux,**

Merci de l'honneur que vous me faites de participer à mon jury de thèse. Je vous remercie pour vos conseils et votre retour d'expérience lors de la préparation de ce manuscrit.

### **A l'équipe EFFORT,**

**Anaïs**, merci pour tous ces bons moments passés ensemble au labo et en dehors, pour ta bonne humeur et ton soutien dans toute la rédaction de cette thèse (et ça date...) **Nina**, merci pour tous tes conseils et de m'avoir soutenue au labo, dans le bureau et au cours de différentes pauses café. Je vous avais dit que je la passerai avant la date limite, on peut dire que c'est gagné ? **Rodolphe**, merci pour ta bonne humeur et tes petites blagues qui m'ont aidé dans cette rédaction !

### **A mes (anciens) collègues et toute la team AIDD,**

Merci pour votre soutien et pour votre bonne humeur au cours de ces 2 ans au labo parmi la **team AIDD**. Je n'oublie pas mes anciens collègues, **Bruna, Salia, Anaïs, Kévin** qui n'ont pas hésité un instant à répondre à mes questions en lien avec ce sujet de thèse. Une mention particulière à **Aurore, Alessia** et **Nour** pour votre écoute et vos conseils avisés pendant la rédaction.

### **A mes copains de la fac,**

**Louise**, merci pour tous ces bons moments passés avec toi en pharma, j'en retiens que de bons souvenirs ! **Antoine**, merci pour ton soutien, tes conseils et ton humour pendant ces 4 dernières années. A mes copains de M2, **Floriane, Guillaume, Vincent, Pierre**, un grand merci pour votre

présence tout au long de la rédaction, en particulier, **Guillaume**, pour tes réponses à toutes mes questions/remarques et pour ton soutien dans mes moments de doutes.

#### **Au KOP,**

Ma vie serait bien différente si je ne vous avais pas à mes côtés depuis le lycée. **Pauline, Nico, Tarik, Robin, Léo, Max, Matthieu** sans oublier les +1, **Valentin, Chloé, Meredith**, je vous remercie pour votre soutien au cours de mes études, pour nos soirées et nos bons moments, j'en garde que de bons souvenirs. Un merci tout particulier à toi **Pauline** qui a toujours été là pour moi, qui m'a toujours épaulée dans les moments difficiles et pour tous nos fous rires !

#### **A toute ma famille,**

Un grand merci à ma famille qui s'agrandit de jour en jour pour votre soutien indéfectible. Merci d'avoir cru en moi pendant ces dernières années.

#### **A mes parents,**

Je ne sais pas comment vous remercier en si peu de mots tant vous avez fait pour moi ! Merci pour vos encouragements, vos sacrifices, vos précieux conseils et votre présence tout le long de mon parcours universitaire. Un grand merci pour votre soutien sans faille depuis toutes ces années et d'avoir toujours cru en moi.

#### **A mes sœurs,**

**Amélie, Julie**, merci d'être toujours présentes pour moi et de me soutenir dans tout ce que j'entreprends. Merci pour tout ce que vous m'apportez tous les jours, j'ai beaucoup de chance de vous avoir à mes côtés et j'espère que l'on gardera toujours cette belle complicité. Merci également à mes beaux-frères, **Adrien** et **Jeremy** pour votre soutien et pour votre bonne humeur à tout moment (même pendant mes périodes de stress).

#### **A Thomas,**

Parce que grâce à ces études, j'ai pu croiser ton chemin à des centaines de kilomètres d'ici... Je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien quotidien (même de loin), tes encouragements et tes précieux conseils pendant la rédaction. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble et pour tous ceux à venir. Tack så mycket, för allt !

## Table des matières

Remerciements .....	15
Introduction générale.....	21
I. Les bactéries et le développement des antibiotiques.....	23
A. Présentation des bactéries.....	23
1. L'enveloppe .....	23
2. Composition intracellulaire et extracellulaire de la bactérie .....	28
B. Le développement des antibiotiques.....	29
1. Historique des antibiotiques .....	29
2. Arsenal thérapeutique disponible en France .....	30
II. L'antibiorésistance .....	34
A. Les différents mécanismes de résistance.....	34
1. Les résistances innées et acquises .....	34
2. Inactivation de l'antibiotique .....	37
3. Modification de la cible .....	40
4. Diminution de la perméabilité membranaire.....	41
5. (Sur)expression de pompes d'efflux.....	41
B. Emergence des bactéries multirésistantes.....	43
III. Les recommandations actuelles pour guider le diagnostic.....	46
A. Réalisation d'un antibiogramme .....	46
1. Méthode de diffusion sur milieu solide .....	46
2. Méthode de dilution en milieu liquide.....	49
B. Utilisation de l'antibiogramme à l'hôpital.....	50
1. Définition des critères de décision dans le choix de la thérapeutique .....	50
2. Les limites de l'antibiogramme .....	54
IV. L'émergence des tests rapides de diagnostic en officine.....	55
A. Les tests rapides de diagnostic <i>in vitro</i> (TDR).....	55
1. Les différentes méthodes de tests de diagnostic.....	55
2. Utilisation des tests de diagnostic rapides en ville .....	57
B. Intérêt dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques .....	61
1. Avantages des tests rapides de diagnostic pour les patients.....	61
2. Un enjeu de santé publique .....	62
3. Enjeu économique.....	63
V. Développement de nouveaux tests diagnostiques .....	64
A. Détection des gènes de $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE).....	64



1.	Utilisation des approches phénotypiques et biochimiques .....	65
2.	Développement de nouvelles approches.....	68
B.	Détection des gènes de résistance aux carbapénèmes .....	76
1.	Tests basés sur la technique de l'hybridation .....	77
2.	Tests basés sur l'amplification des acides nucléiques.....	79
3.	Tests basés sur les méthodes immunochromatographiques.....	84
C.	Détection des gènes de résistances aux antituberculeux avec Deeplex® Myc-TB.....	86
1.	La tuberculose .....	86
2.	Les outils disponibles pour le diagnostic.....	87
3.	Présentation du kit de détection Deeplex® Myc-TB .....	88
	Conclusion générale .....	93
	Bibliographie .....	95

## Table des illustrations

Figure 1 : (a) Représentation d'une bactérie Gram positif. (b) Représentation d'une bactérie Gram négatif. Réalisé avec Biorender .....	24
Figure 2 : Structure du lipopolysaccharide chez les bactéries Gram négatif <sup>[6]</sup> .....	26
Figure 3 : Synthèse du peptidoglycane. Réalisé avec Biorender .....	28
Figure 4 : Représentation des familles thérapeutiques et leurs cibles. Réalisé avec Biorender. ....	31
Figure 5 : Représentation du mécanisme de transformation au sein de deux bactéries <sup>[18]</sup> .....	35
Figure 6 : Représentation du mécanisme de transduction par un vecteur viral au sein de deux bactéries <sup>[18]</sup> .....	35
Figure 7 : Représentation du mécanisme de conjugaison au sein de deux bactéries <sup>[18]</sup> .....	36
Figure 8 : Représentation des différents mécanismes de résistance d'une bactérie <sup>[21]</sup> .....	36
Figure 9 : Représentation de la structure des aminoglycosides et de l'action des AMEs .....	37
Figure 10 : Mécanisme d'hydrolyse d'une pénicilline par une sérine $\beta$ -lactamase. ....	39
Figure 11 : Mécanisme d'hydrolyse d'une pénicilline par une métallo- $\beta$ -lactamase.....	40
Figure 12 : Représentation des 5 familles de pompes d'efflux bactériennes .....	42
Figure 13 : Structure de la pompe AcrAB/TolC <sup>[40]</sup> .....	43
Figure 14 : (a) Représentation des prescriptions d'antibiotiques en ville entre 2011 et 2021. (b) Représentation de la consommation d'antibiotiques au niveau européen <sup>[45]</sup> .....	44
Figure 15 : Incidence d'A. baumannii résistant aux carbapénèmes au niveau mondial .....	45
Figure 16 : Schéma récapitulatif de la préparation de la gélose pour un antibiogramme <sup>[52]</sup> .....	48
Figure 17 : Principe de la détermination de la CMI d'un antibiotique par la méthode de dilution en milieu liquide <sup>[54]</sup> .....	50
Figure 18 : Représentation des différents résultats possibles du TROD angine à streptocoques du groupe A .....	59
Figure 19 : Lecture des résultats de la bandelette urinaire dans le cas d'un dépistage d'infections urinaires. <sup>[72]</sup> .....	60
Figure 20: Représentation de la bandelette ETEST® BLSE permettant la détermination de la CMI. Ici, la CMI de la ceftazidime seule (TZ) est de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tandis que la CMI de la ceftazidime et de l'acide clavulanique (TZL) est de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[86]</sup> .....	66
Figure 21 : Représentation du principe du test colorimétrique ESBL NP® <sup>[87]</sup> .....	67
Figure 22 : Principe de l'immunodosage à flux latéral appliqué à la détection de $\beta$ -lactamases. Réalisé avec Biorender et adapté de Noster J. et al. <sup>[87]</sup> .....	70
Figure 23 : Principe du test LFIA-CTX ainsi que les deux résultats possibles obtenus après migration à travers la membrane de nitrocellulose <sup>[94]</sup> .....	72
Figure 24 : Principe du NG-Test® CTX-M-MULTI <sup>[96]</sup> .....	73
Figure 25 : Principe du test LFIA Rapidec ESC combinant les principes des tests LFIA CTX et le NG-Test® CTX-M-MULTI <sup>[97]</sup> .....	74
Figure 26 : Représentation des résultats pouvant être obtenus suite à l'utilisation du test LFIA Rapidec ESC <sup>[97]</sup> .....	75
Figure 27: Représentation des résultats du test AID Carbapenemase avec l'utilisation de plusieurs sondes et 3 contrôles : contrôle du conjugué, contrôle de l'amplification et contrôle de la bactérie pan 16S <sup>[105]</sup> .....	78
Figure 28: a) Principe du test RESIST-5 O.K.N.V.I : 1) Ajout de 12 gouttes de solution tampon dans un tube semi-rigide 2) Prélèvement de la colonie bactérienne avec une anse bactériologique 3) Agitation dans le tube 4) Insertion du compte-goutte au niveau du tube 5) Agitation pour homogénéiser la solution 6) Dépôt de trois gouttes au niveau des puits des cassettes 7) Lecture du résultat après 15 minutes. b) Représentation des résultats selon les deux cassettes <sup>[125]</sup> .....	85

Figure 29 : Représentation des résultats sous forme d'une carte dans l'application web Deeplex® [133]

..... 89

## Introduction générale

L'utilisation massive et répétée des antibiotiques a favorisé l'apparition de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques existants. Ces dernières sont reconnues comme une menace majeure pour la santé humaine puisqu'elles ont été responsables d'environ 4,95 millions de morts en 2019 dans le monde et les estimations prévoient 10 millions de décès annuels d'ici 2050. La perspective que le monde entre dans une ère post-antibiotique est une possibilité réelle. La propagation rapide de bactéries multi-résistantes, pour lesquelles l'arsenal thérapeutique est devenu limité, est particulièrement préoccupante. C'est pourquoi, j'ai décidé à travers ce manuscrit de me focaliser sur le développement et la place des tests de diagnostic dans cette lutte contre l'antibiorésistance.

Pour cela, ce manuscrit sera dédié dans un premier temps à la présentation des bactéries et l'arsenal thérapeutique dont nous disposons en France pour faire face aux infections. La notion d'antibiorésistance sera abordée à travers les mécanismes mis en jeu par la bactérie et ses enjeux au niveau mondial. Par la suite, les recommandations pour aider la prise en charge du patient et orienter le diagnostic, notamment à l'hôpital, seront détaillés avant d'aborder l'émergence des tests rapides de diagnostic en officine par le biais d'exemples. Enfin, des solutions pour orienter plus rapidement et efficacement le diagnostic seront détaillées grâce à l'utilisation de tests pour détecter directement le gène de résistance mis en cause.



# I. Les bactéries et le développement des antibiotiques

## A. Présentation des bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes vivants unicellulaires et sans noyau, caractéristiques des procaryotes, faisant partie du règne des eubactéries. Les premières observations du monde microbien remontent au XVII<sup>e</sup> siècle suite au développement de lentilles de microscope par le savant néerlandais Antoni Van Leeuwenhoek. Puisque les bactéries datent de plusieurs millions d'années, elles ont joué un rôle essentiel dans l'évolution de la vie sur Terre. Elles font aujourd'hui partie de l'environnement, à la fois marin et terrestre, et ne sont pas nécessairement pathogènes. En effet, nombre d'entre elles sont présentes à la surface de notre peau mais aussi au sein de notre microbiote intestinal et sont nécessaires au bon déroulement de notre système immunitaire, on parle de bactéries commensales. Toutefois, lorsque l'équilibre bactérie - hôte est dérégulé, la bactérie peut à terme provoquer une infection. Afin de contrer le développement de ces infections dues, à la fois à des bactéries directement pathogènes ou à celles qui le deviennent au cours de leur vie, il est nécessaire de pouvoir les traiter avec un traitement adapté.

Les avancées majeures en microbiologie ont permis de mieux comprendre le rôle des bactéries en santé humaine ainsi que leurs compositions. Une bactérie est constituée d'une enveloppe, d'un ADN chromosomique circulaire et unique au sein du cytoplasme et dans certains cas, la présence de plasmides, également appelé ADN extra-chromosomique, est observée. Ces bactéries sont également caractérisées par une paroi plutôt complexe souvent prolongée par la présence de flagelles. L'ensemble des constituants de la bactérie étant essentiel à sa survie, chacun peut devenir une cible pertinente pour les antibiotiques afin de les tuer ou de limiter la prolifération de celles-ci.

Pour introduire la problématique des bactéries et les cibles thérapeutiques potentielles, nous décrirons plus spécifiquement, à travers ce premier chapitre, les différents constituants des bactéries afin d'en exposer les cibles éventuelles puis dans un second temps, nous détaillerons les antibiotiques disponibles de nos jours.

### 1. L'enveloppe

L'enveloppe de la bactérie est une structure complexe et dynamique permettant d'assurer l'interaction avec les cellules voisines ainsi que la survie de la bactérie face au monde extérieur. Elle est constituée à minima d'une membrane cellulaire et d'une paroi.

Selon la structure de l'enveloppe, il est possible de distinguer trois types de bactéries : les bactéries Gram négatif, les bactéries Gram positif ainsi que les bactéries possédant une enveloppe atypique. Ces

dernières, comme les bactéries de l'ordre des *Mycobacteriales*, sont définies ainsi car difficilement interprétable par la technique classique de coloration de Gram, décrite ci-dessous.

i. Différenciation des bactéries à l'aide de la coloration de Gram

Les bactéries peuvent être groupées selon plusieurs classifications :

- La **classification de Linnée** qui permet de définir le règne, l'embranchement, la famille ainsi que l'espèce et le genre.
- La **classification en fonction de leur besoin en oxygène** afin de différencier les bactéries aérobies, anaérobies et les bactéries aéro-anaérobies facultatives.
- La **classification de Gram** qui permet de distinguer les bactéries Gram positif et négatif en fonction du résultat de la coloration.

Dans cette sous-partie, il sera décrit uniquement la classification en fonction de la coloration de Gram puisqu'elle reste la méthode de référence en laboratoire d'analyse microbiologique aujourd'hui.

L'enveloppe des bactéries Gram positif est constituée d'une membrane plasmique unique et d'une couche épaisse de peptidoglycane en contact direct avec le milieu extérieur, permettant le maintien de l'intégrité cellulaire. L'enveloppe des bactéries Gram négatif est, quant à elle, reconnaissable grâce à ces deux membranes lipidiques. En effet, elle possède une membrane interne et une membrane externe entourant le milieu périplasmique constitué d'une fine couche de peptidoglycane, ainsi qu'un polymère appelé lipopolysaccharide (LPS) au niveau de la membrane externe (Figure 1).<sup>[1]</sup>

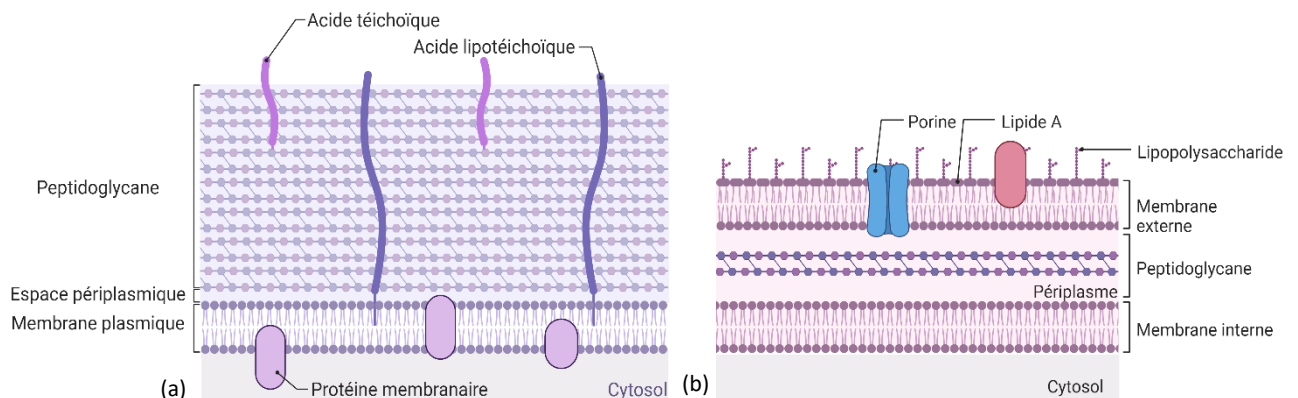


Figure 1 : (a) Représentation d'une bactérie Gram positif. (b) Représentation d'une bactérie Gram négatif. Réalisé avec Biorender

Cette différence au niveau de l'enveloppe de la bactérie peut donc être détectée par la technique de la coloration de Gram, mise au point par le bactériologiste danois Hans Christian Gram en 1884.<sup>[2]</sup> Pour cela, différentes étapes sont réalisées sur le prélèvement :

- Une première coloration par du cristal violet est effectuée pendant une minute

- Après un rinçage à l'eau, l'échantillon est recouvert d'une solution iodée ou de lugol
- Après une minute, le deuxième rinçage à l'eau est réalisé
- Une décoloration de la préparation est réalisée avec un mélange alcool/acétone
- Un troisième rinçage à l'eau est réalisé avant de recolorer l'échantillon par un contre-colorant : solution de safranine ou de fuchsine
- Un dernier lavage à l'eau suivi d'un séchage sur papier-filtre est réalisé pour l'examen microscopique

A la fin du test, une coloration en violet indique la présence de bactéries Gram positif alors qu'une coloration rose est caractéristique des bactéries Gram négatif. Cette différence de résultat s'explique par la différence d'épaisseur de la couche de peptidoglycane. En effet, dès la première étape de coloration, toutes les bactéries apparaissent en violet mais seules les bactéries possédant une fine couche de peptidoglycane peuvent être décolorées ensuite par le mélange alcool/acétone. En effet, l'alcool va extraire les lipides contenus dans la membrane externe des bactéries Gram négatif et ainsi augmenter la porosité de la paroi qui ne peut plus fixer le complexe violet-lugol conduisant à une décoloration de la bactérie capable d'être recolorées par la solution de safranine. Au contraire, la paroi des bactéries Gram positif étant caractérisée par une couche épaisse de peptidoglycane, elle est capable de retenir le complexe violet-lugol et de ce fait être moins sensible à la décoloration par l'alcool.<sup>[3]</sup>

## ii. Structure des membranes plasmiques bactériennes

### ➤ **Membrane externe**

La membrane externe des bactéries est composée d'une double couche de phospholipides ainsi que de glycolipides liés au peptidoglycane permettant de jouer le rôle de barrière. En effet, cette membrane permet de protéger la bactérie de l'entrée de composés néfastes tels que des sels biliaries, xénobiotiques, mais aussi de s'assurer du passage de petites molécules hydrophiles à travers des canaux OMP (*Integral Outer-membrane proteins*). A l'inverse, cette membrane permet également d'éviter la perte de composants depuis l'espace périplasmique vers l'extérieur.

Une des particularités des bactéries Gram négatif est la présence du lipopolysaccharide (LPS) au niveau de la membrane externe. Celui-ci joue un rôle indispensable tant d'un point de vue structurel que fonctionnel dans la perméabilité sélective de la paroi de la bactérie. Ce LPS est important pour la survie de la bactérie et peut être reconnu *via* les TLR-4 (Toll-like receptor 4) par les cellules immunitaires de l'hôte telles que les monocytes ou macrophages. Le LPS est ubiquitaire mais étant spécifique à chacune des bactéries, l'hôte peut alors adapter sa réponse en fonction de la bactérie. Toutefois, il est



également un facteur de virulence pour les bactéries pathogènes puisqu'il est capable de s'opposer aux défenses immunitaires de l'hôte infecté.<sup>[4,5]</sup>

Le LPS est constitué de trois parties distinctes : le lipide A, le noyau oligosaccharidique et l'antigène O (aussi appelé polysaccharide O). Tout d'abord, le lipide A est ancré dans la membrane cellulaire tandis que les sucres sont disposés sous forme de feuillets depuis la surface de la membrane externe. L'association des sous-unités oligosaccharidiques est générée de manière indépendante et c'est une fois entièrement synthétisé qu'il sera capable de venir s'attacher au lipide A pour obtenir le LPS (Figure 2).

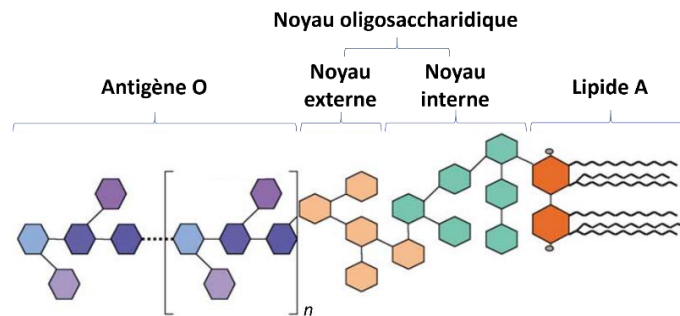


Figure 2 : Structure du lipopolysaccharide chez les bactéries Gram négatif<sup>[6]</sup>

Concernant la synthèse du LPS, celle-ci est réalisée dans le cytoplasme de la bactérie. D'une part, le lipide A est composé d'une structure disaccharidique D-GlcN-D-GlcN reliée par une liaison  $\alpha$  1-6. D'autre part, le noyau oligosaccharidique peut être divisé en deux : le noyau interne qui se lie au lipide A et le noyau externe qui se lie aux différentes unités de l'antigène O. Enfin, les unités variées du polysaccharide O sont assemblées par des glycosyltransférases conduisant à une région extrêmement variable chez les bactéries Gram négatif (Figure 2). Ce polymère situé sur la partie la plus externe du LPS est appelé antigène O puisqu'il est la partie ciblée par les anticorps de l'hôte, à l'origine de la réponse immunitaire. Toutefois, c'est le lipide A, majoritairement conservé chez les bactéries, qui est responsable de l'activité endotoxique du LPS, c'est pourquoi, suite à la réponse immunitaire de l'hôte, le lipide A peut être libéré et déclencher une réponse inflammatoire importante à l'origine, dans certains cas, d'un choc septique.<sup>[6]</sup>

### ➤ Membrane interne

La membrane interne des bactéries, constituée d'une double couche de phospholipides, est une barrière de perméabilité plus importante que la barrière constituée par la membrane externe vis-à-vis du passage d'ions ou de toutes autres molécules. Cet agencement dynamique regroupe la majorité des protéines extracellulaires telles que les lipoprotéines ainsi que les protéines intégrales qui passent à travers la membrane grâce à leurs domaines à hélice transmembranaire.

D'un point de vue fonctionnel, cette membrane interne est essentielle puisqu'elle est le siège de plusieurs mécanismes physiologiques tels que les mécanismes énergétiques (réaction de phosphorylation oxydative), la biosynthèse des lipides, la production des précurseurs de la paroi ou encore la sécrétion de protéines.

### iii. Structure de la paroi bactérienne

La paroi bactérienne est majoritairement constituée du peptidoglycane. Celui-ci est un hétéropolymère fortement réticulé présent à la surface de la membrane plasmique chez les bactéries Gram positif et entouré par les deux membranes chez les bactéries Gram négatif. Sa structure en réseau confère à la bactérie une certaine rigidité et joue un rôle dans le maintien de son intégrité cellulaire face à diverses modifications de pression osmotique.<sup>[7]</sup>

Chez les bactéries Gram négatif, ce peptidoglycane est représenté sous la forme d'une fine couche tandis qu'une couche épaisse est caractéristique d'une bactérie Gram positif. Il est représenté par un squelette de polysaccharide formé par l'alternance d'acide N-acétylmuramique (NAM) et de N-acétylglucosamine (NAG) reliés par des liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidique et de chaînes latérales d'acides aminés (Figure 3). Des ponts inter-peptidiques permettent à l'ensemble de ces chaînes d'être articulées. Chez les bactéries Gram positif, on retrouve dans ces diverses couches de peptidoglycane, les acides téichoïques et lipotéichoïques se liant aux NAM.<sup>[8]</sup>

La synthèse du peptidoglycane peut être résumée en 3 étapes :

- Une **étape cytoplasmique** pour la synthèse des précurseurs UDP-NAG et UDP-NAM-pentapeptide
- Une **étape membranaire** pour l'export de l'intermédiaire lipidique à la membrane
- Une **étape pariétale** pour l'allongement des chaînes de peptidoglycane et sa réticulation

Chez les bactéries Gram négatif, la biosynthèse du peptidoglycane débute par la formation de l'UDP-N-acétylglucosamine (UDP-NAG) à partir du fructose-6-phosphate. Puis, l'UDP-NAM (UDP-N-acétylmuramique) est obtenu à partir de l'UDP-NAG grâce à l'activité catalytique de l'enzyme *MurA*, qui transfère un groupement énoypyruvyle à partir du phosphoénolpyruvate. Différentes aminoacyl ligases vont ensuite ajouter de manière séquentielle des acides aminés à l'unité UDP-NAM de manière à obtenir un pentapeptide formé d'un tripeptide L-Ala-D-Glu-L-Lys ou acide diaminopimélique (DAP), et d'un dipeptide D-Ala-D-Ala. Ce pentapeptide est ajouté à l'unité UDP-NAM pour obtenir l'unité UDP-NAM-pentapeptide, également appelé Nucléotide de Park.<sup>[9,10]</sup>

Ensuite, le groupement phosphate de ce nucléotide est transféré sur un transporteur lipidique pour former le lipide I puis une molécule d'UDP-NAG est transférée sur le NAM-pentapeptide pour obtenir le précurseur de base : NAG-NAM-pentapeptide ou lipide II. L'ensemble est transféré à travers la

membrane grâce à l'action d'une flippase *MurJ*. Par la suite, la polymérisation du pentapeptide nécessite d'une part, l'action des transglycosidases de manière à former les différents brins de glycane et d'autre part, l'action des transpeptidases, comme les protéines liant la pénicilline (PBPs) pour former les liaisons peptidiques entre une L-Lys et l'avant dernière D-Ala d'une chaîne peptidique juxtaposée, à l'origine du peptidoglycane réticulé (Figure 3).<sup>[11]</sup>

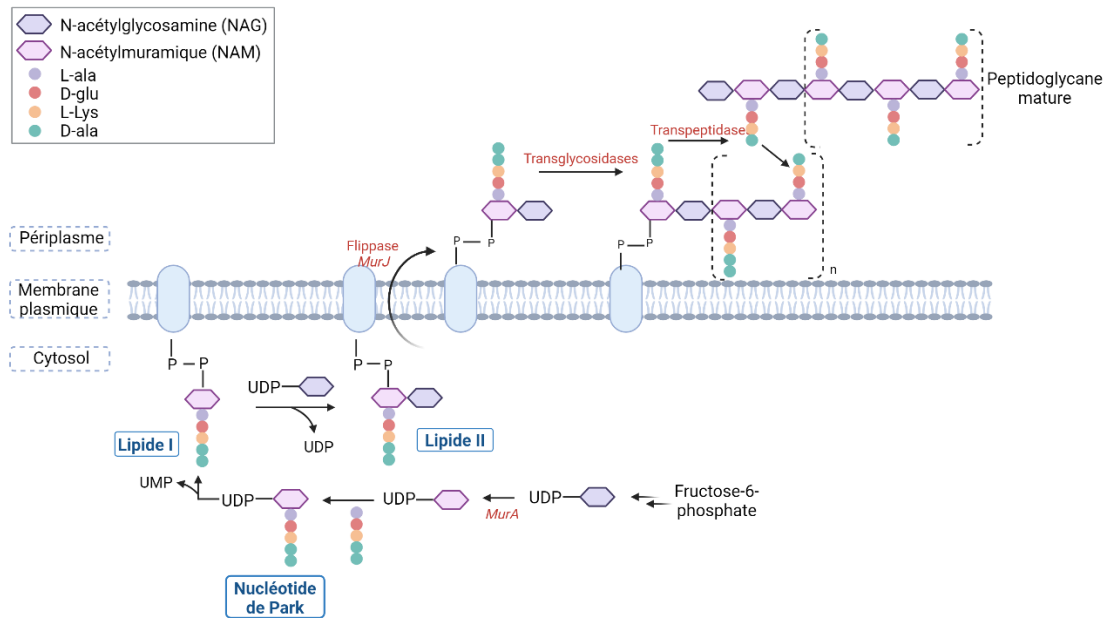


Figure 3 : Synthèse du peptidoglycane. Réalisé avec Biorender

## 2. Composition intracellulaire et extracellulaire de la bactérie

Après avoir décrit l'enveloppe de la bactérie, il est important de noter que le cytoplasme contient un ADN chromosomique unique circulaire. En effet, les bactéries possèdent un seul exemplaire de matériel génétique. Cependant, en plus de cet ADN génomique, les bactéries possèdent généralement un ou plusieurs plasmides, également appelés ADN extra-chromosomiques. Ces derniers pouvant être transmis à d'autres bactéries, ils sont souvent à l'origine de phénomène de résistance. De plus, de nombreux ribosomes, lieu essentiel à la synthèse protéique, sont retrouvés dans les cytoplasmes des bactéries.

D'un point de vue structurel, les bactéries et notamment les bacilles peuvent être allongés par des flagelles. Ces derniers sont des cils filamenteux prenant naissance au niveau de la membrane plasmique. Leur nombre peut varier entre 1 et 30 en fonction des espèces bactériennes. Ils sont composés de flagellines et sont essentiels à la mobilité des bactéries.<sup>[12]</sup>

De façon plus fréquente chez les bactéries Gram positif, des pili peuvent être observés à la surface des bactéries. On distingue deux types de pili :

- Les pili communs, plutôt courts et nombreux, jouant un rôle dans l'adhérence aux différentes muqueuses.
- Les pili sexuels, plus long et moins nombreux, ayant un rôle dans le phénomène de conjugaison lorsque les bactéries échangent leur matériel génétique.

De plus, une capsule peut être retrouvée de manière facultative chez certaines bactéries, c'est notamment le cas chez *Klebsiella pneumoniae*. Cette dernière permet de protéger la bactérie contre l'environnement et contre une réponse du système immunitaire de l'hôte.

## B. Le développement des antibiotiques

### 1. Historique des antibiotiques

Les médicaments visant à soigner les maladies infectieuses sont reconnus comme étant la plus grande avancée en médecine humaine du XX<sup>e</sup> siècle mais pour autant, les premières préparations pharmaceutiques sont beaucoup plus anciennes. En effet, il y a plus de 2500 ans, des préparations de soja moisi ont démontré des propriétés thérapeutiques en Chine, tout comme l'utilisation de moisissures en Ancienne Egypte et Grèce qui ont prouvé leur efficacité sur des plaies infectées. <sup>[13]</sup>

A la suite d'étude sur les agents microbiens, Louis Pasteur conclut en 1877 que les animaux ne développaient aucun signe de maladie lors de l'injection concomitante du bacille d'anthrax (*Bacillus anthracis*) et de bactéries non pathogènes.<sup>[14]</sup> Cette notion a ensuite été définie sous le terme de « antibiose » pour décrire la substance active d'un organisme permettant de combattre certaines maladies et également capables de tuer les autres organismes pour se protéger lui-même.

Toutefois, le terme « antibiotique », décrit comme étant une substance qui conduit à la mort du pathogène a quant à lui été introduit une première fois en 1871. C'est en 1889 que Rudolf Emmerich et Oscar Löw développent le premier antibiotique utilisé dans les hôpitaux : la pyocyanase. Ce médicament, extrait du *Bacillus pyocyaneum*, a démontré des propriétés thérapeutiques en induisant la mort du bacille de la diphtérie et des germes de streptocoques en dix minutes ainsi que celle du bacille de la typhoïde et des staphylocoques en vingt-quatre heures.

Grâce aux progrès en médecine et face aux ravages liés aux maladies infectieuses telles que la syphilis ou la tuberculose, les scientifiques commencent dès les années 1900 à se pencher sur le sujet des

pathologies infectieuses. En effet, Paul Erlich, a découvert le Salvarsan®, médicament dérivé de l'arsenic, en 1910, devenant ainsi le traitement de référence contre la syphilis.

C'est en 1928 qu'Alexander Fleming, bactériologiste britannique, découvre et identifie la pénicilline. En effet, il se rend compte à son retour de vacances, que ses cultures de staphylocoques ont été contaminées par le champignon *Penicillium notatum*. Il remarque que les bactéries ne se développent plus à l'endroit où le *Penicillium* prolifère et émet l'hypothèse que ce dernier synthétise une substance qui bloque le développement de la bactérie. C'est alors que naît la pénicilline, substance responsable de ce phénomène. Il a fallu attendre 1940 pour qu'Howard Florey et Ernst Boris Chain donne suite à cette découverte pour isoler la pénicilline qui est toutefois très faible en quantité pour un usage en clinique. De ce fait, une nouvelle levure, le *Penicillium chrysogenum*, qui produit jusqu'à deux cent fois plus de pénicilline, est isolée et purifiée pour permettre une production à grande échelle et faire de cette molécule, un antibiotique majeur pour traiter les soldats pendant la Seconde Guerre Mondiale.<sup>[15]</sup>

Par la suite, en 1935, un biochimiste allemand, Gerhard Domagk, synthétise le sulfamidochrysoïdine connu sous le nom de Prontosil® pour traiter des maladies qui étaient jusqu'à ce jour mortelles. Ce composé de la famille des sulfamides démontre une activité antibactérienne et devient le premier antibiotique produit par hémisynthèse, suivi par de nombreuses autres classes d'antibiotiques développées au milieu du XX<sup>e</sup> siècle.<sup>[16]</sup>

C'est en 1942 à la suite des travaux de Selman Waksman que le terme « antibiotique » est entré dans le langage courant scientifique, on parle de l'âge d'or des antibiotiques. Ces derniers sont définis comme désignant l'ensemble des molécules qui permettent de tuer ou d'inhiber la prolifération des bactéries, on parle alors d'antibiotiques à effet bactéricide ou bactériostatique.

Après plus d'un siècle, nous possédons à ce jour un large éventail thérapeutique pour lutter contre les infections bactériennes en France. C'est pourquoi, dans la suite de ce chapitre, les différentes classes d'antibiotiques seront explicitées selon leur mode d'action, de façon à exposer l'arsenal thérapeutique dont nous disposons aujourd'hui.

## 2. Arsenal thérapeutique disponible en France

L'ensemble des constituants essentiels à la bactérie peuvent être ciblés, ce qui nous permet de regrouper les médicaments actuels selon différentes classes en fonction de leur mode d'action (Figure 4).

On retrouve notamment :

- Les médicaments qui ciblent la synthèse de l'**enveloppe bactérienne**
  - Soit en inhibant la synthèse du peptidoglycane au niveau de la paroi, c'est le cas de la grande famille des  $\beta$ -lactamines, des glycopeptides ainsi que de la fosfomycine.
  - Soit en désorganisant les membranes, c'est le cas des lipopeptides et les polymyxines.
- Les médicaments qui se lient au ribosome bactérien pour inhiber la **synthèse protéique**, c'est le cas des aminosides, des tétracyclines, des macrolides, des phénicolés, de l'acide fusidique ou encore des oxazolidinones.
- Les médicaments qui ciblent l'**ADN bactérien**, c'est le cas, d'une part, des fluoroquinolones ainsi que des sulfamides antibactériens qui mènent à un arrêt de la réplication de l'ADN, et d'autre part, des 5-nitro-imidazolés qui conduisent à une destruction de l'ADN.

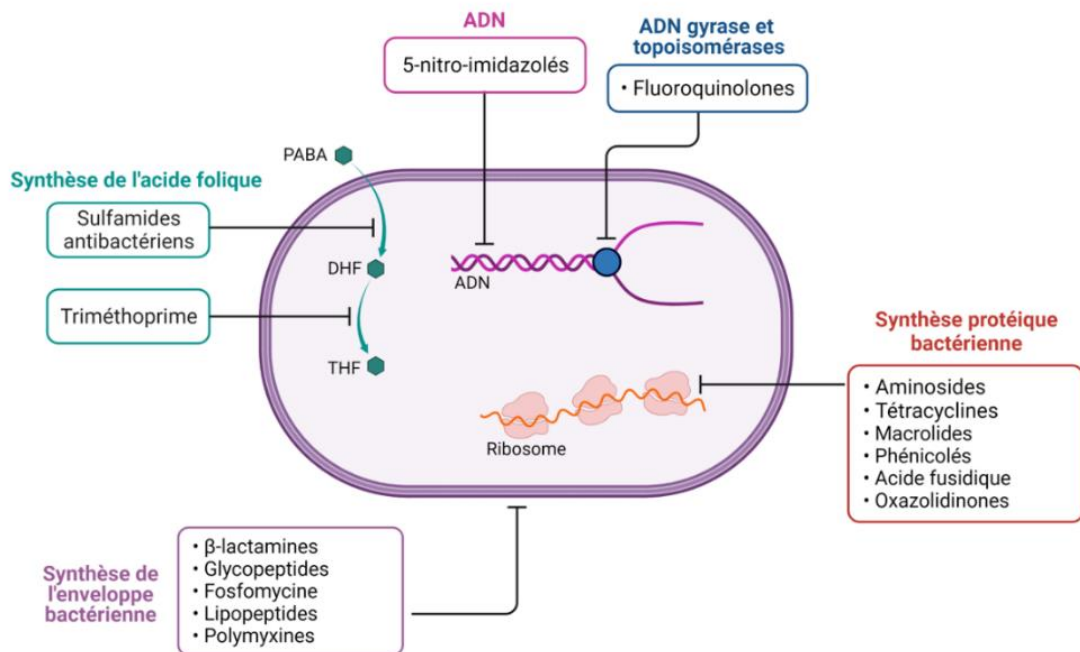


Figure 4 : Représentation des familles thérapeutiques et leurs cibles. Réalisé avec Biorender.

En France, les antibiotiques peuvent être divisés en quatorze grandes familles qui diffèrent selon leur mode d'action. L'ensemble de l'arsenal thérapeutique aujourd'hui disponible est représenté dans le Tableau 1 ci-dessous. La majorité des antibiotiques sont bactéricides à l'exception des sulfamides, cyclines et macrolides qui eux sont bactériostatiques c'est-à-dire qu'ils conduisent à un arrêt de la prolifération des bactéries.

Tableau 1 : Représentation des différents antibiotiques actuellement sur le marché en France répartis selon leur cible et leur famille.

Cible	Famille	Sous-famille	Molécules (DCI) sur le marché en France	
Inhibiteurs de la synthèse des enveloppes bactériennes	β-lactamines	Pénicillines	Pénicillines A	<i>Amoxicilline, Ampicilline</i>
			Pénicilline G	<i>Benzylpénicilline sodique</i>
			Pénicilline V	<i>Oracilline</i>
			Pénicilline M	<i>Oxacilline, Cloxacilline</i>
			Carboxypénicillines	<i>Ticarcilline, Témocilline</i>
			Uréidopénicilline	<i>Pipéracilline</i>
			Amidinopénicilline	<i>Pivmécillinam</i>
		Céphalosporines	C1G	<i>Céfadroxil, Céfradine, Céfazoline, Céfalotine, Céfaclor, Céfalexine</i>
			C2G	<i>Céfuroxime, Céfamandole, Céfoxitine</i>
			C3G	<i>Céfixime, Cefpodoxime, Céfodiam, Ceftriaxone, Ceftazidime, Céfotaxime</i>
			C4G	<i>Céfépime</i>
			C5G	<i>Ceftaroline, Ceftobiprole</i>
		Carbapénèmes	<i>Imipénèm + Cilastatine, Méropénèm, Ertapénèm</i>	
		Monobactame	<i>Aztréonam</i>	
		Glycopeptides	<i>Teicoplanine, Vancomycine, Dalbavancine</i>	
Fosfomycine	<i>Fosfomycine trométamol</i>			
Lipopeptides	<i>Daptomycine</i>			
Polymyxines	<i>polymyxine E ou Colistine, polymyxine B</i>			

<b>Inhibition de la synthèse protéique</b>	Tétracycline	<i>Minocycline, Doxycycline, Lymécycline, Chlortétracycline, Méthylèncycline, Tigécycline</i>
	Aminosides	<i>Amikacine, Gentamicine, Tobramycine, Streptomycine, Néomycine, Nétilmicine, Spectinomycine</i>
	Macrolides	<i>Erythromycine, Clarithromycine, Roxithromycine, Azithromycine, Spiramycine, Josamycine</i>
	Phénicolés	<i>Chloramphénicol</i>
	Acide fusidique	<i>Acide fusidique</i>
	Oxazolidinones	<i>Linézolide, Tédizolide</i>
<b>Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques</b>	Fluoroquinolones	<i>Norfloxacin, Ofloxacin, Lévofoxacin, Ciprofloxacine, Moxifloxacine, Péfloxacin, Loméfloxacine, Enoxacin</i>
<b>Inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique</b>	Sulfamides antibactériens	Sulfadiazine, Sulfaméthizol, Sulfafurazole + Erythromycine, Sulfaméthoxazole + Triméthoprim (Cotrimoxazole)
<b>Destructeurs de l'ADN bactérien</b>	5-nitroimidazolés	<i>Métronidazole, Ornidazole, Tinidazole, Secnidazole</i>



Pour conclure ce chapitre, l'ensemble des molécules thérapeutiques dont nous disposons aujourd'hui ont permis de répondre à un grand nombre d'infections mais peuvent désormais échapper aux bactéries. En effet, ces dernières ont développé des propriétés leur permettant de contrer l'action du médicament, à l'origine d'un phénomène inquiétant appelé antibiorésistance.

## II. L'antibiorésistance

L'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques est reconnue comme étant un réel problème de santé publique. C'est pourquoi, dans ce deuxième chapitre seront étudiés les différents mécanismes à l'origine de ce phénomène puis dans un second temps, la notion d'antibiorésistance sera illustrée par les conséquences observées en France et dans le monde.

### A. Les différents mécanismes de résistance

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine d'une résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Dans un premier temps, la distinction entre résistance innée et acquise sera explicitée suivie dans un second temps de la présentation des différents mécanismes de résistance existants chez les bactéries.

#### 1. Les résistances innées et acquises

Tout d'abord, on parle de résistance innée lorsque l'ensemble des souches d'une même espèce bactérienne sont naturellement résistantes à un antibiotique. Par exemple, la classe des polymyxines est inactive sur les bactéries Gram positif puisqu'elle cible le lipide A du LPS, présent uniquement chez les bactéries Gram négatif.

Dans d'autres cas, des bactéries peuvent développer, au cours de leur vie, une résistance à un antibiotique donné, on parle de résistance acquise. Pour cela, les bactéries peuvent subir des mutations aléatoires à un endroit quelconque de leur génome et une des mutations peut être à l'origine de la résistance à l'antibiotique. Ainsi, l'antibiotique peut tuer les bactéries dites sensibles c'est-à-dire ne présentant pas la mutation et seules les bactéries présentant la mutation vont survivre. Ceci est favorisé lorsque l'emploi d'un antibiotique est inadapté, on parle alors de pression de sélection par l'antibiotique. Les bactéries résistantes peuvent ensuite se répliquer conduisant à la dispersion des gènes de résistance soit par transfert vertical à la génération future de bactérie soit par transfert horizontal à d'autres agents pathogènes. La bactérie dite receveuse acquiert de nouvelles fonctions lui permettant de s'adapter à son environnement, participant alors à l'évolution de la biodiversité mais non sans impacts sur la santé.

Le transfert horizontal de gènes peut être défini selon trois grands mécanismes : transformation, conjugaison et transduction.<sup>[17]</sup> Même si le transfert de gènes par transduction ou transformation semble être moins fréquent que la conjugaison, ils ne doivent pas être négligés dans la propagation rapide de la résistance aux antibiotiques.

### ➤ Transformation

Dans le cas présent, les bactéries ayant développé un état de compétence peuvent introduire dans leur génome de l'ADN extracellulaire nu depuis l'environnement (Figure 5). En effet, l'ADN incorporé est souvent originaire d'une mort cellulaire ou de l'excrétion de cellules vivantes et peut être considéré comme une source de nutriments. Les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être intégrés dans le chromosome ou le plasmide de la bactérie receveuse. Les bactéries du genre *Haemophilus*, *Neisseria*, *Helicobacter* ou encore *Streptococcus* sont par exemple capable d'effectuer la transformation.

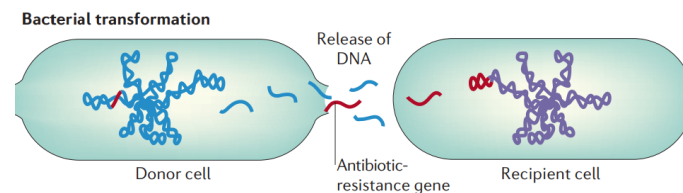


Figure 5 : Représentation du mécanisme de transformation au sein de deux bactéries <sup>[18]</sup>

### ➤ Transduction

Le phénomène de transduction est quant à lui médié par l'intermédiaire d'un virus. Les gènes de résistance aux antibiotiques transférés d'une bactérie à une autre *via* des bactériophages peuvent être intégrés dans le chromosome de la bactérie receveuse (Figure 6).<sup>[19]</sup>

En effet, une bactérie peut être infectée par un phage et intégrera une copie de l'ADN viral au sein de son génome. Ce dernier sera ensuite incorporé dans la capside du bactériophage. De ce fait, lorsque le phage va se lier à une cellule receveuse, il pourra transmettre cet ADN viral recombiné qui sera incorporé dans le génome de cette cellule et transféré de nouveau à une autre cellule.

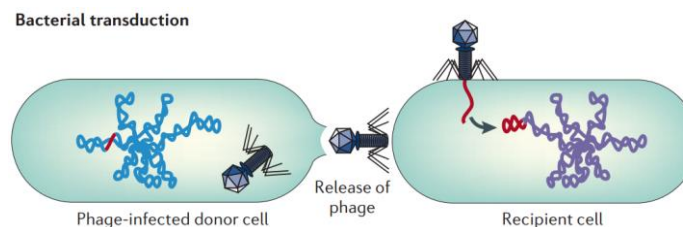


Figure 6 : Représentation du mécanisme de transduction par un vecteur viral au sein de deux bactéries <sup>[18]</sup>

## ➤ Conjugaison

Le mécanisme de conjugaison concerne l'acquisition de matériel génétique *via* des contacts cellule-cellule grâce aux pili sexuels, généralement d'une même espèce. Il fait appel à des éléments génétiques mobiles tels que des plasmides afin de partager l'information génétique. En effet, une bactérie donneuse reconnaît une bactérie receveuse et peut lui transmettre un des deux brins de son ADN plasmidique *via* le pilus sexuel. Puis, les brins complémentaires sont synthétisés pour chacune d'elles et l'ADN se retrouve de nouveau sous sa forme circulaire (Figure 7). Ce phénomène de conjugaison étant stimulé par les antibiotiques, il est une des sources majoritaires de dissémination de résistance dans des environnements où les antibiotiques sont fréquemment utilisés tels que l'hôpital.

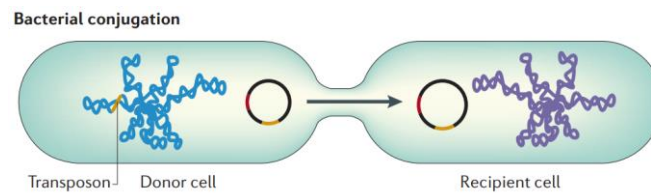


Figure 7 : Représentation du mécanisme de conjugaison au sein de deux bactéries <sup>[18]</sup>

Ainsi, que ce soit *via* un transfert de plasmide ou par mutation chromosomique, l'ensemble de ces phénomènes confère à la bactérie un avantage sélectif.<sup>[20]</sup> Ces deux procédés permettent à la bactérie de développer une résistance aux antibiotiques *via* quatre principaux mécanismes (Figure 8) : l'inactivation de l'antibiotique par la production d'enzymes, la modification de la cible de l'antibiotique, le changement de la perméabilité de la paroi et enfin l'efflux de l'antibiotique. La suite de cette partie abordera différents exemples illustrant ces mécanismes de résistance.

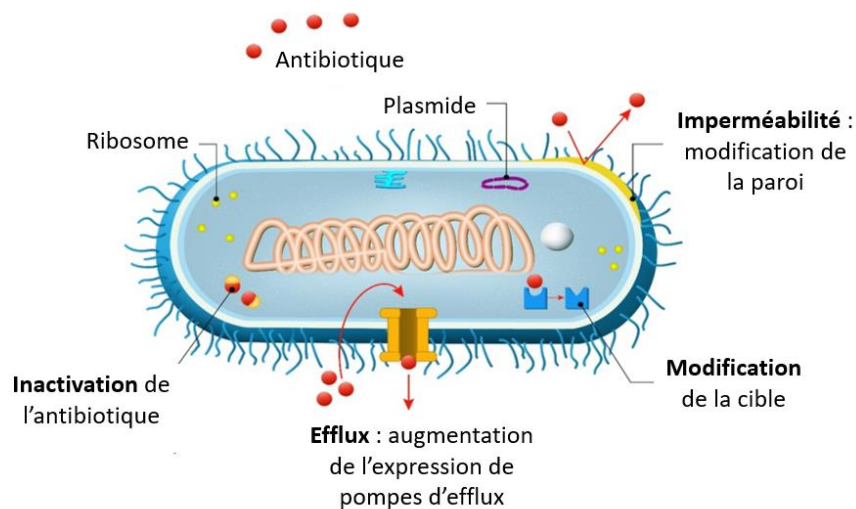


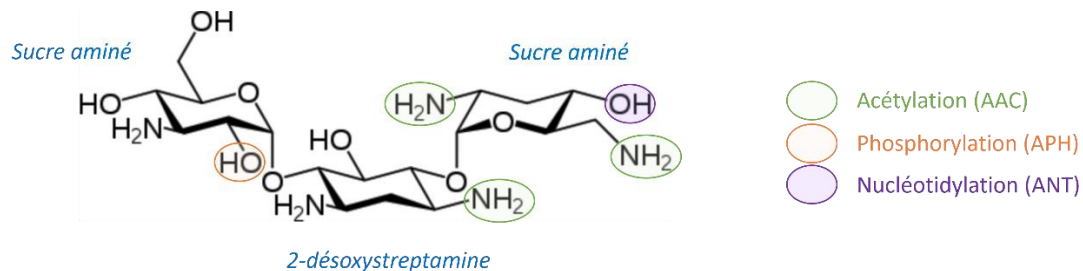
Figure 8 : Représentation des différents mécanismes de résistance d'une bactérie <sup>[21]</sup>

## 2. Inactivation de l'antibiotique

Tout d'abord, un des mécanismes de résistance mis en place par les bactéries est la production d'enzymes capables d'inactiver le médicament. Ceci peut être réalisé de deux façons différentes : soit en ajoutant un groupement chimique à la structure du médicament soit par destruction de l'antibiotique, le rendant de ce fait inactif.<sup>[22]</sup> Ce mécanisme de résistance étant majeur, deux exemples seront détaillés : les enzymes modifiant les aminoglycosides et les  $\beta$ -lactamases.

La production d'enzymes pouvant introduire une nouvelle fonction chimique au sein de la molécule est un moyen de résistance retrouvé à la fois chez les bactéries Gram positif et Gram négatif. On retrouve notamment ce phénomène pour les antibiotiques ciblant la synthèse des protéines, c'est le cas des aminoglycosides. En effet, les bactéries peuvent produire des enzymes modifiant les aminoglycosides (aminoglycoside modifying enzymes - AMEs) pouvant changer de manière irréversible la fonction hydroxyle ou amine du noyau 2-déoxystreptamine ou des sucres retrouvés dans la structure des aminoglycosides (Figure 9).<sup>[23]</sup> Elles sont classées selon leur activité biochimique en trois groupes :

- **AAC** : aminoglycoside acétyltransférases : permet l'acétylation des groupes amino ( $-NH_2$ ) de l'antibiotique grâce à l'acétyl CoA
- **ANT** : aminoglycoside nucléotidyltransférases : permet de transférer un groupement AMP à partir de l'ATP sur le groupement hydroxy ( $-OH$ ) de l'antibiotique
- **APH** : aminoglycoside phosphotransférases : permet d'ajouter un groupement phosphate à l'antibiotique.



*Figure 9 : Représentation de la structure des aminoglycosides et de l'action des AMEs*

Le groupement ajouté permet un encombrement stérique, de ce fait, l'antibiotique ne peut plus se lier à la sous-unité 30S du ribosome, il perd donc son activité antibactérienne. Il est important de noter que ces AMEs sont codées sur des plasmides et sont de ce fait à l'origine d'une propagation rapide de la résistance au sein des bactéries.

Dans certains cas, des AMEs à activité biochimique différente peuvent s'assembler pour donner, à terme, un haut niveau de résistance à la grande majorité des aminoglycosides, c'est le cas de l'enzyme

bifonctionnelle AAC(6')APH(2'') retrouvée chez *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*.<sup>[24,25]</sup> Celle-ci est capable d'inactiver la gentamicine par une phosphorylation de l'hydroxyle en position 2'' et est aussi capable d'inactiver tous les autres aminoglycosides à l'exception de la streptomycine par une acétylation de l'hydroxyle en position 6'.

Les bactéries peuvent également produire des enzymes capables d'hydrolyser l'antibiotique, le rendant inactif, c'est le cas des  $\beta$ -lactamases. Ces enzymes ciblent les antibiotiques de la grande famille des  $\beta$ -lactamines capable de bloquer la synthèse du peptidoglycane par inhibition des PBPs (Penicillin Binding Proteins).<sup>[26]</sup> Elles sont généralement codées sur les chromosomes ou sur des éléments génétiques mobiles, à l'origine de leur dissémination très rapide. Ces dernières sont divisées en quatre classes (A, B, C et D) selon la classification d'Ambler (Tableau 2) et peuvent cliver le cycle  $\beta$ -lactame caractéristique de la famille des  $\beta$ -lactamines.<sup>[27,28]</sup> Ces quatre classes de  $\beta$ -lactamases peuvent être divisées en deux sous-groupes : les sérines  $\beta$ -lactamases (SBL) pour les classes A, C et D et les métallo- $\beta$ -lactamases (MBL) regroupant les enzymes de classe B.

Tableau 2 : Classification d'Ambler des  $\beta$ -lactamases ainsi que leurs substrats et exemples. BLSE:  $\beta$ -lactamases à spectre étendu.

Classification d'Ambler	Substrats	Exemples
<b>A (sérine-<math>\beta</math>-lactamases)</b>	Pénicillines et céphalosporines à spectre étroit	Pénicillinase : TEM-1, TEM-2, SHV-1
	Pénicillines et céphalosporines	BLSE : CTX-M, TEM-3, TEM-4, TEM-24, TEM-52
	Pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes	Carbapénèmases : KPC
<b>B (métallo-<math>\beta</math>-lactamases)</b>	Toutes les $\beta$ -lactamines sauf les monobactams	Carbapénèmases : IMP, VIM, NDM
<b>C (sérine-céphalosporinases)</b>	Céphalosporines	BLSE : AmpC plasmidiques
<b>D (sérine-oxacillinases)</b>	Pénicillines	BLSE : OXA-11
	Carbapénèmes	Carbapénèmases : OXA-23, OXA-48

### ➤ Les sérines $\beta$ -lactamases

Les sérines  $\beta$ -lactamases caractérisées par un résidu sérine au niveau de leur site catalytique sont les enzymes les plus répandues au sein des bactéries. D'un point de vue mécanistique, le groupement hydroxyle (-OH) de la sérine attaque le cycle  $\beta$ -lactame pour former un intermédiaire tétraédrique. Par la suite, les électrons au niveau de l'oxygène vont se rabattre vers le carbone et permettre la rupture de la liaison C-N et la formation d'un acyl-enzyme. Enfin, l'hydrolyse par une molécule d'eau permet de libérer d'une part l'enzyme et d'autre part la  $\beta$ -lactamine non active sous forme d'acide (Figure 10).

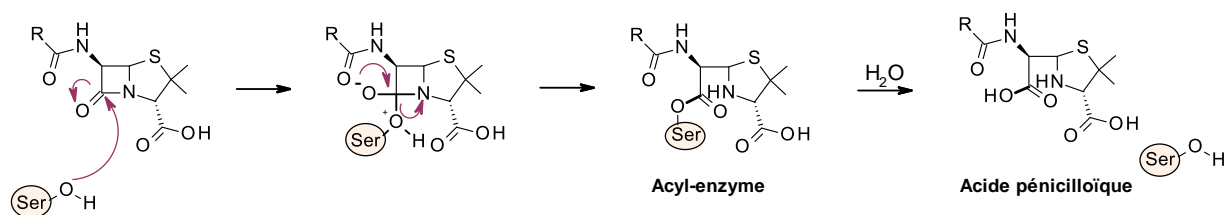


Figure 10 : Mécanisme d'hydrolyse d'une pénicilline par une sérine  $\beta$ -lactamase.

Les enzymes de classe A sont largement répandues à travers le monde en réponse à leur spectre d'activité large incluant des pénicillinases (notamment TEM-1, largement étudié), des céphalosporinases, des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) telles que CTX-M et des carbapénèmases telles que KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapénémase). Il est important de noter que la production de BLSE codée sur un plasmide est le principal mécanisme de résistance aux céphalosporines à la fois chez *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Les  $\beta$ -lactamases de classe C tels que AmpC hydrolysent préférentiellement les céphalosporines, c'est pourquoi on parle spécifiquement de sérine-céphalosporinases. Même si la majorité des BLSE fait partie de la classe A, plusieurs oxacillinases (OXA) ayant des propriétés semblables sont considérées comme des  $\beta$ -lactamases de classe D. Les enzymes OXA et leurs variants sont caractérisées par leur capacité à hydrolyser les  $\beta$ -lactamines avec une activité hydrolytique plus élevée pour l'oxacilline (pénicilline M). Ces dernières sont particulièrement retrouvées chez *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) mais également chez des Entérobactérales telles que *E. coli*, *K. pneumoniae*. Enfin, seules les enzymes de classe A peuvent être inhibées par des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases tels que l'acide clavulanique ou le tazobactam.<sup>[28]</sup>

### ➤ Les métallo- $\beta$ -lactamases

Les enzymes de classe B sont des métallo- $\beta$ -lactamases (MBL) capables d'hydrolyser le cycle  $\beta$ -lactame en passant par un intermédiaire stabilisé par un atome de zinc présent au niveau du site catalytique, comme le montre la Figure 11.<sup>[29]</sup>

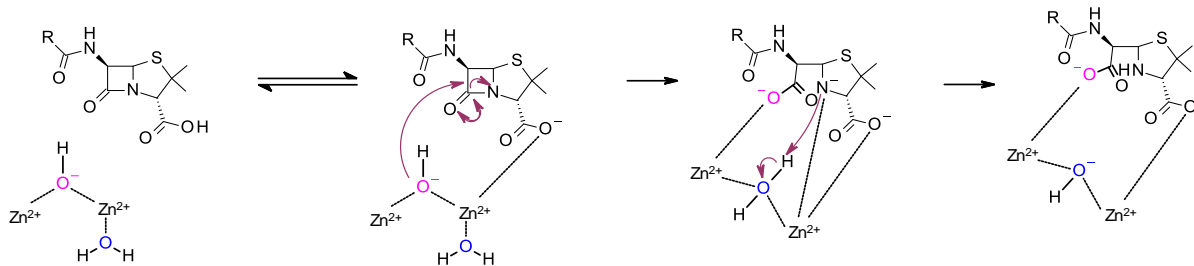


Figure 11 : Mécanisme d'hydrolyse d'une pénicilline par une métallo-β-lactamase

Ces β-lactamases de classe B sont actives contre les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes mais pas les monobactams. Elles étaient initialement codées par des gènes retrouvés chez des bactéries non-pathogènes mais très vite, ces gènes se sont retrouvés chez de nombreuses bactéries pathogènes, à l'origine d'une résistance à plusieurs familles d'antibiotiques. Il existe une dizaine de MBL dont majoritairement les trois familles suivantes : IMP, VIM et NDM. Les enzymes VIM et IMP sont les plus répandues et sont retrouvées chez *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) ainsi que chez les Entérobactérales. Elles sont encodées par des plasmides ce qui favorise leur dissémination chez d'autres espèces bactériennes. Enfin, il n'existe à ce jour aucun inhibiteur de métallo-β-lactamases sur le marché.

### 3. Modification de la cible

Un autre mécanisme de résistance développé par les bactéries est la modification de la cible de l'antibiotique dans le but d'empêcher son interaction avec l'antibiotique selon deux mécanismes : soit en modifiant directement le site de liaison, soit en protégeant la cible en déplaçant l'antibiotique du site de liaison.

Dans un premier temps, une mutation au niveau de la cible peut conduire à un phénomène de résistance, c'est notamment le cas pour les résistances aux fluoroquinolones. Ces médicaments altèrent la réplication de l'ADN en se liant à GyrA au niveau de l'ADN gyrase et à ParC retrouvé au sein de la topoisomérase IV. Ils se lient à des acides aminés très conservés tels qu'une sérine pour l'ADN gyrase et un acide glutamique pour la topoisomérase IV.<sup>[30,31]</sup> Ainsi, des mutations dans les gènes *gyrA* ou *parC* peuvent entraîner des substitutions d'acides aminés modifiant ainsi la structure de la cible. Toutefois, il est intéressant de noter que des mutations au niveau de la cible secondaire sont possibles uniquement si une mutation affecte la cible primaire. Par exemple, des mutations dans *gyrA* en plus de mutations dans *parC* chez *S. aureus* peuvent être observées, conduisant à des isolats hautement résistants. Ainsi, ces mutations affectent l'affinité des fluoroquinolones pour l'ADN gyrase et/ou la topoisomérase IV menant ainsi à une résistance à cette famille d'antibiotiques.

Dans un second temps, la bactérie peut déplacer l'antibiotique de sa cible pour la protéger. Ce mécanisme de résistance est communément retrouvé pour les antibiotiques ciblant la synthèse protéique au niveau du ribosome. C'est le cas des deux protéines Tet(M) et Tet(O) jouant un rôle crucial dans la résistance aux tétracyclines.<sup>[32]</sup> Elles sont codées par des éléments génétiques mobiles et sont donc facilement distribuées chez de nombreuses espèces bactériennes. Elles agissent comme homologues des facteurs d'élongation (EF-G) retrouvés lors de la synthèse des protéines. Pour cela, elles se lient au ribosome, ce qui induit une modification de conformation, rendant impossible l'interaction des tétracyclines avec leur site de liaison. Ainsi, ces protéines se substituent à la place des tétracyclines de manière compétitive permettant une reprise de la synthèse protéique bactérienne.<sup>[33]</sup>

#### 4. Diminution de la perméabilité membranaire

La bactérie peut également modifier la perméabilité membranaire grâce à des porines présentes à sa surface. Ce mécanisme est majoritairement retrouvé chez les bactéries Gram négatif limitant l'entrée du médicament à travers la membrane externe. Ce sont notamment les antibiotiques hydrophiles, comme les  $\beta$ -lactamines, tétracyclines et les fluoroquinolones qui sont particulièrement affectés par ce changement de perméabilité puisqu'ils utilisent généralement des canaux pour faciliter leur passage à travers la membrane externe.<sup>[34]</sup> C'est pourquoi, *Pseudomonas* est peu sensible aux  $\beta$ -lactamines suite à un changement ou une diminution de l'expression de porines à la surface de leur membrane externe.<sup>[35]</sup>

La perméabilité membranaire peut décroître à la suite de différents mécanismes d'altération des porines : un changement du type de porine, une expression diminuée des porines ou une modification de la fonction des porines.<sup>[36]</sup>

Plusieurs porines sont décrites dans la littérature, notamment OmpF, OmpC et PhoE responsables de résistance chez *E. coli* mais également OprD chez *P. aeruginosa* conduisant à une paroi imperméable à l'entrée des carbapénèmes.

#### 5. (Sur)expression de pompes d'efflux

Enfin, le dernier mécanisme de résistance d'une bactérie consiste en la réduction de la concentration intracellulaire des antibiotiques par expression et surexpression de pompes d'efflux.

En effet, les pompes d'efflux sont des protéines membranaires de transport, naturellement présentes chez la bactérie, qui permettent l'expulsion de substrats toxiques (métaux lourds, sels biliaries, xénobiotiques...) et de déchets métaboliques endogènes depuis l'espace périplasmique vers l'extérieur



de la bactérie.<sup>[37]</sup> Elles sont classées en cinq familles selon leur mode d'action et leur structure (Figure 12). On distingue les transporteurs ABC (ATP-Binding-Cassette), les transporteurs MATE (Multidrug And Toxic Compound Extrusion), les transporteurs MFS (Major Facilitator Superfamily), les transporteurs SMR (Small Multidrug Resistance) ainsi que les transporteurs RND (Resistance-Nodulation cell Division).

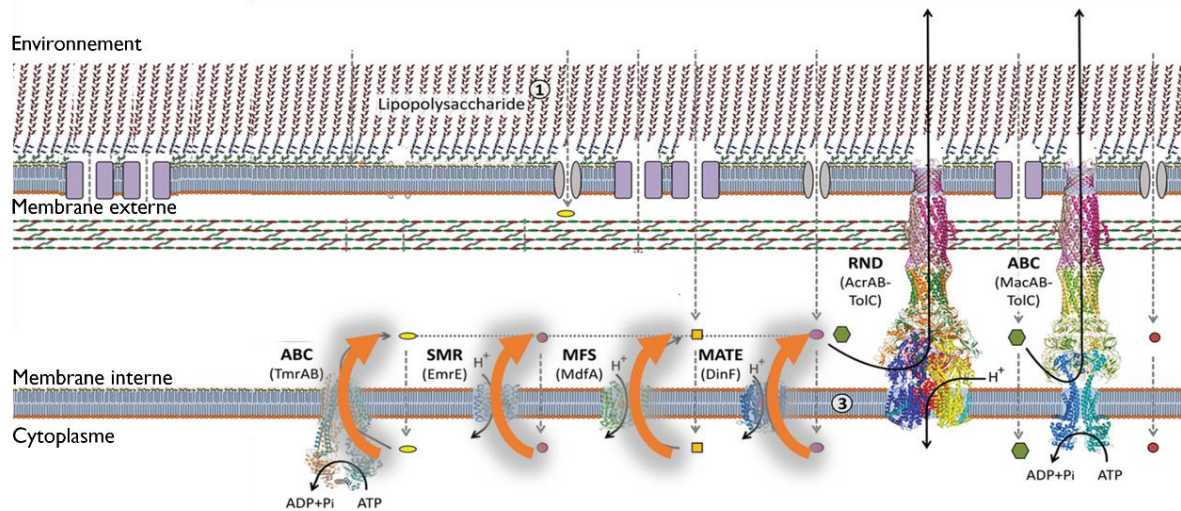


Figure 12 : Représentation des 5 familles de pompes d'efflux bactériennes

Ces protéines peuvent conférer à la bactérie une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques, c'est le cas des pompes d'efflux des macrolides « Mef » chez *Streptococcus pneumoniae*.<sup>[38]</sup> D'autre part, la pompe d'efflux « Tet » de la famille MFS reconnaît spécifiquement les tétracyclines. Celle-ci traverse uniquement la membrane interne, c'est pourquoi, elle peut être retrouvée à la fois chez les bactéries Gram négatif et positif.<sup>[39]</sup>

Toutefois, la plupart des pompes d'efflux sont responsables de multirésistance car elles sont capables de prendre en charge plusieurs familles d'antibiotiques de structures chimiques très différentes. C'est le cas des pompes de la famille RND, telle que AcrAB/TolC retrouvée chez les Entérobactérales comme *E. coli* et *K. pneumoniae*.<sup>[40]</sup> Cette pompe d'efflux est uniquement présente chez les bactéries Gram négatif en raison de sa structure tripartite comprenant (Figure 13) :

- Une pompe d'efflux (AcrB) au niveau de la membrane interne
- Une porine (TolC) au niveau de la membrane externe
- Une protéine de fusion (AcrA) au niveau de l'espace périplasmique

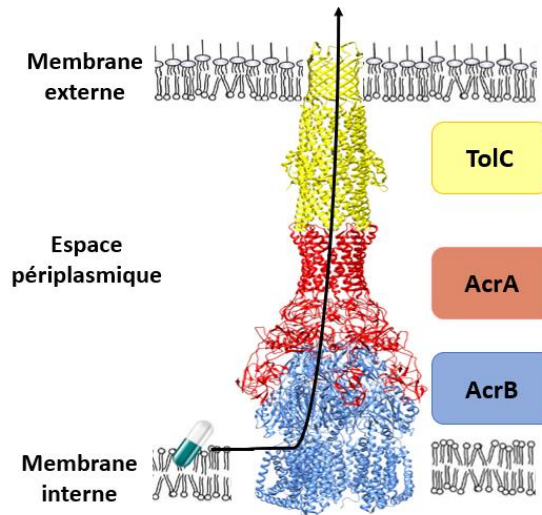


Figure 13 : Structure de la pompe AcrAB/TolC<sup>[40]</sup>

Cette pompe permet l'efflux de l'antibiotique vers l'extérieur de la bactérie grâce à une force protomotrice. Elle est capable d'expulser différentes familles dont les macrolides, les  $\beta$ -lactamines, les quinolones, les oxazolidinones ainsi que les tétracyclines. Les gènes codant ces pompes sont retrouvés sur le chromosome bactérien mais peuvent également être le résultat de mutations aléatoires conduisant à une surexpression de ces pompes. Ainsi, elles sont amplement impliquées dans la multirésistance des bactéries Gram négatif et constituent une cible privilégiée pour lutter contre l'antibiorésistance.

L'ensemble des mécanismes de résistance détaillés dans cette partie est aujourd'hui responsable d'une montée exponentielle de l'antibiorésistance. Dans cette seconde sous-partie, les causes et les conséquences de la résistance seront explicitées à l'échelle nationale et mondiale.

## B. Emergence des bactéries multirésistantes

Les antibiotiques ont, pendant de très nombreuses années, démontré leur efficacité en diminuant de façon considérable la mortalité due aux infections bactériennes. Notre arsenal thérapeutique pour lutter contre les maladies infectieuses est efficace, mais ne suffit pas à traiter l'ensemble des infections. En effet, leur efficacité a conduit à l'utilisation massive, répétée, abusive et parfois inadaptée de ces médicaments favorisant alors la sélection de souches bactériennes à l'origine de la résistance aux antibiotiques, également appelé antibiorésistance. C'est d'ailleurs pour cela qu'Alexander Fleming avait, dès 1945, alerté sur le risque de résistance aux antibiotiques en donnant déjà quelques conseils de bonne conduite. Ainsi, l'augmentation rapide d'infections causées par les bactéries résistantes représente une menace majeure pour la santé humaine puisque l'efficacité des

antibiotiques est altérée menant les patients vers une impasse thérapeutique allant jusqu'à une augmentation du nombre de décès en France.<sup>[41]</sup>

L'émergence de l'antibiorésistance est d'une part, liée à la pollution de l'air, des eaux ainsi qu'à un usage excessif des antibiotiques en élevage et d'autre part, aux activités humaines et aux échanges internationaux. Pour alerter sur ce sujet, Santé Publique France a publié les chiffres concernant la consommation d'antibiotiques en ville entre 2011 et 2021 (Figure 14a). Celle-ci a montré en 2020 une nette diminution liée à la pandémie de la Covid-19. En effet, le confinement, les gestes barrières ainsi que la diminution voire l'absence d'épidémies saisonnières ont joué un rôle prédominant dans la chute de la consommation d'antibiotiques. A l'inverse, à l'hôpital, un accroissement important de prescription d'antibiotiques a été observé lors de cette pandémie mondiale. Ceci est illustré par une étude qui révèle que 74.6% des patients hospitalisés pour la Covid-19 avaient reçu des antibiotiques alors que seuls 6.9% présentaient une infection bactérienne.<sup>[42]</sup> Parallèlement à la baisse des gestes barrières en 2021, l'utilisation des antibiotiques a de nouveau augmenté.<sup>[43]</sup> Toutefois, malgré une incitation à la baisse des prescriptions d'antibiotiques, la France reste aujourd'hui un pays surconsommateur d'antibiotiques en médecine humaine avec un usage de plus de 30% par rapport à la moyenne européenne, se classant quatrième au rang européen (Figure 14b).<sup>[44]</sup>

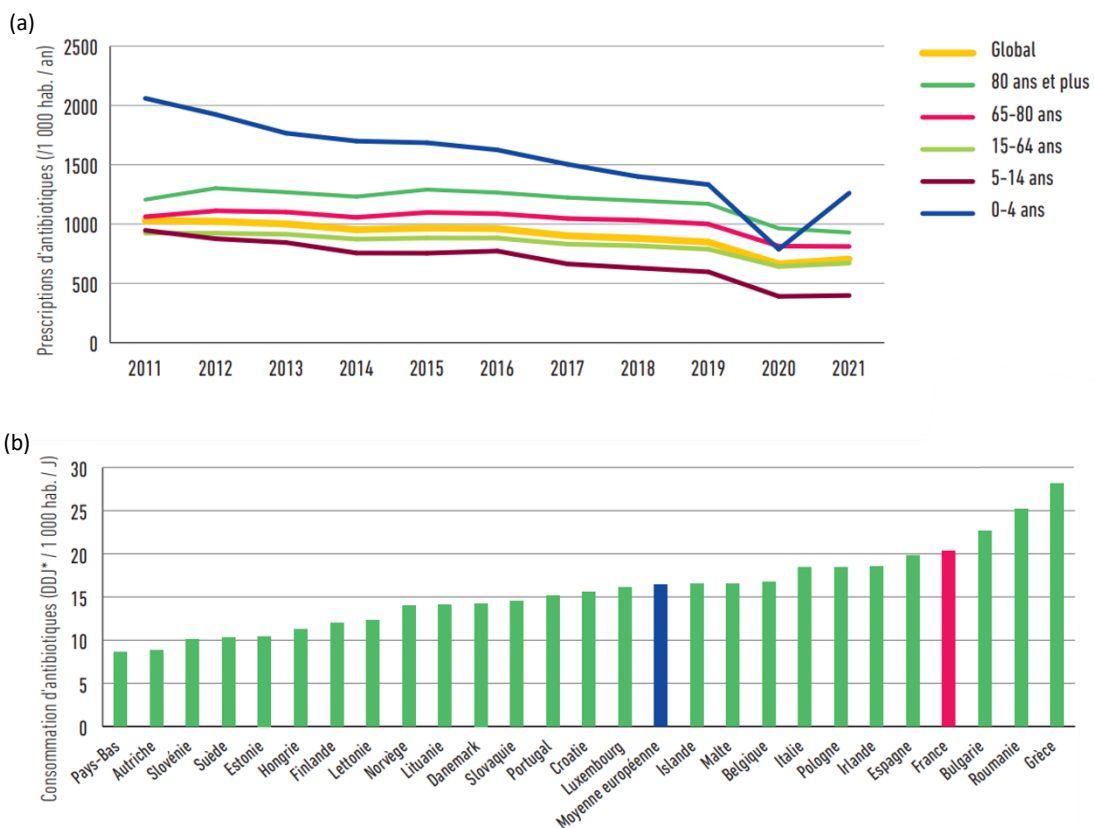


Figure 14 : (a) Représentation des prescriptions d'antibiotiques en ville entre 2011 et 2021. (b) Représentation de la consommation d'antibiotiques au niveau européen <sup>[45]</sup>

Une étude parue dans le journal *Lancet Planet Health* a montré qu'au niveau mondial l'usage d'antibiotiques en pédiatrie a augmenté de 46% entre 2000 et 2018. Ceci est à l'origine d'une résistance très élevée notamment en Iran où plus de 80% des souches bactériennes *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *E. coli* sont devenues résistantes à des antibiotiques de première intention de la famille des  $\beta$ -lactamines : l'amoxicilline ainsi que l'ampicilline.<sup>[45,46]</sup> Cette montée de bactéries résistantes aux antibiotiques est particulièrement importante en Inde et Thaïlande alors que le taux d'incidence le plus faible est retrouvé dans les pays nordiques comme la Suède et la Norvège.<sup>[47]</sup>

Toutefois, face au manque de développement de nouveaux antibiotiques, ce phénomène d'antibiorésistance est aujourd'hui considéré comme une véritable priorité de santé publique, d'autant plus que le nombre de cas de résistance aux traitements augmente de façon préoccupante à travers le monde, notamment en Afrique Subsaharienne, région du monde la plus touchée. En effet, selon le rapport « Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance », publié dans le Journal *Lancet*, les infections associées à l'antibiorésistance ont conduit à 4,95 millions de morts dans le monde en 2019 dont 1,27 millions directement attribuables à des bactéries multirésistantes.<sup>[48]</sup> C'est pourquoi, l'Organisation Mondiale de la Santé a établi une liste de plusieurs pathogènes et les a classés comme étant critiques et préoccupants puisque certaines souches sont résistantes aux céphalosporines ou carbapénèmes, connus comme étant les antibiotiques de dernière intention (Figure 15). D'après la liste récemment mise à jour, on y retrouve notamment *A. baumannii* ainsi que les Entérobactérales telles que *E. coli* et *K. pneumoniae*.<sup>[49]</sup> De plus, ce phénomène est très inquiétant puisque les estimations prévoient 10 millions de décès annuels d'ici 2050, selon le rapport de Jim O'Neill.<sup>[50]</sup> Il est donc indispensable de découvrir de nouvelles stratégies pour lutter contre l'émergence de bactéries multirésistantes (MDR) et extrêmement résistantes (XDR).

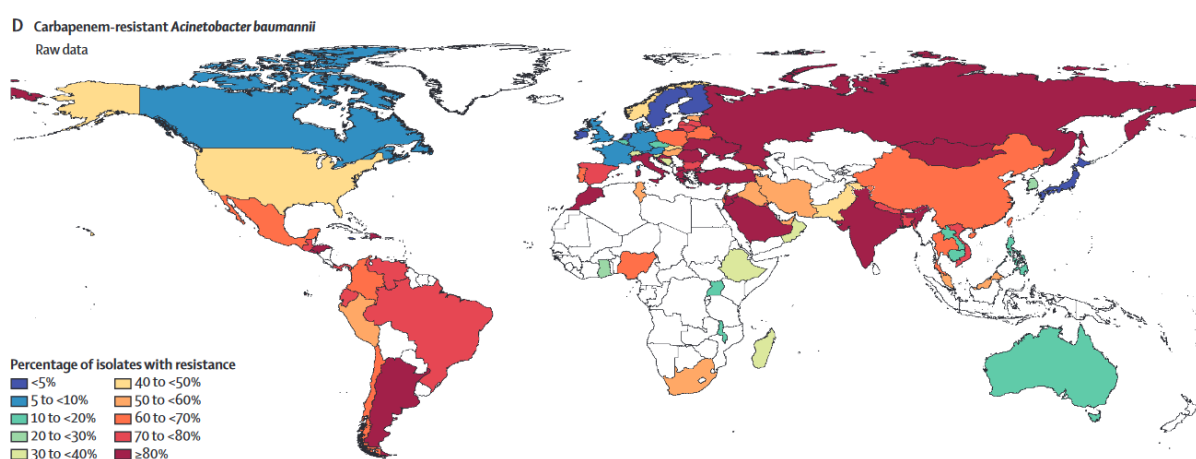


Figure 15 : Incidence d'*A. baumannii* résistant aux carbapénèmes au niveau mondial

Pour conclure, la montée de ces bactéries résistantes est une réelle menace pour l'Homme qui se retrouve face à une impasse thérapeutique. Ainsi, face à ce phénomène inquiétant retrouvé à l'échelle mondiale et au manque de développement de nouvelles molécules thérapeutiques, nous pouvons étudier les recommandations actuelles mises en place en France pour guider la mise en place appropriée d'un traitement antibiotique dans le but d'aider à la lutte contre l'antibiorésistance.

### III. Les recommandations actuelles pour guider le diagnostic

Dans ce troisième chapitre seront détaillées les recommandations actuelles françaises, en particulier, le principe et le rôle de l'antibiogramme en clinique. Dans un second temps, nous étudierons son utilisation à l'hôpital et les différents critères de choix de la thérapeutique après interprétation des résultats.

#### A. Réalisation d'un antibiogramme

Tout d'abord, l'antibiogramme est une technique utilisée en clinique pour évaluer la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. En plus d'orienter dans le choix de l'antibiotique pour traiter l'infection bactérienne, ce test *in vitro* permet également de surveiller l'apparition de résistances à différents antibiotiques et ainsi éviter la propagation du pathogène au sein d'une même unité. Il reste aujourd'hui un outil très apprécié des cliniciens et son utilisation à l'hôpital est toujours d'actualité. Les techniques d'interprétation ainsi que la qualité de l'ensemble des composants de l'antibiogramme font l'objet d'instructions et d'une standardisation de la part de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) et du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).<sup>[51]</sup>

Le modèle utilisé est celui de l'inhibition de la croissance bactérienne. Pour cela, l'antibiogramme est réalisé à partir d'un échantillon biologique tel que du sang ou des urines prélevés chez le patient. Cet échantillon dans lequel on suspecte la présence de bactéries est ensuite isolé et mis en culture sur un milieu solide ou liquide avec différents antibiotiques afin de déterminer leur sensibilité.

##### 1. Méthode de diffusion sur milieu solide

Dans un premier temps, la mise en culture de l'échantillon sur milieu solide utilise la méthode de diffusion sur gélose également appelée méthode des disques. Pour cela, un inoculum de bactérie est déposé sur un milieu de culture puis des disques imprégnés d'une concentration fixe d'antibiotiques

sont apposés sur ce milieu. C'est seulement après une nuit d'incubation que l'interprétation peut avoir lieu pour évaluer la sensibilité de la bactérie.

*i. Le milieu de culture*

Le milieu de culture utilisé pour la majorité des bactéries est la gélose de Mueller-Hinton. Ce milieu nutritif doit répondre à diverses exigences de façon à évaluer au mieux la sensibilité des antibiotiques et ainsi pouvoir interpréter facilement et sans erreurs le résultat final.<sup>[52]</sup> Celui-ci doit permettre une croissance satisfaisante de la bactérie et il est important d'avoir un pH compris entre 7.2 et 7.4 puisqu'un pH trop acide peut augmenter l'activité des  $\beta$ -lactamines alors qu'à l'inverse, un pH trop basique peut augmenter l'activité des aminosides et ainsi fausser le résultat. Outre le pH, la teneur en cations bivalents comme le calcium  $\text{Ca}^{2+}$  doit être ajustée puisqu'ils peuvent interférer avec le mode d'action des médicaments de la classe des polymyxines par exemple. Enfin, après avoir contrôlé ces différents paramètres, le milieu de culture est coulé dans des boîtes de Pétri rondes avant d'être séché pour être prêt à l'emploi. Celui-ci est coulé sur 4 mm d'épaisseur pour respecter les gradients de concentrations des antibiotiques déposés dessus par la suite.

*ii. Les disques d'antibiotiques*

Les disques sont préparés à partir d'un papier absorbant contenant une concentration fixe d'antibiotiques. Chacun d'entre eux sont identifiables grâce à une abréviation de l'antibiotique en trois lettres comme par exemple AMX pour amoxicilline, IPM pour imipenème, etc. Tous les disques d'antibiotiques sont espacés d'une même distance. De plus, l'antibiotique peut diffuser à travers la gélose de deux façons différentes, soit par diffusion verticale en profondeur dans le milieu, soit par diffusion horizontale avec une concentration maximale de l'antibiotique au niveau du disque.

*iii. L'inoculum bactérien et l'ensemencement*

Ce paramètre est un élément important puisqu'une densité anormale de bactéries peut impacter le résultat de l'antibiogramme. Pour cela, la suspension est préparée dans de l'eau physiologique stérile qui est ensuite ajustée grâce à un densitomètre ainsi qu'un étalon d'opacité déterminé par l'échelle de McFarland.

Quinze minutes plus tard, l'ensemencement par écouvillonnage doit avoir lieu. Pour se faire, à l'aide d'un écouvillon préalablement plongé dans la suspension cellulaire, l'objectif est de former des stries sur l'ensemble de la surface de la boîte de Pétri afin d'avoir une distribution uniforme des bactéries. Après avoir ajouté la suspension cellulaire, les disques d'antibiotiques sont appliqués au niveau de la

surface grâce à un distributeur automatique ou à défaut, manuellement, puis l'ensemble est incubé dans les quinze minutes suivantes.

#### iv. Incubation et lecture du résultat de l'antibiogramme

L'ensemble va incuber vingt-quatre heures à 37°C puis le résultat pourra être observé. Si les différents paramètres précédents ont été appliqués correctement alors une zone d'inhibition circulaire et homogène autour du disque est obtenue. En effet, après incubation, un disque de couleur translucide est observé ce qui montre que la bactérie était sensible à l'antibiotique et a donc été tuée par celui-ci tandis que tout le reste de la boîte est opaque confirmant ainsi la présence de bactéries.

Les diamètres des zones d'inhibitions autour du disque peuvent être mesurés avec précision grâce à la transparence à travers la boîte de Pétri retournée (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Le diamètre d'inhibition étant proportionnel à la sensibilité de la bactérie, ces valeurs sont comparées à celles définies par les autorités pour ensuite passer à la dernière étape qui est l'interprétation du résultat.

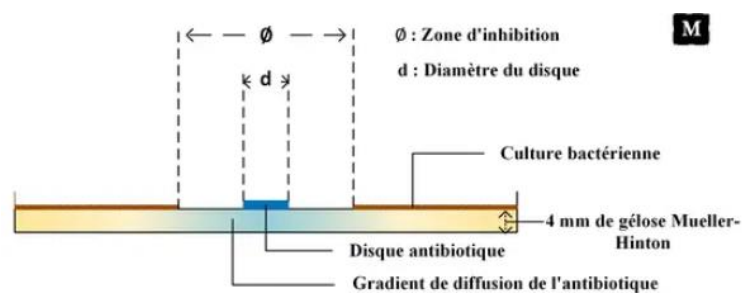


Figure 16 : Schéma récapitulatif de la préparation de la gélose pour un antibiogramme <sup>[52]</sup>

#### v. Interprétation du résultat de l'antibiogramme

Autrefois, l'interprétation de l'antibiogramme par un professionnel de santé permettait de classer la bactérie comme étant résistante (R), à un stade intermédiaire (I) ou sensible (S) à un antibiotique. Depuis 2020, l'EUCAST en collaboration avec les sociétés savantes de microbiologie européennes a redéfini les catégories « sensible » et « intermédiaire » puisque la catégorie « sensible » est devenue « sensible à posologie standard » tandis que la catégorie « intermédiaire » est devenue « sensible à posologie élevée »<sup>[53]</sup> :

- Une souche dite « **sensible à posologie standard** » ou « **S** » est une souche pour laquelle l'antibiotique testé peut être utilisé selon la posologie habituelle et mener à une réussite thérapeutique.
- Une souche dite « **sensible à posologie élevée** » ou « **SFP** » indique au clinicien que la probabilité de succès thérapeutique est élevée si l'exposition à l'antibiotique est élevée. Pour

cela, il convient d'administrer l'antibiotique à une forte dose ou que ce dernier se concentre fortement au site infectieux.

- Une souche dite « **résistante** » ou « **R** » est une souche pour laquelle l'antibiotique testé ne pourra pas traiter l'infection bactérienne quelles que soient la dose et la durée de traitement.

Ainsi, deux valeurs de concentrations et de diamètres critiques peuvent être définies :

- Une concentration critique basse « **c** » à laquelle correspond un diamètre critique « **D** »
- Une concentration critique haute « **C** » à laquelle correspond un diamètre critique « **d** »

Ces deux valeurs vont aider à l'interprétation de l'antibiogramme pour classer la bactérie selon la catégorisation détaillée ci-dessus et ainsi choisir la thérapeutique la plus adaptée. En effet, les diamètres d'inhibition mesurés ( $\emptyset$  mesuré) sont comparés à ces valeurs de diamètres critiques pour établir des normes selon le tableau ci-dessous.

*Tableau 3 : Critères d'interprétation de l'antibiogramme selon le diamètre mesuré et la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)*

Diamètre d'inhibition mesuré	CMI de l'antibiotique	Interprétation
$\emptyset$ mesuré $\geq D$	$CMI \leq c$	Sensible à posologie standard (S)
$d < \emptyset$ mesuré $< D$	$c < CMI < C$	Sensible à posologie élevée (SFP)
$\emptyset$ mesuré $< d$	$CMI > C$	Résistant (R)

De ce fait, les souches **S** sont les souches pour lesquelles la CMI de l'antibiotique est inférieure ou égale à la concentration critique basse « **c** », ce qui correspond à un diamètre supérieur ou égale au diamètre critique « **D** ». D'autre part, les souches **R** sont les souches pour lesquelles la CMI du médicament est supérieure à la concentration critique haute « **C** » et donc avec un diamètre mesuré inférieur au diamètre critique « **d** ». Pour les souches **SFP**, le diamètre mesuré est compris entre les deux diamètres critiques.

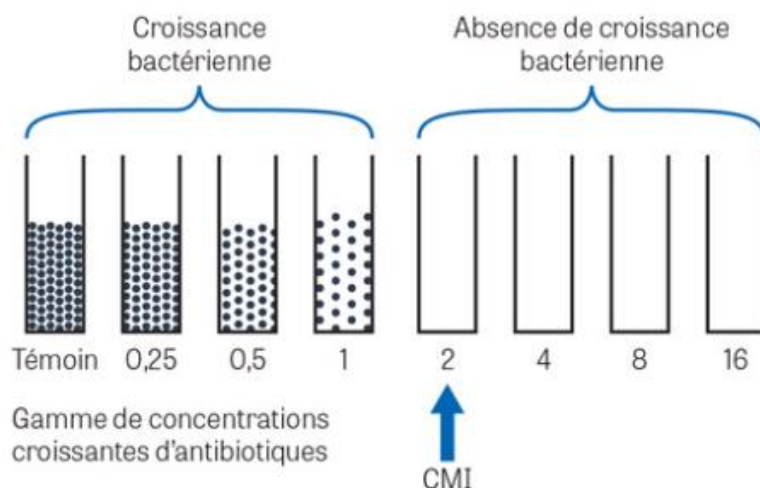
## 2. Méthode de dilution en milieu liquide

De nos jours, la méthode la plus répandue est la méthode de dilution en milieu liquide. Cette technique consiste à mesurer la croissance bactérienne en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques dans différents tubes ou microplaques.

Pour cela, il convient de préparer une série de tubes avec le même milieu de culture liquide (environ deux mL) puis d'y ajouter une gamme de concentrations croissantes d'antibiotiques à tester tout en



gardant un tube comme contrôle pour témoigner de la croissance de la bactérie. L'ensemble est inoculé avec une même quantité de bactérie puis incubé à 37°C pendant 18 heures. C'est seulement après cette durée d'incubation que la CMI pourra être lue. Si le tube devient trouble, cela veut dire que la bactérie s'est multipliée, à l'inverse, le premier tube de couleur translucide permet de déterminer la CMI c'est-à-dire la concentration la plus faible capable d'inhiber la croissance bactérienne (Figure 17).



*Figure 17 : Principe de la détermination de la CMI d'un antibiotique par la méthode de dilution en milieu liquide <sup>[54]</sup>*

La méthode de l'antibiogramme en milieu liquide peut également être semi-automatisée grâce à une lecture spectrophotométrique ou turbidimétrique des micropuits.

L'antibiogramme reste la technique de référence pour évaluer la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un antibiotique. C'est pourquoi nous allons étudier les critères de choix du traitement en fonction des résultats de l'antibiogramme et explorer différents cas de figures en fonction de l'infection.

## B. Utilisation de l'antibiogramme à l'hôpital

### 1. Définition des critères de décision dans le choix de la thérapeutique

L'antibiogramme est largement utilisé à l'hôpital pour aider et guider au mieux la prise en charge thérapeutique. Les critères de décision se font sur la base des savoirs des sociétés savantes telles que la Société Française de Microbiologie et des recommandations émises par la SPILF (Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française) en relation avec les autorités de santé française telles que la HAS (Haute Autorité de Santé), Santé Publique France ainsi que l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé). Cette dernière émet à la fois un protocole de prise en charge et une synthèse des recommandations à destination du prescripteur.<sup>[55]</sup> Chaque établissement de santé prend en compte les recommandations nationales de la SPILF mais sont libres

de les adapter à leur propre situation régionale voire même à la situation de l'établissement lui-même. En effet, il est indispensable de rester vigilant quant à la notion de portage et il ne faut pas oublier qu'un grand nombre de paramètres environnementaux joue un rôle important et ne sont pas à négliger dans la mise en place d'un traitement, malgré l'existence de recommandations bien codifiées.

Dans cette partie seront étudiés les différents cas de figures possibles en clinique, à savoir, la mise en place d'un traitement probabiliste ainsi que l'attente des résultats de l'antibiogramme pour prescrire un traitement documenté.

#### *i. Mise en place d'un traitement probabiliste*

Tout d'abord, pour des raisons évidentes, un traitement sans examen complémentaire sera mis en place dans le cas où une espèce bactérienne n'est pas cultivable et auquel cas la réalisation d'un antibiogramme est impossible. Une espèce est définie comme étant non cultivable lorsque son activité métabolique est considérée comme étant trop faible pour se diviser dans un milieu de culture. Le choix de la thérapeutique se fait à la suite de surveillance au niveau national après avoir obtenu des succès cliniques sur ces bactéries.

De plus, la mise en place d'un traitement sans examen préalable peut être illustrée par le cas clinique le plus courant qui est l'infection urinaire simple. La cystite correspond à une infection urinaire bactérienne au niveau de la vessie. Cette dernière est très fréquente chez les femmes puisque près d'une femme sur deux est touchée au cours de sa vie et est dans la plupart des cas, sans gravité. Les symptômes caractéristiques d'une cystite sont des sensations de brûlures en urinant, des envies fréquentes avec une élimination d'urine en petite quantité (pollakiurie) ainsi qu'une douleur en bas du ventre.

Dans plus de 90% des cas, la cystite est causée par la bactérie *E. coli*, naturellement présente au niveau de la flore commensale du tube digestif, capable de remonter dans la vessie par l'urètre afin de s'y multiplier et être à l'origine des symptômes décrits ci-dessus.<sup>[56]</sup> L'urètre jouant un rôle important dans la délocalisation de cette bactérie, c'est pour cela que les femmes sont plus fréquemment touchées en raison de la faible longueur de celui-ci.

Face à ces épisodes fréquents dans la population, la SPILF a codifié des recommandations de prise en charge en 2016 qui ont ensuite été revisitées en 2018. Ces dernières montrent qu'en absence de facteurs de risques de complication, il est suffisant de réaliser uniquement une bandelette urinaire réactive capable de détecter la présence de leucocytes et/ou de nitrites dans les urines pour établir le diagnostic de cystite et ainsi introduire un traitement antibiotique.<sup>[57]</sup> Dans ce cas précis de cystite aiguë sans signe de complications, un traitement à base de fosfomycine en une seule prise est

préconisé en première intention ou du pivmécillinam pendant cinq jours en deuxième intention, selon les recommandations officielles. En effet, les autorités ayant suffisamment de recul sur cette infection, ils estiment que *E. coli* est majoritairement sensible à la fosfomycine et de ce fait, il n'est pas nécessaire de réaliser des analyses plus poussées telles qu'un examen cytobactériologique des urines (ECBU) suivi de la mise en culture de la bactérie. Ce dernier sera prescrit dans le cadre d'un échec thérapeutique lorsque la fosfomycine a été mise en place ou d'emblée si le patient présente une cystite à risque de complication, de récurrence ou autres facteurs de risques.

D'autre part, puisque le délai des résultats d'un antibiogramme est de plusieurs jours, un traitement probabiliste peut être mis en place afin de traiter le plus rapidement possible l'infection chez le patient. Cela concerne essentiellement les infections graves à risque d'évolution mais également des infections plus bénignes nécessitant tout de même une intervention rapide.

Par exemple, dans le cas où une méningite bactérienne est suspectée chez le patient, il est important de réagir face au risque d'évolution inévitable pour ce dernier. En effet, cette infection peut provoquer une méningo-encéphalite dans le cas où elle a atteint d'autres parties du système nerveux central mais également une septicémie à la suite d'une infection généralisée.<sup>[58]</sup> Pour établir le diagnostic, une ponction lombaire est réalisée dans l'heure suivant son admission puis l'antibiogramme est directement effectué sur le liquide cébrospinal, c'est-à-dire le liquide qui circule entre les méninges et dont on suspecte une infection. Toutefois, face à cette urgence absolue, l'antibiothérapie est immédiatement mise en place dans l'heure après l'arrivée à l'hôpital voire au plus tard dans les trois heures suivant l'admission. Dans certains cas, l'antibiothérapie peut être prescrite avant même la réalisation de la ponction lombaire, c'est le cas lorsqu'il y a suspicion de purpura fulminans ou si une contre-indication à la ponction lombaire est connue.

Même si les méningites virales causées par des virus de la famille des entérovirus sont les plus fréquentes, les méningites bactériennes représentent tout de même 20 à 25% des méningites communautaires et sont considérées comme étant plus graves que les méningites virales. Plusieurs pathogènes peuvent être à l'origine de cette infection bactérienne : c'est le cas de *Streptococcus pneumoniae* (pneumocoque, germe le plus fréquemment responsable), *Neisseria meningitidis* (méningocoque et majoritairement les méningocoques B, C, W et Y), *Listeria monocytogenes*, *Haemophilus influenzae* ainsi qu'*E. coli*.

Ainsi, face à cette diversité d'espèces bactériennes, l'intérêt de la mise en place d'un traitement probabiliste à large spectre est de maximiser les chances de réussite thérapeutique avant de

déterminer la bactérie mise en cause. Le traitement utilisé en première intention fait partie des céphalosporines de troisième génération : céfotaxime, ceftriaxone par voie intraveineuse. Toutefois, il sera important de surveiller la réponse à ce traitement dans un contexte émergent de la résistance aux céphalosporines de troisième génération.

ii. Attente des résultats de l'antibiogramme pour la mise en place d'un traitement antibiotique

Dans le cadre de cystites à risque de complication, un ECBU est prescrit et lorsque le traitement peut être différé de 24 à 48 heures, alors l'antibiothérapie initiale est directement adaptée en fonction des résultats de l'antibiogramme. En effet, chez certains patients, la cystite peut devenir plus grave et des complications possibles peuvent subvenir. C'est notamment le cas chez la femme enceinte, l'homme à risque de développer une prostatite ou épидидymite, chez les personnes âgées de plus de 75 ans et également chez les patients ayant une maladie rénale chronique sévère.

Chez ces patients à risque et lorsque le traitement peut être différé, alors un antibiogramme est réalisé dans le but de mettre en place un traitement documenté. En fonction des résultats, différentes voies thérapeutiques peuvent être utilisées selon le schéma suivant :

- Première intention : amoxicilline
- Deuxième intention : pivmécillinam
- Troisième intention : nitrofurantoïne
- Quatrième intention : fosfomycine - trométamol
- Cinquième intention : triméthoprim

L'infection urinaire au cours de la grossesse est relativement fréquente en raison de la compression de la vessie par l'utérus qui conduit à une évacuation incomplète des urines. C'est pourquoi, chez la femme enceinte sans risque antérieur d'infection urinaire, la réalisation d'une bandelette urinaire une fois par mois à partir du quatrième mois de grossesse est demandée. Tandis que chez les femmes à risque d'infection urinaire, un ECBU est directement demandé dès la début de la grossesse suivi d'un examen mensuel à partir du quatrième mois de grossesse.

Ainsi, ce suivi mensuel permet de dépister lorsqu'une colonisation urinaire est présente chez la femme enceinte. Celle-ci est définie lorsque le taux de bactériurie est supérieur à  $10^5$  UFC/mL. En cas de colonisation urinaire positive, un antibiogramme est immédiatement réalisé et le traitement sera adapté en fonction des résultats. Dans ce cas, aucun traitement probabiliste n'est mis en place. Les recommandations de la SPILF en fonction de l'antibiogramme sont les suivantes<sup>[59]</sup> :

- Première intention : amoxicilline
- Deuxième intention : pivmécillinam

- Troisième intention : fosfomycine - trométamol
- Quatrième intention : triméthoprime
- Cinquième intention : nitrofurantoïne ou cotrimoxazole ou amoxicilline + acide clavulanique

## 2. Les limites de l'antibiogramme

L'antibiogramme a démontré son utilité et son efficacité dans la prise en charge des patients atteints d'une infection bactérienne, toutefois, son utilisation présente des limites. En effet, cette technique est applicable uniquement aux bactéries cultivables sur milieux de cultures et conduit donc à un manque de traitement documenté pour les bactéries non ou difficilement cultivables. De ce fait, un traitement probabiliste à large spectre est obligatoire pour ces bactéries. Toutefois, l'utilisation de ces antibiotiques peut avoir un impact sur des bactéries non-pathogènes nécessaires à notre mode de vie et peut également impacter et majorer le développement de l'antibiorésistance.

Ensuite, l'antibiogramme ne peut jouer son rôle que lorsque l'on dispose d'informations sur l'étiologie de l'infection. En effet, selon les bactéries isolées à partir du prélèvement, l'antibiogramme sera effectué uniquement sur les espèces susceptibles d'intervenir dans l'étiologie de la maladie.

Enfin, l'antibiogramme est un outil *in vitro* et ne peut prédire totalement le comportement et l'efficacité d'un antibiotique *in vivo*. En effet, plusieurs paramètres interviennent dans l'efficacité *in vivo* tels que le choix du protocole thérapeutique, la bonne ou mauvaise pénétration de l'antibiotique dans les cellules notamment pour des infections par des bactéries intracellulaires, l'influence de l'organisme du patient en particulier son métabolisme sur le médicament ainsi que l'apparition de résistance au cours du traitement. Dans d'autres cas, suite aux résultats de l'antibiogramme, il peut être nécessaire d'avoir recours au diagnostic moléculaire tel que la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) multiplex pour diagnostiquer les mécanismes de résistance de la bactérie. Ces résultats seront complémentaires à ceux issus du diagnostic phénotypique.

Ainsi, ce chapitre a montré l'importance de l'antibiogramme dans la lutte contre l'antibiorésistance puisqu'il permet de choisir l'antibiotique adapté pour traiter l'infection bactérienne et ainsi limiter l'utilisation d'antibiotiques inappropriés favorisant l'émergence de bactéries résistantes. Cependant, des limites existent quant à son utilisation. En effet, sa réalisation ne peut prédire totalement l'efficacité d'un antibiotique en clinique et ne peut se faire qu'à l'hôpital en collaboration avec les laboratoires de biologie médicale, posant ainsi des limites quant à son utilisation en officine. C'est

pourquoi, le prochain chapitre se focalisera sur l'utilisation des tests rapides de diagnostic en officine, leurs principes, atouts et intérêts dans la lutte contre l'antibiorésistance.

## IV. L'émergence des tests rapides de diagnostic en officine

### A. Les tests rapides de diagnostic *in vitro* (TDR)

Tout d'abord, les tests de diagnostic *in vitro* sont des dispositifs d'analyse d'échantillons biologiques prélevés chez le patient tels que le sang, l'urine, ou la salive dans le but d'établir un diagnostic ou un dépistage.<sup>[60]</sup> En plus d'une utilisation en laboratoire de biologie, ils peuvent être réalisés par des professionnels de santé de proximité dans le but d'obtenir rapidement des résultats.

Le développement de ces tests a vu le jour au début des années 1980 et sont aujourd'hui de plus en plus utilisés grâce à l'innovation technologique ainsi que la miniaturisation des dispositifs. D'un point de vue réglementaire, ces dispositifs *in vitro* sont encadrés par le règlement européen 2017/746 et font l'objet de suivis réguliers de la part des autorités de santé.

Grâce aux résultats rapides, ils peuvent jouer un rôle non négligeable dans la lutte contre l'antibiorésistance. C'est pourquoi, nous verrons, au cours de ce chapitre, la composition des différents tests rapides de diagnostic ainsi que leurs avantages et intérêts dans la prise en charge du patient puis des exemples de dispositifs de diagnostic retrouvés en ville seront décrits.

#### 1. Les différentes méthodes de tests de diagnostic

Parmi les techniques mises en œuvre au sein d'un test de diagnostic, on retrouve essentiellement les méthodes immunologiques permettant de mettre en évidence l'antigène de la bactérie et les méthodes biochimiques pour la détection d'activités enzymatiques de la bactérie.<sup>[61]</sup>

Dans un premier temps, les méthodes **biochimiques** mettent en évidence différentes activités enzymatiques de la bactérie, c'est ce qui est typiquement utilisé pour détecter la leucocyte estérase afin de quantifier la présence de globules blancs dans les urines (leucocyturie). Cette méthode est notamment retrouvée pour le dépistage des infections urinaires.

Dans un second temps, les méthodes **immunologiques**, largement répandues, comprennent d'une part, les techniques d'agglutination et de coagglutination, qui nécessitent des particules de latex recouvertes d'anticorps, qui en présence d'antigènes vont conduire à une agglutination, on parle de

méthode directe.<sup>[62]</sup> Toutefois, en raison d'une faible sensibilité, cette technique est aujourd'hui très peu utilisée mais est tout de même retrouvée pour la détection de streptocoques du groupe A. D'autre part, on retrouve les techniques ELISA ou méthode indirecte puisqu'il y aura formation d'un complexe antigène-anticorps lorsque les antigènes bactériens seront en contact avec les anticorps.

De façon plus précise, plusieurs formes de méthodes ELISA sont aujourd'hui disponibles au sein des tests de diagnostic rapides. On retrouve notamment :

➤ Les techniques basées sur une révélation du complexe antigène-anticorps par réaction enzymatique

Pour cela, les anticorps sont couplés à une enzyme et la révélation du complexe se fera grâce à l'ajout d'un substrat de cette enzyme. La couleur obtenue permet ainsi une détection qualitative des antigènes bactériens. Toutefois, puisque la sensibilité n'est pas assez suffisante, d'autres méthodes ont été développées.

➤ Les techniques basées sur l'immunochromatographie

Dans ce cadre, l'échantillon biologique migre par capillarité sur une membrane de nitrocellulose jusqu'à interagir avec un anticorps permettant d'obtenir une bande colorée en guise de signal d'interaction antigène-anticorps. C'est pourquoi on parle de migration chromatographique faisant appel à une révélation immunologique. Dans le but de confirmer la bonne migration de l'échantillon, une bande dite contrôle apparaît et lorsque la substance à détecter est présente dans l'échantillon une seconde bande apparaît. Ce principe est largement utilisé dans les tests de diagnostic, retrouvés sous forme de bandelettes ou de cassettes.

➤ L'immunoessai optique

Cette dernière méthode, plus rare, est basée sur le changement de propriétés optiques d'une plaque de silicium. En effet, lorsqu'elle est en présence de l'antigène bactérien d'intérêt, cette dernière devient jaune, marqueur de la présence d'un complexe immun, alors qu'elle reste violette, si aucun complexe immun ne s'est formé. Cette méthode est majoritairement utilisée pour le diagnostic de bactéries difficilement cultivables comme *Chlamydia* ou encore *Mycobacterium*.

Après avoir exposé les différentes méthodes utilisées dans les tests rapides de diagnostic, nous allons maintenant illustrer ces propos par différents exemples utilisés en ville de nos jours.

## 2. Utilisation des tests de diagnostic rapides en ville

Différents tests de diagnostic sont aujourd'hui disponibles en médecine de ville lors de la pose d'un diagnostic, notamment les tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) pour les angines à streptocoques et les bandelettes urinaires pour dépister les infections urinaires. Ces tests ont fait leur apparition en consultation de ville puisque leur réalisation est compatible avec la durée d'une consultation. En effet, le résultat du test est obtenu après dix à quinze minutes, permettant ainsi d'orienter le diagnostic rapidement et d'adapter le traitement dans la même consultation.

### i. Exemple 1 : utilisation des tests de diagnostic rapide des angines à streptocoques à l'officine

C'est face à une augmentation du nombre de cas de rhumatismes articulaires aigus d'évolution rapide et de syndromes de choc toxique aux Etats-Unis dans les années 1980 qu'il a été préconisé de surveiller attentivement les infections bactériennes à *Streptococcus pyogenes*.<sup>[63]</sup>

Les angines sont des inflammations aiguës de l'oropharynx qui peuvent être d'origine virale (80% des cas) ou bactérienne (20% des cas). Dans le cas d'une infection bactérienne, l'angine à streptocoques du groupe A ou *S. pyogenes* est la plus fréquente, notamment chez l'enfant (25 à 40% contre 10 à 25% chez l'adulte).<sup>[64]</sup> Cette bactérie Cocci Gram positif strictement humaine est capable de détruire entièrement les globules rouges retrouvés en périphérie de la colonie, on dit que cette bactérie est responsable de  $\beta$ -hémolyse.

Toutefois, la distinction entre une angine virale ou une angine à streptocoques du groupe A ne peut pas être identifiée cliniquement, c'est pourquoi, le développement de tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) permet de distinguer l'origine de l'angine et ainsi prescrire des antibiotiques uniquement en cas d'angine streptococcique. C'est ainsi que depuis 2016 et dans le cadre de la lutte contre l'antibiorésistance, le gouvernement français, avec l'ANSM, ont permis le recours de manière plus systématique aux TROD pour les angines en ville dans le but de permettre une prescription raisonnée d'antibiotiques. Suite à l'avenant 18 de la Convention Nationale Pharmaceutique, les TROD angines sont désormais remboursés à 70% par la sécurité sociale depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2020, et le reste par la complémentaire santé, et font partie des nouvelles missions du pharmacien d'officine. En effet, le patient peut se diriger vers son médecin traitant mais également vers son pharmacien, connu comme professionnel de santé de proximité, pour réaliser le test. En fonction du résultat, il lui délivre les conseils pour soulager les symptômes de l'angine virale ou l'oriente vers le médecin traitant pour une prescription d'antibiotiques avec présentation du résultat du TROD. Dans certains cas, lorsque le patient se dirige en première intention chez le médecin, ce dernier peut recourir à une prescription dite conditionnelle d'antibiotiques. Cela signifie que le pharmacien doit réaliser le TROD et si le résultat



s'avère positif pour une angine d'origine bactérienne, alors il peut dispenser l'antibiotique, tandis que si le résultat est négatif, alors il ne prend pas en compte l'ordonnance du médecin. <sup>[65]</sup>

En 2019, quatorze tests diagnostiques d'angines étaient commercialisés en France. Dans le but de décrire un de ces tests, prenons l'exemple du test Streptatest® de Biosynex.<sup>[66]</sup> Ce test permet la détection des antigènes du streptocoque du groupe A (SGA) suite à un prélèvement oropharyngé à l'aide d'un écouvillon. La boîte du test est composée d'une part, d'un contrôle positif streptocoque A inactivé ainsi qu'un contrôle négatif du streptocoque A et d'autre part, d'un réactif d'extraction A (nitrite de sodium 2M) et d'un réactif d'extraction B (acide acétique 0,2M). Le Streptatest® utilise la technique d'immunochromatographie sur membrane. Pour cela, un anticorps anti-streptococcique A est fixé au niveau de la zone « test » puis un deuxième anticorps anti-streptococcique A marqué à des particules de latex est retrouvé au niveau de la zone d'immersion de la membrane.<sup>[66,67]</sup>

D'un point de vue pratique, quatre gouttes du réactif d'extraction A puis quatre gouttes du réactif d'extraction B sont déposés dans un tube d'extraction. Ensuite, le prélèvement est effectué à l'aide de l'écouvillon puis celui-ci est déposé dans le tube d'extraction contenant les deux réactifs. Après avoir agité l'écouvillon dans le tube et attendu une minute, l'écouvillon peut être retiré du tube et la bandelette peut être plongée dans la préparation pour lire visuellement le résultat après cinq minutes.

Les réactifs utilisés permettent d'extraire l'antigène des streptocoques du groupe A de l'écouvillon. Ce dernier se lie de manière spécifique à l'anticorps anti-streptococcique A conjugué à des particules de latex puis la préparation va migrer le long de la bandelette pour former un complexe avec l'anticorps anti-streptococcique A fixé au niveau de la zone de test. Le résultat du test est obtenu sous la forme de bandes colorées. En effet, la présence d'une bande rouge au niveau de la zone de contrôle montre la conformité du test, si celle-ci n'est pas présente, alors le test n'est pas valide et le résultat ne peut pas être correctement interprété. Lorsqu'une deuxième bande rouge apparaît au niveau de la zone test, cela indique un résultat positif pour une angine d'origine bactérienne aux streptocoques du groupe A, tandis que l'absence de cette bande à ce même endroit indique un résultat négatif (Figure 18).

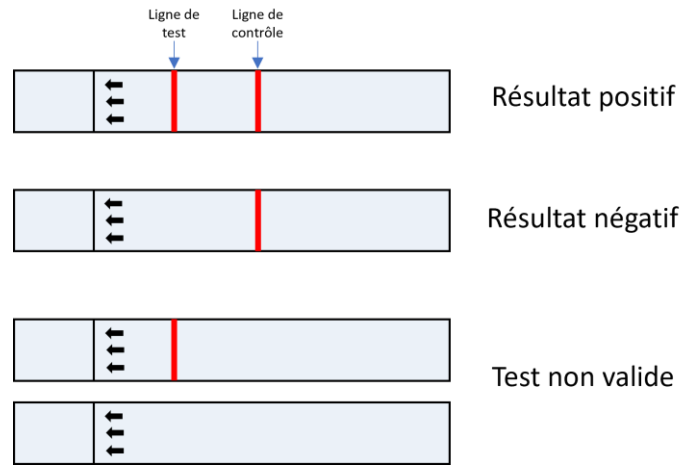


Figure 18 : Représentation des différents résultats possibles du TROD angine à streptocoques du groupe A

Ces tests sont caractérisés par leur sensibilité c'est-à-dire la capacité à identifier les patients porteurs de la bactérie et leur spécificité c'est-à-dire la capacité à ne pas détecter les patients non porteurs du germe. Selon les tests, la sensibilité du diagnostic est comprise entre 87,3 et 97,6%, tandis que la spécificité est comprise entre 94,7 et 100%.

Ainsi, ce test de diagnostic des angines à streptocoques A peut jouer un rôle important dans la lutte contre l'antibiorésistance en permettant l'utilisation raisonnée des antibiotiques.

ii. Exemple 2 : utilisation des bandelettes urinaires pour les infections urinaires en ville

Un autre exemple de tests rapides de diagnostic largement utilisés en pratique est l'emploi de bandelettes urinaires pour détecter différents problèmes de santé comme des maladies du foie, du rein ou encore des infections urinaires. En effet, ce test est composé de divers réactifs chimiques permettant de détecter des paramètres ou composants de l'urine, tels que le pH, la présence de protéines, leucocytes, nitrites ou le glucose dans les urines, dans le but d'orienter un diagnostic.<sup>[68]</sup>

Il existe plusieurs types de bandelettes urinaires en fonction du nombre de paramètres que l'on souhaite détecter ou mesurer. Dans le cadre de la lutte contre la résistance aux antibiotiques, des bandelettes permettent de dépister une cystite dans le but d'avoir une conduite raisonnée quant à la prescription et la dispensation d'antibiotiques. En effet, lorsqu'un patient présentant des symptômes d'infection urinaire consulte un médecin, le diagnostic se fait à partir d'un examen clinique et d'une bandelette urinaire réactive pour analyser les composants présents dans les urines. Pour cela, les bandelettes les plus fréquemment utilisées possèdent quatre zones de réactifs pour contrôler de manière rapide quatre paramètres différents : les leucocytes, les nitrites, les protéines et la présence de sang dans les urines.<sup>[69]</sup> En effet, la présence de nitrites obtenues après transformation des nitrates issus de l'alimentation marque la présence d'entérobactéries au niveau du tractus urinaire. Toutes les bactéries ne produisent pas de nitrites car toutes ne possèdent pas de nitrate réductase, c'est le cas

des Cocci Gram positif ou de bactéries Gram négatif tel que *P. aeruginosa* par exemple. De plus, ces urines infectées peuvent également être repérées par la présence de traces de sang et d'une augmentation du nombre de leucocytes et de protéines dans les urines.

Pour cela, le patient peut obtenir ce test urinaire auprès de son pharmacien d'officine avec ou sans consultation du médecin au préalable, faisant l'objet de nouveaux arrêtés publiés au Journal Officiel du 30 novembre 2023.<sup>[70]</sup> En effet, le patient peut directement se présenter à la pharmacie pour réaliser le test et en fonction du résultat, deux cas de figures sont envisagés. Si le test est positif, alors de manière générale, le pharmacien oriente le patient vers son médecin pour qu'il puisse prescrire des antibiotiques en présentant les résultats du test de diagnostic. Au contraire, si le test est négatif, cela permet une prescription inutile d'antibiotiques. D'autre part, de manière similaire à ce que l'on retrouve pour les TROD angines, le patient peut se présenter à l'officine avec une ordonnance conditionnelle après avoir consulté son médecin. Dans ce cas, le pharmacien est autorisé à dispenser les antibiotiques prescrits sur l'ordonnance seulement si le test s'avère positif.<sup>[71]</sup>

D'un point de vue pratique, le deuxième jet des urines du matin est recueilli au sein d'un flacon propre de manière à pouvoir ensuite plonger la bandelette urinaire pendant une à deux secondes dans le flacon. Il est préférable de plonger la bandelette dans les urines plutôt que verser l'urine sur la bandelette tout en vérifiant que l'ensemble des zones réactives du test soit en contact avec les urines. Dans le cadre des cystites, la présence de protéines, de nitrites ainsi que de traces de sang dans les urines peut être détectée après seulement une minute en contact avec les urines, et les leucocytes après deux minutes. Enfin, les couleurs obtenus aux quatre zones réactives de la bandelette sont comparées à celles de l'échelle colorimétrique présente au niveau de l'emballage dans le but d'établir le diagnostic avec des résultats fiables entre 93.1 et 97.3% (Figure 19). Toutefois, pour ne pas fausser le résultat, il est recommandé de ne pas réaliser ce test après un apport alimentaire important en nitrites ainsi que la prise de vitamine C puisque cela peut gêner la détection du sang dans les urines.

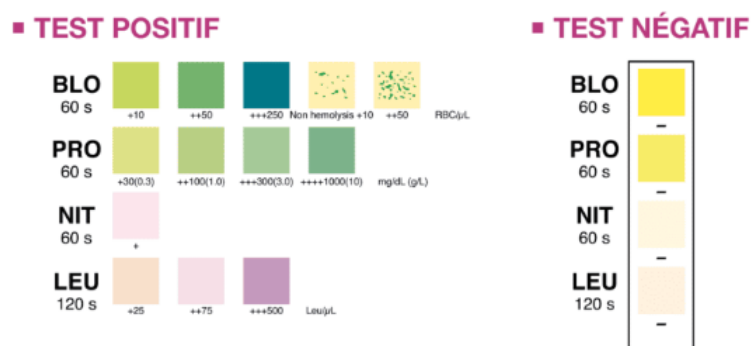


Figure 19 : Lecture des résultats de la bandelette urinaire dans le cas d'un dépistage d'infections urinaires. <sup>[72]</sup>

L'interprétation des résultats peut donc se faire très rapidement et sans difficulté. Dans un premier temps, si les nitrites et les leucocytes sont négatifs, alors il n'y a probablement pas d'infections urinaires, tandis que, si les leucocytes et nitrites sont positifs ou seulement les nitrites, cela signifie que le patient a probablement une infection urinaire. Enfin, si les leucocytes sont positifs mais les nitrites négatifs, il est conseillé de réaliser de nouveau ce test urinaire et si les résultats sont identiques, le patient doit être orienté vers son médecin.<sup>[73]</sup> En cas de résultats douteux, le médecin peut prescrire des analyses supplémentaires, notamment un ECBU (Examen CytoBactériologique des Urines) pour rechercher la présence du germe à l'origine de l'infection urinaire ou une NFS (Numération Formule Sanguine) pour contrôler le taux de globules blancs par exemple.

Pour conclure, ce dispositif urinaire est utilisé en première intention pour le dépistage des infections urinaires basses. En plus de permettre une prise en charge rapide du patient avec un traitement adapté, nous allons étudier dans la prochaine partie les avantages de ces tests rapides de diagnostic et en quoi leur utilisation joue un rôle essentiel dans la lutte contre l'antibiorésistance.

## B. Intérêt dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques

### 1. Avantages des tests rapides de diagnostic pour les patients

Dans un premier temps, grâce à leur aide à la décision thérapeutique, les tests rapides de diagnostic permettent une prise en charge optimale du patient et ainsi un meilleur suivi de la diffusion des bactéries multirésistantes au sein d'un même environnement. En effet, lorsque la spécificité et la sensibilité de ces tests sont considérées comme optimales, ils permettent une utilisation raisonnée des antibiotiques avec un objectif principal : permettre une orientation de diagnostic rapide.<sup>[74]</sup>

Ils permettent également le diagnostic différentiel entre les infections bactériennes et virales, c'est le cas par exemple pour le StreptaTest® qui permet de différencier une angine bactérienne d'une angine virale et ainsi d'adapter les conseils et la thérapeutique associés. D'autre part, ces tests permettent également l'identification de germes chez un porteur sain pour adapter au mieux une antibioprophylaxie avant tout acte chirurgical par exemple.

Ensuite, si l'infection bactérienne est avérée, l'intérêt de ces tests est d'identifier efficacement le ou les pathogène(s) en cause et ainsi étudier leur sensibilité aux antibiotiques pour adapter le traitement à un patient donné. Dès lors que le résultat est connu, le patient peut immédiatement bénéficier d'un traitement adapté et éviter l'utilisation d'antibiotiques de manière inappropriée. Ces tests permettent au médecin d'orienter le diagnostic de manière documentée et éviter ainsi la mise en place d'une

antibiothérapie probabiliste à large spectre. Ils s'inscrivent alors parfaitement dans l'ère de la médecine personnalisée qui est aujourd'hui au cœur du développement des nouvelles thérapeutiques.

Ainsi, les principaux avantages de ces tests sont leur rapidité, spécificité, sensibilité ainsi que leur simplicité et praticité. En effet, ils peuvent être réalisés directement au lit du patient, de manière non invasive, sans faire appel à un laboratoire de biologie, c'est pourquoi ces tests s'intègrent parfaitement dans une routine journalière. Enfin, le résultat est rapide puisqu'il peut être obtenu après 1 à 2 minutes pour les bandelettes urinaires, 10 à 15 minutes pour des tests rapides d'orientation diagnostique, ce qui n'est pas négligeable comparé au délai de plus de 24 heures pour les tests microbiologiques conventionnels.

## 2. Un enjeu de santé publique

La consommation excessive d'antibiotiques reste aujourd'hui un problème de santé publique en France puisque le nombre de prescription d'antibiotiques ne cesse d'augmenter malgré la mise en place de campagnes de prévention. En effet, en 2022, il a été recensé plus de 800 prescriptions d'antibiotiques en ville pour 1 000 habitants, soit plus de 16.6% par rapport à 2021.<sup>[75]</sup> Ces consommations varient selon l'âge et le sexe du patient, mais de manière générale, une consommation d'antibiotiques supérieure à celle de 2019 est observée chez les femmes et chez les enfants de moins de 4 ans. Cet accroissement de prescription concerne notamment l'amoxicilline et les céphalosporines. Or, la résistance à ces deux antibiotiques est aujourd'hui préoccupante et doit inciter les professionnels de santé à restreindre leur prescription. C'est pourquoi, d'un point de vue de santé publique, ces tests de diagnostic rapide peuvent intervenir en amont dans le choix de la thérapeutique et éviter ainsi la propagation de la résistance bactérienne.

Concernant les TROD angine, leur utilisation a permis de diminuer la prescription et la consommation d'antibiotiques depuis 2001. En effet, le Centre National de Référence des Streptocoques a observé une nette corrélation entre l'instauration des tests auprès des médecins généralistes et la baisse de la résistance des streptocoques du groupe A aux macrolides et lincosamides (35% en 2004 contre 5% en 2017).<sup>[76]</sup> Toutefois, ces tests de diagnostic restent encore aujourd'hui sous-utilisés par les médecins généralistes. Ils estiment en effet que, dans la majorité des cas, le diagnostic clinique suffit à poser le diagnostic d'angine. De plus, d'autres paramètres entrent en jeu pour les médecins : le manque de sensibilité et spécificité optimale de certains tests, le temps supplémentaire en consultation pour réaliser les tests ou encore l'impossibilité de le réaliser chez les enfants. Ainsi, il est important de rappeler l'intérêt de ces tests pour les médecins généralistes puisque leur non-utilisation représente un obstacle dans la lutte contre l'antibiorésistance.

L'identification en amont de bactéries résistantes ou multirésistantes par les tests de diagnostic rapide permet également à l'établissement de soin d'instaurer des mesures d'hygiène préventives telles que l'isolement du patient porteur de la bactérie résistante pour éviter la dissémination du portage au sein de l'établissement et ainsi prévenir de l'émergence potentielle de résistances.

Enfin, une analyse publiée par le Ministère de la Santé démontre que près de la moitié des médecins généralistes prescrivent un antibiotique de manière non justifiée à un patient qui n'en a peut-être pas besoin.<sup>[77]</sup> Cela pourrait être évité si les médecins généralistes utilisaient d'une part, les tests de diagnostic rapide déjà existants et d'autre part, si d'autres tests étaient développés pour simplifier le diagnostic d'une infection bactérienne. De plus, aux côtés des médecins, le pharmacien d'officine joue un rôle essentiel dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques puisqu'il peut améliorer le suivi des patients et favoriser la pertinence des prescriptions en réalisant directement des tests de diagnostic sans consultation médicale au préalable. Les missions du pharmacien vont par la suite s'élargir puisque le Projet de Loi de Financement de la Sécurité Sociale (PLFSS) 2024 prévoit la prescription par le pharmacien lui-même lorsque l'origine bactérienne est avérée par un test. Ceci prévaut à la fois pour les infections urinaires ou pour les angines à streptocoques du groupe A.

### 3. Enjeu économique

Dans un dernier temps, l'antibiorésistance est également à l'origine d'une réelle charge économique puisque les organismes résistants aux antibiotiques sont responsables d'une augmentation des taux de morbidité et de mortalité. La surconsommation d'antibiotiques en France a induit des dépenses supplémentaires de 70 à 440 millions d'euros par an. Ces coûts sont toutefois difficilement analysables puisqu'en plus des coûts de surconsommation d'antibiotiques s'ajoutent les coûts liés à l'hospitalisation, les consultations médicales à multiples reprises, la diffusion de germes résistants à l'origine de contamination croisée, sans oublier les coûts sociétaux avec un impact sur la vie professionnelle. D'après une étude menée en 2015, l'antibiorésistance aurait entraîné à la France un coût global de 109.3 millions d'euros.<sup>[78]</sup> D'autre part, une étude plus ancienne avait montré que l'implantation des tests pour les angines à streptocoques A permettait d'économiser environ 6 euros par patient en moyenne, ce qui revient à une économie de 27 millions d'euros à l'année pour l'Assurance Maladie. Cela montre que les tests de diagnostic rapide permettent d'éviter une surconsommation d'antibiotiques et donc une diminution des coûts liés aux bactéries multirésistantes.<sup>[79]</sup> C'est pourquoi, il est désormais urgent de développer de nouvelles ressources afin de limiter l'extension de l'antibiorésistance tant d'un point de vue santé publique que d'un point de vue économique. Pour cela, en plus des campagnes de prévention auprès des patients, il est nécessaire

de convaincre les médecins généralistes de prendre le temps d'utiliser les tests de diagnostic rapide pour limiter la propagation des souches résistantes.

Enfin, les tests de diagnostic rapide semblent être une stratégie efficace pour diminuer la résistance aux antibiotiques puisqu'elle permet de limiter l'utilisation inutile d'antibiotiques et elle s'annonce être la stratégie la plus économique à la fois chez l'adulte et l'enfant. En effet, une étude coût-efficacité réalisée en 2012 a montré que l'utilisation des tests était la stratégie la plus simple à mettre en place car rapide et pratique. La mise en culture, quant à elle, nécessite de prévoir un délai de plusieurs jours ainsi qu'une nouvelle consultation si le résultat est positif. Dans le cas des angines bactériennes à streptocoques A, l'utilisation des tests permet de limiter la fréquence des complications associées à l'angine, limiter l'extension des souches résistantes et ainsi limiter les dépenses de santé.<sup>[80]</sup>

Plus récemment, des tests pouvant identifier le ou les gènes de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques ont été développés dans le but de toujours optimiser le choix du traitement et agir dans la lutte contre l'antibiorésistance. C'est pourquoi, nous allons maintenant nous focaliser sur le développement de ces tests dans le monde.

## V. Développement de nouveaux tests diagnostiques

Dans la lutte contre le développement des résistances aux antibiotiques, le dépistage des gènes de résistances représente une réelle avancée. Ce chapitre abordera les tests pouvant être utilisés pour détecter la résistance aux bactéries Gram négatif avec dans un premier temps la description des tests permettant la détection des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu puis dans un second temps les tests pouvant dépister la résistance aux carbapénèmes. Enfin, puisque la tuberculose reste aujourd'hui l'infection bactérienne la plus meurtrière dans le monde, les outils de diagnostic de la résistance aux agents antituberculeux seront décrits.

### A. Détection des gènes de $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Parmi la dissémination des  $\beta$ -lactamases de classe A, la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu est aujourd'hui l'un des mécanismes de résistance le plus répandu chez les Entérobactérales, notamment *K. pneumoniae* et *E. coli*. Ces dernières sont capables d'hydrolyser à la fois les pénicillines, les céphalosporines de troisième et quatrième générations telles que la ceftriaxone, le céfotaxime, le ceftazidime ainsi que l'aztréonam de la famille des monobactames, mais pas les céphamycines ni les carbapénèmes. La propagation mondiale de ces enzymes est un réel problème de santé publique

puisque ces Entérobactérales productrices de BLSE sont responsables de 19% des infections nosocomiales et sont associées à une augmentation de la mortalité et des coûts liés aux soins. Les BLSE regroupent les enzymes TEM, SHV, CTX-M, VEB et GES, parmi lesquelles, une montée croissante des CTX-M a vu le jour à la fin des années 1980 pour se répandre de manière spectaculaire dans le monde entier et être à l'origine d'infections nosocomiales et communautaires.

Les enzymes CTX-M ou CefoTaXimases-München doivent leur nom suite à leur apparition au sein d'une souche clinique d'*E. coli* détectée chez un enfant souffrant d'une otite moyenne à Munich et conférant une résistance élevée au céfotaxime uniquement.<sup>[81]</sup> Suite à la présence de mutations ponctuelles, des variants de cette enzyme ont vu le jour et sont capables d'hydrolyser également le ceftazidime. La propagation rapide et massive des CTX-M font de ces enzymes, les BLSE les plus répandues chez les Entérobactérales à l'échelle mondiale. Plus de 170 variants sont aujourd'hui décrits et sont répartis en cinq groupes majeurs selon leur séquence d'acide aminés : CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25. Une identité de l'ordre de 90% est retrouvée parmi les membres d'un même groupe.<sup>[82,83]</sup> Il est important de noter que le variant CTX-M-15 du groupe 1 est considérée comme la variante la plus répandue dans de nombreuses régions du monde suivie de la variante CTX-M-14 du groupe 9, qui est quant à elle, répandue en Chine, Japon, Asie du Sud-Est et en Espagne. Les enzymes du groupe 2 et 8 sont plutôt retrouvées en Amérique du Sud. Enfin, les gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases CTX-M sont issus des bactéries du genre *Kluyvera*. En effet, au sein de souches *Kluyvera ascorbata* a été retrouvés des précurseurs de gènes codant pour les enzymes des groupes CTX-M-1 et 2 tandis que d'autres précurseurs de gènes pour les groupes 8 et 9 ont été identifiés dans des souches *Kluyvera georgiana*. L'origine des enzymes CTX-M-25 n'est, quant à elle, pas identifiée pour le moment.<sup>[84]</sup>

Ainsi, face à la montée croissante des enzymes CTX-M, la détection rapide de ces enzymes est cruciale pour permettre la mise en œuvre de mesures de prévention des infections et de gestion des antibiotiques, limitant ainsi le recours aux carbapénèmes. C'est pourquoi, cette première partie de chapitre se focalisera sur le développement et la mise au point de tests, majoritairement immunochromatographiques, pour détecter efficacement et rapidement la présence de différents groupes d'enzymes CTX-M. Elle présentera d'une part les approches ancestrales, à savoir les techniques phénotypiques et biochimiques et d'autre part, le développement de nouvelles approches telles que les techniques immunochromatographiques.

## 1. Utilisation des approches phénotypiques et biochimiques

### i. Approches phénotypiques

Dans le milieu hospitalier, l'identification des porteurs de BLSE CTX-M est basée sur une approche phénotypique en utilisant la méthode des disques de diffusion sur des échantillons mis en culture avec



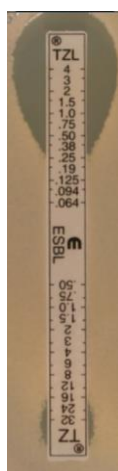
ou sans inhibiteur de  $\beta$ -lactamases. Cette méthode est considérée comme étant fiable par le Haut Conseil de la Santé Publique, toutefois, elle est lente et nécessite l'expertise du personnel pour l'interprétation des résultats. Des géloses sélectives peuvent également être employées pour une identification claire et spécifique. Dans le cas de la détection des BLSE, la gélose CHROMagar ESBL ou chromID ESBL, développées par CHROMagar et bioMérieux, tous deux basés en France peuvent être utilisées par exemple. Or, le dépistage de ces résistances est essentiel dans la lutte contre la dissémination de BLSE de type CTX-M au sein des établissements de soins, c'est pourquoi d'autres solutions ont été développées.

## ii. Approches biochimiques

Des tests biochimiques ont été développés pour s'inscrire dans cette lutte de propagation rapide des enzymes CTX-M. Pour cela, nous retrouvons par exemple le test ETEST® BLSE développé par la société bioMérieux en France, le test ESBL NP® développé par Liofilchem basé en Italie ou encore le  $\beta$ -Lacta™ produit par Bio-rad aux Etats-Unis.

### *Présentation du ETEST® BLSE*

Tout d'abord, le ETEST® utilise la méthode de gradient de diffusion, c'est-à-dire un mélange de la méthode de dilution avec celle de diffusion, dans le but de déterminer la CMI.<sup>[85]</sup> Pour cela, une bandelette imbibée à ces deux extrémités est déposée sur une géloseensemencée. On y retrouve d'un côté, une céphalosporine de troisième ou quatrième génération seule (céfotaxime, ceftazidime ou céfépime) et de l'autre côté, la même céphalosporine en combinaison avec l'acide clavulanique. La CMI se lit visuellement à partir de l'échelle graduée de la bandelette en fonction de l'ellipse d'inhibition (Figure 20). Si le rapport entre la CMI de la céphalosporine seule comparé à la CMI de l'antibiotique en association avec l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamase est supérieur à huit alors la présence du phénotype BLSE est confirmée.



*Figure 20: Représentation de la bandelette ETEST® BLSE permettant la détermination de la CMI. Ici, la CMI de la ceftazidime seule (TZ) est de 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tandis que la CMI de la ceftazidime et de l'acide clavulanique (TZL) est de 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  <sup>[86]</sup>*

### Présentation du test ESBL NP® et du $\beta$ -Lacta™

Le test ESBL NP® développé par la société Liofilchem et le test  $\beta$ -Lacta™ produit par Bio-rad utilisent tous les deux la même technique. En effet, ce sont des tests colorimétriques permettant de détecter uniquement les bactéries productrices de BLSE pour le test ESBL NP® tandis que le test  $\beta$ -Lacta™ peut mettre en évidence la présence de BLSE, d'autres céphalosporinases ou des carbapénèmases. Dans le but de décrire la technique, prenons l'exemple du test ESBL NP®. Pour cela, les bactéries sont incubées dans trois milieux contenant tous le même indicateur de pH, le rouge de phénol, et contenant soit le céfotaxime seul, soit le céfotaxime associé au tazobactam, soit sans aucun antibiotique. L'hydrolyse du céfotaxime par une BLSE conduit à la formation d'un produit sous forme d'acide carboxylique entraînant une diminution du pH et donc un changement de couleur passant du rouge au jaune. [87] Dans le cas d'une BLSE, son activité peut être inhibée par le tazobactam et de ce fait empêcher l'hydrolyse de l'antibiotique et ainsi le changement de couleur. L'intérêt de tester l'échantillon en présence du tazobactam est de différencier les producteurs de BLSE des non producteurs de BLSE puisque ces derniers ne sont pas sensibles au tazobactam (Figure 21).

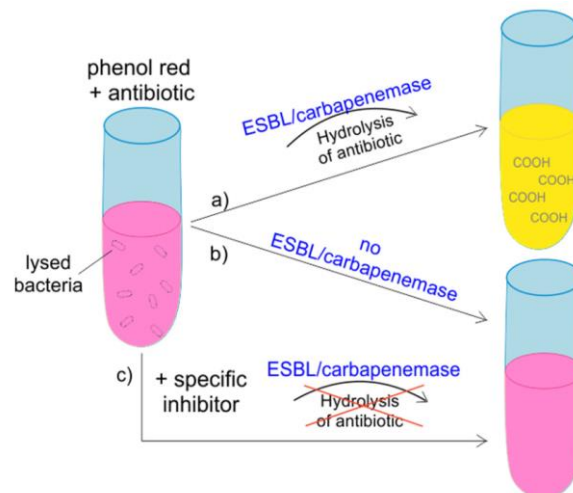


Figure 21 : Représentation du principe du test colorimétrique ESBL NP® [87]

Une étude menée par Gonzalez *et al.* a permis d'évaluer les performances de ces deux tests biochimiques sur 93 isolats bactériens regroupant majoritairement des Entérobactérales, *Pseudomonas spp.* et *Acinetobacter spp.* [88] Tous ont été caractérisés par la présence de  $\beta$ -lactamases au préalable. D'une part, concernant le test ESBL NP®, des résultats similaires ont été obtenus pour les trois espèces avec une sensibilité globale de 89% et une spécificité globale de 93%. Cette même équipe a évalué ce test sur 450 échantillons d'urine ce qui a permis une interprétation claire de 444 échantillons avec une sensibilité et spécificité de 98% et 99.8% respectivement. Toutefois, si l'on prend

en compte les six résultats non interprétables et qu'on les compare aux résultats obtenus lors de la mise en culture des échantillons, alors deux d'entre eux correspondaient à des producteurs de BLSE, ce qui n'était pas le cas des quatre autres. De ce fait, si l'on considère les résultats non interprétables comme des faux-négatifs, alors le test possède une sensibilité globale de 94.1%.<sup>[89]</sup> D'autre part, le  $\beta$ -Lacta™ a permis de donner des résultats interprétables pour 80 isolats sur les 93 souches bactériennes disponibles et a montré une sensibilité entre 89% et 77% selon que les résultats non interprétables soient considérés comme positifs ou négatifs et une spécificité globale de 93%.

Ainsi, ces tests colorimétriques permettent de fournir une indication rapide sur la souche testée afin de voir si elle est productrice de BLSE ou non mais ne permettent pas de déterminer précisément le type de BLSE mis en jeu. C'est pourquoi, de nouvelles méthodes ont été développées, notamment les tests utilisant des techniques moléculaires ou immunochromatographiques.

## 2. Développement de nouvelles approches

### *i. Approche moléculaire*

Les tests moléculaires sont la méthode de référence pour la détection des BLSE et en particulier des enzymes CTX-M grâce à leur sensibilité et spécificité souvent élevées. Elles sont basées sur l'amplification des acides nucléiques par PCR.

La technique PCR permet l'extraction de très petites quantités d'acides nucléiques dans le but de produire plusieurs copies d'une séquence cible de l'ADN. Elle est basée sur une répétition de cycles divisée en trois étapes. Dans un premier temps, une étape de dénaturation permet de chauffer le mélange réactionnel de façon à séparer les doubles brins complémentaires de l'ADN. Ensuite, la deuxième étape consiste à refroidir le milieu permettant aux amorces sens et anti-sens de s'apparier à l'ADN simple brin. Puis, le cycle se termine par une phase d'extension où l'ADN polymérase ajoute des nucléotides au niveau de chaque amorce de manière à synthétiser le brin complémentaire de l'ADN. Ainsi, à chaque cycle de PCR, le nombre de séquences ciblées de l'ADN est doublé. Les tests PCR multiplex en temps réel permettent l'amplification de plusieurs cibles en une seule réaction et donc dans notre cas, la détection simultanée de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques dans un seul test.

Deux tests sont actuellement disponibles sur le marché : le test ESBL ELITE MGB® développé par la société française ELITech ainsi que le test Check-Direct ESBL Screen for BD Max™ de la société Check-Points Health basée aux Pays-Bas.

#### Présentation du test ESBL ELITe MGB®

Le test ESBL ELITe MGB® est un test de diagnostic *in vitro* reposant sur de la PCR multiplex en temps réel, équipé de 2 sondes pour une amplification des gènes CTX-M-1 d'une part et des gènes CTX-M-9 d'autre part. Ce test permet donc de détecter précocement les enzymes CTX-M les plus largement répandues, comme CTX-M-14 du groupe 9 et CTX-M-15 du groupe 1, dans diverses matrices telles que des cultures ou hémocultures positives enrichies, en moins de 3 heures. L'évaluation de ce kit a été effectuée et publiée par Girlich *et al.* à partir de 29 colonies constituées principalement d'Entérobactérales et de 20 hémocultures caractérisées positives.<sup>[90]</sup> Parmi les 29 colonies, le test a montré une sensibilité de 100% et une spécificité de 96.5% en raison de la révélation d'un faux positif. A partir des hémocultures positives, le test a montré une sensibilité et spécificité de 100%. Toutefois, plusieurs limitations peuvent être décrites telles que l'utilisation d'hémocultures enrichies, nécessitant l'utilisation d'échantillons issus de vrais patients pour évaluer réellement la sensibilité du kit. De plus, ce test ne cible que les enzymes du groupe 1 et du groupe 9 sans révéler précisément l'enzyme mise en cause, ce qui pose des problèmes en termes d'épidémiologie. En effet, son utilisation sera limitée dans un pays où la prévalence d'autres groupes de CTX-M tels que le groupe 2 est élevée.

#### Présentation du test Check-Direct ESBL Screen

Le test Check-Direct ESBL Screen, quant à lui, est capable de détecter les gènes issus du groupe CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 et les gènes SHV. Il utilise également la PCR en temps réel avec l'utilisation de cinq sondes fluorescentes pour la détection des produits amplifiés, dont quatre pour la reconnaissance spécifique des gènes BLSE et une de contrôle. Ceci permet de détecter presque tous les variants cliniquement pertinents des groupes d'enzymes mais pas les variants plus rares ni les autres familles de BLSE mineures telles que TEM, GES ou VEB. Il est destiné à être utilisé uniquement sur des écouvillons rectaux ce qui permet son utilisation rapide dans le processus de diagnostic, ne nécessitant pas de mise en culture. L'évaluation de ce kit a été réalisée sur 176 échantillons d'*E. coli* ou *K. pneumoniae* avec seulement 6.3% des échantillons producteurs de BLSE. Le test a, cependant, détecté 12.7% des échantillons comme étant positifs au phénotype BLSE ce qui explique sa faible sensibilité de 81.8% et une spécificité de 92%.<sup>[91]</sup>

De manière générale, ces tests nécessitent un équipement spécifique au sein du laboratoire médical ainsi qu'un personnel formé à l'utilisation de la PCR, résultant en une technique laborieuse et coûteuse. C'est pourquoi, l'objectif est de développer des méthodes beaucoup plus rentables, ne nécessitant pas de matériel spécifique, facile à utiliser et interpréter sans formation supplémentaire

du personnel. C'est le cas notamment du développement de techniques basées sur l'immunodosage à flux latéral qui ont montré leur importance dans la lutte contre l'antibiorésistance.

ii. Le développement des tests immunochromatographiques

Dans le but d'obtenir des résultats fiables et rapides en quelques minutes à partir de diverses matrices (colonies isolées sur milieu sélectif ou non, hémocultures positives, écouvillons rectaux...), les tests immunochromatographiques ont démontré qu'ils pouvaient répondre à ces conditions. A l'inverse des tests précédemment décrits qui détectaient les gènes de résistance, ces tests sont composés d'anticorps capables de reconnaître les protéines codées par les gènes de résistance à partir de cultures bactériennes. Dans ce cas précis, la plupart des tests immunochromatographiques disponibles sur le marché utilisent la méthode décrite ci-dessous (Figure 22). Cette technique consiste à déposer l'analyte avec les antigènes, correspondant dans ce cas précis aux  $\beta$ -lactamases CTX-M, qui vont être capables de migrer le long de la membrane de nitrocellulose par capillarité. En contact avec les anticorps marqués à l'or colloïdal, un complexe antigène-anticorps va se former puis sera capturé par les anticorps spécifiques de l'antigène immobilisés au niveau de la ligne de test permettant l'apparition d'une bande colorée. Par ailleurs, des anticorps anti-IgG sont immobilisés au niveau de la ligne de contrôle pour capturer l'excès d'anticorps marqués aux particules d'or. La formation d'une bande colorée au niveau de cette ligne permet de vérifier que le test est fonctionnel et que les résultats peuvent être interprétés.

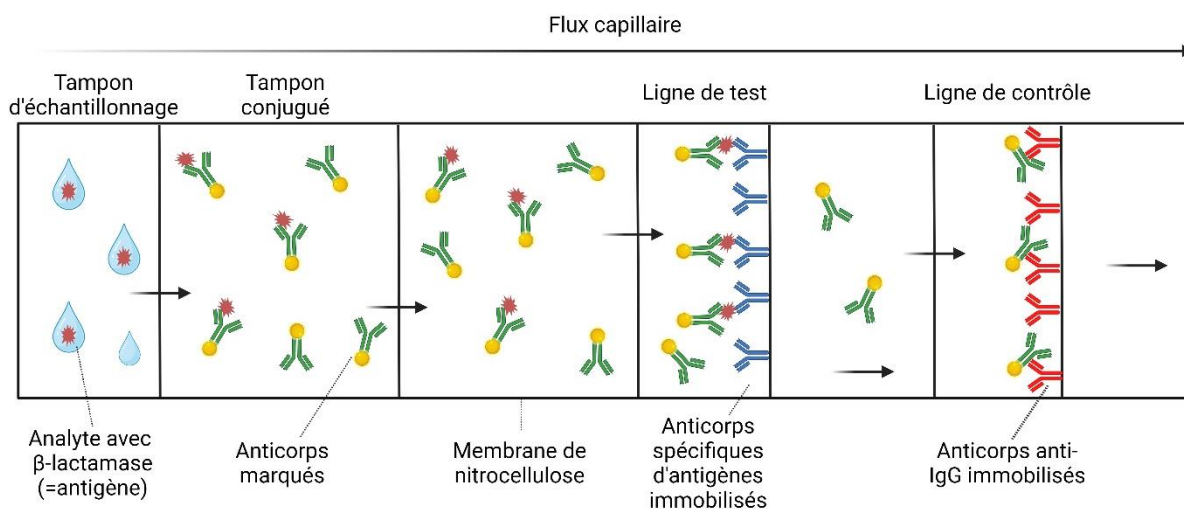


Figure 22 : Principe de l'immunodosage à flux latéral appliqué à la détection de  $\beta$ -lactamases. Réalisé avec Biorender et adapté de Noster J. et al. [87]

Cette technique immunochromatographique est employée pour plusieurs tests qui seront détaillés ci-dessous.

### *Présentation du test RESIST CTX-M*

Le test RESIST CTX-M, commercialisé par la société Coris BioConcept permet de détecter uniquement les enzymes les plus répandues, notamment les enzymes CTX-M-15 du groupe 1 et CTX-M-14 du groupe 9. Pour cela, des anticorps monoclonaux anti-CTX-M-14 et anti-CTX-M-15 sont immobilisés à deux endroits distincts de la membrane de nitrocellulose.<sup>[92]</sup> Deux autres types d'anticorps conjugués à de l'or colloïdal sont également retrouvés au niveau de la membrane dont un dirigé contre un second épitope de l'enzyme CTX-M et un autre pour le contrôle du test. Ensuite, le tampon contenant une colonie bactérienne re-suspendue à partir d'une culture sur plaque de gélose va être ajouté au niveau de la membrane. Par diffusion passive, l'analyte va entrer en contact avec les anticorps marqués puis l'ensemble sera capturé par les anticorps spécifiques (anti-CTX-M-14 ou anti-CTX-M-15) au niveau de la ligne de test correspondante. Si l'échantillon possède les enzymes recherchées, une bande colorée apparaîtra à l'une et/ou l'autre des lignes de test. Ce test peut également capturer plus largement les autres variants des groupes 1 et 9. Enfin, l'échantillon continue de migrer jusqu'à la dernière ligne, dite de contrôle, pour capturer l'excès d'anticorps conjugués afin de valider le test en 15 minutes.<sup>[93]</sup>

L'utilisation de ce test a été évalué sur 148 isolats cliniques et a montré une sensibilité et une spécificité de 100%. L'intérêt de ce test est de distinguer la  $\beta$ -lactamase mise en jeu dans le mécanisme de résistance grâce à la distinction des deux cibles en deux lignes de test. De ce fait, il peut apporter une réelle information épidémiologique. Toutefois, son utilisation doit être réfléchiée dans les régions du monde où d'autres enzymes CTX sont répandues.

### *Présentation du test LFIA-CTX*

Ce principe a été appliqué au test LFIA-CTX développé par le CEA-Joliot en partenariat avec une équipe de l'AP-HP où l'utilisation d'anticorps monoclonaux permet de détecter non pas l'enzyme responsable de l'hydrolyse mais l'hydrolyse elle-même du céfotaxime. Il permet d'identifier et de différencier la structure du céfotaxime par rapport au produit hydrolysé obtenu en présence de  $\beta$ -lactamases.<sup>[94]</sup> Dans le cas présent, l'échantillon contenant la bactérie et le céfotaxime est déposé au niveau de la bandelette puis des anticorps monoclonaux spécifiques du céfotaxime marqués à de l'or colloïdal vont reconnaître le céfotaxime intact non-hydrolysé. Au niveau de la membrane de nitrocellulose, la ligne de test est constituée du céfotaxime couplé à de la BSA (Bovine Serum Albumine) tandis que la ligne de contrôle est constitué d'anticorps capables de reconnaître les anticorps anti-céfotaxime marqués. Ainsi, le céfotaxime présent dans l'échantillon va entrer en compétition avec le céfotaxime immobilisé au niveau de la membrane. De ce fait, si le céfotaxime présent dans l'échantillon est intact, alors il va se coupler aux anticorps anti-céfotaxime marqués qui ne seront donc plus disponibles pour se lier au céfotaxime immobilisé au niveau de la ligne de test. A l'inverse, si le céfotaxime est hydrolysé par des céphalosporinases, alors il ne sera pas reconnu par les anticorps anti-céfotaxime qui pourront alors se

lier au céfotaxime immobilisé et faire apparaître une bande colorée au niveau de la ligne de test (Figure 23).

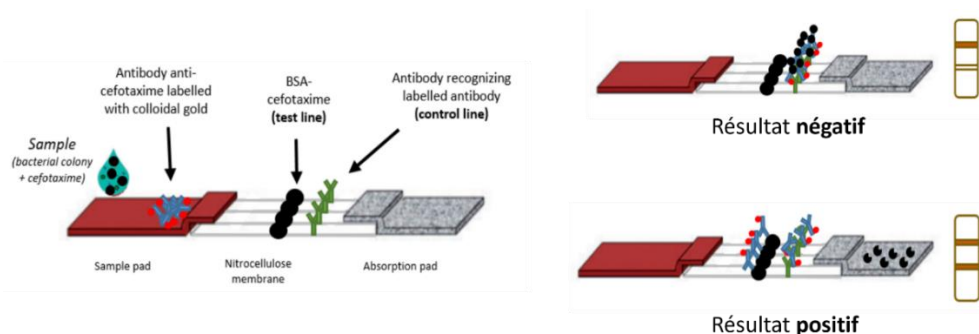


Figure 23 : Principe du test LFIA-CTX ainsi que les deux résultats possibles obtenus après migration à travers la membrane de nitrocellulose<sup>[94]</sup>

Ce test a été validé sur 348 isolats de bactéries Gram négatif caractérisés par la présence de  $\beta$ -lactamases. Sur les 310 isolats capables d’hydrolyser le céfotaxime, 307 ont été identifiés comme étant positif par le test LFIA-CTX permettant de définir une sensibilité de 99.1% et une spécificité de 100%. Cependant, ce test permet de détecter les  $\beta$ -lactamases ayant une activité d’hydrolyse des céphalosporines et n’est donc pas capable de dire si cette activité est causée par la présence de céphalosporinases, de BLSE ou de carbapénémases. Ainsi, dans le but de détecter précisément l’enzyme responsable de l’hydrolyse, le test NG-Test<sup>®</sup> CTX-M-Multi a été mis au point.

#### Présentation du NG-Test<sup>®</sup> CTX-M-MULTI

Le NG-Test<sup>®</sup> CTX-M-MULTI commercialisé par la société NG-Biotech est un test immunologique reposant sur la technique précédemment décrite dans le but de détecter en 15 minutes les cinq principaux groupes d’enzymes CTX-M, à savoir les CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25 à partir d’une colonie bactérienne. De nombreux variants y compris mineurs peuvent être détectés montrant son importance dans des zones où les variants de CTX-M ne sont pas les mêmes que les tendances épidémiologiques mondiales. Le panel de détection possible avec ce test est décrit dans le tableau ci-après.<sup>[95]</sup>

Tableau 4 : Description des variants possibles à la détection par le test NG-Test<sup>®</sup> CTX-M-MULTI

Détection du groupe	Détection des variants
Groupe 1	CTX-M-1, -3, -10, -15, -32, -37, -55, -57, -71, -82, -101, -182
Groupe 2	CTX-M-2
Groupe 8	CTX-M-8
Groupe 9	CTX-M-9, -13, -14, -17, -18, -19, -24, -27, -65, -93
Groupe 25	CTX-M-94, -100

D'un point de vue fonctionnel, des anticorps monoclonaux de souris anti-CTX-M marqués sont présents en amont de la bandelette pour fixer l'enzyme CTX-M si elle est présente dans l'échantillon. Le complexe formé va alors migrer par flux capillaire pour arriver à la ligne de test puis à la ligne de contrôle. Dans un premier temps, la ligne de test est constituée de trois paires d'anticorps monoclonaux anti-CTX-M immobilisés et une bande colorée apparaîtra si ces anticorps interagissent avec le complexe antigène-anticorps. Il y a seulement trois paires d'anticorps et non cinq, en raison de la réactivité croisée de certains anticorps avec les CTX-M-8 et -25. La ligne de contrôle immobilise des anticorps polyclonaux de chèvre anti-souris de manière à pouvoir interagir avec les anticorps monoclonaux anti-CTX-M marqués, pour rendre conforme le test à son utilisation (Figure 24).<sup>[96]</sup> Ainsi, si une bande colorée apparaît à la fois au niveau de la ligne de test et de la ligne de contrôle, alors l'échantillon contient une enzyme CTX-M, ce qui n'est pas le cas si seule la ligne de contrôle est colorée. Si aucune bande n'apparaît ou si le contrôle n'est pas positif, le résultat ne peut pas être interprété et l'expérience doit être de nouveau réalisée.

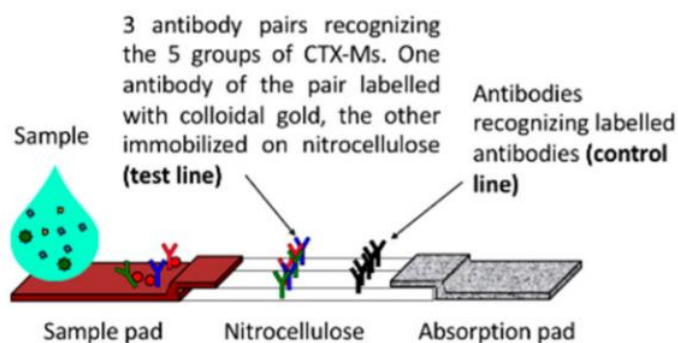


Figure 24 : Principe du NG-Test® CTX-M-MULTI<sup>[96]</sup>

Selon l'article publié par l'équipe de Bernabeu *et al.*, ce test a montré une sensibilité et une spécificité de 100% quant à la détection des enzymes CTX-M à partir de plusieurs échantillons cultivés sur plaque de gélose, peu importe les Entérobactérales mises en cause. De plus, ce kit peut également être utilisé pour des échantillons obtenus à partir d'hémocultures positives, ce qui permettrait de réduire le délai d'obtention des résultats.

Puisque ce test couvre un large panel de variants de l'enzyme CTX-M, son utilisation peut être recommandée sur tous les continents, cependant, le résultat du test permet uniquement de signaler la présence ou non de l'enzyme. Il ne permet pas de décrire précisément l'enzyme mise en cause dans le mécanisme de résistance. De plus, ce test est spécifique des enzymes CTX-M et ne permet pas de détecter d'autres enzymes capables d'hydrolyser les céphalosporines à spectre étendu. CTX-M étant la BLSE la plus largement répandue à travers le monde, ce test peut être implanté dans de nombreuses régions. Toutefois, en fonction de la situation épidémiologique, il peut être intéressant de le coupler



au test LFIA-CTX décrit précédemment pour ainsi détecter l'activité d'hydrolyse du céfotaxime et non pas seulement l'expression de CTX-M. C'est pourquoi, le test LFIA Rapidec ESC a été développé.

#### Présentation du test LFIA Rapidec ESC

Le test LFIA Rapidec ESC, combinant le LFIA-CTX et le NG-test® CTX-M-MULTI, permet l'identification des enzymes CTX-M et de toutes autres enzymes capables d'hydrolyser les céphalosporines à spectre étendu à partir de colonies bactériennes cultivées sur différents milieux de culture. Ce test repose sur la même technique que celle présentée pour le NG-test® CTX-M-MULTI mais avec l'ajout d'une ligne supplémentaire pour la détection des autres enzymes hydrolysant les céphalosporines à spectre étendu. Pour cela, deux types d'anticorps monoclonaux sont présents au niveau du tampon d'échantillonnage.<sup>[97]</sup> On retrouve d'une part, les anticorps monoclonaux de souris anti-CTX-M marqués capable de fixer les  $\beta$ -lactamases CTX-M et d'autre part les anticorps anti-céfotaxime capable de reconnaître spécifiquement le céfotaxime non hydrolysé. Deux lignes de tests sont présentes ainsi qu'une ligne de contrôle qui correspond aux anticorps anti-souris préalablement décrits avec le NG-test®. La première ligne de test est représentée par l'immobilisation du céfotaxime-BSA (ligne retrouvée au sein du test LFIA-CTX) tandis que la deuxième ligne de test est marquée par les trois paires d'anticorps monoclonaux anti-CTX-M (Figure 25). L'échantillon migre à travers la membrane de nitrocellulose par capillarité pendant 10 minutes et les résultats peuvent être interprétés.

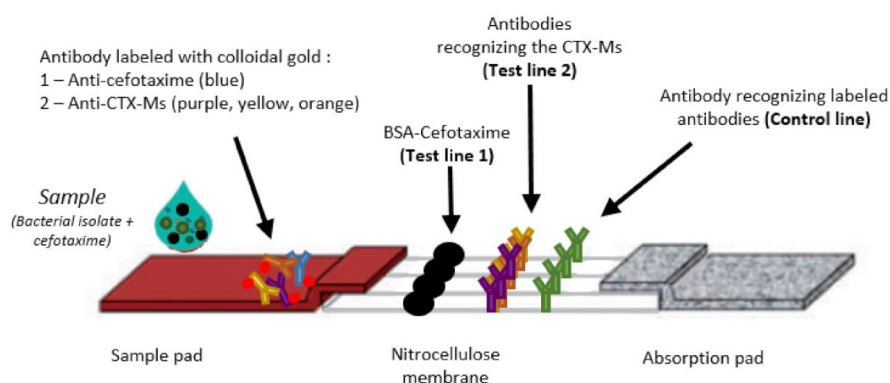
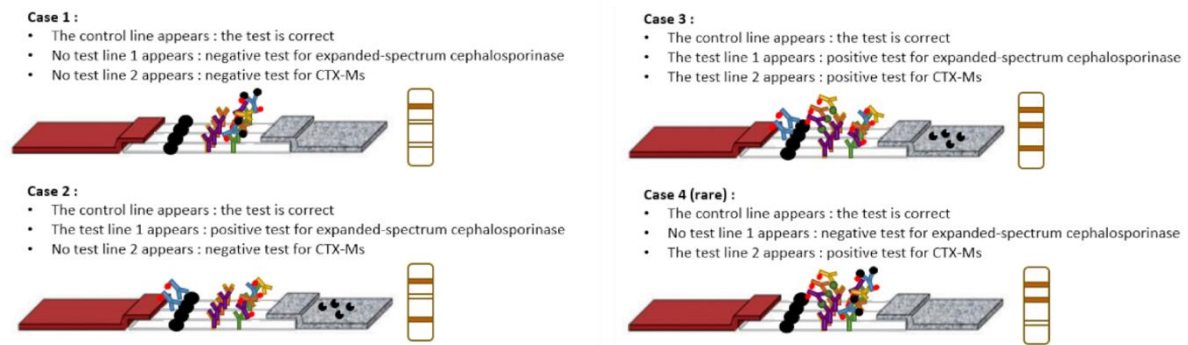


Figure 25 : Principe du test LFIA Rapidec ESC combinant les principes des tests LFIA CTX et le NG-Test® CTX-M-MULTI <sup>[97]</sup>

Différents résultats peuvent être observés :

- **Cas 1** : l'échantillon ne présente aucune  $\beta$ -lactamase capable d'hydrolyser le céfotaxime, alors seule la bande au niveau de la ligne de contrôle apparaît.
- **Cas 2** : une bande colorée apparaît au niveau de la première ligne ainsi qu'au contrôle alors cela signifie que le céfotaxime a été hydrolysé par des  $\beta$ -lactamases puisque le céfotaxime immobilisé a pu se lier aux anticorps anti-céfotaxime. Puisque la deuxième ligne de test n'est pas colorée, alors ce test montre la présence de  $\beta$ -lactamases non CTX-M.

- **Cas 3** : une bande colorée apparaît au niveau des deux lignes de test ainsi que la ligne de contrôle, alors cela montre la présence d'une part, des enzymes CTX-M et d'autre part, des enzymes capables d'hydrolyser le céfotaxime.
- **Cas 4** : une bande colorée apparaît au niveau de la deuxième ligne ainsi qu'à la ligne de contrôle, alors l'échantillon est positif au phénotype de BLSE CTX-M uniquement.



*Figure 26 : Représentation des résultats pouvant être obtenus suite à l'utilisation du test LFIA Rapidec ESC [97]*

Les performances de ce test ont fait l'objet d'une évaluation et ont montré une excellente spécificité et sensibilité (100%) lorsqu'il a été évalué sur 188 isolats. Parmi ces échantillons, 171 souches étaient capables d'hydrolyser le céfotaxime et ont effectivement donné un résultat positif au niveau de la première ligne du test. En effet, le céfotaxime étant hydrolysé, il ne peut pas se lier aux anticorps anti-céfotaxime qui, de ce fait, pourront se lier au céfotaxime immobilisé au niveau de la première ligne de test. D'autre part, 17 isolats étaient incapables d'hydrolyser le céfotaxime donnant un résultat négatif à cette même ligne du test. Parmi eux, la souche CTX-M-93, exprimant CTX-M mais incapables d'hydrolyser le céfotaxime, a donné, quant à elle, un résultat positif au niveau de la deuxième ligne du test. En effet, cette ligne regroupe des anticorps anti-CTX-M capables de reconnaître les isolats exprimant CTX-M.

Ainsi, ce test combinant deux techniques de détection de la résistance au céfotaxime a montré une excellente spécificité et sensibilité et a montré la complexité des tests actuels dans la lutte contre l'antibiorésistance. Suite à ce réel progrès dans le monde du diagnostic, l'objectif est maintenant de tester ce LFIA Rapidec ESC sur d'autres matrices ne nécessitant pas d'étape de culture sur gélose afin de gagner énormément de temps dans la mise en place d'un traitement approprié.

Dans un contexte de lutte contre la résistance aux antibiotiques, ces tests devraient alors aider à une utilisation appropriée des antibiotiques de façon à retarder l'utilisation des carbapénèmes. Toutefois, la résistance aux carbapénèmes s'est déjà bien disséminée dans plusieurs régions du monde et nous

devons également faire face à ce phénomène inquiétant. C'est pourquoi, d'autres tests ciblant les gènes de résistance aux carbapénèmes ont été mis au point.

## B. Détection des gènes de résistance aux carbapénèmes

Suite à l'émergence des  $\beta$ -lactamases capables d'inactiver les  $\beta$ -lactamines, l'utilisation de cette famille d'antibiotiques est désormais menacée. Ceci a été illustré par la prolifération des Entérobactérales résistantes aux céphalosporines à spectre élargi, hydrolysant l'ensemble des  $\beta$ -lactamines à l'exception des carbapénèmes connus comme étant des antibiotiques à large spectre de derniers recours. De ce fait, une augmentation des prescriptions de carbapénèmes a été observée avec comme conséquence une augmentation inquiétante de la résistance aux carbapénèmes suite à la production de carbapénémases. Comme mentionné dans le *Chapitre II(A)2*, ces dernières peuvent appartenir à différentes catégories de la classification d'Ambler. En effet, parmi la classe A, on retrouve les enzymes KPC largement répandues à travers le monde et d'autres enzymes mineures telles que GES, IMI, SME, GIM par exemple. La classe B, quant à elle, regroupe les métallo- $\beta$ -lactamases IMP, VIM et NDM. Enfin, les dernières carbapénémases faisant partis de la classe D d'Ambler sont les oxacillinasés (OXA). Parmi ces carbapénémases, on distingue les enzymes les plus répandues dans le monde KPC, VIM, NDM et OXA-48 connus comme étant les « big 4 ».

Les infections causées par des Entérobactérales productrices de carbapénémases étant difficiles à traiter, il est important de les détecter précocement pour la mise en place rapide de mesures de prévention et de contrôle. De plus, les combinaisons  $\beta$ -lactamines/inhibiteur de  $\beta$ -lactamases ne couvrent pas la totalité des carbapénèmes. En effet, la combinaison ceftazidime/avibactam est efficace contre les bactéries productrices de KPC et OXA-48 tandis que la combinaison imipénèm/rélebactam n'est efficace que contre les bactéries productrices de KPC. Il est alors nécessaire et recommandé de pouvoir différencier les gènes mis en cause dans la résistance pour d'une part, guider le traitement des personnes infectées et d'autre part, alimenter les données épidémiologiques.

Les protocoles de détection actuellement mis en place sont la mise en culture d'échantillons d'écouvillons rectaux sur des milieux sélectifs tels que ChromID CARBA (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), CHROMagar KPC (CHROMagar, Paris, France) suivie d'une confirmation par test phénotypique pour détecter ou non l'hydrolyse des carbapénèmes. On retrouve notamment le test Carba-NP (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), le test Mace Mast, l'hydrolyse de l'imipénèm par MALDI-TOF ou encore le test  $\beta$ -Carba™. Ces méthodes fournissent des informations clés pour la surveillance de la résistance aux antimicrobiens mais pas de notions directes sur les mécanismes de résistance. De plus,

ce protocole est long et donc incompatible avec la mise en place rapide de mesures d'hygiène et de prise en charge individuelle. Les techniques moléculaires restent alors la méthode la plus efficace pour l'identification précoce et précise des gènes de  $\beta$ -lactamases à partir d'un échantillon clinique pas nécessairement mis en culture, en moins d'une heure. Il est aujourd'hui recommandé la mise en œuvre le plus rapidement possible d'un test qui permet de détecter à minima les « big 4 » dans les laboratoires de diagnostic en routine. En se focalisant sur les bactéries Gram négatif résistantes aux carbapénèmes et productrices de céphalosporinases à spectre étendu, il existe désormais plus de 30 tests sur le marché.<sup>[98]</sup>

Actuellement, les tests moléculaires se basent sur trois grandes techniques de détection : l'amplification des acides nucléiques, l'hybridation et les méthodes immunochromatographiques. Cette partie se focalisera alors sur les différents tests disponibles commercialement et sera divisée selon les trois grandes techniques de détection.

### 1. Tests basés sur la technique de l'hybridation

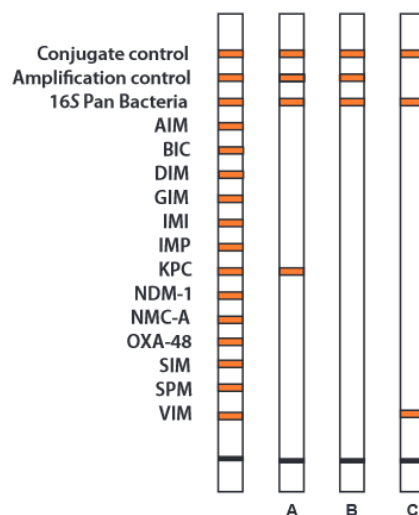
Tout d'abord, ces tests combinent à la fois l'amplification par PCR et l'étape d'hybridation de l'ADN. En effet, cela permet de s'assurer que l'échantillon dispose de suffisamment d'ADN pour détecter les gènes de résistance aux antibiotiques suite à l'hybridation avec les sondes marquées. Selon les tests, on retrouve différentes méthodes d'hybridation : les techniques basées sur des réseaux d'ADN (DNA array), les tests de sonde linéaire (LPA) ou encore les tests d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH). Parmi eux, la société Nanosphere Luminex aux Etats-Unis a développé le test Verigene® Gram-negative blood culture permettant la détection des « big 4 » en moins de 2 heures avec une sensibilité comprise entre 92.3 et 100% selon les études. D'autres tests tels que BIOFIRE® FILMARRAY (développé par bioMérieux, France)<sup>[99]</sup>, Unyvero® de chez Curetis AG (Allemagne)<sup>[100]</sup>, ePlex® BCIF-FN panel de chez GenMarkDx<sup>[101]</sup> et T2Resistance™ Panel de chez T2Biosystems®<sup>[102]</sup>, tous deux basés aux Etats-Unis, permettent la détection des « big 4 » et du gène de résistance IMP, avec des résultats compris entre 1h et 5h et une sensibilité de 100%, lorsque celle-ci a été étudiée et validée. Enfin, le test AID Carbapenemase conçu et développé par la société Autoimmun Diagnostika GmbH en Allemagne permet l'identification et la détection de 13 gènes de carbapénèmases.<sup>[103]</sup> Puisque ce dernier est capable de cibler un large panel de carbapénèmases, son fonctionnement ainsi que l'évaluation de sa performance seront détaillés.

#### *Le test AID Carbapenemase*

Le test AID Carbapenemase repose sur la technique d'hybridation sur bandelette.<sup>[104]</sup> Pour cela, une extraction de l'ADN issu de culture ou d'échantillons urinaires est tout d'abord nécessaire pour pouvoir

ensuite l'amplifier par PCR. Cette étape d'amplification est marquée par l'ajout de marqueur biotine au niveau de chaque séquence d'ADN. Ensuite, ce mélange issu de la PCR va subir une hybridation inverse sur des bandes de nitrocellulose recouvertes de sondes marquées. En effet, des sondes d'ADN simple brin exprimant les gènes de résistance sont fixées sur différentes bandes et une liaison spécifique pourra être détectée si la séquence complémentaire de la sonde est retrouvée. L'ADN non lié quant à lui est lavé et les séquences d'ADN biotinylées spécifiques sont marquées par un complexe streptavidine-phosphatase alcaline. Par la suite, l'ajout de substances telles que le tétrazolium bleu nitré (NCT) et le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCID) vont permettre de cliver la phosphatase alcaline, résultant en une bande colorée en bleu foncé. La détection des gènes de résistance pourra ainsi être déduite en comparant les bandes colorées obtenues.

Les résultats du test sont obtenus selon la [Figure 27](#) ci-dessous, en moins de 5 heures.<sup>[105]</sup> Trois contrôles sont utilisés : le contrôle du conjugué, le contrôle de l'amplification ainsi que le contrôle de la bactérie pan 16S dans le but de montrer que les différentes étapes d'isolement, d'amplification et d'hybridation de l'ADN se sont bien déroulées. Le gène ARNr 16S codant pour la sous-unité 16S de l'ARNr est utilisé car il est très conservé chez toutes les bactéries. Dans le schéma ci-dessous, au niveau de la sonde A, l'agent pathogène ressort positif pour la présence de la carbapénémase KPC, la sonde C, quant à elle, montre la présence d'un agent pathogène VIM-positif. De plus, le contrôle de l'amplification n'est pas suffisant dans la sonde C, ce qui peut être le cas lorsqu'un échantillon est utilisé à partir d'une culture bactérienne. Enfin, pour la sonde B, aucun pathogène n'a montré de signe de résistance aux carbapénèmes.



*Figure 27: Représentation des résultats du test AID Carbapenemase avec l'utilisation de plusieurs sondes et 3 contrôles : contrôle du conjugué, contrôle de l'amplification et contrôle de la bactérie pan 16S<sup>[105]</sup>*

Dans le but d'évaluer la sensibilité et la spécificité de ce test, 151 souches cliniques de bactéries Gram négatif hébergeant une activité d'hydrolyse due aux carbapénèmases ont été sélectionnées et l'évaluation de ce test a pu se faire sur l'identification directe des gènes de résistance à partir de 299 échantillons urinaires issus de patients dont on suspectait une infection urinaire.<sup>[106]</sup>

Ce test a été conçu pour détecter les gènes de carbapénèmases majeurs tels que blaKPC, blaOXA-48 like, blaVIM, blaNDM et blaIMP, des variants mineurs de pénicillinases tels que blaIMI, blaNMC-A et blaBIC, ainsi que des gènes de métallob- $\beta$ -lactamases comme blaAIM, blaDIM, blaGIM, blaSIM et blaSPM. Sur les souches cliniques de bactéries Gram négatif faisant partie de la famille des Entérobactérales ou non, le test a montré une sensibilité et spécificité de 100%. Sur les 299 échantillons urinaires, le test AID Carbapenemase a identifié 20 échantillons positifs à une activité de carbapénémase. Une PCR a permis de confirmer cette activité sur 12 échantillons (représentant 60% des échantillons positifs). Il est toutefois intéressant de noter que parmi les huit échantillons qui n'ont pas pu être confirmés, trois ont montré une sensibilité modérée au méropénèm sur l'antibiogramme. En effet, un diamètre d'inhibition compris entre 25 et 28 mm a été retrouvé alors que les recommandations EUCAST actuelles indiquent un diamètre d'inhibition de 25 mm pour le dépistage de carbapénèmases. Ceci indique donc la présence potentielle de carbapénèmases faiblement exprimées.

Pour conclure, ce test ne peut être réalisé que dans un laboratoire possédant l'équipement pour la PCR, mais reste cependant un test facile à utiliser, précis et sensible. Ainsi, de par sa capacité à détecter un grand nombre de carbapénèmases chez les bactéries Gram négatif, le test AID Carbapenemase peut être utilisé aujourd'hui comme outil de dépistage dans les laboratoires de diagnostic de première ligne rendant un résultat en moins de 5 heures. Dans le but d'obtenir des résultats encore plus rapidement, d'autres techniques ont été développées telles que la méthode d'amplification des acides nucléiques.

## 2. Tests basés sur l'amplification des acides nucléiques

Cette dernière catégorie de tests utilise la technique moléculaire d'amplification des acides nucléiques par PCR à des fins diagnostiques. Dans le cas présent, les tests développés permettent la détection des gènes codant pour des carbapénèmases par PCR en temps réel ou par amplification isotherme en boucle (LAMP). Cette dernière technique consiste en un principe similaire à celui de la PCR, expliqué précédemment, mais utilise une ADN polymérase à forte activité de déplacement des brins, ne dépendant pas de la température.

Cette technique d'amplification des acides nucléique est majoritairement utilisée dans les tests de diagnostic rapide des gènes de résistance aux antimicrobiens puisque c'est une méthode généralement spécifique et très sensible avec des résultats obtenus entre 15 minutes et quelques heures. L'ensemble des tests disponibles commercialement ne peuvent pas être décrits au vu de leur nombre mais seront énumérés. Seuls les tests capables de détecter un panel de gènes avec une bonne sensibilité et spécificité seront détaillés.

i. Détection des cinq principales carbapénèmases

En effet, l'une des recommandations actuelles est de détecter au minimum les « big 4 » dans le cadre de la surveillance de la résistance aux antibiotiques. Les tests tels que Eazyplex® Superbug développé par la société AmplexDiagnostics GmbH en Allemagne et Check-direct CPE de la société Check-Points Health aux Pays-Bas peuvent les détecter avec une sensibilité de 100%. Le test Eazyplex® permet d'obtenir des résultats après 15 minutes à partir d'échantillons variés, colonies bactériennes ou urines par exemple grâce à la méthode d'amplification isotherme.<sup>[107]</sup> Tandis que le test Check-direct CPE permet la détection des « big 4 » en 3 heures directement à partir d'écouvillons rectaux et avec une spécificité de 100% évaluée sur une étude de 83 isolats cliniques.<sup>[108]</sup>

En plus de ces quatre carbapénèmases s'ajoute l'émergence d'une cinquième  $\beta$ -lactamase également répandue à l'échelle mondiale : l'enzyme IMP. Pour cela, en plus de détecter les « big 4 », le test Revogene® Carba C de chez Meridian Bioscience aux Etats-Unis<sup>[109]</sup>, le test BD Max™ Check-points CPO<sup>[110]</sup> développé par Becton-Dickinson en France et le test GeneXpert® Carba-R (Cepheid, Etats-Unis)<sup>[111,112]</sup> sont capables de l'identifier. Le test Revogene® Carba C a été évalué directement sur des colonies bactériennes regroupant à la fois des Entérobactérales, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* et a montré une sensibilité de 100%, excepté pour *P. aeruginosa* (93.7%) où deux variants rares d'IMP n'ont pas été détectés. Les deux autres tests ont été évalués directement à partir d'écouvillons rectaux permettant d'avoir des résultats encore plus rapides. En effet, le test BD Max™ Check-Points CPO a permis de détecter la présence de carbapénèmases en 2.5 heures (comprenant l'extraction de l'ADN et la PCR) avec une sensibilité de 92.8% et spécificité de 97.8%. Toutefois, ce test ne permettait pas la différenciation entre les enzymes VIM et IMP limitant sa potentielle utilisation dans les pays où ces enzymes sont largement répandues. Enfin, le test GeneXpert Carba-R a été le premier test à détecter des carbapénèmases autorisé par la FDA (*Food Drug Administration*) grâce à son délai de résultats (moins d'une heure grâce à l'utilisation de la PCR en temps réel) et sa performance excellente (sensibilité de 100% et spécificité de 99.13%). Son utilisation est particulièrement simple puisque l'écouvillon est positionné dans un flacon de réactif d'échantillon puis ce dernier est transféré dans la cartouche Xpert pour pouvoir être chargé sur le système GeneXpert afin de lancer l'analyse.

Cependant, ces tests sont capables de détecter uniquement les carbapénèmases les plus connues et disséminées à travers le monde, posant une limite dans la surveillance mondiale de la résistance. En effet, ils ne sont pas capables de détecter des carbapénèmases mineures ou des variants mineurs d'*A. baumannii*. De ce fait, la performance doit être améliorée pour permettre l'utilisation de ces tests comme outils de surveillance pour une lutte optimale contre la résistance aux carbapénèmes.

ii. Détection des carbapénèmases mineures et du gène de résistance à la colistine

En plus de détecter les cinq carbapénèmases majeures avec une sensibilité et spécificité de 100%, le test AllPlex™ Entero-DR de chez Seegene en Corée du Sud permet aussi de détecter les gènes *vanA* et *vanB* codant pour la résistance à la vancomycine à partir d'hémocultures.<sup>[113]</sup> C'est le cas également des tests développés par la société Mobidiag tels que Amplidiag® CarbaR+VER permettant de détecter à la fois les carbapénèmases majeures, les gènes *vanA* et *vanB* chez les Entérocoques ainsi que les oxacillinases acquises d'*A. baumannii* telles que les oxacillinases OXA-23, OXA-24 et OXA-58. Cependant, ce dernier test n'est pas capable de détecter les organismes producteurs de carbapénèmases mineures.<sup>[114]</sup> Pour palier à ce déficit, le test de génération supérieure Amplidiag® CarbaR+MCR a été développé dans le but d'inclure la détection d'une carbapénémase mineure appelée GES. Ce dernier possède une sensibilité comprise entre 92 et 100% et une spécificité comprise entre 86 et 100%.<sup>[115]</sup> La spécificité est légèrement diminuée en raison de la détection d'organismes producteurs d'enzymes GES non carbapénèmases. En effet, des variants GES, en particulier GES-7 ont été détectés comme producteurs de carbapénèmases alors qu'il n'hébergeait pas la mutation Gly170Ser responsable de l'activité d'hydrolyse des carbapénèmes. Toutefois, l'intérêt de ce test est qu'il peut être réalisé sur des colonies bactériennes produites sur gélose Müller-Hinton, sur des milieux sélectifs ou directement à partir d'ADN extraits d'écouvillons rectaux en moins de 3 heures.

En conséquence de la montée des carbapénèmases, la colistine est devenue aujourd'hui l'antibiotique utilisé pour les infections causées par les Entérobactérales résistantes aux carbapénèmes. Toutefois, son utilisation de plus en plus massive a conduit à l'émergence de gènes de résistance codés par des plasmides dont *mcr-1*, *mcr-2* retrouvés chez *E. coli* dès 2015. La survenue d'infections causées par des Entérobactérales exprimant à la fois des carbapénèmases et les gènes *mcr-1* ou 2 suscite des inquiétudes puisque la perspective que le monde entre dans une ère « post-antibiotique » où les infections ne pourront plus être guéries est une possibilité réelle. Ainsi, il devient urgent de disposer de méthode de détection des gènes de résistance pour pouvoir apporter le traitement le plus approprié face à ces infections.



C'est pourquoi, la société Mobidiag en Finlande a développé le test Novodiag® CarbaR+ pour détecter à la fois les cinq grandes familles de carbapénèmases, les variants oxacillinases d'*A. baumannii* (OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58) ainsi que les gènes *mcr-1* et *mcr-2* à partir d'isolats cliniques ou d'écouillons rectaux. Une étude réalisée sur 201 isolats cliniques a montré une sensibilité de 98.2% et une spécificité de 99.7%. En parallèle, lors d'une étude réalisée sur 80 écouillons rectaux, le test Novodiag® CarbaR+ a montré une sensibilité de 97.8% et une spécificité de 98.6% avec des résultats obtenus en un peu plus d'une heure.<sup>[116]</sup>

Enfin, dans le but de détecter le plus de cibles possibles en un même kit, deux tests ont été développés pour détecter à la fois les carbapénèmases majeures, mineures et les gènes de résistance à la colistine : le test EasyScreen™ ESBL/CPO (Genetic Signatures, Australie) ainsi que le test AusDiagnostics MT CRE EU (AusDiagnostics, Australie).

#### *Présentation du test EasyScreen™ ESBL/CPO*

Ce test a été développé par la société Genetic Signatures basé à Newtown en Australie et permet la détection de 15 gènes de carbapénèmases ainsi que le gène *mcr-1* codant pour la résistance à la colistine.

Ce test utilise la technique de la PCR associée à la technologie 3base® à partir de cultures bactériennes sur plaques de gélose Müeller-Hinton.<sup>[117,118]</sup> Pour cela, un tampon d'extraction permet de lyser et convertir les acides nucléiques en une forme d'ADN à 3 bases. Ainsi, le bisulfite de sodium réagit avec une cytosine pour former de l'uracile qui est ensuite converti en thymine après amplification par PCR. L'intérêt de passer par la technologie 3base® est de réduire la complexité des génomes pour développer des amorces présentant moins de mésappariements et donc une meilleure amplification par la suite. Une fois l'ADN converti, le kit EasyScreen™ ESBL/CPO permet une amplification par PCR dans le but de détecter les BLSE et les organismes producteurs de carbapénèmases (CPO) à partir de cultures ou d'écouillons rectaux. Ce test détecte le gène *mcr-1* pour déterminer la résistance à la colistine ainsi que 15 gènes codant pour des enzymes issues des différentes classes de  $\beta$ -lactamases tels que :

- Des **pénicillinases** : SHV, TEM
- Des **céphalosporinases** : CMY, DHA
- Des  **$\beta$ -lactamases à spectre étendu** : GES, CTX-M, SHV, TEM
- Des **carbapénèmases** :
  - Majeures : KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48-like
  - Mineures : GES, IMI, SME, OXA-23, OXA-51

Une étude de *Gonzalez et al.*, parue en 2022, a évalué la performance de ce kit sur 341 isolats cliniques comprenant des Entérobactérales, *Pseudomonas spp.* et *Acinetobacter spp.*<sup>[119]</sup> On retrouvait à la fois des bactéries productrices de carbapénèmases ciblées ou non par le test et des Entérobactérales productrices de *mcr-1*. Pour ce qui concerne les Entérobactérales, l'étude a montré une sensibilité de 100% et une spécificité de 96.30% pour la détection des carbapénèmases ainsi qu'une sensibilité de 95.76% et spécificité de 40.98% pour les BLSE. Cette faible spécificité est due au fait que le test n'est pas capable de différencier l'activité de la  $\beta$ -lactamase. En effet, les enzymes GES peuvent être à la fois GES-BLSE ou GES-carbapénèmases ainsi que les variants TEM et SHV qui peuvent avoir une activité BLSE ou pénicillinases. D'autre part, le gène *mcr-1* a été détecté avec une spécificité de 100%. Pour *Pseudomonas spp.*, les carbapénèmases ont été identifiées avec une sensibilité de 92.11% et une spécificité de 96.30% puisque tous les variants d'IMP n'ont pas toujours été détectés. Pour la détection des BLSE, la sensibilité était de 100% avec une spécificité de 92.98%. Enfin, pour *Acinetobacter*, les carbapénèmases ont été détectées avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 84.85%.

Ainsi, le kit de détection EasyScreen™ ESBL/CPO qui a obtenu le marquage CE en 2018, permet une détection simple, efficace et rapide (moins de 3 heures entre la colonie et le résultat) et pourrait donc être facilement implanté dans les laboratoires de diagnostic de première ligne. Puisqu'il est capable d'identifier à la fois les variants majeurs et mineurs, alors ce test est tout à fait adapté à une utilisation à l'échelle mondiale. Cependant, quelques limites sont présentes dans ce test puisque les études ont évalué sa performance uniquement à partir de cultures bactériennes et ont montré qu'il n'est pas capable de détecter les oxacillinases acquises d'*A. baumannii* telles que OXA-24 et OXA-58 et des résultats faussement positifs ou négatifs ont été plus identifiés chez *Acinetobacter* et *Pseudomonas*.

#### *Présentation du test AusDiagnostics MT CRE EU*

La société australienne AusDiagnostics a développé le test AusDiagnostics MT CRE EU pour une détection de 12 gènes de carbapénèmases et du gène *mcr-1*, marqueur de la résistance à la colistine en moins de 4 heures. En effet, les carbapénèmases majeures connues telles que KPC, OXA-48, NDM, VIM, IMP sont ciblées, tout comme les enzymes mineures SIM, GIM, SPM, FRI, IMI, GES et SME.

Ce test est basé sur de la PCR en tandem multiplex en deux étapes.<sup>[120]</sup> La première étape consiste en 15 à 18 cycles de PCR permettant d'améliorer la sensibilité et limiter la compétition entre les cibles présentes à faible et forte concentration. Ensuite, ces produits sont dilués pour éviter toutes potentielles réactions croisées puis sont aliquotés dans les puits de la plaque contenant les amorces internes de chacune des cibles génétiques. Ainsi, ces amorces internes permettront de se lier aux amorces externes issues de la première étape de sorte que seul l'ADN cible soit amplifié. Lors de cette deuxième étape, un colorant va émettre de la fluorescence lorsque l'ADN double brin est produit

pendant l'étape d'amplification. Ainsi, la fluorescence détectée permet de valider la présence d'un gène cible dans le puits.

Ce test a été évalué sur un panel de bactéries mises en culture regroupant des Entérobactérales et des bactéries non fermentaires telles que *P. aeruginosa* et *A. baumannii*. Il a réussi à détecter l'ensemble des carbapénèmases présentes dans les isolats (n=268) dont la majorité appartenait aux cinq grandes familles de carbapénèmases. La sensibilité et la spécificité de ce test étaient de 95.5% et 99.8% respectivement.<sup>[121]</sup> L'intérêt de ce test est qu'il est très spécifique puisqu'aucune réaction croisée n'a été observée lors des études et puisqu'il arrive correctement à différencier l'activité BLSE de l'activité d'hydrolyse des carbapénèmes du variant GES, ce qui n'était pas le cas des différents tests décrits précédemment.

### 3. Tests basés sur les méthodes immunochromatographiques

Ces tests immunochromatographiques à flux latéral ont été développés pour identifier et caractériser plusieurs carbapénèmases en un temps record de 15 minutes. On retrouve notamment le test O.K.N.V.I RESIST-5 développé par la société CORIS BioConcept basé à Gembloux en Belgique qui est une amélioration du test RESIST-4 O.K.N.V introduit en 2019, ainsi que le test NG-Test CARBA-5 de NG-Biotech basé à Guipry, France. Comme le kit NG-Test®, utilisé pour identifier les céphalosporinases à spectre étendu, a déjà été développé dans le chapitre précédent, le test NG-Test CARBA-5 ne sera pas détaillé puisqu'il utilise la même méthode mais avec une différenciation des cinq principales carbapénèmases KPC, OXA-48 like, NDM, VIM et IMP sur des colonies bactériennes.<sup>[122]</sup> Une étude sur 147 souches, regroupant des Entérobactérales et *P. aeruginosa* a été réalisée et a montré une sensibilité globale de 100%. Toutefois, ce test n'a pas été validé pour *A. baumannii*.<sup>[123]</sup>

#### *Présentation du test RESIST-5 O.K.N.V.I*

Le test RESIST-5 O.K.N.V.I repose sur l'utilisation d'une membrane avec des nanoparticules d'or colloïdal et permet la détection des cinq principales carbapénèmases à partir d'une colonie d'Entérobactérales ou de bactéries Gram négatif non fermentaires telles que *P. aeruginosa* et *A. baumannii*.<sup>[124]</sup> Ce kit est divisé en 2 cassettes pour l'identification d'une part des carbapénèmases OXA-48, KPC, NDM et d'autre part les carbapénèmases VIM et IMP. Pour la première cassette, une membrane de nitrocellulose est sensibilisée avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope de la carbapénémase OXA-48 et ses variants correspondant à la ligne « O », un autre anticorps dirigé contre l'épitope KPC (ligne « K ») et un dernier anticorps dirigé contre l'épitope NDM (ligne « N »). Le même principe est utilisé pour la deuxième cassette avec des anticorps monoclonaux qui reconnaissent individuellement les épitopes VIM et IMP. Dans chacun des deux cas, un réactif contrôle

est retrouvé au niveau de la ligne « C ». Des anticorps monoclonaux conjugués et couplés à des particules d'or colloïdal sont également présents et sont dirigés vers un deuxième épitope de la carbapénémase ciblée ou du contrôle. Lors de l'ajout de l'échantillon sur la bandelette, les anticorps conjugués migrent par capillarité avec l'échantillon à travers la membrane de nitrocellulose et entrent en contact avec les anticorps immobilisés. Si l'échantillon contient une ou plusieurs carbapénémases, les complexes se formeront et seront illustrés par la présence d'une ligne colorée au niveau des lignes spécifiques.

D'un point de vue pratique, quelques gouttes de la solution tampon fournie dans le kit est déposée dans un tube. Les colonies bactériennes sont ensuite récoltées à l'aide d'une anse puis sont ajoutées dans le tube contenant le tampon. Après agitation, trois gouttes de cette solution sont déposées au niveau des puits des deux cassettes distinctes. Après 15 minutes, les résultats peuvent être interprétés :

- Le résultat est **positif** si une ligne rouge apparaît au niveau de la ligne de contrôle C ainsi qu'à une ou plusieurs lignes de tests (O, K, N, V, I).
- Le résultat est **négatif** si une ligne rouge apparaît au niveau de la ligne de contrôle C sans aucune autre ligne.
- Le résultat est **invalide** si une bande colorée apparaît au niveau des lignes de tests sans aucune ligne au niveau du contrôle.

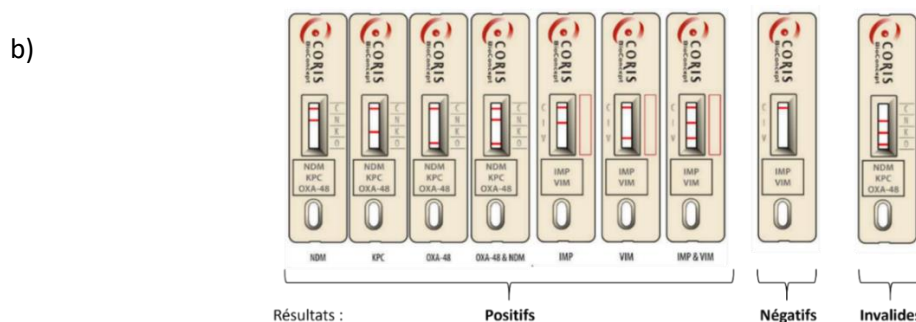
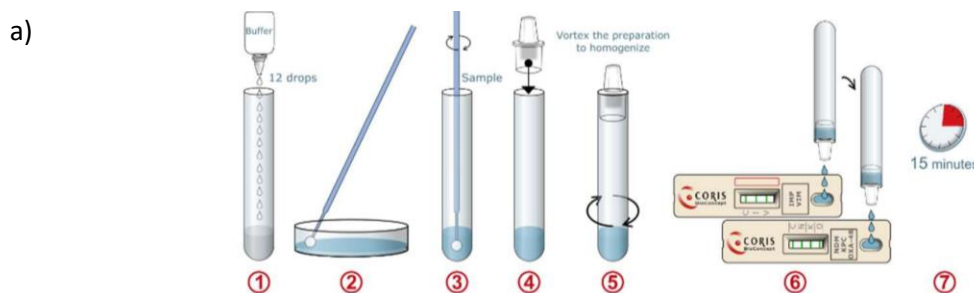


Figure 28: a) Principe du test RESIST-5 O.K.N.V.I : 1) Ajout de 12 gouttes de solution tampon dans un tube semi-rigide 2) Prélèvement de la colonie bactérienne avec une anse bactériologique 3) Agitation dans le tube 4) Insertion du compte-goutte au niveau du tube 5) Agitation pour homogénéiser la solution 6) Dépôt de trois gouttes au niveau des puits des cassettes 7) Lecture du résultat après 15 minutes. b) Représentation des résultats selon les deux cassettes [125]

Plusieurs études ont permis d'évaluer la performance de ce test sur des souches cliniques. Par exemple, Hong *et al.*, ont étudié l'utilisation du test RESIST-5 O.K.N.V.I sur 268 isolats cliniques de bactéries Gram négatif et ont montré une sensibilité et spécificité globales de 98.4% et 100% respectivement. En effet, le test a montré une sensibilité de 100% pour KPC, IMP, OXA-48, 97.6% pour NDM et 93.3% pour la carbapénèmase VIM.<sup>[126]</sup> De plus, toutes les souches productrices de carbapénèmases non ciblées ont été identifiées comme des résultats négatifs, indiquant l'absence de réaction croisée entre les différentes classes de carbapénèmases. Une autre étude rétrospective réalisée sur 164 isolats cliniques producteurs de carbapénèmases prélevés entre 2013 et 2018 en Belgique a montré des sensibilités légèrement plus basses pour NDM (91.2%), VIM (90%) et IMP (84.2%). La sensibilité était toujours de 100% pour OXA-48 et KPC.<sup>[125]</sup>

Pour conclure, bien que ce test soit uniquement qualitatif et ne présume en rien de la présence d'autres mécanismes de résistance, il permet de détecter les cinq principales carbapénèmases retrouvées aujourd'hui en Europe en un test unique. De plus, les résultats sont rapides (15 minutes) et sont faciles à interpréter visuellement.

Enfin, pour conclure ce chapitre sur le développement de nouveaux tests diagnostiques, nous nous focaliserons sur le développement d'un kit précis, rapide et fiable pour la détection de la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) aux différents agents antituberculeux disponibles en clinique.

## C. [Détection des gènes de résistances aux antituberculeux avec Deeplex® Myc-TB](#)

### 1. [La tuberculose](#)

La tuberculose, causée par l'agent *M. tuberculosis*, est une maladie infectieuse transmissible par voie aérienne, à l'origine d'environ 1.3 millions de morts en 2022 et plus de 10 millions de nouveaux cas par an dans le monde selon le dernier rapport de l'OMS.<sup>[127]</sup> Elle touche environ ¼ de la population mondiale avec une prévalence plus élevée dans les régions en voie de développement de l'Asie du Sud-Est (regroupant 46% de l'ensemble des nouveaux cas recensés).

Les personnes infectées par l'agent pathogène vont, pour la plupart, développer une tuberculose dite latente, c'est-à-dire asymptomatique, tandis que moins de 10% des patients vont manifester des symptômes, on parle alors de tuberculose maladie. Cette infection touche particulièrement les poumons et se caractérise par une toux prolongée, des douleurs thoraciques, une fatigue importante

avec apparition de fièvre et de sueurs nocturnes. Cependant, elle peut, dans certains cas, se propager à d'autres organes tels que le rein, le cerveau ou la colonne vertébrale.

Afin de traiter cette infection, le traitement de première intention consiste en une combinaison de quatre antibiotiques regroupant la rifampicine, l'isoniazide, l'éthambutol et le pyrazinamide pendant deux mois suivie de l'association rifampicine et isoniazide pour quatre mois supplémentaires. Le traitement étant long et contraignant, une mauvaise observance ainsi que l'apparition d'effets indésirables sont observées. Ceci a pour conséquence l'émergence de souches résistantes appelées souches *Multi Drug Resistant* (MDR) si elles sont résistantes à la rifampicine et l'isoniazide et souches *Extensively Drug Resistant* (XDR) si elles sont résistantes à la rifampicine, à l'isoniazide, aux fluoroquinolones et soit à la bédaquiline soit au linézolide (traitement de deuxième ligne). Il est important de noter qu'en moyenne, sur 10 tuberculoses pharmacorésistantes, seulement 3 sont aujourd'hui diagnostiquées et mises sous traitements médicamenteux.<sup>[128]</sup> Ainsi, pour limiter ce phénomène, l'OMS a classé la tuberculose parmi les infections bactériennes prioritaires pour la recherche et le développement de nouvelles solutions au niveau mondial.

## 2. Les outils disponibles pour le diagnostic

Face à l'émergence de la résistance aux antibiotiques, le diagnostic précoce est aujourd'hui essentiel pour traiter efficacement et rapidement les patients souffrant de tuberculose. Les recommandations actuelles de l'OMS pour le dépistage de la tuberculose latente reposent sur l'utilisation de tests immunologiques : l'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) ou le test de détection de la libération d'interféron gamma (IGRA).<sup>[129]</sup> Le premier consiste en une injection dans le derme d'une goutte de liquide contenant l'antigène mycobactérien provoquant une réaction inflammatoire permettant de déterminer si la personne a déjà été au contact avec l'agent infectieux. De ce fait, une réaction positive peut également être retrouvée chez une personne qui a été vaccinée par le BCG. Le test IGRA, quant à lui, consiste à mettre en contact le sang du patient avec des antigènes spécifiques du bacille de Koch (*M. tuberculosis*) afin d'évaluer la libération d'interféron gamma par les globules blancs. Ce test étant spécifique de *M. tuberculosis*, il ne provoque pas de réponse positive si la personne a été vaccinée. D'autre part, lorsqu'un patient présente des symptômes de la tuberculose, le gold standard historique était la mise en culture d'échantillons prélevés à partir des expectorations sur milieu solide ou liquide. Toutefois, face à une croissance lente des mycobactéries, cette méthode peut durer plusieurs semaines. Pour une étude étendue de la sensibilité aux médicaments, différentes cultures doivent être réalisées, cependant, il est important de noter que cette procédure n'est pas applicable pour tous les antituberculeux notamment le pyrazinamide qui nécessite des conditions de pH acide rendant la mise en culture difficile. Ainsi, pour contrer ces inconvénients et améliorer la sensibilité du diagnostic, l'OMS

préconise le développement de tests moléculaires rapides dans le but de détecter à la fois les formes simples de tuberculose et les formes résistantes à la rifampicine (traitement de première intention).

Différents tests moléculaires sont déjà sur le marché. On retrouve notamment le test Genotype MTBDR plus® pour détecter les souches résistantes à la rifampicine en ciblant le gène *rpoB* et à l'isoniazide en ciblant les gènes *katG* et *inhA* afin de détecter respectivement le faible et haut niveau de résistance à cet antibiotique. Il existe également le test Genotype MTBDR sl® de Hain Life Science développé en Allemagne pour détecter des souches XDR, résistantes aux traitements de seconde ligne.<sup>[130]</sup> D'autre part, il existe les tests moléculaires sur cartouches GeneXpert MTB/RIF®, MTB/RIF Ultra® développés par la société Cepheid aux Etats-Unis. Ils permettent la détection de la tuberculose résistante à la rifampicine en moins de 80 minutes et sont recommandés depuis 2010 par l'OMS pour les patients souffrant de tuberculose pulmonaire avec suspicion de multirésistance.<sup>[131,132]</sup> Dans le but d'avoir une prédiction encore plus performante et à plus large spectre, la société GenoScreen, en partenariat avec le Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL) à l'Institut Pasteur de Lille, a développé un test de diagnostic, le test Deeplex® Myc-TB.

### 3. Présentation du kit de détection Deeplex® Myc-TB

Ce test permet de diagnostiquer spécifiquement et précisément la résistance de l'agent pathogène à 15 antituberculeux utilisés en clinique, en moins de 48 heures et sans mise en culture.<sup>[133]</sup> Le test est basé sur le séquençage profond et ciblé de l'ADN avec une analyse automatisée des résultats représentés sous la forme d'un diagramme visuel. Ce kit permet également d'identifier plus de 100 espèces de mycobactéries et de détecter des mutations qui sont pour l'heure non caractérisées. En plus d'une sensibilité moyenne de 95.2% et d'une spécificité de 97.1%, la profondeur de séquençage élevée lui permet de détecter des sous-populations bactériennes résistantes, représentant jusqu'à 3% des bactéries dans un échantillon.<sup>[134]</sup>

#### i. Description du kit

D'un point de vue fonctionnel, à partir d'une culture positive aux mycobactéries ou d'un échantillon où l'on suspecte la présence de mycobactéries, une extraction de l'ADN est effectuée suivie d'une amplification des régions du génome des mycobactéries, en ciblant 18 gènes de *M. tuberculosis* codant pour la résistance à 15 antibiotiques : les gènes *rpoB*, *ahpC*, *fabG1*, *katG*, *inhA*, *pncA*, *embB*, *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis*, *tlyA*, *gidB*, *rpsL*, *ethA*, *rv0678*, *rrl*, *rpIC*.<sup>[135,136]</sup> Ces régions sont ensuite séquencées puis une analyse automatisée et robuste permet de prédire si la souche de *M. tuberculosis* présente dans l'échantillon est sensible ou résistante aux différents antibiotiques, en fonction de la présence ou l'absence de mutations. Les souches de *M. tuberculosis* sont détectées en fonction de l'identité du

gène *hsp65*. D'autre part, le spoligotypage est réalisé par l'étude des séquences répétées au sein du locus CRISPR et enfin, le génotypage est réalisé par l'analyse du polymorphisme des SNP.<sup>[135]</sup> Ces données pourront ensuite être téléchargées *via* l'application web sécurisée. L'ensemble de ces étapes sont condensées dans le kit tout-en-un Deeplex® Myc-TB puisque ce dernier regroupe un mélange prêt à l'emploi pour l'amplification par PCR multiplex, un contrôle positif de l'ADN et un code permettant d'avoir accès aux résultats sur l'application web.

ii. Représentation des résultats

Les résultats sont représentés sous la forme d'une carte avec au centre les informations concernant la mycobactérie identifiée et le profil de résistance sur les gènes cibles est retrouvé à l'extrémité du cercle (Figure 29). Différentes couleurs sont utilisées pour permettre une interprétation facile des résultats. En effet, si une mutation associée à un phénotype de résistance est observée, alors celle-ci apparaît en rouge, à l'inverse, si la mutation n'est pas associée à un profil de résistance, alors elle est indiquée en vert. Dans certains cas, la mutation peut être identifiée en bleu si cette dernière n'est pas encore bien caractérisée et dont l'impact est inconnu ou orange en cas d'hétéro-résistance. Ces mêmes couleurs sont utilisées par le logiciel pour décrire la sensibilité aux différents antibiotiques : la couleur verte est retrouvée lorsque la bactérie est sensible à l'antibiotique, tandis que les couleurs rouge et orange sont retrouvées si la bactérie est résistante. Ceci permet de représenter les résultats de manière simple, complète et concrète.

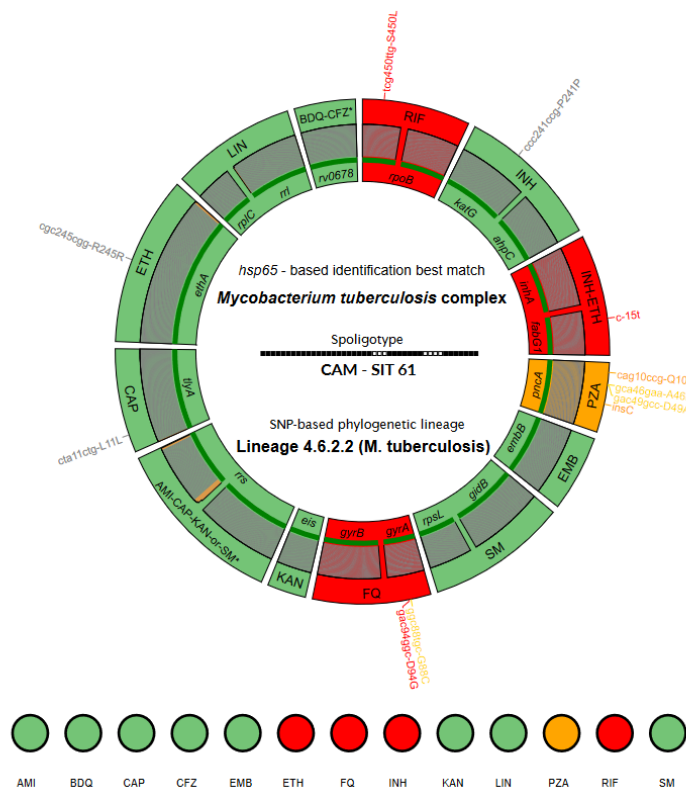


Figure 29 : Représentation des résultats sous forme d'une carte dans l'application web Deeplex®<sup>[133]</sup>



### iii. Evaluation de la performance du kit

Parmi les régions du monde les plus touchées par l'épidémie de souches pharmacorésistantes, on retrouve l'Eswatini, au sud de l'Afrique. Afin de lutter contre cette maladie, l'OMS a recommandé l'utilisation du test Xpert MTB/RIF comme test de première intention pour détecter la résistance à la rifampicine, marqueur d'une tuberculose multirésistante. Toutefois, ce test ne détecte que les mutations retrouvées au niveau de la région déterminant la résistance à la rifampicine (RRDR) du gène *rpoB*, couvrant plus de 95% des cas connus de tuberculose résistante à la rifampicine. Or, une étude a rapporté que plus de 50% des souches de *M. tuberculosis* en Eswatini portent la mutation Ile491Phe dans *rpoB*, mais pas dans la région déterminant la résistance à la rifampicine, conférant alors une résistance à la rifampicine qui n'est pas détectée par les tests actuellement recommandés par l'OMS, dont Xpert MTB/RIF.<sup>[137]</sup> Une étude réalisée en République Démocratique du Congo, où le test Xpert MTB/RIF a été implanté depuis 2011, a également démontré que, parmi les cas considérés comme sensibles par Xpert, 65% étaient détectés comme résistants par le séquençage avec le kit Deeplex® Myc-TB en raison d'une limite de détection inférieure à celle du test Xpert.<sup>[138]</sup> De plus, une étude réalisée à Djibouti a comparé les phénotypes de résistance détectés par Deeplex à ceux des bases de données MTBSeq, Mykrobe et PhyReSe détectés par WGS après mise en culture des prélèvements. Ceci a montré que parmi les 11 phénotypes détectés uniquement par le test moléculaire Deeplex, 10 représentaient des variants minoritaires de résistance, non détectés par WGS en raison d'un défaut de profondeur de lecture.<sup>[139]</sup>

Ainsi, face à un dépistage inefficace, la transmission de ces mutants de résistance n'ont fait qu'augmenter, passant de 30% en 2008 à 60% lors d'une récente enquête menée en 2017. Or, cette mutation Ile491Phe est systématiquement associée à une mutation de haut niveau de résistance à l'isoniazide ainsi qu'à des mutations provoquant une résistance à l'éthambutol et le pyrazinamide, tous deux traitements de première intention. De manière plus préoccupante, il a été démontré que plus de la moitié des souches présentant cette mutation, présentent également la mutation Rv0678 M146T qui accorde une résistance à la clofazimine et la bédaquiline, récemment mis sur le marché. Il est alors urgent de trouver une solution de dépistage dans ces régions endémiques. C'est pourquoi, le kit Deeplex® Myc-TB récemment développé pourrait défier les limites actuellement observées par les différents tests moléculaires grâce à sa capacité à détecter des variants de résistance minoritaires.

De plus, il est aujourd'hui difficile de poser le diagnostic de tuberculose chez les personnes ayant du mal à fournir des échantillons d'expectorations, c'est le cas des enfants ou les personnes vivants avec le VIH par exemple. Or, il a été démontré que le complexe de *M. tuberculosis* peut être retrouvé dans les selles des patients et serait donc une source possible de détection. Toutefois, la culture des souches

de *M. tuberculosis* dans les selles est peu performante avec une faible sensibilité, limitant l'utilisation des tests phénotypiques de résistance aux médicaments et donc une perte de chance d'avoir un traitement adapté. Dans ce cas de figure, l'utilisation de méthode moléculaire plus fiable montre son intérêt pour effectuer des tests complets de résistance puisque la sensibilité est améliorée lorsque le séquençage profond et ciblé basé sur les amplicons est utilisé. De ce fait, une étude d'évaluation des performances de ce kit a été réalisée à partir d'échantillons de selles obtenus chez des patients en Eswatini.<sup>[140]</sup> Les résultats ont montré que le kit avait détecté l'ADN du complexe *M. tuberculosis* dans 68% des cas qui étaient positifs par RT-qPCR et pour 74% d'entre eux, un profil complet de résistance à 13 médicaments antituberculeux a pu être répertorié. Ainsi, ce kit est capable de détecter la résistance aux médicaments à partir de selles, ce qui en fait un outil précieux pour les patients résidant dans les régions les plus touchées par l'épidémie de souches pharmacorésistantes non détectées par les tests moléculaires conventionnels tels que GeneXpert MTB/RIF.

Ainsi, le kit Deeplex® Myc-TB représente une réelle avancée pour la lutte contre la résistance aux antibiotiques et peut être utilisé pour l'ensemble de la population dont on suspecte une tuberculose simple, multirésistante ou ultrarésistante. C'est d'ailleurs grâce à la robustesse de ce kit et à la prédiction rapide et étendue de la résistance que l'OMS recommande depuis octobre 2023 ce test innovant au niveau mondial. Il permet effectivement d'aider les cliniciens à adapter rapidement, efficacement et individuellement le traitement de la tuberculose pour prévenir au mieux les réponses aux traitements.



## Conclusion générale

L'arsenal thérapeutique pour lutter contre les infections bactériennes est aujourd'hui menacé par la montée exponentielle de l'antibiorésistance. Face au manque de développement de nouvelles molécules et à la consommation excessive d'antibiotiques, une des recommandations est de pouvoir établir rapidement le diagnostic des infections pour la mise en place d'un traitement approprié et ainsi lutter contre l'émergence de bactéries résistantes.

L'antibiogramme est la solution de choix pour guider le traitement, cependant, il ne peut prédire totalement l'efficacité de l'antibiotique et ne peut se faire qu'à l'hôpital ou au laboratoire, posant ainsi une limite quant à son utilisation en officine. C'est pourquoi, le développement de tests rapides de diagnostic pourrait permettre une prise en charge optimale du patient en un temps restreint et permettre un meilleur suivi de la diffusion des bactéries multirésistantes.

Ce manuscrit s'est concentré sur le développement et l'utilisation de tests de diagnostic permettant la détection de gènes de résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques. Il a ainsi été démontré l'intérêt de ces tests pour la détection de la résistance aux bactéries Gram négatif, notamment la détection de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu ainsi que la présence de carbapénèmases. D'autre part, il a été montré qu'un kit de diagnostic rapide, fiable et robuste a été développé pour la détection de la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* et est maintenant recommandé par l'OMS pour prévenir au mieux les réponses aux médicaments antituberculeux.

En conclusion, les tests de diagnostic ont montré un rôle important dans la lutte contre l'antibiorésistance et continuent aujourd'hui à être développés. Toutefois, le diagnostic de l'infection ne suffit pas à lui-même. Le développement de nouvelles molécules thérapeutiques permettrait effectivement de limiter la propagation des résistances, c'est pourquoi, d'un point de vue réglementaire, il est désormais important d'encourager les laboratoires à investir dans ce domaine. Enfin, les mesures d'hygiène et de sensibilisation aux antibiotiques ne doivent pas être négligées et peuvent être optimisées grâce à l'intervention des professionnels de santé, dont les pharmaciens.



## Bibliographie

1. Paolozzi L, Liébart JC, Arlat M, Dion M, Rakotoarivonina H. Introduction à la microbiologie [Internet]. 2023. Available from: <https://www.dunod.com/sciences-techniques/introduction-microbiologie-microbiologie-fondamentale-et-appliquee>
2. Coico R. Gram Staining. *Curr Protoc Microbiol* 2006;00(1):A.3C.1-A.3C.2.
3. Beveridge TJ. Mechanism of gram variability in select bacteria. *J Bacteriol* 1990;172(3):1609-20.
4. Li Y, Shi F, Li Y, Wang X. Structure and function of lipopolysaccharide lipid A in bacteria--a review. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2008;48(6):844-9.
5. Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res* 2010;49(2):97-107.
6. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 2002;4(8):837-51.
7. Enveloppe cellulaire, spores et biosynthèse macromoléculaire [Internet]. [cité 2023 mars 18]; Available from: <https://www.microbiologybook.org/French%20Bacteriology/bact4.htm>
8. Pazos M, Peters K. Peptidoglycan [Internet]. In: Kuhn A, éditeur. *Bacterial Cell Walls and Membranes*. Cham: Springer International Publishing; 2019. page 127-68. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_5)
9. Shaku M, Ealand C, Matlhabe O, Lala R, Kana BD. Peptidoglycan biosynthesis and remodeling revisited. *Adv Appl Microbiol* 2020;112:67-103.
10. Peptidoglycan Synthesis [Internet]. 2020 [cité 2023 avr 1]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=W5hUp07Qqms>
11. Garde S, Chodisetti PK, Reddy M. Peptidoglycan: Structure, Synthesis, and Regulation. *EcoSal Plus* [Internet] 2021;9(2). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2020>
12. Structure bactérienne. [cité 2023 avr 2]; Available from: [http://www.ucam.ac.ma/fssm/biologie/cours\\_td/microbiosv3/COURS%20SV3/STRUCTURE%20BACTERIENNE.pdf](http://www.ucam.ac.ma/fssm/biologie/cours_td/microbiosv3/COURS%20SV3/STRUCTURE%20BACTERIENNE.pdf)
13. Histoire des antibiotiques et de leur évolution [Internet]. *Small Rumin*. 2021 [cité 2023 mars 15]; Available from: <https://aboutsmallruminants.com/fr/histoire-antibiotiques-evolution-chronologie/>
14. Pasteur le précurseur | Histoire et Découverte [Internet]. *Pasteur2022* [cité 2023 mars 29]; Available from: <https://www.pasteur2022.fr/pasteur-le-precurseur>
15. L'histoire des antibiotiques [Internet]. *VIDAL2009* [cité 2023 mars 15]; Available from: <https://www.vidal.fr/medicaments/utilisation/antibiotiques/antibiotiques-c-est-quoi/histoire.html>
16. Définition et Histoire des Antibiotiques [Internet]. *Antibiot*. [cité 2023 mars 15]; Available from: <http://www.antibiotique.eu/deacutefinition--histoire.html>

17. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2005;3(9):711-21.
18. Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(1):36-45.
19. Lerminiaux NA, Cameron ADS. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol* 2019;65(1):34-44.
20. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 2010;74(3):417-33.
21. Terry M. Arc Bio Launches Antimicrobial Resistance Software | BioSpace [Internet]. 2018 [cité 2023 juin 5]; Available from: <https://www.biospace.com/article/arc-bio-launches-antimicrobial-resistance-software/>
22. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 2016;4(2).
23. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother* 2010;13(6):151-71.
24. Ferretti JJ, Gilmore KS, Courvalin P. Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2"-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *J Bacteriol* 1986;167(2):631-8.
25. Mederski-Samoraj BD, Murray BE. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. *J Infect Dis* 1983;147(4):751-7.
26. Lima LM, Silva BNM da, Barbosa G, Barreiro EJ.  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem* 2020;208:112829.
27. Nagshetty K, Shilpa BM, Patil SA, Shivannavar CT, Manjula NG. An Overview of Extended Spectrum Beta Lactamases and Metallo Beta Lactamases. *Adv Microbiol* 2021;11(01):37.
28. Cattoir V, Bicêtre F. Les nouvelles beta-lactamases à spectre étendu (BLSE). *Pathol Infect En Réanimation* 2008;204-9.
29. Meini MR, Llarrull LI, Vila AJ. Overcoming differences: the catalytic mechanism of metallo- $\beta$ -lactamases. *FEBS Lett* 2015;589(22):3419-32.
30. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 2014;22(8):438-45.
31. Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat* 1999;2(1):38-55.
32. Dönhöfer A, Franckenberg S, Wickles S, Berninghausen O, Beckmann R, Wilson DN. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(42):16900-5.
33. Li W, Atkinson GC, Thakor NS, Allas U, Lu C chao, Chan KY, et al. Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nat Commun* 2013;4:1477.
34. Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2008;6(12):893-903.

35. Hancock REW, Brinkman FSL. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:17-38.
36. Hiroshi N. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet] 2003;67. Available from: <https://doi.org/10.1128/mubr.67.4.593-656.2003>
37. Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, van Veen HW, Pos KM, Piddock LJV, et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol* 2018;16(9):523-39.
38. Schroeder MR, Stephens DS. Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 2016;6:98.
39. Nikaïdo H. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem* 2009;78(1):119-46.
40. Kobyłka J, Kuth MS, Müller RT, Geertsma ER, Pos KM. AcrB: a mean, keen, drug efflux machine. *Ann N Y Acad Sci* 2020;1459(1):38-68.
41. Guillemot D, Gasquet I, Vallet O, David MF, Laurent C, Mathieu D. Thirty-day mortality of nosocomial systemic bacterial infections according to antibiotic susceptibility in an 800-bed teaching hospital in France. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(6):502-4.
42. Langford BJ, So M, Raybardhan S, Leung V, Soucy JPR, Westwood D, et al. Antibiotic prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2021;27(4):520-31.
43. Santé Publique France. Prescriptions d'antibiotiques en médecine de ville : reprise en 2021 [Internet]. [cité 2023 avr 7]; Available from: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/resistance-aux-antibiotiques/documents/infographie/prescriptions-d-antibiotiques-en-medecine-de-ville-reprise-en-2021-infographie>
44. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) - Annual Epidemiological Report for 2021. 2022 [cité 2023 juin 7]; Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-consumption-europe-2021>
45. Rabirad N, Mohammadpoor M, Rastegar Lari A, Shojaie A, Bayat R, Alebouyeh M. Antimicrobial susceptibility patterns of the gram-negative bacteria isolated from septicemia in Children's Medical Center, Tehran, Iran. *J Prev Med Hyg* 2014;55(1):23-6.
46. Browne AJ, Chipeta MG, Haines-Woodhouse G, Kumaran EPA, Hamadani BHK, Zarea S, et al. Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. *Lancet Planet Health* 2021;5(12):e893-904.
47. Klein EY, Tseng KK, Pant S, Laxminarayan R. Tracking global trends in the effectiveness of antibiotic therapy using the Drug Resistance Index. *BMJ Glob Health* 2019;4(2):e001315.
48. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet Lond Engl* 2022;399(10325):629-55.
49. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance [Internet]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240093461>



50. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Rev Antimicrob Resist [Internet] 2016 [cité 2023 juin 5]; Available from: <https://amr-review.org/>
51. Joshi S. Hospital antibiogram: A necessity. Indian J Med Microbiol 2010;28(4):277-80.
52. Antibiogramme | Protocole | Interprétation [Internet]. Available from: <https://microbiologie-clinique.com/antibiogramme.html>
53. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - recommandations 2023. Société Fr Microbiol [Internet] [cité 2024 juill 13]; Available from: [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2023/06/CASFM2023\\_V1.0.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2023/06/CASFM2023_V1.0.pdf)
54. L'antibiogramme : objectifs, méthodes et interprétation | HYGIENES [Internet]. [cité 2024 juill 14]; Available from: <https://www.hygienes.net/publication-scientifique/lantibiogramme-objectifs-methodes-et-interpretation>
55. Qu'est ce que la SPILF ? [Internet]. Available from: <https://www.infectiologie.com/fr/spilf-presentation.html>
56. Cystite (infection urinaire) : symptômes et causes [Internet]. [cité 2023 déc 3]; Available from: <https://www.ameli.fr/assure/sante/themes/cystite/reconnaitre-cystite>
57. Les tests de dépistage des cystites [Internet]. VIDAL [cité 2023 mai 28]; Available from: <https://www.vidal.fr/maladies/reins-voies-urinaires/infection-urinaire-cystite/depistage.html>
58. Méningites - symptômes, causes, traitements et prévention [Internet]. VIDAL [cité 2023 mai 29]; Available from: <https://www.vidal.fr/maladies/douleurs-fievres/meningites.html>
59. Choix et durée de l'antibiothérapie : Femme enceinte : colonisation urinaire et cystite [Internet]. Haute Aut. Santé [cité 2023 mai 29]; Available from: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_2722927/fr/choix-et-duree-de-l-antibiotherapie-femme-enceinte-colonisation-urinaire-et-cystite](https://www.has-sante.fr/jcms/c_2722927/fr/choix-et-duree-de-l-antibiotherapie-femme-enceinte-colonisation-urinaire-et-cystite)
60. Le secteur du Diagnostic In Vitro [Internet]. SIDIV Available from: <https://www.sidiv.fr/le-secteur-du-div/>
61. Doléans A, Issabré Y, Freney J. Les tests rapides en bactériologie. Ann Biol Clin 2003;61.
62. Vazquez-Pertejo MT. Tests immunologiques des maladies infectieuses - Maladies infectieuses [Internet]. Édition Prof. Man. MSD2022; Available from: <https://www.msmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/diagnostic-biologique-des-maladies-infectieuses/tests-immunologiques-des-maladies-infectieuses>
63. Streptocoques A et B [Internet]. Inst. Pasteur2015; Available from: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/streptocoques-b>
64. Reconnaître une angine [Internet]. Available from: <https://www.ameli.fr/assure/sante/themes/angine/definition-symptomes-diagnostic>
65. Angine : état des lieux de l'ANSM sur les TROD disponibles en pharmacie [Internet]. VIDAL [cité 2023 juill 14]; Available from: <https://www.vidal.fr/actualites/23998-angine-etat-des-lieux-de-l-anism-sur-les-trod-disponibles-en-pharmacie.html>

66. Test de diagnostic rapide (TDR) des angines à streptocoque beta-hémolytique du groupe A [Internet]. [cité 2023 juill 23]; Available from: [https://www.exacto.fr/wp-content/uploads/2020/01/ifu\\_10025\\_fr\\_v03202001r01.pdf](https://www.exacto.fr/wp-content/uploads/2020/01/ifu_10025_fr_v03202001r01.pdf)
67. Test angine Streptatest [Internet]. Exacto Available from: <https://www.exacto.fr/produits/tests-pro/test-angine-streptatest/>
68. Les tests urinaires par bandelettes [Internet]. VIDAL [cité 2024 janv 7]; Available from: <https://www.vidal.fr/sante/examens-tests-analyses-medicales/examens-tests-urinaires/bandelettes.html>
69. Bandelette urinaire : test et interprétation des résultats [Internet]. Elsan Available from: <https://www.elsan.care/fr/pathologie-et-traitement/maladie-urinaire/bandelette-urinaire-deroulement-interet>
70. Prise en charge des infections urinaires en officine : trois nouveaux textes étendent les compétences des pharmaciens [Internet]. CNOP [cité 2024 janv 6]; Available from: <https://www.ordre.pharmacien.fr/les-communications/focus-sur/les-actualites/prise-en-charge-des-infections-urinaires-en-officine-trois-nouveaux-textes-etendent-les-competences-des-pharmaciens>
71. Cystites : dépistage [Internet]. Available from: <https://www.ameli.fr/pharmacien/sante-prevention/cystites-depistage>
72. Autotest infection urinaire [Internet]. Biosynex Available from: <https://www.biosynex.com/fiches-produit/pharmacien/diagnostic/autotests/autotest-infection-urinaire/>
73. Test infection urinaire [Internet]. Exacto Available from: <https://www.exacto.fr/produits/autotests/test-infection-urinaire/>
74. Résistance aux antibiotiques · Un phénomène massif et préoccupant [Internet]. Inserm 2018 [cité 2023 juill 2]; Available from: <https://www.inserm.fr/dossier/resistance-antibiotiques/>
75. Santé publique France. La reprise de la consommation d'antibiotiques en secteur de ville se confirme en 2022. 2023; Available from: <https://www.santepubliquefrance.fr/espace-presse/la-reprise-de-la-consommation-d-antibiotiques-en-secteur-de-ville-se-confirme-en-2022>
76. Streptocoque du groupe A [Internet]. Available from: <https://cnr-strep.fr/index.php/infections-a-streptocoque/infection-a-streptocoque-du-groupe-a>
77. Verger P. Un médecin généraliste sur deux est confronté à des problèmes d'antibiorésistance | Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques. Dir Rech Études Lévaluation Stat [Internet] 2022;1217. Available from: <https://drees.solidarites-sante.gouv.fr/publications-communique-de-presse/etudes-et-resultats/un-medecin-generaliste-sur-deux-est-confronte>
78. Touat M, Opatowski M, Brun-Buisson C, Cosker K, Guillemot D, Salomon J, et al. A Payer Perspective of the Hospital Inpatient Additional Care Costs of Antimicrobial Resistance in France: A Matched Case–Control Study. *Appl Health Econ Health Policy* 2019;17(3):381-9.
79. Les tests rapides, outils essentiels de la lutte contre l'antibiorésistance - 10 propositions en faveur du déploiement et du développement des tests rapides en France. 2016 [cité 2024 janv 12]; Available from: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=35338>

80. Maizia A, Letrilliart L, Colin C. Stratégies de diagnostic de l'angine aiguë en France : une étude coût-efficacité. *Presse Médicale* 2012;41(4):e195-203.
81. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol* 2012;3:110.
82. Palzkill T. Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC  $\beta$ -lactamases. *Front Mol Biosci* 2018;5:16.
83. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(1):1-14.
84. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2008;14 Suppl 1:33-41.
85. Boattini M, Bianco G, Comini S, Iannaccone M, Casale R, Cavallo R, et al. Direct detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producers in Enterobacterales from blood cultures: a comparative analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2022;41(3):407-13.
86. ETEST® pour la détection des mécanismes de résistance [Internet]. BioMérieux Can. Available from: <https://www.biomerieux.ca/fr/product/etestr-pour-la-detection-des-mecanismes-de-resistance>
87. Noster J, Thelen P, Hamprecht A. Detection of Multidrug-Resistant Enterobacterales-From ESBLs to Carbapenemases. *Antibiot Basel Switz* 2021;10(9):1140.
88. Gonzalez C, Moguet C, Chalin A, Oueslati S, Dortet L, Simon S, et al. Comparison of Three Expanded-Spectrum Cephalosporin Hydrolysis Assays and the NG-Test CTX-M Multi Assay That Detects All CTX-M-Like Enzymes. *Diagn Basel Switz* 2022;12(1):197.
89. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing enterobacteriaceae from urine samples by use of the ESBL NDP test. *J Clin Microbiol* 2014;52(10):3701-6.
90. Girlich D, Bernabeu S, Fortineau N, Dortet L, Naas T. Evaluation of the CRE and ESBL ELITE MGB® kits for the accurate detection of carbapenemase- or CTX-M-producing bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;92(1):1-7.
91. Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Lönnqvist E, Marttila H, Rintala E, Rantakokko-Jalava K, Vuopio J. Performance of the Check-Direct ESBL Screen for BD MAX™ for detection of asymptomatic faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist* 2020;22:408-13.
92. Bogaerts P, Lukukula CM, Bouchahrouf W, Berhin C, Denis O, Iyamba JML, et al. Comparison of two immunochromatographic tests for the detection of CTX-M ESBL on clinical isolates at the Belgian National Reference Centre.
93. RESIST CTX-M Rapid diagnostic [Internet]. Available from: <https://www.corisbio.com/products/resist-ctx-m>
94. Moguet C, Gonzalez C, Sallustrau A, Gelhaye S, Naas T, Simon S, et al. Detection of expanded-spectrum cephalosporin hydrolysis by lateral flow immunoassay. *Microb Biotechnol* 2022;15(2):603-12.

95. ESBL resistance detection [Internet]. NG Biotech Available from: <https://www.ngbiotech.com/ng-test-ctx-m-multi/>
96. Bernabeu S, Ratnam KC, Boutal H, Gonzalez C, Vogel A, Devilliers K, et al. A Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Identification of CTX-M-Producing Enterobacterales from Culture Plates and Positive Blood Cultures. *Diagn Basel Switz* 2020;10(10):764.
97. Moguet C, Gonzalez C, Naas T, Simon S, Volland H. Multiplex Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Expanded-Spectrum Hydrolysis and CTX-M Enzymes. *Diagn Basel Switz* 2022;12(1):190.
98. UK Health Security Agency. Commercial assays for the detection of acquired carbapenemases. 2022;
99. BIOFIRE® FILMARRAY® Pneumonia Panel plus [Internet]. bioMérieux [cité 2024 mars 26]; Available from: <https://www.biomerieux-nordic.com/product/biofirer-filmarray-pneumonia-panel-plus>
100. The Unyvero Platform [Internet]. Curetis GmbH [cité 2024 avr 7]; Available from: <https://www.curetis.com/products>
101. McCarty TP, Cumagun P, Meeder J, Moates D, Edwards WS, Hutchinson J, et al. Test Performance and Potential Clinical Utility of the GenMark Dx ePlex Blood Culture Identification Gram-Negative Panel. *Microbiol Spectr* 11(1):e04092-22.
102. De Angelis G, Paggi R, Lowery TJ, Snyder JL, Menchinelli G, Sanguinetti M, et al. Direct Testing for KPC-Mediated Carbapenem Resistance from Blood Samples Using a T2 Magnetic Resonance Based Assay. *Antibiot Basel Switz* 2021;10(8):950.
103. AID Carbapenemase Kit – Detection of 13 carbapenem resistances [Internet]. Available from: <https://www.aid-diagnostics.com/en/kits/molecular-biologic-assay/infectious-diseases/antibiotic-resistances/carbapenemase>
104. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS). Molecular methods for antimicrobial resistance (AMR) diagnostics to enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System [Internet]. World Health Organ. [cité 2024 mars 30]; Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/310993/WHO-WSI-AMR-2019.1-eng.pdf?ua=1>
105. Autoimmun Diagnostika GmbH. Detection and Differentiation of the most prevalent Carbapenemase Genes. [cité 2024 juin 7]; Available from: <https://www.oxfordbiosystems.com/Portals/0/PDF/AMR/Carbapenamase.pdf>
106. Bloemberg GV, Braun-Kiewnick A, Tedrup J, Meijerink C, Durer E, Ritter C, et al. Evaluation of the AID carbapenemase line probe assay for rapid detection and identification of carbapenemase genes in Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* 2017;72(7):1948-54.
107. García-Fernández S, Morosini MI, Marco F, Gijón D, Vergara A, Vila J, et al. Evaluation of the eazyplex® SuperBug CRE system for rapid detection of carbapenemases and ESBLs in clinical Enterobacteriaceae isolates recovered at two Spanish hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2015;70(4):1047-50.
108. Nijhuis R, Samuelsen O, Savelkoul P, van Zwet A. Evaluation of a new real-time PCR assay (Check-Direct CPE) for rapid detection of KPC, OXA-48, VIM, and NDM carbapenemases using spiked rectal swabs. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77(4):316-20.

109. Girlich D, Laguide M, Dortet L, Naas T. Evaluation of the Revogene Carba C Assay for Detection and Differentiation of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. *J Clin Microbiol* 2020;58(4):e01927-19.
110. Girlich D, Oueslati S, Bernabeu S, Langlois I, Begasse C, Arangia N, et al. Evaluation of the BD MAX Check-Points CPO Assay for the Detection of Carbapenemase Producers Directly from Rectal Swabs. *J Mol Diagn* 2020;22(2):294-300.
111. Hoyos-Mallecot Y, Ouzani S, Dortet L, Fortineau N, Naas T. Performance of the Xpert® Carba-R v2 in the daily workflow of a hygiene unit in a country with a low prevalence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 2017;49(6):774-7.
112. Moore NM, Cantón R, Carretto E, Peterson LR, Sautter RL, Traczewski MM, et al. Rapid Identification of Five Classes of Carbapenem Resistance Genes Directly from Rectal Swabs by Use of the Xpert Carba-R Assay. *J Clin Microbiol* 2017;55(7):2268-75.
113. Hannus P, Räisänen K, Martelin JJ. Rapid detection of antimicrobial resistance markers with Allplex™ Entero-DR assay directly from positive blood culture bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2021;40(4):801-6.
114. Oueslati S, Girlich D, Dortet L, Naas T. Evaluation of the Amplidiag CarbaR+VRE Kit for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Bacteria. *J Clin Microbiol* 2018;56(3):e01092-17.
115. Girlich D, Bernabeu S, Groperrin V, Langlois I, Begasse C, Arangia N, et al. Evaluation of the Amplidiag CarbaR+MCR Kit for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing and Colistin-Resistant Bacteria. *J Clin Microbiol* 2019;57(3):e01800-18.
116. Girlich D, Bogaerts P, Bouchahrouf W, Bernabeu S, Langlois I, Begasse C, et al. Evaluation of the Novodiag CarbaR+, a Novel Integrated Sample to Result Platform for the Multiplex Qualitative Detection of Carbapenem and Colistin Resistance Markers. *Microb Drug Resist Larchmt N* 2021;27(2):170-8.
117. Anti-Microbial Resistance [Internet]. Genet. Signat. EMEA [cité 2024 mars 30]; Available from: <https://geneticsignatures.com/eu/our-products/anti-microbial-resistance/>
118. Our Technology : EasyScreen™ & 3base™ Technology [Internet]. Genet. Signat. EMEA Available from: <https://geneticsignatures.com/eu/about/our-technology/>
119. Gonzalez C, Oueslati S, Biez L, Dortet L, Naas T. Evaluation of the EasyScreen™ ESBL/CPO Detection Kit for the Detection of  $\beta$ -Lactam Resistance Genes. *Diagn Basel Switz* 2022;12(9):2223.
120. Our Technology : TandemPlex - Multiplex Tandem PCR [Internet]. AusDiagnostics [cité 2024 avr 13]; Available from: <https://www.ausdiagnostics.com/our-technology/>
121. Meunier D, Woodford N, Hopkins KL. Evaluation of the AusDiagnostics MT CRE EU assay for the detection of carbapenemase genes and transferable colistin resistance determinants mcr-1/-2 in MDR Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2018;73(12):3355-8.
122. Hopkins KL, Meunier D, Naas T, Volland H, Woodford N. Evaluation of the NG-Test CARBA 5 multiplex immunochromatographic assay for the detection of KPC, OXA-48-like, NDM, VIM and IMP carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2018;73(12):3523-6.

123. Carbapenemase resistance detection [Internet]. NG Biotech Available from: <https://www.ngbiotech.com/ng-test-carba-5/>
124. OKNVI RESIST-5 - Identification of OXA-48-like, KPC, NDM, VIM and IMP carbapenemases [Internet]. Available from: <https://www.corisbio.com/products/oknvi-resist-5>
125. Greissl C, Saleh A, Hamprecht A. Rapid detection of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM carbapenemases in Enterobacterales by a new multiplex immunochromatographic test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38(2):331-5.
126. Hong J, Kang D, Kim D. Performance Evaluation of the Newly Developed In Vitro Rapid Diagnostic Test for Detecting OXA-48-Like, KPC-, NDM-, VIM- and IMP-Type Carbapenemases: The RESIST-5 O.K.N.V.I. Multiplex Lateral Flow Assay. *Antibiotics* 2021;10(4):460.
127. Organisation mondiale de la Santé. Tuberculose [Internet]. 2023 [cité 2024 févr 27]; Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
128. Global Tuberculosis Report 2023 [Internet]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>
129. DGS\_Céline.M, DGS\_Céline.M. La tuberculose [Internet]. Ministère Trav. Santé Solidar. 2024; Available from: <https://sante.gouv.fr/soins-et-maladies/maladies/maladies-infectieuses/article/la-tuberculose>
130. Webmaster S. Évaluation moléculaire de la résistance mycobactérienne par les tests « Génotype® MTBDR Plus et Génotype® MTBDR SL » au Sénégal. [Internet]. Société Pneumol. Lang. Fr. 2023; Available from: <https://splf.fr/evaluation-moleculaire-de-la-resistance-mycobacterienne-par-les-tests-genotype-mtbd/>
131. Diallo AB, Kollo AI, Camara M, Lo S, Ossoga GW, Mbow M, et al. Performance du GeneXpert MTB/RIF® dans le diagnostic de la tuberculose extra-pulmonaire à Dakar: 2010-2015. *Pan Afr Med J* 2016;25:129.
132. Xpert® MTB/RIF Ultra [Internet]. [cité 2024 févr 17]; Available from: <https://www.cepheid.com/fr-FR/tests/tb-emerging-infectious-diseases/xpert-mtb-rif-ultra.html>
133. Deeplex® Myc-TB - Un nouveau test de prédiction des résistances aux antibiotiques de Mycobacterium tuberculosis [Internet]. Available from: <https://www.genoscreen.fr/fr/services-genomiques/produits/deeplex-myc-tb-test-antibioresistance>
134. Jouet A, Gaudin C, Badalato N, Allix-Béguec C, Duthoy S, Ferré A, et al. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. *Eur Respir J* [Internet] 2021;57(3). Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/57/3/2002338>
135. Deeplex - Deeplex® Myc-TB [Internet]. Deeplex Available from: <https://www.deeplex.com/deeplex-myc-tb/>
136. Feuerriegel S, Kohl TA, Utpatel C, Andres S, Maurer FP, Heyckendorf J, et al. Rapid genomic first- and second-line drug resistance prediction from clinical Mycobacterium tuberculosis specimens using Deeplex-MycTB. *Eur Respir J* 2021;57(1):2001796.

137. Makhado NA, Matabane E, Faccin M, Pinçon C, Jouet A, Boutachkourt F, et al. Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis in South Africa undetected by WHO-endorsed commercial tests: an observational study. *Lancet Infect Dis* 2018;18(12):1350-9.
138. Kayomo MK, Mbula VN, Aloni M, André E, Rigouts L, Boutachkourt F, et al. Targeted next-generation sequencing of sputum for diagnosis of drug-resistant TB: results of a national survey in Democratic Republic of the Congo. *Sci Rep* 2020;10(1):10786.
139. Tagliani E, Hassan MO, Waberi Y, De Filippo MR, Falzon D, Dean A, et al. Culture and Next-generation sequencing-based drug susceptibility testing unveil high levels of drug-resistant-TB in Djibouti: results from the first national survey. *Sci Rep* 2017;7(1):17672.
140. Sibandze DB, Kay A, Dreyer V, Sikhondze W, Dlamini Q, DiNardo A, et al. Rapid molecular diagnostics of tuberculosis resistance by targeted stool sequencing. *Genome Med* 2022;14(1):52.

Université de Lille  
UFR3S-Pharmacie  
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
Année Universitaire 2023/2024

**Nom :** MEURILLON

**Prénom :** Virginie

**Titre de la thèse :** L'utilisation des tests diagnostiques dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques

**Mots-clés :** bactéries, antibiotiques, antibiorésistance, bactéries multirésistantes, antibiogramme, tests diagnostiques, gènes de résistance

---

**Résumé :**

L'utilisation massive des antibiotiques a favorisé l'apparition de souches bactériennes résistantes à ces médicaments. Ce phénomène est devenu une priorité majeure en matière de santé publique, puisque ces bactéries ont entraîné 4.95 millions de décès en 2019 et les estimations prévoient 10 millions de décès annuels d'ici 2050.

Dans un contexte de lutte contre la dissémination de ces résistances, ce manuscrit a pour objectif de décrire l'utilisation et la place des tests diagnostiques, plus particulièrement les tests visant à détecter les gènes de résistance.

Après une présentation des bactéries et de l'arsenal thérapeutique dont nous disposons en France, le développement de l'antibiorésistance et ses enjeux au niveau mondial seront abordés. Par la suite, les recommandations actuelles en termes de diagnostic à l'hôpital puis à l'officine seront abordées. Enfin, les solutions pour orienter plus rapidement et efficacement le diagnostic seront détaillées grâce à l'utilisation de tests capables de détecter directement le gène de résistance mis en cause.

**Membres du jury :**

**Président :** Nicolas Willand, PU, Faculté de Pharmacie, Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

**Directeur, conseiller de thèse :** Marion Flipo, MCU, Faculté de Pharmacie, Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

**Assesseurs :**

Julie Demaret, MCU-PH, Faculté de Pharmacie, CHU de Lille

Nicolas Blondiaux, Pharmacien Biologiste, Praticien Hospitalier, Centre hospitalier de Tourcoing