



**HAL**  
open science

## Développement et validation de tests de détection rapide de la résistance aux antibiotiques

Hervé Boutal

► **To cite this version:**

Hervé Boutal. Développement et validation de tests de détection rapide de la résistance aux antibiotiques. Immunologie. Université Paris-Saclay, 2017. Français. NNT : 2017SACLS499 . tel-01715103

**HAL Id: tel-01715103**

**<https://theses.hal.science/tel-01715103v1>**

Submitted on 22 Feb 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Développement et validation de tests de détection rapide de la résistance aux antibiotiques

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée à  
l'Université Paris-Sud

Dans le Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse  
du CEA de Saclay

École doctorale n°569 :  
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué  
(ITFA)  
Spécialité de doctorat : Immunologie et Biothérapies

Présentée le 27 novembre 2017 par :

**Hervé Boutal**

## Composition du Jury :

M le Docteur Bernard Maillère Directeur de recherche. CEA de Saclay	Président
M le Professeur Patrick Plésiat Directeur du CNR. CHRU de Besançon	Rapporteur
M le Professeur Richard Bonnet Directeur du CNR. CHRU de Clermont-Ferrand	Rapporteur
M <sup>me</sup> le Docteur Clara Ballesté-Delpierre Coordinator of Antibiotic Resistance Initiative. ISGlobal	Examineur
M le Docteur Jean-Yves Madec Directeur Scientifique Antibiorésistance de l'ANSES	Examineur
M le Docteur Hervé Volland Directeur de recherche. CEA de Saclay	Directeur de thèse



*À mes chers parents,  
au cœur du pays vert.*

## Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse (LERI) du Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (SPI) du CEA de Saclay.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Monsieur le Professeur Patrick Plessiat et le Monsieur le Professeur Richard Bonnet qui m'ont fait l'honneur de consacrer de leur précieux temps à la lecture et à l'évaluation de ce manuscrit. Mais également Madame le Docteur Clara Ballesté-Delpierre, Monsieur le Docteur Jean-Yves Madec et Monsieur le Docteur Bernard Maillère pour leur participation. Cette tâche ne vous aurait pas été demandée sans une rencontre au sein du Labex LERMIT avec Monsieur le Docteur Naas. Merci Thierry pour ta contribution dans l'initiation de ces travaux, ton expertise, tes relectures et corrections de résumés, posters et autres articles, ainsi que tes réponses à mes questions naïves concernant ce nouveau monde de l'antibiorésistance.

Une THESE... mais comment en est-on arrivé là ?

Une discussion sur une plaine brumeuse de Seine et Marne entre un Hussard en fin de service national et une cavalière sur sa « Docile » monture. Suite à cette chevauchée, un entretien pour un CDD portant sur le diagnostic des maladies à prions : « Tu ne sais rien faire et c'est tant mieux ! » suffit à le résumer. Puis expliquer à sa Maman qui travaille dans les ressources humaines que oui, on doit pouvoir dire que tout s'est bien passé. Et ce fut le cas. Merci Karine pour m'avoir mis le pied à l'étrier au sein du SPI. Merci Jacquot et Cricri pour cette prise de risque ou action humanitaire « après le Breton, on a sorti un Cantalou du caniveau ». Messieurs, bien au-delà de cette décision vous avez également contribué à ce que je suis aujourd'hui, ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Les années prion furent pour moi un apprentissage de tous les jours, et dès le début. « Tout le monde est parti en réunion à BioRad, installe-toi je te donne quelque chose à lire ». Mon premier article scientifique pensais-je, en fait non, une BD dont j'ai oublié le titre. Un grand merci à Marie-Claire pour ton accueil chaleureux ce jour-là, tous les précieux conseils distillés au fil de ces années, tes petits billets disséminés dans le laboratoire, tes éclats de voix mais surtout tes éclats de rire.

Mon premier jour en L3 fut mémorable, mais surtout pour toi Stéphanie, (oui à l'époque je t'appelais encore Stéphanie). Moi : « concernant l'utilisation de la pipette, je me souviens vaguement d'une histoire de premier cran et deuxième cran, tu peux me réexpliquer s'il te plaît », Toi : « Oui bien sûr, mais par contre on va ressortir pour ça ». Oui, un technicien ne sachant pas se servir d'une pipette ça peut laisser songeur ! Après toutes ces manip en L3 où il m'aurait fallu les yeux de la foi (hein Bernadette), je te remercie pour ta brique apportée aux fondations de ma formation, et l'art subtil de faire des plans de plaques en fait partie. Mais il y a aussi tous ces dérapages mémorables conclus par ce rire qui te caractérise si bien. Merci à la chef de laboratoire atypique qui a soutenu cette thèse. Merci pour tout, Ma Stéphounette.

Depuis ces années, vous êtes aussi là à mes côtés, toutes deux incontestablement à l'opposé, l'une aussi discrète que l'autre zébullonne, mais toujours d'un soutien scientifique ou moral inaltérable, Nath, Cécillette, merci pour ces années passées à travailler avec vous. Encore un grand merci Cécillette d'avoir accepté de relire l'introduction de ce manuscrit, avec trois enfants, c'est certain tu ne savais pas comment occuper deux ou trois soirées... Merci encore pour tous tes encouragements qui raisonneraient même au milieu d'une plaine mongole.

Merci à Jéjé avec qui j'ai partagé ces années jusque dans les locaux de Biorad. Aujourd'hui, le NSP n'est plus, c'est plutôt bière et palet breton.

Vinrent ensuite les années NRBC, où ce ne furent plus les vaches ataxiques ou autres moutons tremblants qui voulaient du mal à l'Homme, mais bien l'Homme lui-même. La menace d'armes biologiques m'a permis d'obtenir un CDI pour continuer mon chemin au CEA. Merci encore à Jacquot et Cricri de m'avoir accordé leur confiance pour du long terme.

MERCI à Ma Juju, depuis ces années ma voisine de paillasse et de bureau. Nos activités au laboratoire ont été très proches et l'on peut même se comprendre sans que les phrases n'aient de sens. Merci pour ta rigueur dans le travail, pour ton aide précieuse et indéfectible lors de lourdes manip, pour ton écoute lors des moments de doute. Merci pour la personne généreuse que tu es, tous ces souvenirs et ce qui viendra encore.

Ces années sont aussi marquées par des projets professionnels plus fréquents avec le Breton déjà cité, encadrant en distillant ses brillants conseils sans jamais dénaturer ce que vous êtes. Avec ton soutien, vint le choix de reprendre un cursus universitaire, et j'en suis là, en fin de doctorat. Merci d'avoir renforcé mes fondations, merci de tout ce que tu m'as appris au cours de toutes ces années. Merci à l'encadrant, merci au directeur de thèse, merci à l'Ami. Ah oui, et si vous avez une chanson improbable dans la tête, il vous l'a certainement transmise au détour d'un couloir. Heidi ou Maya l'abeille par exemple, oui le granit a aussi sa sensibilité !

Ah, ces années de Thèse,

Dont les résultats dépendent en partie du travail d'une fine équipe, celle des « Monoclonaux ». Ce sont eux les parents des anticorps. Un grand merci à Marcus, acharné au sauvetage du « crevard », qui finalement sera le cadeau bonus. Un grand merci à la dynamique (oui ça rime avec dynamite et ça lui va bien), sportive et délirante petite Karine. Oh que oui c'est agréable de travailler avec toi Karinette (plein de bisettes). Enfin, Quentin, petit dernier du trio qui supporte mon côté taquin, merci Gamin !

Mais je n'aurais pu faire tout le reste sans l'aide précieuse de ma petite Anaïs. (Attention, elle n'est pas là pour faire de la figuration et ayez toujours quelque chose sous le coude pour l'occuper). Bon sang, mais elle ne s'arrête donc jamais ! Pour tout ce travail réalisé avec rigueur, efficacité et toujours dans la bonne humeur, mais aussi ces petits moments de délire, je considère que j'ai été chanceux de partager tout cela avec toi, un énorme MERCI.

Je tiens également à remercier Céline toujours là pour détendre l'atmosphère avec une blague de haut niveau, Audrey notre cinéaste amateur qui fait de chaque départ un moment plus agréable, Nanou toujours souriante et prête à répondre à mes questions, Elise (le petit

coin coin du labo) pour ses coups de boost, Alexandra toujours à jour des nouveautés (entendez par là potins), Edyta pour son aide et sa formidable vivacité, DomDom pour être notre petit rossignol. Mais aussi tous les pioupious qui ont contribué ou contribuent à l'ambiance agréable du LERI, Sosoo, Louison, le grand Lamine, mon ami libanais Bakhos, mon ami espagnol Danito, Christelle (prépare d'ores et déjà ton intro), Raphaël, Lili, Chloé, Zouriatou, Nathalie.

Mais mon environnement de travail ne serait pas ce qu'il est sans les « ZINRA », tout particulièrement toi Narber, merci de partager avec tant de professionnalisme et de générosité tes connaissances, et je ne parle pas de toutes tes autres facettes qui font de toi un personnage singulier et attachant. Merci aussi à Monsieur Nano, quel poète, chaque mail est à décortiquer pour en tirer cette substance qui t'est si propre, merci pour ton indulgence face à ma si grande incompetence dans ce monde du numérique. Merci à Karine, Sandrine, Titi et Aïcha pour votre joie de vivre, Blanche, Naïma, Marine mes complices de la Force et à Stéphane et Jihana.

Merci à toute l'équipe du Kremlin Bicêtre pour leur accueil lors des validations de tests, et tout particulièrement à Sandrine, ma guide sur place. Elle m'a appris qu'une boîte de pétri s'observe avec tous ses sens « Tu as une conta là, ça sent le *Proteus* ». Ton expérience, ta gentillesse, ton dynamisme et ta disponibilité furent une grande aide, merci.

Merci à Sandrine, Laurie et Florence pour leur soutien logistique et administratif dans notre vie de tous les jours.

Merci à toi Tonton, notre chef de service, merci pour tes encouragements et le compactage de nos poubelles...

Enfin, je remercie tous mes amis pour leur soutien et mes remerciements les plus tendres et chaleureux reviennent à ceux qui sont la cause de tout cela. Une pensée pour mes chers parents pour lesquels, j'espère, la lecture de ce manuscrit sera un éclaircissement sur une partie de ma vie loin d'eux, ou du moins, leur procurera un paisible endormissement.

# DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE TESTS DE DETECTION RAPIDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Les bêta-lactamines sont les antibiotiques préférentiellement utilisés contre les bactéries à Gram négatif responsables d'infections. La dissémination mondiale d'organismes produisant des bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE) ou des carbapénémases est une préoccupation générale ainsi qu'une menace économique.

Parmi ces organismes, les entérobactéries jouent un rôle important dans les infections nosocomiales (ainsi que les infections communautaires pour *E. coli*). L'émergence et la dissémination d'entérobactéries productrices de BLSE (E-BLSE), exprimant principalement des bêta-lactamases de la famille des CTX-Ms, et dans une mesure plus inquiétante de carbapénémases (EPC), principalement les enzymes NDM, KPC, IMP, VIM et OXA-48, sont sans le moindre doute un problème de santé publique majeur.

Les CTX-Ms hydrolysent les céphalosporines à large spectre et sont les BLSEs principalement rencontrées chez les entérobactéries lors d'infections urinaires communautaires, mais aussi les bactériémies à *E. coli* qui peuvent en découler. Ces infections sévères sont traitées avec des carbapénèmes, considérés comme les antibiotiques de dernier recours. Malheureusement, leur utilisation croissante a soumis les entérobactéries à une pression de sélection conduisant à de plus en plus de souches montrant une sensibilité réduite aux carbapénèmes pouvant aboutir à un échec thérapeutique.

Si l'on considère les possibilités de traitement limitées pour les E-BLSEs, que les EPCs sont souvent résistantes à plusieurs si ce n'est toutes les classes d'antibiotiques, et que pour certaines peu ou pas de traitements antibiotiques sont disponibles, leur rapide détection et identification est essentielle. Des tests fiables sont nécessaires pour aider les biologistes à, rapidement mettre en place des mesures de contrôle de ces infections, adapter les traitements antibiotiques et optimiser les stratégies de soins et leur issue favorable.

Lors de la détection des E-BLSEs et des EPCs, il est aussi crucial d'identifier la bêta-lactamase impliquée pour la mise en place d'une thérapie adaptée. Les méthodes basées sur la spécificité des anticorps sont sans aucun doute parmi les plus appropriées pour atteindre cet objectif.

Pour répondre aux besoins actuels, les méthodes de détection des résistances aux antibiotiques doivent être peu coûteuses (coûts réduits des consommables et des équipements) et faciles à mettre en place (technicité faible) pour l'utilisateur. C'est pourquoi nous avons décidé de développer des tests immunochromatographiques qui répondent parfaitement à ce cahier des charges. Pour atteindre cet objectif, nous avons produit des anticorps monoclonaux dirigés contre les CTX-Ms, et les familles de carbapénémases NDM, KPC, et OXA-48. Les tests immunochromatographiques correspondants ont été développés et validés. Nos tests sont robustes, facilement transférables dans une version commerciale et stables pour 24 mois sans réfrigération. Ils sont conviviaux, performants en termes de spécificité et sensibilité, et peu coûteux, de 7€ (pour un mono-test) à moins de 15€ (pour un multiplex). De plus les résultats sont obtenus dans un court délai sans la nécessité d'un équipement particulier pour la lecture. Nous avons validé un mono-test pour la détection des CTX-Ms du groupe 1, et évalué la détection des groupes 1, 2, 8 et 9 directement dans des échantillons cliniques comme les hémocultures ou l'urine. Des mono-tests pour la détection des NDMs et des OXA-48 et un multiplex pour la détection simultanée des cinq principales carbapénémases ont également été validés. Pour ce faire, nous avons utilisés 180 souches isolées sur boîtes, provenant du Centre National de Référence pour la résistance aux carbapénémases chez les entérobactéries, dont le contenu en bêta-lactamase est caractérisé.

Mots clés : Antibiorésistance, entérobactéries,  $\beta$ -lactamases, tests immunochromatographiques



# **Table des matières**



LISTE DES ABREVIATIONS	19
INTRODUCTION GENERALE	23
1. L'origine des antibiotiques	23
2. Les antibiotiques : un outil thérapeutique	24
2.1. Antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique	26
2.1.1. Les aminosides	26
2.1.2. Les tétracyclines	27
2.1.3. Les macrolides	28
2.1.4. La rifampicine	29
2.2. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques	29
2.3. Antibiotiques avec une action sur la membrane	30
2.4. Antibiotiques qui inhibent une voie métabolique	31
2.5. Antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane	32
2.5.1. La paroi bactérienne	32
2.5.2. Le peptidoglycane, structure et biosynthèse	33
2.5.3. Les glycopeptides	35
2.5.4. La fosfomycine	36
2.5.5. Les bêta-lactamines	37
2.5.6. Les $\beta$ -lactamines : les sous familles	40
3. La résistance aux antibiotiques	43
3.1. Notions de CMI, résistance et sensibilité aux antibiotiques	44
3.2. Antibiorésistance : impact économique et sociétal	45
3.3. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques	46
3.3.1. L'imperméabilité aux antibiotiques	47
3.3.2. L'efflux des molécules d'antibiotique	47
3.3.3. La modification de la cible thérapeutique	48
3.3.4. La modification des molécules d'antibiotique	49
3.4. Les entérobactéries et les bêta-lactamases	49
3.4.1. Les entérobactéries	49
3.4.2. Le concept « One health » et l'antibiorésistance	50
3.5. Les $\beta$ -lactamases chez les entérobactéries	51
3.5.1. Les $\beta$ -lactamases à sérine, classe A de Ambler	53
3.5.2. Les $\beta$ -lactamases à spectre étendu, classe A de Ambler	53
3.5.3. Les carbapénémases à sérine, classe A de Ambler	55
3.5.4. Les métallo- $\beta$ -lactamases, classe B de Ambler	56
3.5.5. Les $\beta$ -lactamases, classe C de Ambler	57
3.5.6. Les $\beta$ -lactamases, classe D de Ambler	57
3.5.7. Répartition géographique des différentes carbapénémases	58
4. Détection et identification des E-BLSE	60
4.1. Détection des entérobactéries produisant des CTX-Ms.	60
4.1.1. L'antibiogramme	60
4.1.2. Les milieux sélectifs	60
4.1.3. Les tests de confirmation	61
4.1.4. L'identification des CTX-Ms	63

4.2.	Détection des entérobactéries produisant des carbapénémases	64
4.2.1.	Tests de diffusion sur gélose	64
4.2.2.	Méthode d'inhibition des carbapénèmes (MIC)	66
4.2.3.	Tests d'hydrolyse des carbapénèmes	67
4.2.4.	Méthodes de détection moléculaires	70
4.2.5.	Détection avec des tests immunochromatographiques	71
4.3.	Tableau comparatif : temps d'exécution et prix des tests	72
PROJET DE THESE		77
MATERIEL ET METHODES		81
1.	Matériel biologique utilisé	81
1.1.	Les souris	81
1.2.	Les protéines recombinantes	81
1.3.	Les anticorps monoclonaux	82
1.4.	Les bactéries	82
2.	Tampons et réactifs utilisés pour les dosages	83
2.1.	Composition des tampons	83
2.2.	Préparation des plaques CAS	83
2.3.	Préparation des traceurs biotinylés	84
2.4.	Préparation des traceurs AChE	84
2.4.1.	Couplage à l'AChE	84
2.4.2.	Mesure de l'activité enzymatique	84
2.5.	Préparation des anticorps traceurs or colloïdal	85
3.	Obtention des protéines recombinantes	85
3.1.	Clonage des gènes CTX-M-2, CTX-M-14	85
3.1.1.	Amplification par PCR des gènes CTX-M-2 et CTX-M-14	85
3.1.2.	Digestion du produit PCR et du vecteur pET22b (+)	86
3.1.3.	Clonage dans pET22b (+) et transformation d' <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	86
3.1.4.	Criblage des clones recombinants obtenus	87
3.1.5.	Purification et contrôle de la séquence du gène d'intérêt.	87
3.1.6.	Transformation d' <i>E. coli</i> BL21 (DE3) chimio-compétentes	88
3.2.	Clonage du gène CTX-M-15	88
3.2.1.	Purification du vecteur pET9a CTX-M-15	88
3.2.2.	Mutagenèse pour ajouter une étiquette poly-histidine	88
3.2.3.	Digestion du produit PCR par DpnI	89
3.2.4.	Transformation de bactéries <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	89
3.2.5.	Criblage des clones de bactéries recombinantes	90
3.2.6.	Digestion du produit PCR par EcoRI	90
3.2.7.	Purification et contrôle de la séquence du gène d'intérêt	90
3.3.	Production et purification des protéines recombinantes	91
3.3.1.	Sélection des conditions d'expression avec induction à IPTG	91
3.3.2.	Préparation des extraits bactériens	91
3.3.3.	Immobilisation des extraits bactériens sur phase solide	92
3.3.4.	Dosage des protéines recombinantes immobilisées	92
3.3.5.	Production en grande quantité des protéines recombinantes	93

3.3.6.	Purification des protéines recombinantes	93
3.3.7.	Quantification et analyse SDS-PAGE	94
4.	Obtention des anticorps monoclonaux	94
4.1.	Immunisation des souris	94
4.2.	Evaluation des réponses immunitaires	95
4.3.	Obtention des hybridomes et isotypage des anticorps	96
4.4.	Production et purification des anticorps monoclonaux	96
4.5.	Concentration des anticorps purifiés et analyse SDS-PAGE	97
4.6.	Utilisation des anticorps en Western Blot	98
5.	Les bandelettes pour détecter les $\beta$ -lactamases	98
5.1.	Description	98
5.2.	Préparation des bandelettes	99
5.3.	Choix du couple d'anticorps pour le dosage	100
5.3.1.	L'analyse combinatoire	100
5.3.2.	La limite de détection avec la protéine recombinante	101
5.3.3.	Limite de détection avec une souche exprimant la $\beta$ -lactamase	101
5.3.4.	Détermination des épitopes des anticorps	102
6.	Validation des tests au format commercial	102
6.1.	Validation avec le soucier du CNR	103
6.2.	Validation d'une utilisation en routine	104
7.	Détection dans l'urine et les hémocultures des CTX-Ms	104
7.1.	Préparation des bandelettes	104
7.2.	Préparation du traceur or colloïdal	105
7.3.	Préparation et dosage des échantillons en urine	105
7.4.	Préparation et dosage des échantillons en hémoculture	106
RESULTATS ET DISCUSSIONS		109
1.	Production des protéines recombinantes	109
1.1.	Bilan des conditions de culture et rendements.	109
1.2.	Analyse SDS-PAGE des protéines recombinantes	111
1.3.	Discussion	113
2.	Obtention des anticorps monoclonaux	114
2.1.	Réponses immunitaires obtenues	114
2.2.	Interprétation des résultats	116
2.3.	Fusions et criblage des anticorps monoclonaux	118
2.4.	Isotypes et classe des anticorps monoclonaux	119
2.5.	Obtention des anticorps monoclonaux purifiés	120
2.5.1.	Production et purification des anticorps	120
2.5.2.	Concentration des anticorps purifiés	121
2.5.3.	Analyse SDS-PAGE des anticorps KPC purifiés	122
2.5.4.	Western blot avec les protéines recombinantes	124
2.6.	Discussion	126
3.	Les étapes de développement et de validation de nos tests	126
3.1.	Les analyses combinatoires	126
3.2.	Les résultats des tests combinatoires	127
3.3.	Les groupes de similarité épitopique	128
3.4.	Sélection du meilleur couple pour chaque $\beta$ -lactamase	129
3.5.	Préparation des bandelettes au format commercial	129
3.6.	Validation des tests au format commercial	130
4.	Préparation et validation des tests pour la détection des CTX-M	130
4.1.	Préparation du test pour la détection de CTX-M-15	130
4.1.1.	Evaluation des anticorps avec la protéine recombinante.	130

4.1.2.	Validation du test CTX-M (G1) avec le soucier « carbapénémases »	133
4.1.3.	Utilisation du mono-test CTX-M (G1) en routine	133
4.2.	Préparation du test pour la détection de CTX-M-2	134
4.2.1.	Evaluation des anticorps avec la protéine recombinante	134
4.2.2.	Détection de CTX-M-2 exprimée par <i>E. coli</i> .	135
4.3.	Préparation du test pour la détection de CTX-M-14	137
4.3.1.	Evaluation des anticorps avec la protéine recombinante	137
4.3.2.	Tests de spécificité de tous les anticorps CTX	138
4.3.3.	Détection de CTX-M-14 exprimée par <i>E. coli</i>	138
4.4.	Identification des épitopes des anticorps choisis	142
4.5.	Détection directe des CTX-Ms dans l'urine et les hémocultures	143
4.5.1.	La bandelette CTX-M 4G : trois lignes test	144
4.5.2.	Détection de souches CTX-M dans l'urine et les hémocultures	144
4.6.	Mise au point et sélection du tampon d'extraction	145
4.6.1.	Caractéristiques du tampon d'extraction	145
4.6.2.	Mise au point d'un tampon d'extraction	145
4.7.	Bilan et discussion	148
5.	Développement et validation des tests pour la détection des carbapénémases	152
5.1.	Préparation du test pour la détection de NDM	152
5.1.1.	Evaluation des anticorps avec la protéine recombinante	152
5.1.2.	Evaluation des anticorps avec des souches NDM	154
5.1.3.	Validation du mono-test NDM avec le soucier « carbapénémases »	156
5.1.4.	Efficacité du tampon d'extraction en fonction de l'espèce bactérienne	157
5.1.5.	Utilisation du mono-test NDM en routine	157
5.2.	Préparation du test pour la détection de OXA-48	158
5.2.1.	Spécificité des anticorps pour des variants d'OXA-48	158
5.2.2.	Evaluation des anticorps avec la protéine recombinante	159
5.2.3.	Evaluation des anticorps avec des souches OXA-48- <i>like</i>	160
5.2.4.	Validation du mono-test OXA-48 avec le soucier « carbapénémases »	162
5.2.5.	Utilisation en routine du mono-test OXA-48	162
5.3.	Préparation du test pour la détection de KPC	163
5.3.1.	Evaluation des anticorps avec la protéine recombinante	163
5.3.2.	Evaluation des anticorps avec des souches KPC	164
5.4.	Détermination des épitopes pour les anticorps NDM, OXA et KPC	166
5.5.	Validation du test multiplex Carba5	166
5.5.1.	Préparation du Carba5	166
5.5.2.	Lecture des cassettes au lecteur	167
5.5.3.	Validation du Carba5 avec le soucier « carbapénémases »	167
5.5.4.	Utilisation du Carba 5 en routine.	168
5.6.	Bilan et discussion	169
	 DISCUSSION GENERALE	 173
	 CONCLUSION GENERALE	 179

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Temps d'exécution et prix des tests	73
Tableau 2 : Protéines recombinantes avec l'étiquette poly-histidine	81
Tableau 3 : Anticorps monoclonaux produits	82
Tableau 4 : Amorces utilisées	87
Tableau 5 : Conditions et rendements de production des protéines recombinantes	111
Tableau 6 : Bilan des fusions et clonages	119
Tableau 7 : Concentrations des anticorps KPC purifiés	121

## Liste des annexes

Annexe 1 : Souches utilisées au Laboratoire CEA	213
Annexe 2 : Séquences des protéines recombinantes avec leur étiquette 6-His	215
Annexe 3 : Isotypes des anticorps monoclonaux produits	217
Annexe 4 : Groupes de « similarité épitopique » des anticorps produits	219
Annexe 5 : Validation des tests avec le soucier « carbapénémases »	221
Annexe 6 : Validation en routine du test CTX-M G1	225
Annexe 7 : Bilan des tests de spécificité avec les anticorps CTX	229
Annexe 8 : Validation en routine du mono-test NDM	231
Annexe 9 : Spécificité des anticorps OXA	233
Annexe 10 : Validation en routine du mono-test OXA-48	235
Annexe 11 : Article : Validation du mono-test NDM	237
Annexe 12 : Validation en routine du Carba5	239
Annexe 13 : Article : Validation du Carba5	241

# Liste des figures

Figure 1 : Cibles thérapeutiques des antibiotiques	25
Figure 2 : Structure de la Streptomycine	26
Figure 3 : Structure générale des tétracyclines	27
Figure 4 : Structure de l'érythromycine	28
Figure 5 : Structure de la rifampicine	29
Figure 6 : Structure générale des quinolones	30
Figure 7 : Structures des Polymyxines B et E	31
Figure 8 : Structure du triméthoprime	31
Figure 9 : Schéma de la paroi des bactéries	33
Figure 10 : Biosynthèse du peptidoglycane	34
Figure 11 : Les étapes de transpeptidation	35
Figure 12 : Les glycopeptides de première génération	36
Figure 13 : Structures moléculaires des formulations de la fosfomycine	37
Figure 14 : Effet de <i>Penicillium notatum</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Figure 15 : Structure du cycle $\beta$ -lactame	38
Figure 16 : Analogie structurale entre la pénicilline et D-Ala-D-Ala	39
Figure 17 : Structures des $\beta$ -lactamines et du dipeptide D-Ala-D-Ala	42
Figure 18 : Relation introduction des antibiotiques et apparition de résistance	43
Figure 19 : Classification clinique des souches en fonction de leur CMI	44
Figure 20 : Les mécanismes de résistance aux antibiotiques	47
Figure 21 : Le concept « ONE Health » en antibiorésistance	51
Figure 22 : Les $\beta$ -lactamases chez les Entérobactéries	52
Figure 23 : Incidence d' <i>E. coli</i> résistante aux C3G dans les bactériémies	54
Figure 24 : Zones d'endémie des carbapénémases	59
Figure 25 : Milieu sélectif chromID BLSE (bioMérieux)	61
Figure 26 : Résultat d'un test de disques combinés	62
Figure 27 : Résultat d'un E-Test	62
Figure 28 : Résultat d'un test de double synergie	63
Figure 29 : Résultats obtenus avec un Hodge test modifié	66
Figure 30 : MALDI TOF : imipénème avant et après hydrolyse	68
Figure 31 : Principe et résultats du Carba NP	69
Figure 32 : Résultats d'un tests blue Carba	70
Figure 33 : Principe d'un test immunochromatographique	72
Figure 34 : Mutagenèse, schéma d'hybridation des amorces	89
Figure 35 : Le dosage des protéines recombinantes sur phase solide	93

Figure 36 : Le protocole d'immunisation	95
Figure 37 : Le format des dosages immuno-enzymatiques	95
Figure 38 : Structure des IgG et IgA dimérique	97
Figure 39 : La description du test bandelette (une seule cible)	99
Figure 40 : Illustration des résultats de la combinatoire	101
Figure 41 : Illustration de cassettes commerciales « mono-test »	102
Figure 42 : La description du test bandelette 5 cibles ou « multiplexe »	103
Figure 43 : La description du test bandelette CTX-M 4G	105
Figure 44 : Préparation et traitement d'échantillons en urine et hémoculture	106
Figure 45 : Cinétiques d'expression pour CTX-M-15 recombinante	110
Figure 46 : Analyse SDS PAGE des protéines recombinantes purifiées	112
Figure 47 : Réponses immunitaires des souris sélectionnées	115
Figure 48 : Schéma des courbes illustrant les réponses immunitaires	116
Figure 49 : Résultat d'une purification d'anticorps avec l'Åktaxpress	121
Figure 50 : Analyse SDS PAGE des anticorps KPC purifiés	123
Figure 51 : Les résultats d'immunoblot avec les protéines recombinantes	125
Figure 52 : Les 800 bandelettes préparées pour une analyse combinatoire	127
Figure 53 : Illustration des résultats d'un test combinatoire.	128
Figure 54 : Bilan du test combinatoire pour la détection de CTX-M-15	131
Figure 55 : Evaluation des couples pour la détection de CTX-M-15.	132
Figure 56 : Bilan des tests combinatoires pour la détection de CTX-M-2	134
Figure 57 : Test prédictif pour la détection de CTX-M-2	136
Figure 58 : Spécificité des couples pour la détection de CTX-M-2	136
Figure 59 : Bilan du test combinatoire pour la détection de CTX-M-14	137
Figure 60 : Tests prédictifs pour la détection de CTX-M-14	139
Figure 61 : Spécificité des couples pour la détection de CTX-M-14	140
Figure 62 : L'éventualité d'un couple « universel » CTX 234/CTX 260*	141
Figure 63 : Choix final du couple pour la détection de CTX-Ms du groupe 9	142
Figure 64 : Identification des épitopes par la méthode SPOT.	143
Figure 65 : Résultats obtenus avec la bandelette CTX-M 4G	144
Figure 66 : Choix du tampon d'extraction	147
Figure 67 : Bilan du test combinatoire pour la détection de NDM-1	153
Figure 68 : Evaluation des couples pour la détection de NDM-1	154
Figure 69 : Sélection du meilleur couple pour détecter des variants de NDM.	155
Figure 70 : Illustration des résultats obtenus avec les Providencia	157
Figure 71 : Bilan du test combinatoire pour la détection de OXA-48	159
Figure 72 : Evaluation des couples pour la détection d'OXA-48.	161
Figure 73 : Choix du meilleur couple pour détecter OXA-48 et ses variants	161

Figure 74 : Bilan du test combinatoire pour la détection de KPC-2	163
Figure 75 : Choix du meilleur couple avec une souche exprimant KPC-3	165
Figure 76 : Spécificité des couples avec plusieurs variants de KPC	165
Figure 77 : Illustration de résultats du multiplex avec le lecteur	168

# Liste des abréviations

AcM	Anticorps monoclonal
AChE	Acétylcholinestérase
AEBSF	Fluorure de 4-(2-aminoéthyl) benzene sulfonyle
BET	Bromure d'éthidium
BLSE	Béta-lactamase à spectre élargi
BSA	Albumine bovine sérique
CAS	Chèvre Anti Souris
CEA	Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CNR	Centre National de Référence
CTX-M	Céfotaximase-Munich
DO	Densité optique
DTNB	Acide dithio-bis-nitrobenzoïque
E-BLSE	Entérobactéries produisant une Béta-lactamase à spectre élargi
EIA	Enzyme immuno assay
EPC	Ebnérobactéries productrices de carbapénémases
FRI	French imipenemase
G1, G2, G8, G9	CTX-M du Groupe 1, Groupe 2, Groupe 8 ou Groupe 9
GES	Guyana extended-spectrum beta-lactamase
GIM	German imipenemase
HAT	Hypoxanthine-Aminoptérine-Thyamidine
IMI	Imipenem-hydrolyzing $\beta$ -lactamases
IMP	Imipénémase
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-galactopyranoside
KPC	<i>Kbsiella pneumoniae</i> carbapénémase
LB	Luria Broth
LOD	Limite de détection
NDM	New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase
NMC-A	Not metallo-enzyme carbapenemase A
OXA	Oxacillinase

PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	Peptidoglycane
PLP	Protéines liant les pénicillines
PVDF	Polyvinylidene difluoride
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SHV	Sulfhydryl variable
SME	Serratia marcescens extended spectrum beta-lactamase
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SVF	Sérum de veau foetal
TAE	Tampon Tris-acétate-EDTA
TEM	Temoneira
VIM	Verona Integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase

# **Introduction générale**



# Introduction générale

## 1. L'origine des antibiotiques

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires produits par des microorganismes et sont des éléments du « Parvome » (1–4). Dans l'environnement leur production se fait à de faibles concentrations (sublétales) et dans ces conditions, les antibiotiques jouent un rôle dans diverses fonctions biologiques. Par exemple, ces faibles concentrations peuvent influencer la diversité génétique par l'induction de transfert horizontal de gènes (5), mais aussi augmenter le taux de recombinaison (6) et de mutagenèse (7). En plus de ces aspects génétiques, un impact sur la diversité phénotypique peut être observé. Des bactéries soumises à ces faibles concentrations peuvent avoir une activité métabolique très faible, les rendant résistantes à de fortes concentrations en antibiotiques (8). Par contre cette tolérance n'est pas transmissible et est réversible en absence d'antibiotique (9). De faibles concentrations en antibiotiques jouent également un rôle dans les mécanismes de signalisation intercellulaire pouvant générer la formation de biofilms et l'expression de facteurs de virulence (10).

Si à de faibles concentrations les antibiotiques ont un rôle dans la régulation d'activités métaboliques et la signalisation, à forte concentration ils peuvent éliminer (action bactéricide) ou inhiber la croissance (action bactériostatique) d'autres microorganismes (11). C'est cette caractéristique qui leur vaut une utilisation comme outils thérapeutiques. Il est intéressant de noter que les faibles concentrations ont également un effet vis-à-vis de ces deux actions en favorisant la sélection ou l'apparition de résistances (12).

## 2. Les antibiotiques : un outil thérapeutique

La sédentarisation de l'espèce humaine a eu pour conséquence une augmentation de la densité des populations. Ce nouveau mode de vie fut propice à la propagation des premiers fléaux imputables à des maladies infectieuses pouvant même aboutir à l'effondrement de certaines civilisations (13–15). La lutte contre les infections a été depuis un enjeu majeur, et l'utilisation des antibiotiques le moyen de lutte le plus efficace à ce jour.

Ce n'est qu'au 19<sup>ème</sup> siècle qu'un lien entre apparition de maladies infectieuses et présence de microorganismes est fait suite aux travaux de Louis Pasteur (1822-1895) et de Robert Koch (1843-1910) dont les postulats éponymes, ci-dessous au nombre de quatre, permettent de vérifier ce lien de cause à effet :

- ✓ L'agent responsable doit être présent lors de l'infection mais absent chez un individu sain
- ✓ Il doit être isolable et amplifiable en culture pure
- ✓ Inoculé à un individu sain, il doit déclencher les mêmes symptômes
- ✓ L'agent doit être le même après isolement sur le nouvel hôte

Cette approche a, par la suite, orienté la recherche médicale vers l'identification des agents infectieux ainsi que leur élimination et le contrôle de leur propagation avec principalement l'utilisation des antibiotiques.

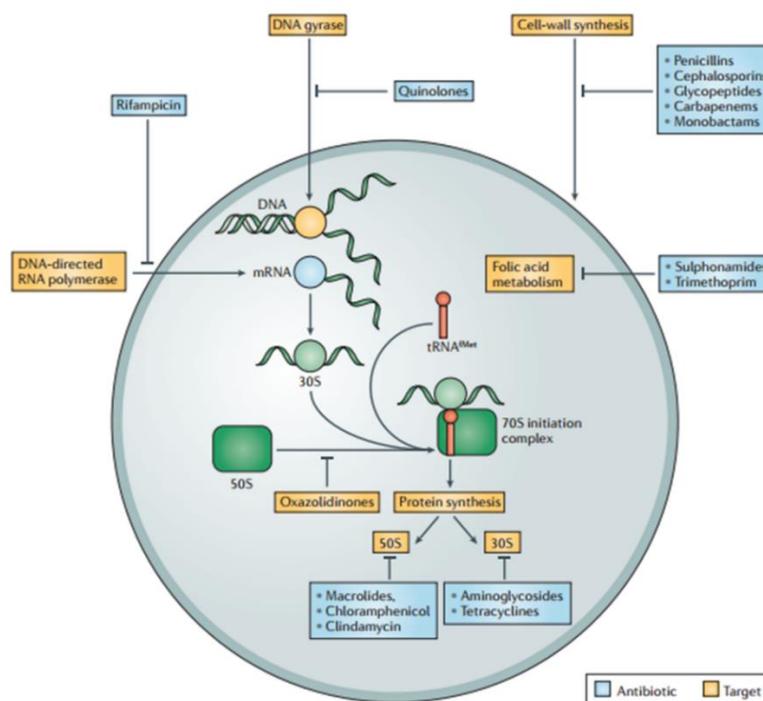
Les antibiotiques, terme proposé par Dubos en 1940 (du grec *anti*, contre et *bios*, la vie), peuvent être classés en fonction de leur mode d'action (bactériostatique ou bactéricide), leur spectre d'activité (large spectre ou spectre étroit), leur voie d'administration (orale ou parentérale), leur cible thérapeutique ou leur structure chimique.

De nos jours, le terme « antibiotiques » englobent les composés naturels, synthétiques et hémi-synthétiques. Depuis la mise en évidence de leur action (16), ils ont été utilisés en santé humaine, animale et végétale comme protection contre les pathogènes. En agriculture, ils sont également employés en prophylaxie pour limiter l'apparition et la

dissémination de maladies, mais aussi comme facteurs de croissance à des doses sub-thérapeutiques, pour une longue durée et sur un grand nombre d'animaux (17).

L'efficacité des antibiotiques et leur utilisation ont augmenté l'espérance et la qualité de vie des êtres humains. Plus de 7000 substances antibiotiques ont été découvertes mais du fait de la toxicité de certaines molécules seulement une centaine est utilisée pour traiter les humains et les animaux (1).

Les antibiotiques ciblent des fonctions essentielles à la croissance des bactéries, notamment en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire, des acides nucléiques, des protéines ou en inhibant des voies métaboliques.



**Figure 1 : Cibles thérapeutiques des antibiotiques**

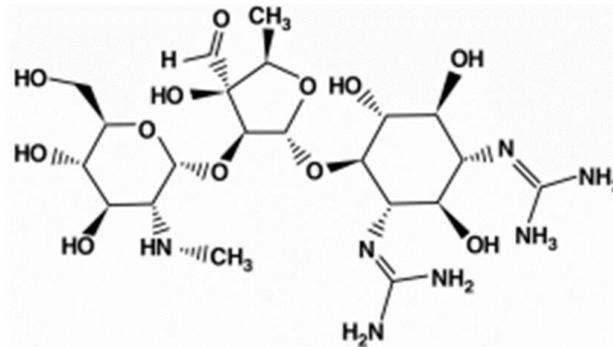
Lewis K. 2013. Platforms for antibiotic discovery. Nat Rev Drug Discov 12:371–387

Par la suite nous ne présenterons que quelques exemples d'antibiotiques pour chaque cible thérapeutique.

## 2.1. Antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique

### 2.1.1. Les aminosides

**Les aminoglycosides** ou **aminosides** sont les premiers antibiotiques découverts après un criblage systématique de l'activité biologique de produits issus des cultures de *Streptomyces spp* par Selman Waksman (1888-1973). La streptomycine est la première molécule découverte de cette famille et sera introduite en thérapie en 1944. Ce sont des antibiotiques à large spectre avec une activité contre les bactéries à Gram négatif (Gram<sup>-</sup>) et les Mycobactéries.



**Figure 2 : Structure de la Streptomycine**

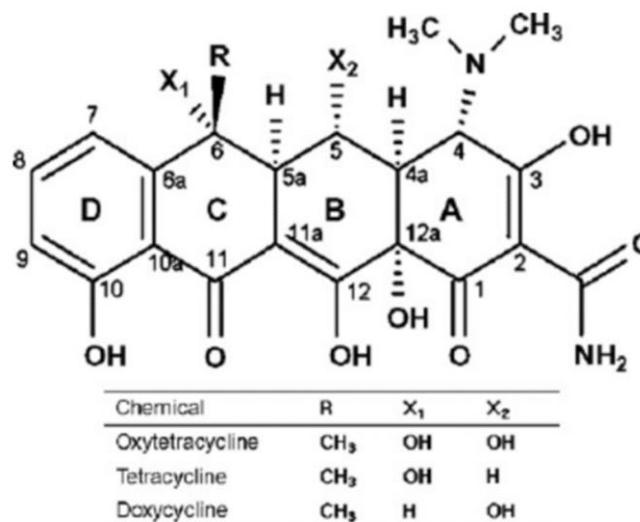
D'après Kwiatkowska B. *et al.* 2013. Immune system as a new therapeutic target for antibiotics. *Adv Biosci Biotechnol* 4:91–101

Les aminoglycosides se composent de sucres aminés reliés par des ponts glycosidiques à un noyau central aminocyclitol ou streptamine. **Ils se fixent à la sous-unité 30S du ribosome**, inhibant ainsi la synthèse protéique. Toutefois, l'action bactéricide rapide laisse à penser que d'autres mécanismes sont impliqués, comme par exemple une désorganisation de la membrane externe (Gram<sup>-</sup>), comme montrée pour la gentamicine (18), entraînant une fuite du contenu cellulaire et donc un effet bactéricide rapide. Ce sont des molécules dont l'efficacité dépend de la concentration. Elles ont un effet post-antibiotique signifiant que les bactéries continuent de mourir même après retrait de la molécule qui s'est accumulée dans le milieu intracellulaire.

Les aminoglycosides présentent toutefois une ototoxicité et une néphrotoxicité, et sont donc utilisés en monodose quotidienne (19,20).

### 2.1.2. Les tétracyclines

**Les tétracyclines** ont été découvertes dans les années 1940. Elles sont produites par *Streptomyces spp* ou par hémisynthèse et sont des molécules à large spectre couvrant une large variété de bactéries à Gram positif (Gram<sup>+</sup>) et à Gram<sup>-</sup> et avec très peu d'effets secondaires.



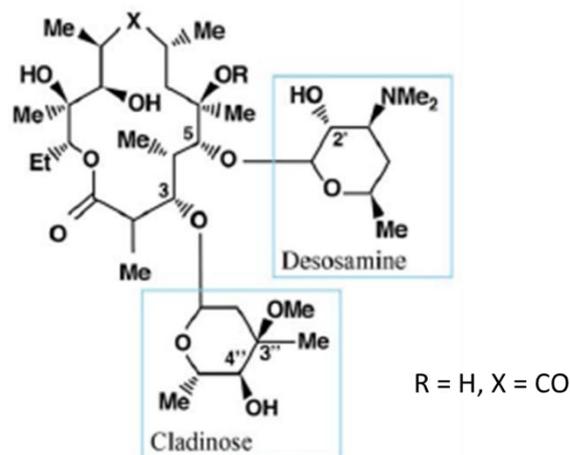
**Figure 3 : Structure générale des tétracyclines**

Yeon Seok Kim *et al.* 2009. *Analytica chimica acta* 634(2):250-4

Elles sont très efficaces pour lutter contre des agents intracellulaires. Elles sont constituées de quatre cycles accolés, d'où leur nom, auxquels sont fixés des groupements fonctionnels. Le représentant le plus simple est la 6-deoxy-6-déméthyl tétracycline. Ces molécules **inhibent la synthèse protéique en empêchant la liaison des aminoacyl ARNt au ribosome bactérien** (21), et ont une activité bactériostatique.

### 2.1.3. Les macrolides

**Les macrolides** sont des molécules naturelles produites par *Streptomyces spp* ou obtenues par hémisynthèse. La première molécule isolée en 1950 a été appelée pikromycine à cause de son goût amer (du grec *pikro* signifiant amer). Ils sont constitués d'un noyau lactonique et sont classés en fonction de la taille de ce cycle sur lequel est fixé un sucre aminé et/ou un sucre neutre. Un des plus connus est l'érythromycine. Ils sont surtout efficaces contre les bactéries aérobies à Gram<sup>+</sup>. Du fait de l'imperméabilité partielle de la membrane externe des bactéries à Gram<sup>-</sup> à ces composés hydrophobes, leur concentration dans le cytoplasme est 100 fois plus faible que chez les Gram<sup>+</sup> (22). **Les macrolides se fixent à la sous-unité 50S des ribosomes** procaryotes au niveau du canal de sortie du peptide néo-synthétisé (23). L'inhibition de la synthèse protéique leur confère plutôt une activité bactériostatique.



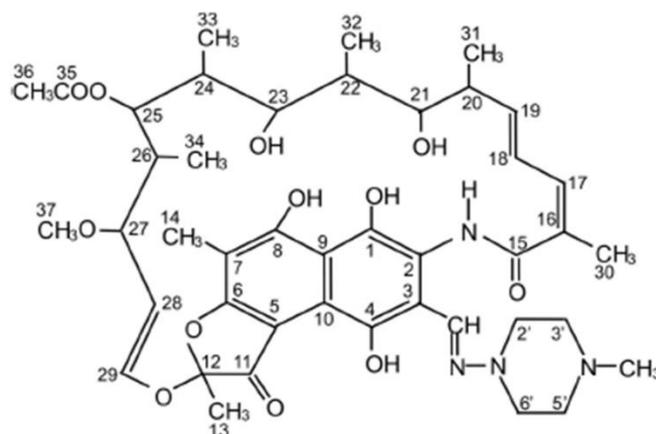
**Figure 4 : Structure de l'érythromycine**

D'après Kwiatkowska B. *et al.* 2013. Immune system as a new therapeutic target for antibiotics. *Adv Biosci Biotechnol* 4:91–101

## 2.2. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques

### 2.2.1. La rifampicine

Cette molécule appartient à la famille des **ansamycines** qui sont des molécules lipophiles traversant facilement les membranes. Elles sont composées de deux cycles aromatiques reliés par une chaîne aliphatique (24). La rifampicine est un dérivé hémisynthétique de la Ryfamycine B produite par *Nocardia mediterranei*. C'est une molécule à large spectre qui **inhibe la transcription au niveau de son initiation par blocage de l'ARN polymérase ADN dépendante** (25). C'est un antibiotique bactéricide avec un effet post-antibiotique du fait de sa liaison irréversible à sa cible.



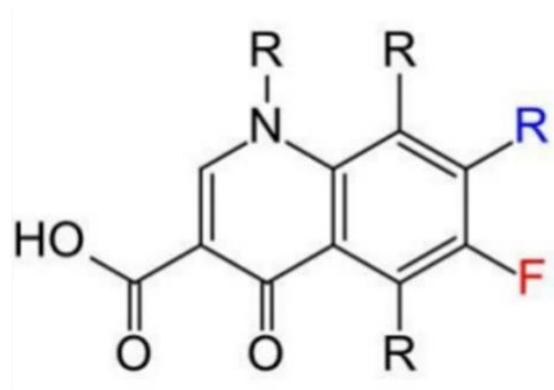
**Figure 5 : Structure de la rifampicine**

Agrawal S. *et al.* 2004. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. *Eur J Pharm Sci* 22:127–144

### 2.2.2. Les quinolones

L'acide nalidixique de la famille des **quinolones** a été découvert en 1962 et introduit cinq ans plus tard en utilisation clinique pour le traitement des infections urinaires impliquant des entérobactéries (26). Après une perte d'intérêt pour cette molécule, une deuxième génération de quinolones, avec un spectre d'action élargi et ne nécessitant qu'une prise journalière, les **fluoroquinolones**, a été utilisée à partir de la fin des

années 70. Ce sont des antibiotiques synthétiques, concentration dépendants (27), à large spectre et avec une activité bactéricide rapide. Les quinolones **agissent sur l'ADN gyrase et la topoisomérase IV** conduisant à un défaut de synthèse de l'ADN et à la mort de la bactérie (28).



Saminathan Kayarohanam, GEOMATIKA University College

**Figure 6 : Structure générale des quinolones**

### **2.3. Antibiotiques avec une action sur la membrane**

**Les polymyxines** sont des antibiotiques produits naturellement par des espèces de *Paenibacillus polymyxa*. Plusieurs classes (A, B, C, D et E) existent mais seules deux sont utilisées en clinique. Il s'agit de la polymyxine B et de la polymyxine E aussi appelée colistine (29). Ce sont des composés constitués d'un cycle de 7 acides aminés et d'une chaîne latérale sur laquelle est lié un acide gras. Ils ont donc des propriétés hydrophiles et lipophiles (détergent) responsables de leurs modes d'action antibactériens. Le principal consiste en la déstabilisation des membranes bactériennes. **Les polymyxines se fixent au lipide A**, constituant du lipopolysaccharide (LPS) ce qui aboutit à la perméabilisation de la membrane externe. La membrane interne est à son tour lysée par les polymyxines ayant atteint l'espace périplasmique. Les polymyxines ne sont efficaces que sur les bactéries à Gram<sup>-</sup>. Elles présentent une néphrotoxicité mais leur utilisation a regagné de l'intérêt pour le traitement d'infections dues à des bactéries à Gram<sup>-</sup> multi-résistantes (30).

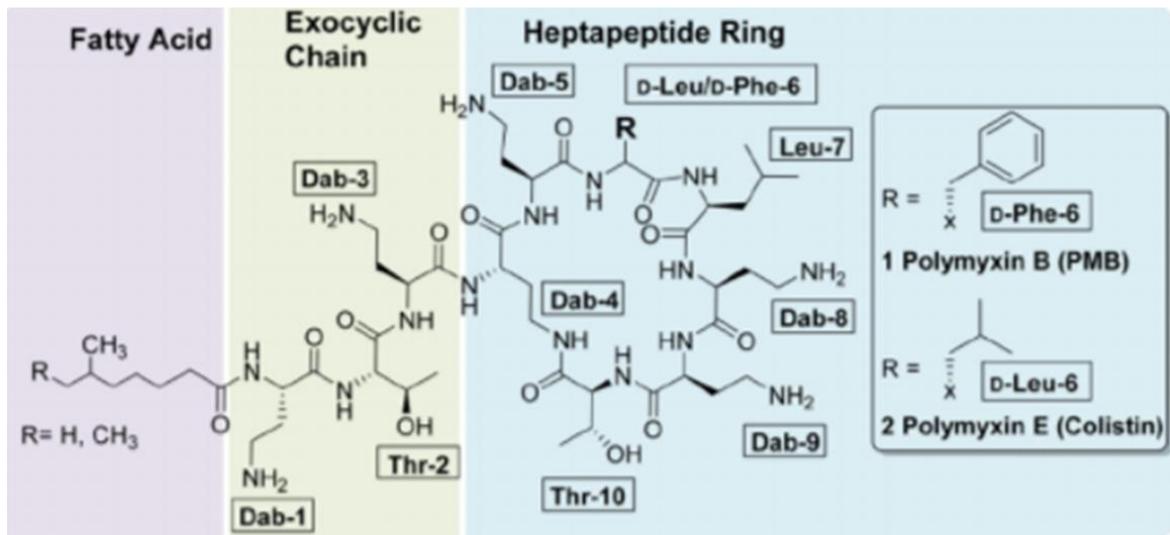


Figure 7 : Structures des Polymyxines B et E

Gallardo-Godoy A *et al.* 2016. Activity and Predicted Nephrotoxicity of Synthetic Antibiotics Based on Polymyxin B. *J Med Chem* 59:1068–1077

## 2.4. Antibiotiques qui inhibent une voie métabolique

**Le triméthoprime**, de la famille des diaminopyrimidines, est un inhibiteur compétitif de la **dihydrofolate réductase** qui catalyse la réduction de l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique.

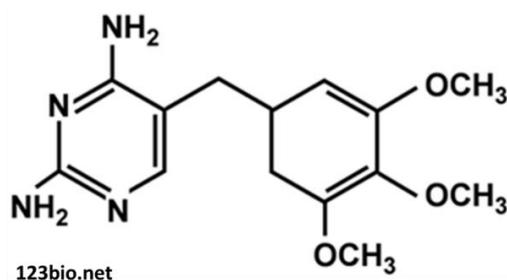


Figure 8 : Structure du triméthoprime

L'acide tétrahydrofolique est un cofacteur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Le triméthoprime est un antibiotique bactériostatique temps dépendant qui inhibe la synthèse de l'ADN (31). Il est utilisé en synergie avec le Sulfaméthoxazole

(32), de la famille des sulfamides, et cette association a une action bactéricide dans le cas de cystites, pyélonéphrites ou infections digestives.

## **2.5. Antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane**

Avant de présenter ces antibiotiques, nous allons présenter la paroi bactérienne et un constituant majeur de cette dernière, le peptidoglycane (PG)

### **2.5.1. La paroi bactérienne**

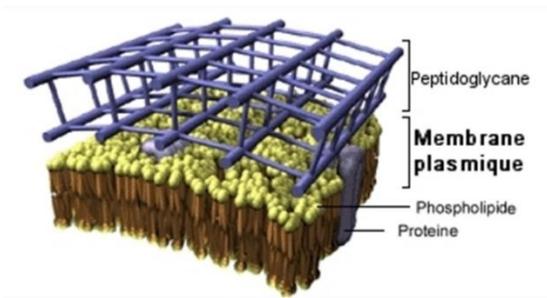
Du fait de leur environnement hostile et changeant, les cellules bactériennes se sont protégées derrière un rempart. Deux structures de ce rempart sont mises en évidence par Christian Gram en 1884 grâce à un protocole de coloration qui différencie les bactéries : certaines conservent la coloration après rinçage à l'éthanol, alors que d'autres la perdent. On parlera dès lors de bactéries à Gram positif pour les premières et Gram négatif pour les secondes (33).

**La paroi** des bactéries à Gram négatif se compose de trois couches principales :

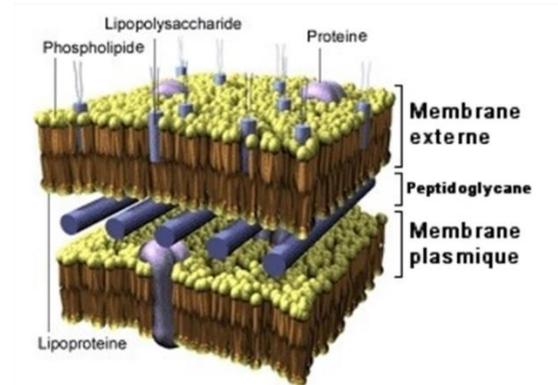
- ✓ la membrane externe
- ✓ le peptidoglycane (PG) qui permet à la bactérie de résister aux contraintes de son environnement et lui donne sa forme
- ✓ la membrane interne (ou membrane cytoplasmique).

Les deux membranes délimitent un compartiment appelé espace périplasmique. La paroi des bactéries à Gram positif quant à elle ne possède pas de membrane externe qui chez les bactéries à Gram<sup>-</sup> a un rôle protecteur contre les molécules toxiques et permet également de stabiliser la structure de la bactérie. Ce manque est donc compensé par une couche de PG plus épaisse.

Bactérie à Gram positif



Bactérie à Gram Négatif



[http://stl\\_bjb.ac-dijon.fr/microbio/mparoibacterienne.htm](http://stl_bjb.ac-dijon.fr/microbio/mparoibacterienne.htm)

Figure 9 : Schéma de la paroi des bactéries

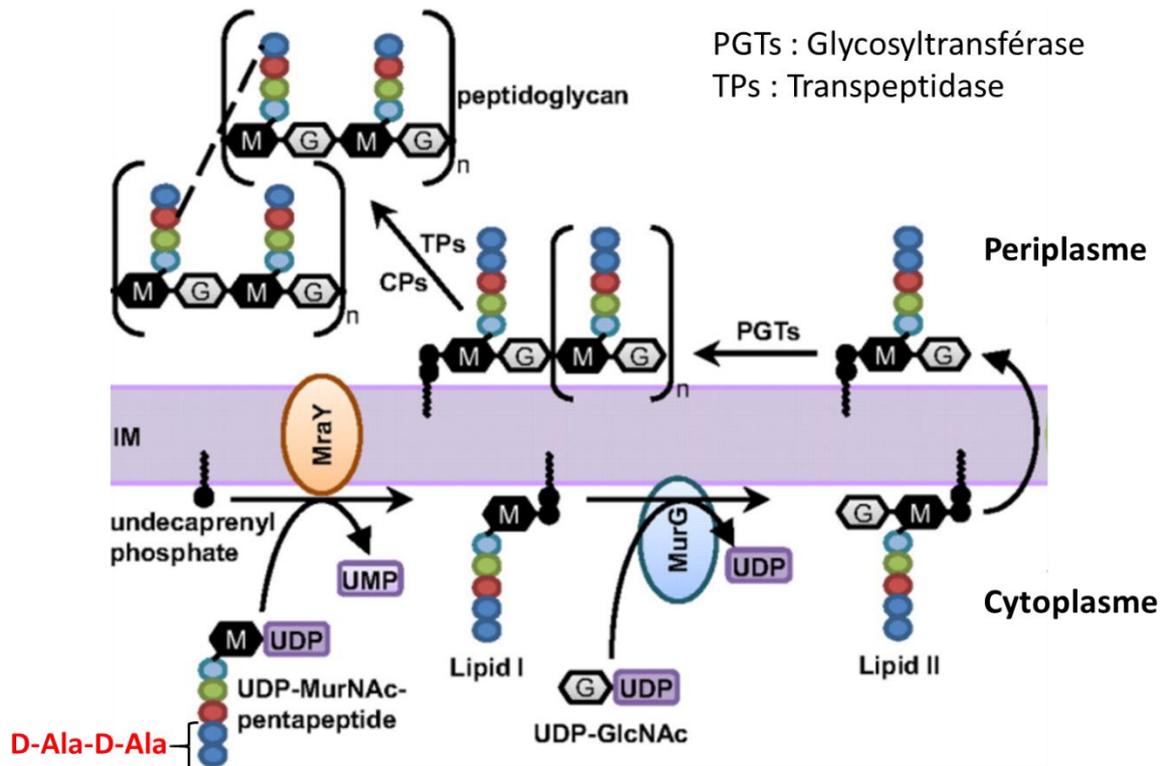
### 2.5.2. Le peptidoglycane, structure et biosynthèse

**Le peptidoglycane**, aussi appelé muréine, se situe sur la face externe de la membrane plasmique et donne sa forme à la bactérie. Il permet aussi de maintenir l'intégrité cellulaire contre la pression osmotique interne et lors de la division cellulaire. L'absence de cette structure rigide provoque dans la plupart des cas la mort de la bactérie par lyse cellulaire (34). C'est un hétéropolymère composé de chaînes glucidiques reliées entre elles par des chaînes peptidiques ou pentapeptide.

La synthèse du PG (FIGURE 10) commence par la synthèse de son précurseur cytoplasmique sous l'action des enzymes de la famille Mur pour aboutir à la molécule soluble UDP-MurNac-pentapeptide (35). Cette molécule est ensuite associée à la membrane plasmique grâce à la protéine *MraY* pour donner le Lipide I. La protéine *MurG* ajoute le groupement UDP-GlcNac pour former le Lipide II. Ce précurseur disaccharidique serait transloqué à la face externe de la membrane plasmique par un transporteur membranaire de type flippase (36).

Dans l'espace périplasmique auront lieu les étapes de polymérisation des unités disaccharidiques par des glycosyltransférases ainsi que la formation des liaisons entre les chaînes peptidiques par des transpeptidases. Ces activités sont portées par des protéines appelées protéines liant les pénicillines ou PLP.

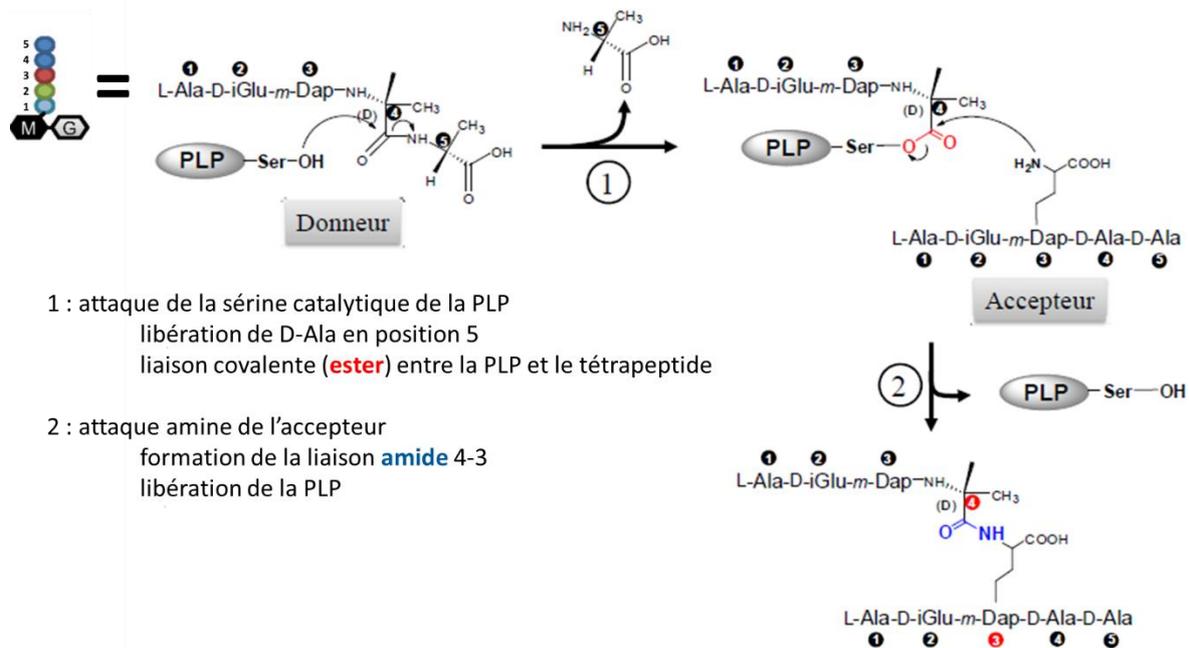
**La transglycosylation** aboutit à la formation d'une liaison  $\beta$ -1,4 entre deux MurNac et GlcNac successifs.



**Figure 10 : Biosynthèse du peptidoglycane**

Adapté de Ruiz N. 2008. Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci 105:15553–15557.

**La transpeptidation** (37) se déroule en deux étapes. Dans un premier temps, l'attaque nucléophile de la serine active de la PLP conduit à la liaison de l'enzyme à un pentapeptide. Cette réaction libère le D-Ala en position 5 du pentapeptide. Dans un deuxième temps, le groupement muréine-tétrapeptide réagit avec un groupement amine primaire du résidu en position 3 d'une chaîne voisine. Il y a formation d'une liaison amide 4-3 et libération de la PLP avec sa sérine activée (FIGURE 11).



**Figure 11 : Les étapes de transpeptidation**

Adapté de Lavollay M (cours antibiorésistance 2016)

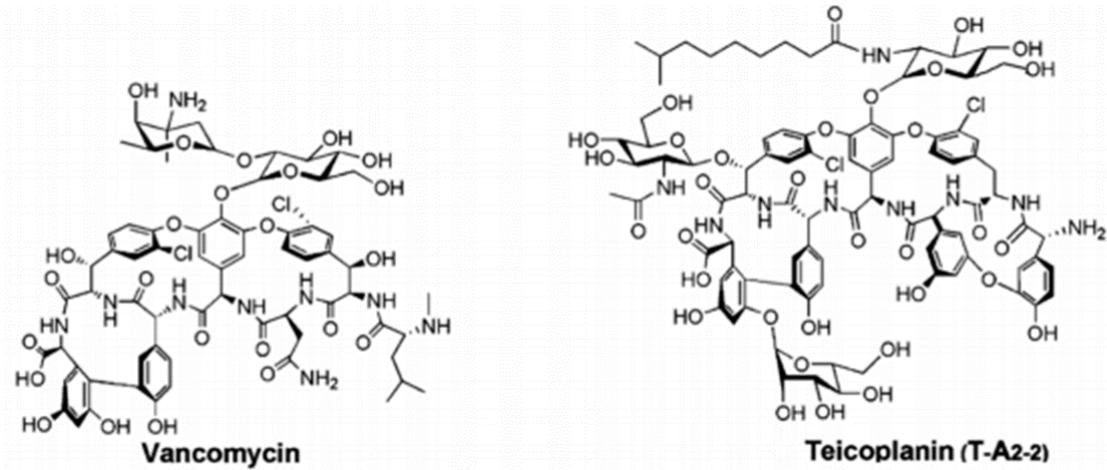
Plusieurs familles d'antibiotiques ciblent le dipeptide D-Ala-D-Ala et bloquent la deuxième réaction, ce qui inhibe la formation du PG.

### 2.5.3. Les glycopeptides

**Les glycopeptides** sont des antibiotiques utilisés contre des infections impliquant des bactéries pathogènes à Gram<sup>+</sup> multi résistantes comme *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp*, et *Clostridium difficile*. Ils sont considérés comme le traitement de dernier recours contre des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM). Ceux sont des heptapeptides produits par des actinomycètes. La vancomycine introduite en 1958 en clinique et la teicoplanine, en 1988, sont les représentants de la première génération (38).

Les glycopeptides inhibent la synthèse du peptidoglycane (PG) en **se liant au dipeptide terminal D-Ala-D-Ala** des précurseurs du PG. Cette liaison séquestre le substrat des transpeptidases et des transglycosylases empêchant l'élongation et la

polymérisation du PG. Le PG est donc plus fin et la membrane endommagée, la cellule devient sensible à la lyse, ce qui contribue à l'effet bactéricide.

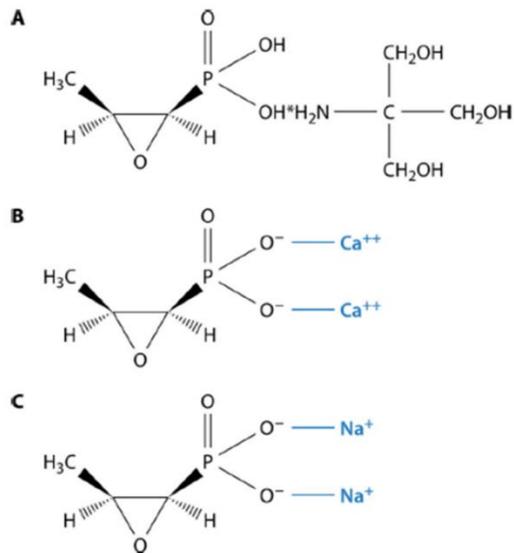


**Figure 12 : Les glycopeptides de première génération**

D'après Binda *et al.* 2014. Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. *Antibiotics* 3:572–594.

#### **2.5.4. La fosfomycine**

**La fosfomycine** est une molécule produite par des *Streptomyces* qui a été découverte en 1969 disponible sous trois formulations, deux pour une administration par voie orale, la fosfomycine trométhamine et la fosfomycine calcique, et une formulation injectable, la fosfomycine sodique (39). La fosfomycine inhibe la synthèse du peptidoglycane dans la phase précoce de sa biosynthèse en **se liant à une cystéine du suite actif de MurA** (40), enzyme responsable de la formation du précurseur cytoplasmique UDP-MurNac du PG. La fosfomycine est un antibiotique à spectre large (41) capable de pénétrer les biofilms (42).

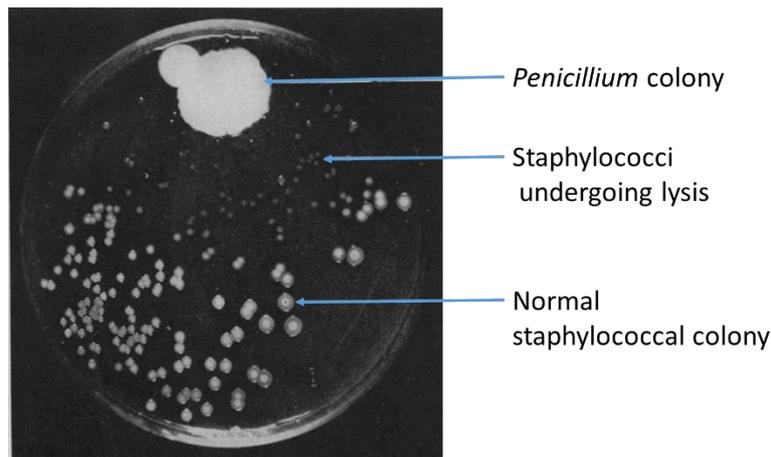


**Figure 13 : Structures moléculaires des formulations de la fosfomycine**

A : Fosfomycine trométamine, B : fosfomycine calcique, C : fosfomycine sodique.  
Falagas *et al.* 2016. Fosfomycin. Clin Microbiol Rev 29:321–347.

### 2.5.5. Les bêta-lactamines

En 1929, Alexander Fleming (1881-1955) observe que la croissance d'un champignon, *Penicillium notatum*, semble avoir une activité antimicrobienne sur ses cultures de *Staphylococcus aureus* (16).



**Figure 14 : Effet de *Penicillium notatum* sur *Staphylococcus aureus***

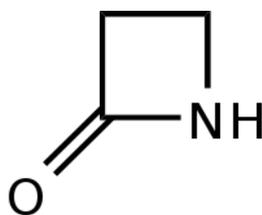
D'après Fleming. 1929

Une molécule libérée par le champignon inhibait dans la zone adjacente à sa pousse la croissance bactérienne (FIGURE 14). Il donnera le nom de pénicilline à cet inhibiteur d'après son organisme d'origine.

L'instabilité de la molécule et sa difficulté d'extraction ne lui permettront pas de poursuivre vers une application thérapeutique. Ce sont les recherches de Ernst Chain et Howard Florey qui rendront cette utilisation possible en 1940 (13). La pénicilline a joué un rôle majeur dans le conflit de la seconde guerre mondiale en diminuant drastiquement le nombre de décès liés aux infections suite à des blessures. La pénicilline a donc été la première molécule thérapeutique naturelle montrant une activité antibactérienne *in vivo*, non inactivée dans l'organisme, et non toxique pour l'Homme (43).

L'utilisation de la pénicilline marque le début de l'ère des antibiotiques.

De cette molécule découlera la famille des **bêta-lactamines** ( $\beta$ -lactamines). Ce sont des molécules à large spectre, avec une action temps dépendante et une faible toxicité pour les organismes traités. Leur obtention est facile et engendre de faibles coûts de production (44). Pour ces raisons, elles correspondent à la famille d'antibiotiques la plus fréquemment utilisée en antibiothérapie (45, 46). L'élément structural commun à toutes les molécules de cette famille est le noyau  $\beta$ -lactame. L'environnement électronique de ce noyau est instable et sa structure est contrainte ce qui le rend sensible aux attaques nucléophiles (47) et conditionne son activité antibiotique spécifique.

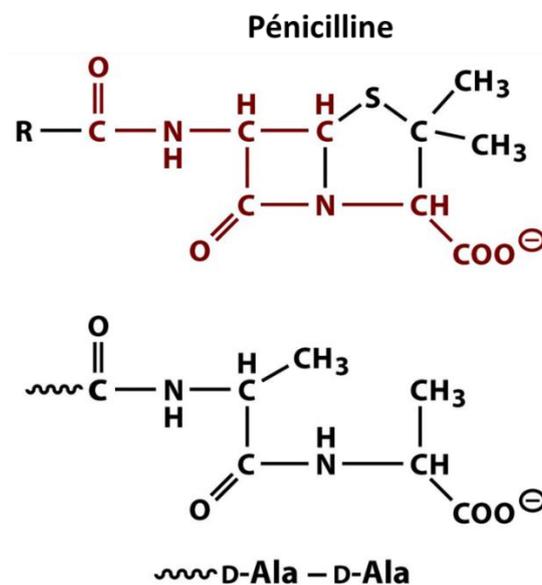


**Figure 15 : Structure du cycle  $\beta$ -lactame**

En fonction des cycles et chaînes latérales ajoutés à ce noyau, on distinguera 4 sous-familles, les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes. Chaque sous-famille aura sa propre biodisponibilité et son spectre d'activité.

Enfin, on parlera des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases qui n'ont pas à proprement dit d'activité antibiotique.

**L'inhibition de la synthèse du PG par les  $\beta$ -lactamines** intervient à l'étape de transpeptidation. En effet, il y a une homologie structurale (48) entre le dipeptide D-Ala-D-Ala et le noyau  $\beta$ -lactame (FIGURE 16). Les  $\beta$ -lactamines servent de substrat aux transpeptidases, mais dans ce cas-là, la sérine active n'est pas libérée en fin de réaction et elle reste liée aux  $\beta$ -lactamines. Il y a donc inhibition irréversible de la PLP ce qui se traduit par une inhibition de la synthèse du PG avec des conséquences délétères pour la bactérie.



**Figure 16 : Analogie structurale entre la pénicilline et D-Ala-D-Ala**

Figure 8-32. Grover N. 2006. Principles of biochemistry (4th ed.). Biochem Mol Biol

Educ 34:162–163

### 2.5.6. Les $\beta$ -lactamines : les sous familles

**Les pénicillines** sont formées du cycle  $\beta$ -lactame associé à un cycle thiazolidine et sont les premiers antibiotiques qui ont été synthétisés de manière industrielle (49). Elles sont divisées en plusieurs molécules :

- ✓ Les pénicillines naturelles, comme les pénicillines G et V (respectivement benzylpénicilline et phénoxpénicilline), qui sont utilisées pour traiter les infections à bactéries Gram<sup>+</sup> aérobies et sont sensibles aux pénicillinases.
- ✓ Les pénicillines résistantes aux pénicillinases, aussi appelées pénicillines M comme la méthicilline, l'oxacilline, la cloxacilline, qui sont surtout utilisées pour traiter des infections impliquant des souches de staphylocoques (Gram<sup>+</sup>) produisant des pénicillinases.
- ✓ Les aminopénicillines, comme l'ampicilline et l'amoxicilline. Leur groupement amine les rend plus hydrophiles, ce qui facilite leur prise en charge par les porines présentes chez les Gram<sup>-</sup>. Leur accès aux PLPs présentes dans l'espace périplasmique en sera facilité. Elles sont utilisées contre les bactéries à Gram<sup>+</sup> aérobies, les coques à Gram<sup>-</sup> et certaines entérobactéries comme *E. coli* et *P. mirabilis* par exemple. Elles sont sensibles aux pénicillinases, et de ce fait, utilisées en combinaison avec un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases, par exemple amoxicilline + acide clavulanique = Augmentin®.
- ✓ Les pénicillines à large spectre (ou carboxypénicillines) comme la ticarcilline, la carbénicilline, dont les groupements en chaîne latérale les rendent plus perméantes encore que les aminopénicillines pour les bactéries à Gram<sup>-</sup> et plus résistantes aux pénicillinases. Elles sont utilisables contre les *Pseudomonas aeruginosa*, les *Proteus* et *Enterobacter*.
- ✓ Les uréidopénicillines, comme la pipéracilline administrable par voie intraveineuse et intra-musculaire, sont également des pénicillines antipyocyaniques et sensibles aux pénicillinases. Par conséquent, la pipéracilline peut être associée au Tazobactam (Tazocilline®).

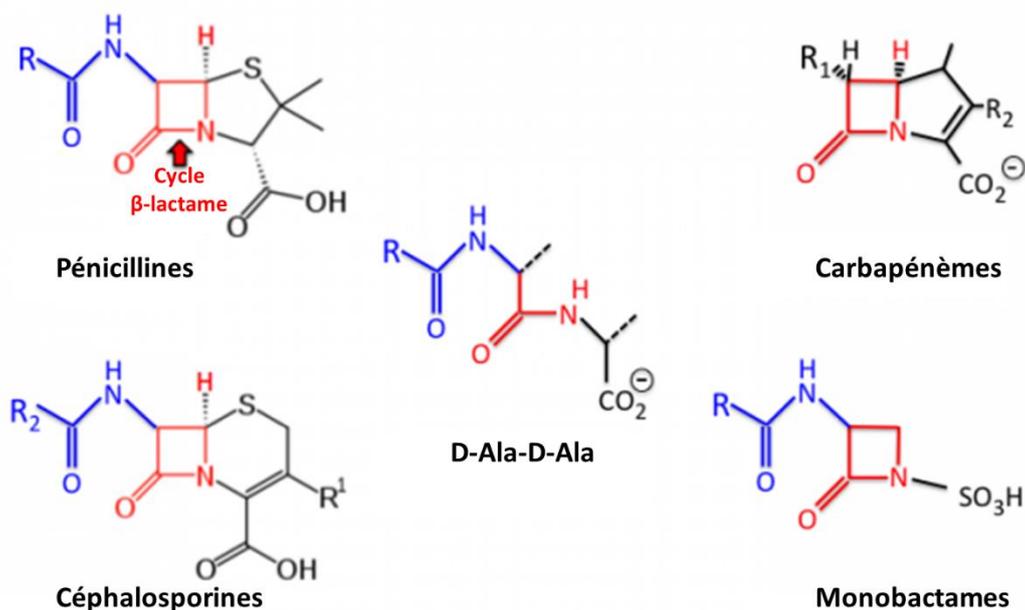
Chez **les céphalosporines**, le cycle thiazolidine est remplacé par un cycle dihydrothiazine qui possède un carbone supplémentaire. Elles ont été découvertes par Giuseppe Brotzu en 1940 à partir d'un champignon, *Cephalosporium acremonium*. Elles sont classées en générations qui correspondent à la date d'apparition de différents analogues avec de nouvelles propriétés (50).

- ✓ Les céphalosporines de première génération (C1G : céfalotine, céfazoline), avec un spectre d'action comparable aux pénicillines M, sont actives contre les cocci à Gram<sup>+</sup> et certains bacilles à Gram<sup>-</sup>, mais elles restent toutefois sensibles aux pénicillinases.
- ✓ Les céphalosporines de deuxième génération (C2G : céfamandole, céfuroxime et céfoxitine), sont plus résistantes aux  $\beta$ -lactamases. Elles possèdent un spectre d'action plus large (vers les Gram<sup>-</sup>) et une meilleure diffusion tissulaire que les C1G. Elles sont notamment utilisables dans des infections respiratoires, urinaires et ostéoarticulaires.
- ✓ Les céphalosporines de troisième génération (C3G : céfotaxime, ceftazidime et ceftriaxone) ont un spectre d'action moindre pour les Gram<sup>+</sup> mais plus élargi pour les Gram<sup>-</sup> (51) telles que les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*. Elles sont utilisables à plus faible concentration et sont plus résistantes aux céphalosporinases que les C1G et C2G. Elles sont principalement employées dans le traitement d'infections nosocomiales. Elles offrent une bonne pénétration tissulaire et traversent la barrière hémato encéphalique. Malheureusement ces molécules sont hydrolysées par les céphalosporinases (à spectre étendu).
- ✓ Les céphalosporines de quatrième génération (C4G : céfépime et cefpirome), résistent mieux à l'hydrolyse des céphalosporinases que les C3G. De plus elles ont une meilleure affinité pour les PLPs.

**Les monobactames** sont des  $\beta$ -lactamines monocycle actives contre les Gram<sup>-</sup> mais pas les Gram<sup>+</sup>. L'aztréonam est le seul monobactame commercialisé avec une activité proche de celle des C3G et qui résiste à l'activité des  $\beta$ -lactamases à spectre restreint et à l'activité des métallo- $\beta$ -lactamases (52).

**Les carbapénèmes** sont les  $\beta$ -lactamines les plus récemment développées avec le spectre d'activité le plus large : Gram<sup>-</sup> et Gram<sup>+</sup>. De plus, ils sont résistants aux pénicillinases et céphalosporinases (chromosomiques ou plasmidiques) ainsi qu'aux  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) (par exemple de type SHV, TEM et CTX-M), et sont donc des candidats de choix pour traiter des infections impliquant des organismes résistants. Ce sont des antibiotiques dits de "dernier recours" L'imipénème est, de toutes les  $\beta$ -lactamines, celle avec le spectre le plus large. Malheureusement, contrairement au méropénème, ertapénème et doripénème, il est hydrolysé par les dihydropeptidases dans les tubules rénaux. C'est pourquoi il est utilisé en association avec la cilastatine qui inhibe ce catabolisme.

Leur usage est principalement limité au milieu hospitalier pour traiter les infections nosocomiales, mais l'incidence des entérobactéries produisant des BLSE tant à l'hôpital que dans la population pourrait entraîner une augmentation de leur utilisation (53, 54).



Adapté de Tulane University, School of medicine

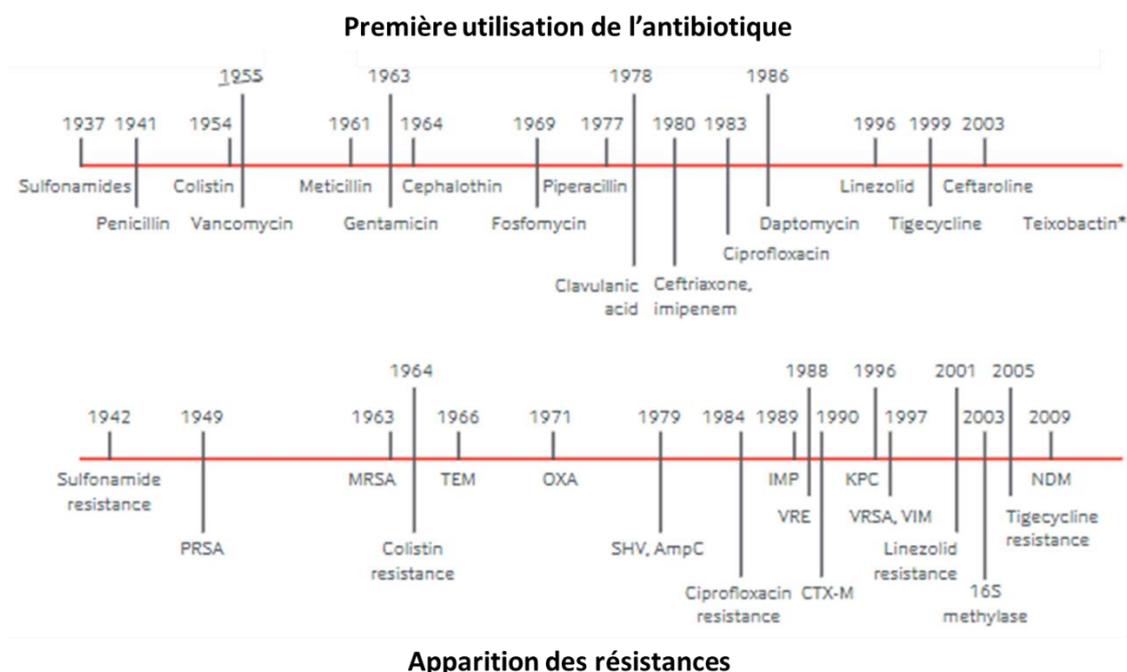
**Figure 17 : Structures des  $\beta$ -lactamines et du dipeptide D-Ala-D-Ala**

Adapté de Tulane University, School of medicine

**Les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases** (55) ont été développés pour lutter contre les résistances impliquant des pénicillinases ou céphalosporinases. Les trois cités le plus souvent sont l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam. Ils sont utilisés en association avec des  $\beta$ -lactamines. Ces molécules sont des substrats suicides des  $\beta$ -lactamases auxquelles ils se lient de façon irréversible, protégeant ainsi les  $\beta$ -lactamines de l'inactivation enzymatique.

### 3. La résistance aux antibiotiques

L'utilisation des antibiotiques a systématiquement induit l'émergence et la sélection de bactéries résistantes à l'action de ces molécules (voir Figure 18). Ces bactéries ont été découvertes dans un premier temps en milieu hospitalier, puis dans la population, chez les animaux d'élevage et dans l'environnement.

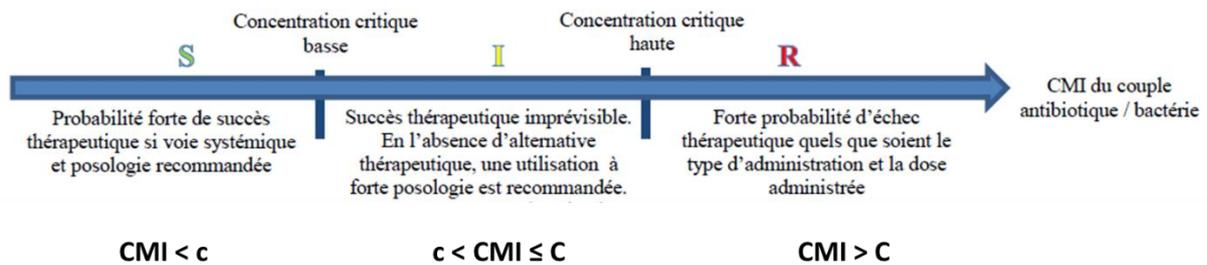


**Figure 18 : Relation introduction des antibiotiques et apparition de résistance**

D'après Iredell *et al.* Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and clinical implications. 2017, The British Medical journal

### 3.1. Notions de CMI, résistance et sensibilité aux antibiotiques

Le paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique est sa **concentration minimale inhibitrice** (CMI), qui correspond à sa plus faible concentration pour laquelle la croissance d'une bactérie n'est plus observable après 24 heures de culture (56). La CMI caractérise donc un couple antibiotique/bactérie et est fonction des résistances de la bactérie envers la molécule testée. La CMI pour une souche donnée est définie par des référentiels de microbiologie comme par exemple, le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM), l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ou le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) pour les Etats Unis.



**Figure 19 : Classification clinique des souches en fonction de leur CMI**

D'après Lettre d'information n°33, Laboratoire Biosphère.

La résistance d'une souche à un antibiotique est soit naturelle soit acquise. Dans le premier cas, elle sera propre à l'ensemble des souches de cette espèce, portée par le chromosome et donc transmissible verticalement. Elle permettra de définir le phénotype sauvage et/ou sensible d'une espèce, et son identification.

Quant à la résistance acquise, elle ne sera présente que dans une proportion variable et évolutive des représentants d'une espèce. Elle dérive d'une modification génétique due soit à une mutation, soit à l'acquisition de matériel génétique comme par exemple un plasmide et sera transmissible horizontalement.

L'ensemble de ces résistances définit le phénotype résistant d'une souche.

Afin de prédire l'issue thérapeutique d'un traitement, la CMI d'un couple antibiotique/bactérie est comparée aux concentrations critiques fournies par les référentiels de microbiologie. Ils définissent une concentration critique basse (c) qui correspond à la concentration sérique obtenue pour une posologie d'usage, et une concentration critique haute (C) qui correspond à la posologie maximale tolérée. La valeur de CMI obtenue permet de classer la souche dans une des catégories cliniques suivantes :

- ✓ Souche sensible (S) : la CMI est inférieure ou égale à c avec une forte probabilité de succès thérapeutique
- ✓ Souche résistante (R) : la CMI est supérieure à C, avec une forte probabilité d'échec thérapeutique
- ✓ Souche intermédiaire (I) : la CMI se situe entre c et C, avec un succès thérapeutique imprévisible tenant compte des incertitudes techniques et biologiques

### **3.2. Antibiorésistance : impact économique et sociétal**

L'émergence des microorganismes résistants, voire multi-résistants (perte de sensibilité vis-à-vis de plusieurs classes d'antibiotiques), laisse aux cliniciens de moins en moins de possibilités thérapeutiques pour traiter les patients porteurs de ce type d'organismes. Les entérobactéries, souvent impliquées dans des infections, montrent de plus en plus de résistances, notamment aux antibiotiques dits de "dernier recours". Cette impasse thérapeutique représente un problème de santé publique majeur.

En plus de ces conséquences sanitaires, ces microorganismes multi-résistants allongent les durées et coûts de traitement faisant aussi peser une charge économique plus importante sur les institutions de santé. Mondialement, ces surcoûts sont estimés entre 300 et 1000 milliards de dollars par an d'ici 2050 (57). A cette date, le nombre de décès liés à la résistance aux antimicrobiens pourrait être de l'ordre de 10 millions de personnes par an dans le monde, au-delà de ceux causés par le cancer (58). L'Organisation Mondiale pour la Santé envisage même une ère post-antibiotiques (59). La sélection et la dissémination des résistances est liée à la mauvaise utilisation des

antibiotiques. Pour limiter ces phénomènes, des actions sont menées à différents niveaux. Par exemple, en France, un programme national de lutte contre la résistance aux antibiotiques a été lancé par la ministre de la santé M. Touraine fin 2015. L'Europe a interdit depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2006 l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'élevage (60, 61). En marge de l'assemblée générale des Nations Unies en septembre 2016, une journée entière a été consacrée à ce problème afin de globaliser les efforts.

A l'ampleur du phénomène, s'ajoute le fait qu'il n'y a pas ou peu de nouvelles molécules en développement pour lutter contre les infections bactériennes. Il est donc primordial de préserver le potentiel thérapeutique de celles déjà disponibles en utilisant de façon raisonnée et ciblée les antibiotiques. Pour ce faire, il est indispensable de rapidement et précocement détecter et identifier les éventuelles résistances des bactéries portées par un patient.

Une fois ces résistances sélectionnées ou acquises, elles sont transmissibles, par transfert de gènes vertical ou horizontal, à des bactéries de la même espèce ou à des bactéries d'autres espèces de la même niche écologique. Ces transferts seront d'autant plus favorisés que la souche résistante sera représentée.

### **3.3. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques**

Il y a plusieurs mécanismes qui permettent aux bactéries de contrecarrer l'action des antibiotiques (62).

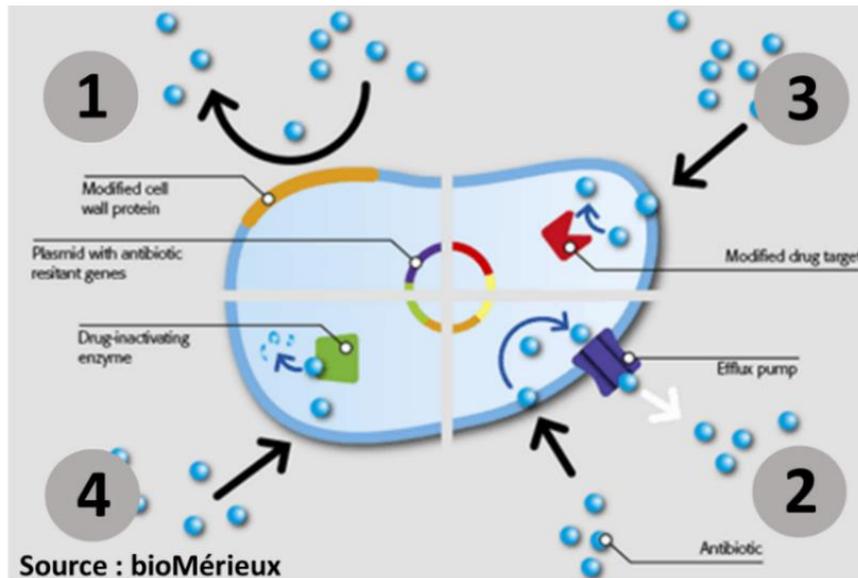


Figure 20 : Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

### 3.3.1. L'imperméabilité aux antibiotiques

La majorité des antibiotiques ont des cibles intracellulaires, ce qui implique que la molécule doit traverser la membrane externe et/ou la membrane cytoplasmique pour avoir un effet antimicrobien. Les bactéries ont développé des mécanismes pour bloquer la diffusion des antibiotiques. Ce phénomène est très répandu chez les bactéries à Gram négatif pour lesquelles cette diffusion, concernant les tétracyclines, les fluoroquinolones ou les  $\beta$ -lactamines, est dépendante des porines (63). La résistance médiée par les porines peut résulter de plusieurs phénomènes :

- ✓ Un changement dans le type de porines exprimées
- ✓ Un changement dans le niveau d'expression des porines
- ✓ Une mutation changeant la spécificité de la porine

avec pour conséquence de maintenir la cible hors d'atteinte de l'antibiotique.

### 3.3.2. L'efflux des molécules d'antibiotique

Les bactéries possèdent une machinerie, constituée de pompes à efflux, capable d'expulser les déchets du métabolisme hors de la cellule. Ces mêmes pompes peuvent

être impliquées dans les phénomènes de résistance aux antibiotiques en limitant l'accumulation de la molécule au contact de sa cible. Ces pompes à efflux peuvent être spécifiques d'une famille d'antibiotiques ou avoir une spécificité envers plusieurs familles rendant la bactérie multi-résistante (64). Une surexpression de ces pompes a donc un effet délétère sur l'efficacité des antibiotiques (65).

### 3.3.3. La modification de la cible thérapeutique

La résistance aux antibiotiques peut aussi survenir si l'antibiotique ne peut plus interagir avec sa cible, soit parce que cette dernière est protégée, soit parce qu'elle est modifiée ce qui génère une perte d'affinité de l'antibiotique.

Un exemple de protection de la cible est responsable de la résistance aux tétracyclines. La bactérie résistante produit des protéines (TetO et TetM) homologues aux facteurs d'élongation impliqués dans la synthèse protéique. Ces protéines se fixent au ribosome et délogent la tétracycline tout en modifiant la conformation du ribosome empêchant l'antibiotique de se refixer (66).

Une autre protéine Qnr confère la résistance aux quinolones en agissant comme un homologue de l'ADN qui se fixe sur les sites de liaison à l'ADN de la gyrase et de la topoisomérase IV. Le nombre de complexes ADN/gyrase est ainsi limité ce qui diminue le nombre de complexes gyrase/ADN clivé/quinolone délétère pour la bactérie (67).

Mais le plus souvent une modification de la cible est incriminée soit :

- ✓ Par une modification de la cible suite à une mutation dans le gène correspondant (exemple mutation pour les gènes de la gyrase ou de la topoisomérase IV et résistance aux fluoroquinolones) (68)
- ✓ Par une modification enzymatique de la cible, par exemple par méthylation du ribosome générant une résistance aux macrolides (69)
- ✓ Par le remplacement de la cible avec comme exemple l'acquisition par *S. aureus* d'une PLP exogène (PBP2a) portée par le gène *mecA*. Cette PLP a une faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines rendant tous les membres de cette famille inefficace contre ce pathogène (70).

Dans tous les cas, l'affinité de l'antibiotique pour sa cible est diminuée ou perdue.

### **3.3.4. La modification des molécules d'antibiotique**

Ce phénomène fait essentiellement appel à des enzymes qui vont modifier chimiquement la molécule d'antibiotique par acétylation, phosphorylation ou adénylation. C'est par exemple le cas des aminoglycosides (71) qui ne pourront plus se fixer à leur cible.

La molécule peut également être dégradée par l'action de l'enzyme, et le mécanisme le plus couramment rencontré cible les  $\beta$ -lactamines. Les enzymes responsables sont appelées les  $\beta$ -lactamases.

Ce mécanisme de résistance est celui principalement rencontré chez les bactéries à Gram négatif dont les entérobactéries (72).

Dans la partie suivante je vais détailler ce mécanisme de résistance chez les entérobactéries.

## **3.4. Les entérobactéries et les bêta-lactamases**

### **3.4.1. Les entérobactéries**

La famille des *Enterobacteriaceae* correspond à de nombreux genres bactériens avec des caractéristiques communes. Ce sont des bacilles à Gram négatif immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche et qui se développent en conditions aéro-anaérobie dans un bouillon ou sur géloses ordinaires à 37°C. Elles fermentent le glucose, possèdent une catalase mais pas d'oxydase et réduisent les nitrates en nitrites.

Elles représentent une part importante du microbiote intestinal de l'homme et des animaux à l'origine de leur dénomination. Certaines peuvent néanmoins proliférer dans

l'environnement (sols, eaux) et jouent un rôle dans le cycle de dégradation de la matière organique.

Bien que faisant partie, pour la plupart, des hôtes normaux du tube digestif, certaines sont des pathogènes opportunistes et occupent une place non négligeable en pathologie infectieuse. Elles sont responsables de septicémies et d'infections nosocomiales et communautaires telles que l'infection urinaire (la plus courante) et les infections pulmonaires ou de plaies. Leur diversité ainsi que leur niveau croissant de résistance aux antibiotiques font que la lutte contre les infections dues à ces bactéries est un challenge de plus en plus difficile pour les cliniciens (59).

#### **3.4.2. Le concept « One health » et l'antibiorésistance**

Les bactéries ont une répartition ubiquitaire (Homme, animaux, environnement), et ce constat s'applique particulièrement aux entérobactéries. Elles sont facilement échangeables entre les individus et les différents réservoirs. Cette famille de bactéries illustre donc parfaitement la problématique du concept « One health ».

Parmi les différents réservoirs susceptibles d'héberger des entérobactéries, seuls la population humaine et les animaux d'élevage ou de compagnie sont traités par des antibiotiques. Par contre, ces derniers se retrouvent dans l'environnement et donc au contact des autres réservoirs *via* les eaux usées ou les déjections des animaux d'élevage. Ce contact entre les entérobactéries et les antibiotiques, quel que soit le réservoir, va induire la sélection de mécanismes de résistances tels que l'expression de  $\beta$ -lactamases. Cette sélection va être fortement facilitée par la proximité et la "perméabilité" des différents réservoirs qui favorisent les échanges (comme les transferts de gènes) entre les entérobactéries et donc l'acquisition de nouvelles résistances. Ceci est illustré par les résultats obtenus suite à la mise en place de mesures d'hygiène en milieu hospitalier pour limiter l'incidence de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM). Si ces mesures d'hygiène ont bien atteint leur objectif pour les SARM, elles n'ont pas permis pour autant de limiter l'incidence d'entérobactéries exprimant des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (73, 74). En effet, les entérobactéries sont facilement échangeables entre les individus ou acquises depuis l'environnement, et la population est un réservoir et pourvoyeur permanent en

entérobactéries produisant des BLSE (E-BLSE) pour le milieu hospitalier. De ce fait, toute mesure prise dans un seul de ces secteurs n'est pas suffisante pour limiter l'émergence et la dissémination de résistances. On parle donc de concept de santé globale ou « One Health » en antibiorésistance (75).

De plus, ce concept est à considérer dans un contexte planétaire du fait de nos modes de transport modernes comme l'avion par exemple. En effet, le taux d'acquisition d'entérobactéries multi-résistantes lors de voyages dans certaines régions du monde peut aller de 31 % en Amérique du Sud, et jusqu'à 72 % en Asie (76).

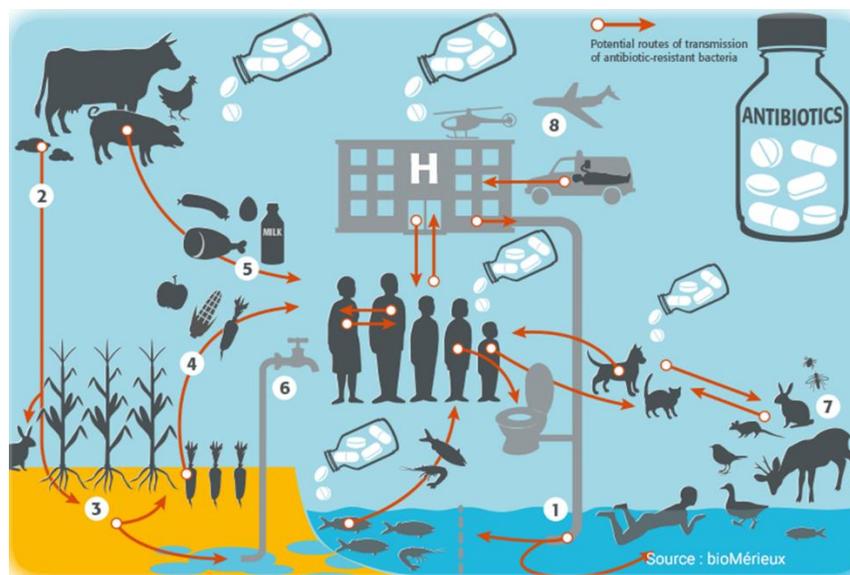


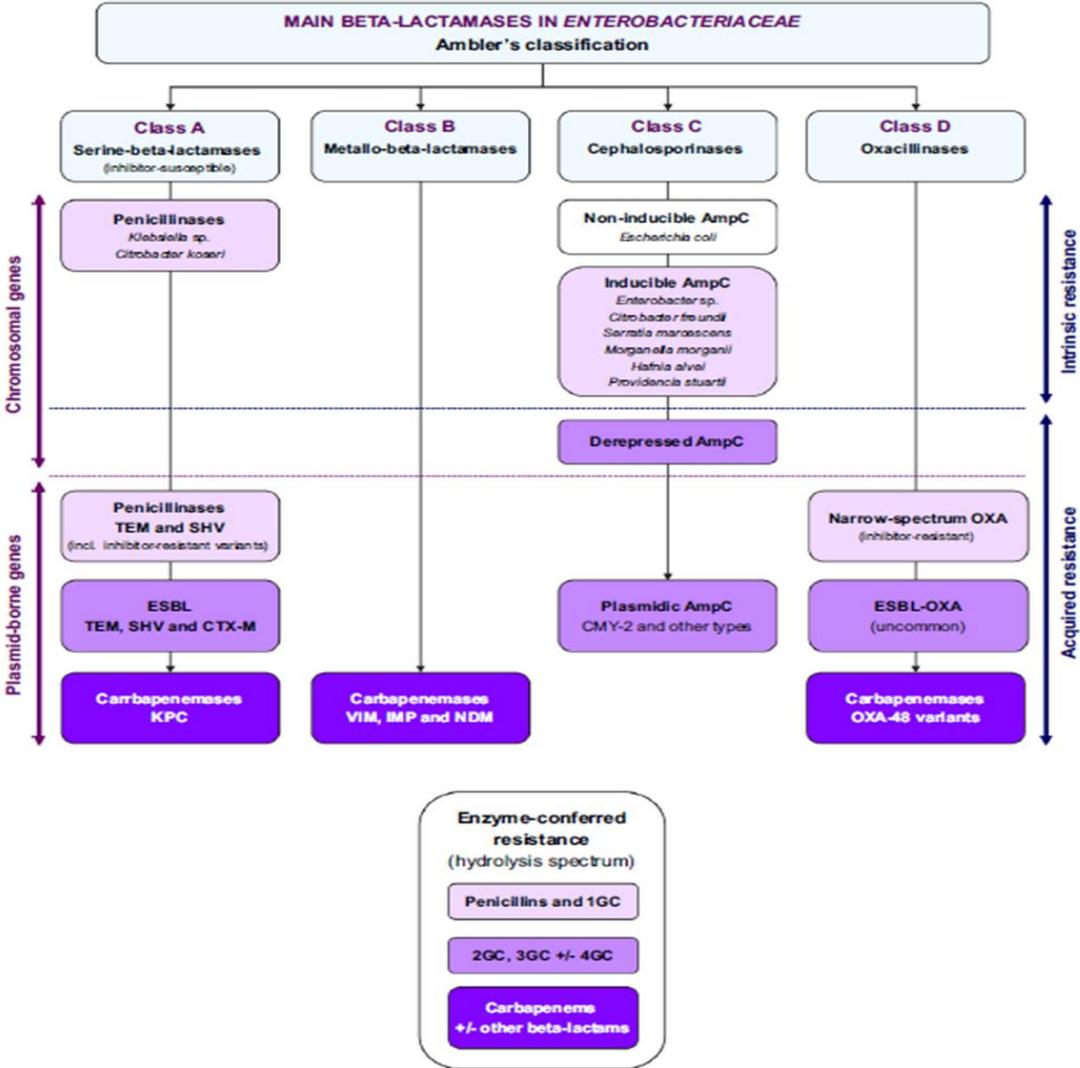
Figure 21 : Le concept « ONE Health » en antibiorésistance

### 3.5. Les $\beta$ -lactamases chez les entérobactéries

La première  $\beta$ -lactamase décrite a été identifiée chez *Escherichia coli*, et bien avant l'utilisation de la pénicilline en médecine (77). Par la suite l'utilisation croissante des  $\beta$ -lactamines a augmenté la pression de sélection et favorisé la sélection d'organismes exprimant de multiples  $\beta$ -lactamases (78, 79). Plus de 700  $\beta$ -lactamases sont décrites et les capacités de multiplication, recombinaison et mutation des bactéries font évoluer ces enzymes aux gré des nouveaux traitements (80).

Il existe principalement deux classifications (81) pour ces enzymes, soit en fonction de leurs substrats et de leurs inhibiteurs, selon Bush-Jacoby-Medeiros, et elles sont alors classées de groupe 1 à 4 ; soit en fonction de leur homologie de séquence en acides aminés et l'on parle alors des classes de Ambler A, B, C et D. C'est cette dernière classification qui est utilisée par la suite dans ce manuscrit. D'autre part, ces enzymes sont nommées soit selon le nom de l'hôte, du plasmide qui les porte, de leurs substrats, du lieu de la découverte, du nom du patient ou de la personne à l'origine de la découverte (82).

Les principales  $\beta$ -lactamases rencontrées chez les entérobactéries sont présentées dans la Figure 22 et sont décrites dans les paragraphes suivants.



**Figure 22 : Les  $\beta$ -lactamases chez les Entérobactéries**

D'après Ruppé *et al.* 2015. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. Ann Intensive Care 5

### 3.5.1. Les $\beta$ -lactamases à sérine, classe A de Ambler

Ceux sont des pénicillinases et céphalosporinases (premières générations) généralement sensibles aux inhibiteurs (comme l'acide clavulanique et le tazobactam). Deux d'entre elles, les enzymes TEM et SHV, sont courantes et souvent rencontrées en milieu clinique chez des souches *E. coli* ou *K. pneumoniae* responsables d'infections urinaires, d'infections pulmonaires nosocomiales et de bactériémies (55).

Toutes les  $\beta$ -lactamases à sérine ont un mode d'action dépendant de l'acylation des  $\beta$ -lactamines, aboutissant à l'hydrolyse du cycle lactame et à la perte d'activité de l'antibiotique. En parallèle, l'enzyme est régénérée et de nouveau active pour permettre l'hydrolyse d'une nouvelle molécule d'antibiotique (55).

### 3.5.2. Les $\beta$ -lactamases à spectre étendu, classe A de Ambler

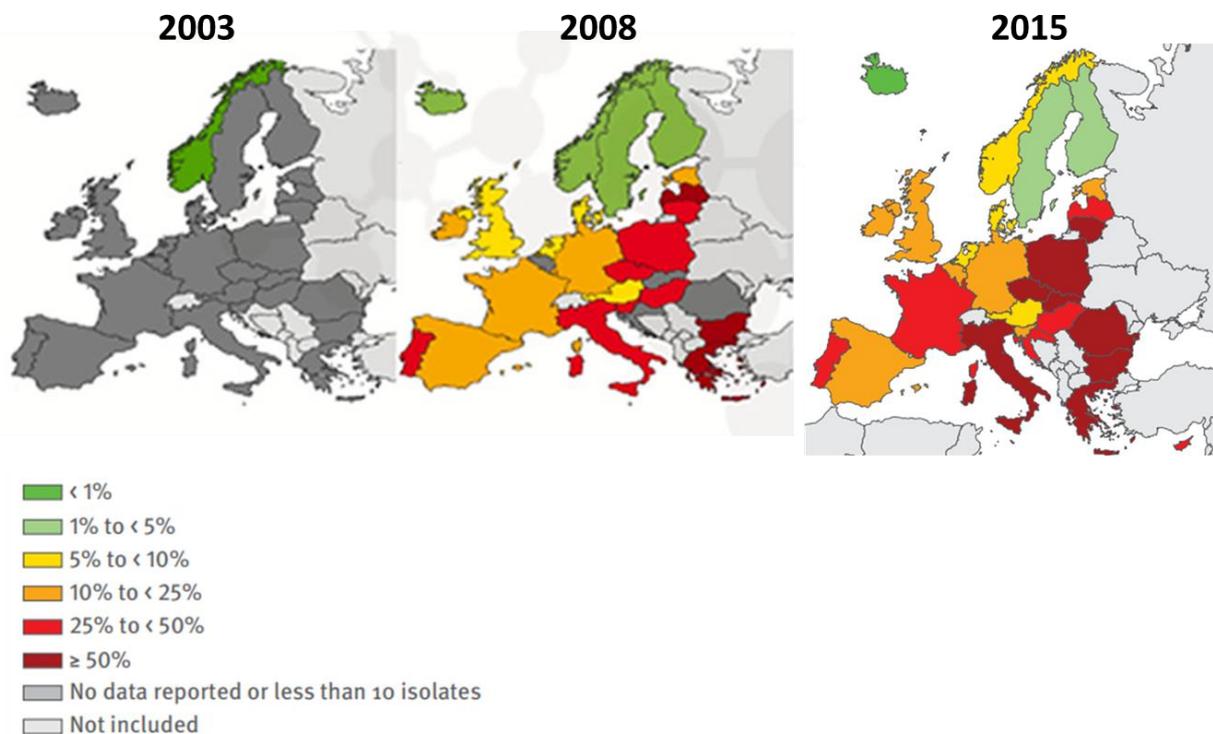
L'augmentation du nombre de souches exprimant des  $\beta$ -lactamases (*E. coli*, *K. pneumoniae*) ainsi que leur apparition dans d'autres pathogènes a incité à l'utilisation de céphalosporines à large spectre (C3G, C4G). Cette pression de sélection a conduit à l'élargissement du spectre des TEM et SHV (par mutation des gènes *bla<sub>TEM-1</sub>* et *bla<sub>SHV-1</sub>*) mais aussi à l'émergence d'une nouvelle famille, les **CTX-Ms**, capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines à large spectre et l'aztréonam (83).

**Les CTX-Ms** sont apparues dans les années 1980 et leur vitesse de dissémination s'est accrue depuis 1995. Elles sont dénommées ainsi en raison de leur résistance à la CéfoTaXime, et M pour Munich, lieu de la première description (84). En fonction de la similitude de séquence en acides aminés, on peut les classer en cinq groupes CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25. Il existe plus de 94 % de similarité entre des membres d'un même groupe et moins de 90 % entre les différents groupes (85).

L'hydrolyse très efficace de la céfotaxime est commune à toutes les CTX-Ms, suivie par celle de la céfépime. Par contre la ceftazidime du fait de sa structure plus massive, en faisait initialement un mauvais substrat (86). Les bactéries productrices de CTX-Ms

restent sensibles aux carbapénèmes et aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique, tazobactam et avibactam).

Depuis leur première description lors d'apparitions sporadiques, la dissémination des CTX-Ms a abouti à une globalisation de leur répartition à travers le monde (87). Les gènes correspondants sont principalement portés par des plasmides, transmissibles par conjugaison, et souvent associés à des gènes de résistance pour d'autres antibiotiques. La propagation de ces éléments échangeables a été très efficace au sein des entérobactéries et un exemple révélateur est la dissémination pandémique de CTX-M-15 porté par un plasmide IncF (88). Leur dissémination ne s'est pas cantonnée aux unités de soins, mais également dans la population, les animaux d'élevage et de compagnie, la faune sauvage et dans les cours d'eau (89–91). Elles sont désormais les BLSEs les plus répandues dans le monde où les mutants les plus rencontrés sont CTX-M-15 et CTX-M-14 appartenant respectivement aux groupes CTX-M-1 et CTX-M-9 (92). CTX-M-1 prédomine chez les animaux (93). Les autres groupes ont des répartitions géographiques plus précises avec CTX-M-2 en Amérique du Sud et au Japon, CTX-M-8 en Amérique du Sud et CTX-M-25 en Israël (92).



**Figure 23 : Incidence de *K. pneumoniae* résistante aux C3G dans les bactériémies**

D'après ecdc, Surveillance report. Antimicrobial resistance surveillance in Europe.

Les CTX-Ms sont surtout rencontrées chez *E. coli* (infections cliniques et communautaires) et *K. pneumoniae* (infections surtout nosocomiales) qui sont principalement concernées lorsque l'on parle d'impact sanitaire. Elles sont également décrites chez d'autres entérobactéries comme *Salmonella enterica*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter spp*, *Serratia marcescens* par exemple (94). Lors d'infections urinaires communautaires impliquant des E-BLSEs, les CTX-Ms sont le plus souvent incriminées (95, 96), ainsi que lors des bactériémies à *E. coli* qui en découlent. Ces dernières infections montrent un taux de mortalité lié de 20 à 30 % (92). L'expression des CTX-Ms est souvent associée à d'autres résistances, comme par exemple celle aux aminosides et/ou fluoroquinolones, et les traitements avec les meilleurs taux de réussite pour ces infections graves mettent en œuvre des carbapénèmes (97).

Avec ses 70 % d'incidence parmi les BLSEs, CTX-M-15 est le variant avec la plus forte prévalence et a un impact clinique important. En effet, ce mutant confère une résistance à la ceftazidime (98) contrairement à la majorité des autres CTX-Ms. De plus, l'expression de CTX-M-15 associée avec une perméabilité membranaire réduite, peut entraîner une sensibilité diminuée ou une résistance aux carbapénèmes, par exemple chez *K. pneumoniae* (99).

### **3.5.3. Les carbapénémases à sérine, classe A de Ambler**

Elles correspondent aux carbapénémases des familles NMC (not-metallo-enzyme carbapenemase), IMI (imipenem-hydrolysing enzyme), SME (*Serratia marcescens* enzyme) dont les gènes sont portés par le chromosome, et GES (Guyana extended-spectrum) et KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) dont les gènes sont portés par un plasmide. Elles hydrolysent les pénicillines, les céphalosporines, l'aztréonam et les carbapénèmes (100). Leur sensibilité aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases est variable et elles sont sensibles à l'acide boronique (*in vitro*).

KPC est différente des autres enzymes de ce groupe car elle hydrolyse plus efficacement les céphalosporines de troisième génération (101) et est faiblement inhibée par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (102, 103). Elle confère une résistance à tous les carbapénèmes (104). Elle est la carbapénémase de ce groupe avec la plus forte prévalence. Initialement isolée sur la côte Est des Etats Unis en 1996 (103), les

souches exprimant cette enzyme se sont rapidement disséminées sur tout le territoire américain, puis à Porto Rico, en Colombie, en Italie, en Grèce, en Israël et en Chine pour y être endémique (105). Ces souches sont principalement nosocomiales, à l'exception de celles des USA et d'Israël. Le taux de mortalité associé aux souches exprimant des KPC, de l'ordre de 50 %, est élevé du fait de leur spectre de résistance (106, 107). Les variants les plus rencontrés sont KPC-2, issus d'une dissémination mondiale d'un clone ST258 portant le gène *bla*<sub>KPC-2</sub> (108), et KPC-3.

L'incidence en augmentation de KPC chez les Entérobactéries (109), associée à des taux de mortalité élevés et une difficile identification des souches (110–112) font de cette enzyme un challenge thérapeutique important.

#### **3.5.4. Les métallo-β-lactamases, classe B de Ambler**

Les métallo-β-lactamases (MBLs) sont ainsi nommées car elles utilisent un ion (majoritairement un ion zinc) comme co-facteur lors de l'attaque nucléophile du noyau β-lactame (62). Cette particularité fait que l'EDTA est un inhibiteur (*in vitro*) de leur activité enzymatique. Ces enzymes ont une large gamme de substrats qui correspond à l'ensemble des β-lactamines bicycliques (les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes) (113). Elles n'hydrolysent pas l'aztreonam et sont insensibles aux inhibiteurs de β-lactamases.

Elles ont été initialement décrites chez des bactéries non pathogènes et sont portées par des gènes chromosomiques. A partir des années 90, des enzymes telles que IMP et VIM sont apparues chez les Entérobactéries, portées par des éléments transférables (100), suivies de NDM décrite en 2008. IMP, VIM et NDM sont les MBLs le plus souvent rencontrées chez les entérobactéries.

IMP-1 a été décrite en 1995 dans une souche de *S. marcescens* isolée au Japon (114). Il existe 47 variants de IMP-1, et les IMPs sont endémiques de l'Est de la Chine, du Japon et de Taïwan (115, 116).

Les VIMs ont été décrites pour la première fois en Italie (Vérone) en 1997 (117). Cette famille d'enzymes est la plus représentée des MBLs en Europe, surtout dans les pays du bassin méditerranéen (Italie, Grèce) (113).

Les NDMs sont les MBLs les plus récemment décrites. Initialement décrite en Inde, NDM-1 (118) est l'enzyme qui a eu la dissémination la plus spectaculaire (119, 120). Les NDMs sont endémiques du subcontinent indien, des Balkans et du Moyen Orient (121–123). Les plasmides qui portent le gène *bla*<sub>NDM-1</sub> peuvent également porter des gènes codant pour d'autres mécanismes de résistance (aminoglycosides, macrolides), ce qui confère aux bactéries qui les portent un large spectre de résistance (109, 124, 125). Par conséquent, les bactéries exprimant NDM restent uniquement sensibles aux antibiotiques comme la colistine, la fosfomycine (bactéricides) et la tigecycline (bactériostatique) (126, 127). La combinaison aztréonam/avibactam a montré lors d'études *in vitro* son potentiel pour inhiber la croissance d'entérobactéries exprimant des MBLs (128).

### **3.5.5. Les $\beta$ -lactamases, classe C de Ambler**

Rencontrées chez les bactéries à Gram<sup>-</sup>, leurs gènes d'expression ont longtemps été décrits comme portés par le chromosome avec un faible niveau d'expression mais inducible lors d'expositions aux  $\beta$ -lactamines (129). A partir des années 1980, leur acquisition grâce à des échanges de plasmides est décrite (130). Elles sont connues sous le nom AmpC, et leur site actif contient une sérine. Ce sont des céphalosporinases à large spectre, également actives sur l'aztréonam et peu sensibles aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (131).

Les AmpC, dont les gènes sont portés par des éléments mobiles, sont de plus en plus courantes chez *Klebsiella* et *E. coli* (132, 133). Lors d'infections nosocomiales, ces bactéries induisent un taux de mortalité compris entre 25 et 70 % (134).

### **3.5.6. Les $\beta$ -lactamases, classe D de Ambler**

Elles ont une activité pénicillinase mais sont aussi capables d'hydrolyser l'oxacilline, d'où le nom d'oxacillinase qui leur a été donné, et le préfixe OXA pour les désigner (135). Leur activité est faiblement influencée par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (tel que l'acide clavulanique). Ces enzymes ont surtout été décrites chez les *Acinetobacter*, et plus particulièrement chez *Acinetobacter baumannii*.

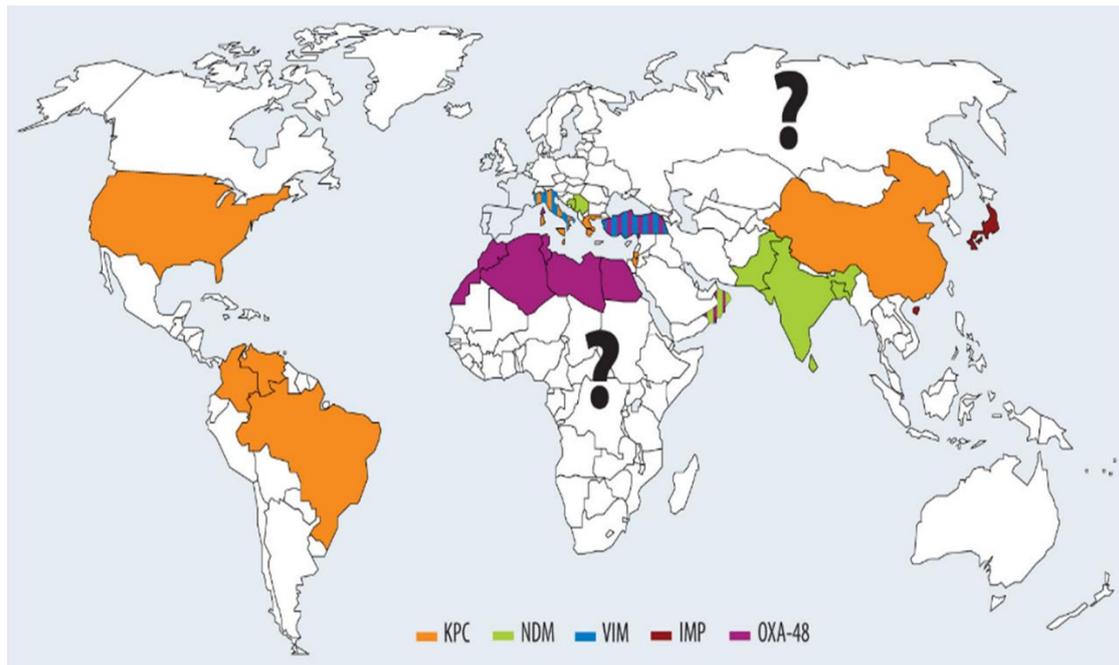
L'une d'entre elle, de type OXA-48 est une oxacillinase avec une activité carbapénémase uniquement présente chez les entérobactéries (135). Elle a été décrite initialement en 2004 dans une souche de *K. pneumoniae* d'un patient turc (50). Ce gène a été par la suite disséminé en milieu hospitalier et dans la population. La Turquie, le Moyen Orient et le Maghreb sont les pays où la prévalence de bactéries porteuses de ce gène est la plus importante (136). En France, OXA-48 est rencontrée dans 75 % des entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) détectées (116). Cette forte prévalence est due au mouvement de population entre la France et le Maghreb.

Le gène *bla*<sub>OXA-48</sub> est principalement porté par un vecteur ne possédant pas d'autres gènes de résistance à des antibiotiques. Par contre, bien qu'OXA-48 n'hydrolyse pas les céphalosporines à large spectre et l'aztréonam, 75 à 85 % des souches exprimant OXA-48 produisent une BLSE ou céphalosporinase dont le gène est porté par d'autres plasmides (116).

Depuis la première description d'OXA-48, des variants de cette enzyme ont été décrits, OXA-181, OXA-204, OXA-232 (135). Ils diffèrent par la substitution ou délétion de quelques acide aminés, qui induisent différentes activités enzymatiques et spécificités (137). Par exemple, OXA-163 hydrolyse les C3G et l'aztréonam (138).

### **3.5.7. Répartition géographique des différentes carbapénémases**

Les principales carbapénémases ont une répartition géographique, présentée dans la Figure 24, déterminée par leur endémicité.



**Figure 24 : Zones d'endémie des carbapénémases**

Poirel *et al.* 2013. Epidémiologie des carbapénémases. La Lettre de l'Infectiologue.

Avec l'ampleur du phénomène de l'antibiorésistance, il faut aussi prendre en compte qu'il n'y a pas ou peu de nouvelles molécules en développement et il est donc primordial de préserver le potentiel thérapeutique de celles déjà disponibles. Pour ce faire il est indispensable de rapidement et précocement détecter et identifier les individus porteurs de microorganismes exprimant des résistances aux antibiotiques.

Différentes méthodes de détection et d'identification existent :

- ✓ Phénotypiques, informant sur la sensibilité à un ou plusieurs antibiotiques
- ✓ Biochimiques, mettant en évidence l'hydrolyse spécifique d'une famille d'antibiotiques
- ✓ Moléculaires, identifiant les gènes qui confèrent la résistance
- ✓ Immunologiques, utilisant la capacité d'anticorps à détecter les protéines jouant un rôle dans les mécanismes de résistance.

## 4. Détection et identification des E-BLSE

### 4.1. Détection des entérobactéries produisant des CTX-Ms.

#### 4.1.1. L'antibiogramme

L'antibiogramme permet de mettre en évidence la sensibilité *in vitro* d'une souche bactérienne. Il s'agit de mettre en évidence une inhibition de croissance d'une souche issue d'un prélèvement chez un patient, en présence d'antibiotiques. Ceci permet de classer les souches et de guider le clinicien dans le choix de l'antibiotique à utiliser.

Une méthode pour réaliser un antibiogramme est la méthode des disques. Le protocole recommandé par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie pour les Entérobactéries (139) consiste succinctement à mettre en culture sur une gélose Mueller Hinton (MH), une suspension standardisée de la souche à tester, selon le standard de turbidité McFarland 0,5 (140). Les géloses sont inoculées de façon homogène avec la suspension bactérienne, puis les disques (buvards imprégnés d'antibiotiques à des concentrations données) sont déposés sur la gélose. Les boîtes sont incubées à  $35^{\circ}\text{C} \pm 2$  en aérobie pendant 16 à 24 heures. La mesure au millimètre des diamètres d'inhibition se fait soit à l'œil, ou bien avec une règle, un pied à coulisse ou un appareil automatisé. L'interprétation des résultats se fait par rapport aux tableaux de références où figurent les concentrations critiques.

Selon les recommandations du Haut Conseil de la Santé Publique (141), la détection de la production de BLSE par une bactérie au moyen d'un antibiogramme peut être considérée comme fiable.

#### 4.1.2. Les milieux sélectifs

Une alternative peut être l'utilisation de géloses sélectives contenant une céphalosporine. Ils existe des réactifs commerciaux, tels que le chromID ESBL (bioMérieux) ou le Brilliance ESBL (Oxoid), dont les performances ont déjà été décrites (142, 143). Ces géloses ne permettent la croissance que des souches exprimant des

mécanismes leur permettant de se multiplier en présence de l'antibiotique (BLSE, perméabilité...) (Figure 25). D'autre part, elles permettent l'identification des souches impliquées grâce à des colorations différentielles induites par la présence d'enzymes caractéristiques.



**chromID® BLSE**

**D'après bioMérieux**

#### **Principe d'utilisation et de lecture**

**Identification immédiate et directe** des entérobactéries les plus fréquentes, après 18 à 24 heures d'incubation.

##### **•Escherichia coli :**

Coloration **rose** à **bordeaux** des souches productrices de  $\beta$ -glucuronidase

##### **•Protee (*Proteus*, *Providencia*, *Morganella*) :**

Coloration **brune** à **marron** des souches exprimant une désaminase.

##### **•Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter (KESC) :**

Coloration **vert** / **bleu** à **vert-brun** des souches productrices de  $\beta$ -glucosidase

**•Inhibition sélective** des bactéries Gram positif et des levures

**•Le caractère BLSE** doit être vérifié par la technique de synergie dite "en bouchon de champagne"

**Figure 25 : Milieu sélectif chromID BLSE (bioMérieux)**

Dans tous les cas, en présence d'une sensibilité diminuée aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (céfépime, cefpirome) ou d'une souche isolée sur milieu sélectif, un test de confirmation doit être pratiqué (141).

#### **4.1.3. Les tests de confirmation**

La confirmation peut se faire par des méthodes de diffusion en gélose :

- ✓ **Par la méthode des disques combinés.** Il s'agit de comparer les diamètres d'inhibition obtenus entre des disques contenant du céfotaxime ou de la ceftazidime sans et avec de l'acide clavulanique (inhibiteur de  $\beta$ -lactamases), (Figure 26). Le diamètre du disque obtenu en présence de l'acide clavulanique doit être supérieur de 5mm à celui obtenu sans l'acide clavulanique pour confirmer la présence d'une BLSE.

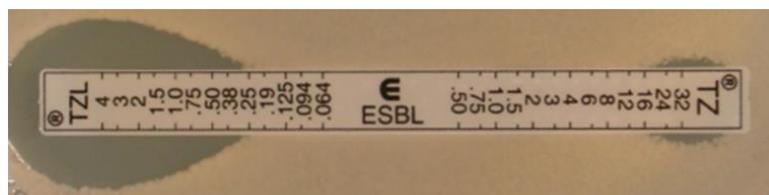


CTX : Céfotaxime, CAZ : Céftazidime, CVA : acide clavulanique

**Figure 26 : Résultat d'un test de disques combinés**

Harada *et al*, Korean J Lab Med 2008;28:401-12

- ✓ **En utilisant une bandelette par gradient de diffusion.** Le E-test (144) permet de déterminer de façon précise la CMI. Il s'agit d'une bandelette, déposée sur une géloseensemencée, dont l'extrémité contient un antibiotique avec un gradient de concentration précis. Après incubation, la CMI correspondra à la valeur lue au niveau de l'intersection entre la zone d'inhibition et la bandelette. Pour les tests de confirmation, la bandelette est imbibée à ses deux extrémités (double bandelette), soit avec une C3G (Céfotaxime, Céftazidime, Céfépime), soit avec la même C3G et de l'acide clavulanique, voir Figure 27. Pour confirmer la présence d'une BLSE dans ce cas, le rapport entre la CMI de la céphalosporine seule/CMI avec l'acide clavulanique doit être  $\geq 8$ .



TZ : Céftazidime

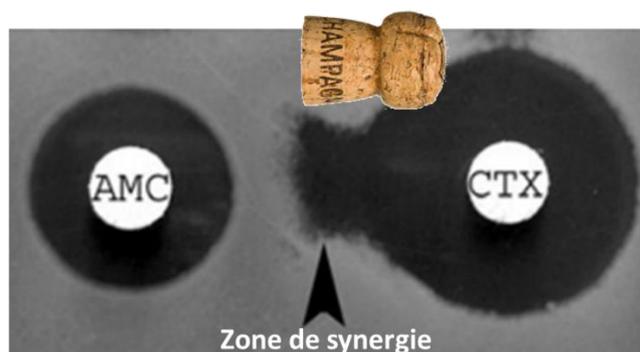
TZL : Céftazidime + acide clavulanique

**Figure 27 : Résultat d'un E-Test**

Etest® BLSE d'après bioMérieux

- ✓ **En faisant un test de double synergie.** Ce test (145) consiste à déposer sur une géloseensemencée, deux disques à une distance de

30 mm contenant pour l'un une C3G et pour l'autre de l'amoxicilline + acide clavulanique. La présence d'une BLSE est confirmée lors d'une sensibilité diminuée à la C3G, associée à une zone d'inhibition élargie vers le disque contenant l'acide clavulanique. Ce phénomène met en évidence une synergie entre la C3G et l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamase avec un profil dit en « bouchon de champagne », voir Figure 28. La sensibilité de ce test peut être augmentée en rapprochant les deux disques sur la gélose (146).



AMC : Amoxicilline-Acide clavulanique  
CTX : Céfotaxime

**Figure 28 : Résultat d'un test de double synergie**

D'après Drieux et al, Clin Microbiol Infect 2008; 14 (Suppl. 1): 90–103

#### **4.1.4. L'identification des CTX-Ms**

La seule façon de confirmer la présence d'une CTX-M sera l'utilisation d'une méthode moléculaire. Un premier protocole utilise des amorces dégénérées permettent l'amplification de l'ensemble des allèles des différentes CTX-Ms lors d'une PCR en temps réel. Les brins d'ADN ainsi obtenus sont séquencés, ce qui permet de déterminer l'appartenance à l'un des différents groupes de CTX-M (147). Cette méthode permet de caractériser 96 souches en moins de 3 heures. Un deuxième protocole utilise des amorces spécifiques de chaque groupe qui peuvent être utilisées simultanément. Ce protocole permet d'identifier directement le groupe d'appartenance (148).

## 4.2. Détection des entérobactéries produisant des carbapénémases

La détection d'entérobactéries exprimant des carbapénémases est un challenge compte tenu que certaines souches peuvent ne montrer qu'une faible diminution de susceptibilité (149, 150). Si une souche montre une diminution de sensibilité (même faible) à au moins un carbapénème, la souche devra faire l'objet de tests complémentaires (151).

Certains de ces tests sont présentés dans les paragraphes suivants.

### 4.2.1. Tests de diffusion sur gélose

#### 4.2.1.1 Disques combinés avec inhibiteurs

Comme décrit précédemment pour la caractérisation des bactéries produisant des CTX-M, cette méthode utilise les capacités de certaines molécules à inhiber l'activité enzymatique des  $\beta$ -lactamases. Pour la caractérisation des bactéries produisant des carbapénémases, on utilise la spécificité des inhibiteurs vis-à-vis des différentes classes pour affiner l'identification. Ainsi, les MBLs par exemple sont inhibées par l'acide dipicolinique (DPA) alors que les  $\beta$ -lactamases des classes de Ambler A et AmpC sont inhibées par l'acide phényl boronique (BA) (152–154).

Par contre, il n'existe pas d'inhibiteur spécifique de OXA-48 (et apparentés) mais les souches d'entérobactéries productrices de ce type d'enzymes sont très résistantes à la témocilline (155, 156).

L'utilisation simultanée de disques de diffusion imbibés de méropénème seul, témocilline seule, méropénème + BA, méropénème + DPA, Méropénème + DPA + BA, méropénème + cloxacilline (inhibiteur de AmpC), permet l'identification des mécanismes de résistance MBL, KPC ou OXA-48 (et apparentés) (155).

- 1) Dans ce test : un diamètre d'inhibition supérieur en présence de cloxacilline (qui inhibe AmpC mais pas KPC) indique la présence de AmpC.

- 2) Un diamètre d'inhibition supérieur en présence de DPA indique une "expression" de MBL.
- 3) Un diamètre supérieur en présence de BA mais pas en présence de cloxacilline indique l'expression de AmpC.

Si aucune différence n'est observée en présence des inhibiteurs, et qu'il n'y a pas de zone d'inhibition avec la témocilline, il y a une forte présomption d'"expression" de OXA-48 ou apparenté.

#### 4.2.2.1 Les bandelettes avec gradient de diffusion

**Pour les métallo-beta-lactamases** : il s'agit d'une double bandelette avec d'un côté du méropénème (ou imipénème) seul, et de l'autre côté associé à de l'EDTA. Pour ce test, la sensibilité qui correspond à l'identification des souches produisant des MBL est meilleure avec le méropénème (94.4 % versus 81.5 % pour l'imipénème) et les IMP sont les moins bien identifiées (82 %) (157).

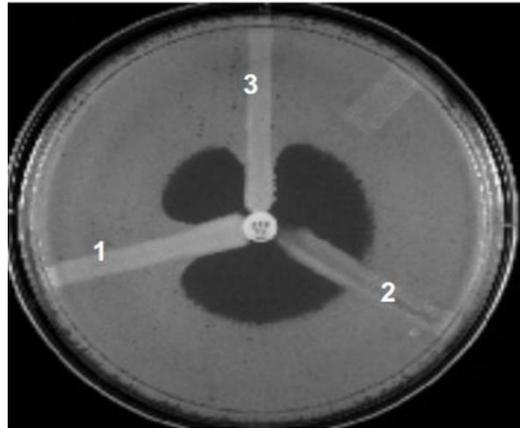
**Pour les KPC** : il s'agit également d'une double bandelette avec d'un côté du méropénème seul, et de l'autre côté du méropénème associé à de l'acide boronique. La sensibilité et la spécificité (présence de faux négatifs) sont respectivement de 91,7 % et 90,3 % (157).

Globalement ces tests offrent de bonnes performances mais nécessitent une étape de culture supplémentaire par rapport aux tests biochimiques ou moléculaires.

#### 4.2.3.1 Le test de Hodge modifié.

Le test de Hodge peut être réalisé en inoculant une gélose (Mueller Hinton) avec une souche sensible (*E. coli* en général). Un disque contenant 10 µg de carbapénème (méropénème ou ertapénème) est ensuite déposé au centre de la gélose. Trois ou quatre colonies de la souche à tester sont prélevées avec une cœse et déposées sur la gélose sous la forme d'une ligne du disque vers la périphérie de la boîte. Un contrôle positif (souche résistante) est déposé dans les mêmes conditions. La boîte est incubée 16 à 24 heures à 37°C. La production d'une carbapénémase est détectée si la souche

étalée permet la croissance de la souche sensible en direction du disque d'antibiotique (158) avec un profil « clover leaf-like ».



**Figure 29 : Résultats obtenus avec un Hodge test modifié**

1 : *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705, contrôle positif, 2 : *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706, contrôle négatif, 3 : souche à tester, positive. Tankeshwar Acharya, 2015, Microbe online

Ce test a été décrit comme un test de confirmation pour la production de carbapénémases (159, 160), mais il n'identifie pas le mécanisme de résistance. Lors de l'utilisation d'un disque d'ertapénème, des faux positifs ont été décrits lors de la présence de BLSE de type CTX-M certainement dus à la faible hydrolyse de l'ertapénème par ces enzymes (161). Le Test de Hodge est aussi parfois difficile à interpréter lors de la détection des MBL qui peut conduire à de faux négatifs (162). Ce test n'est donc pas à recommander dans des régions où la prévalence de carbapénémases est importante. Ce test prend un délai supplémentaire de 16 à 24 heures avant l'obtention des résultats par rapport aux tests biochimiques ou moléculaires.

#### **4.2.2. Méthode d'inhibition des carbapénèmes (MIC)**

Cette méthode consiste à mettre en suspension la souche à tester (cœse de 10 µl) dans de l'eau. Un disque contenant 10 µg de méropénème est ensuite immergé dans la

suspension et incubé à 37°C pendant 2 heures. Ce disque est ensuite récupéré et déposé sur une géloseensemencée avec une souche *E. coli* sensible, puis incubée à 35°C. Si la souche à tester exprime une carbapénémase, le méropénème a été inactivé et la souche *E. coli* pousse au contact du disque, sinon une zone d'inhibition est observée. Cette méthode est peu coûteuse (0,60 €), robuste et ne nécessite aucun équipement qui ne soit déjà présent dans un laboratoire de bactériologie. Une des limitations est la détection de souches avec une activité carbapénémase très faible (163).

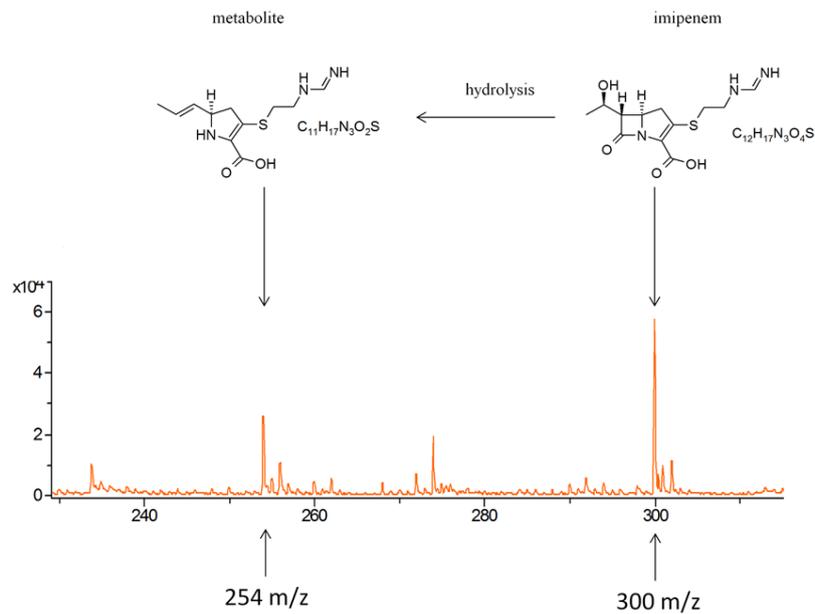
Ce test a été évalué récemment et comparé au Carba NP qui est décrit par la suite, et l'étude conclut qu'il peut être un outil de confiance pour la confirmation des CPEs et spécialement dans les laboratoires avec peu de moyens financiers et matériels (164).

### **4.2.3. Tests d'hydrolyse des carbapénèmes**

#### **4.2.1.3 Spectrométrie de masse : détection des produits d'hydrolyse**

Les produits d'hydrolyse des carbapénèmes par des enzymes peuvent être identifiés par spectrométrie de masse à temps de vol (MALDI TOF). La technique consiste à incuber de 20 minutes à 2 heures une solution de carbapénème avec la souche à tester. Après centrifugation, le surnageant est analysé en spectrométrie de masse pour mettre en évidence la disparition du pic correspondant à l'antibiotique utilisé et à l'apparition du ou des produits de son hydrolyse (165–168). Les résultats obtenus montrent des sensibilités et spécificité proches de 100 % à partir de souches isolées.

Cette méthode identifie le mécanisme de résistance sans identifier la famille de carbapénémase impliquée. Elle nécessite un matériel coûteux (spectromètre) ainsi qu'une mise au point précise et un personnel qualifié.



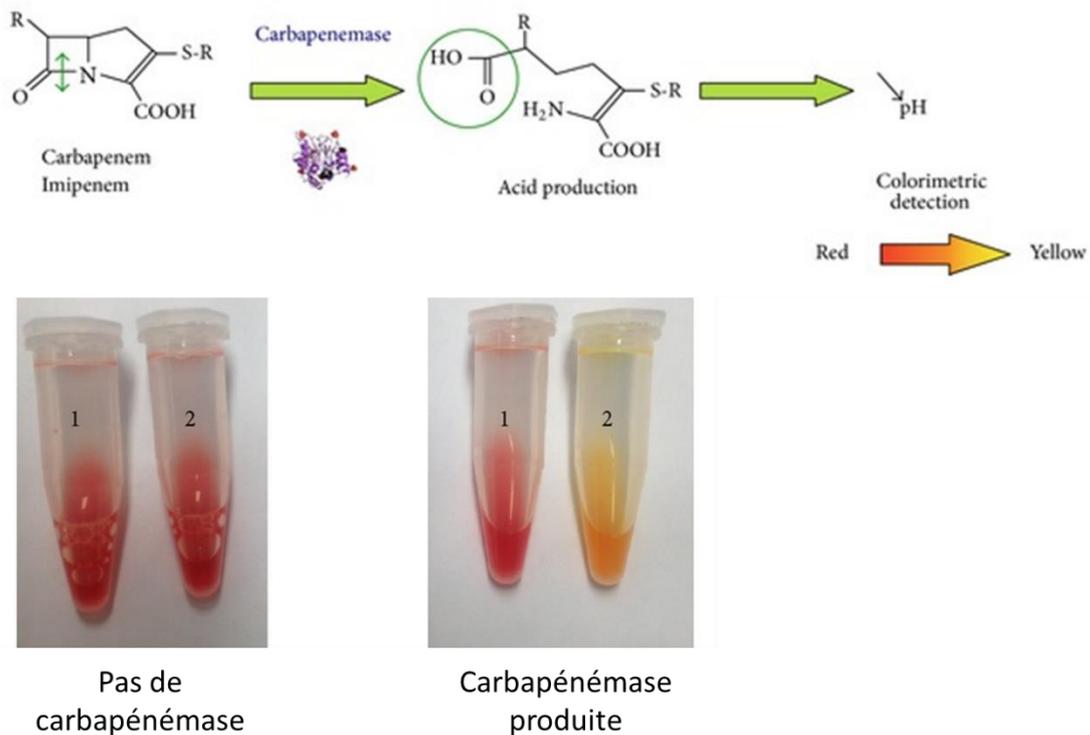
**Figure 30 : MALDI TOF : imipénème avant et après hydrolyse**

Kempf *et al.* 2012, PLoS ONE 7:e31676.

#### 4.2.2.3 Le Carba NP test®

Cette méthode met en évidence l'acidification d'un milieu contenant un indicateur de pH (rouge phénol) qui vire du rouge au jaune. Cette acidification a lieu lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénémase. Des bactéries prélevées sur une gélose sont lysées à l'aide d'un tampon de lyse dans deux tubes séparés. Après homogénéisation, le milieu réactionnel seul est ajouté dans un premier tube, puis le même milieu additionné d'imipénème dans le deuxième. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 2 heures, puis une lecture visuelle est faite pour évaluer le changement de couleur du milieu (169). Les résultats peuvent être anticipés à plus ou moins court terme en fonction de la famille de carbapénémase impliquée, 2 à 30 minutes pour KPC, 30 minutes à 1 heure pour OXA-48 et 15 minutes à 1 heures pour NDM. Néanmoins, ces critères ne permettent pas de conclure sur la famille impliquée.

C'est une méthode peu couteuse et facile à mettre en place au sein des laboratoires avec une bonne sensibilité et spécificité envers toutes les carbapénémases. Il existe des versions commerciales de ce test dont les performances sont proches de celle du test « fait maison », c'est-à-dire avec des réactifs préparés au laboratoire (170).



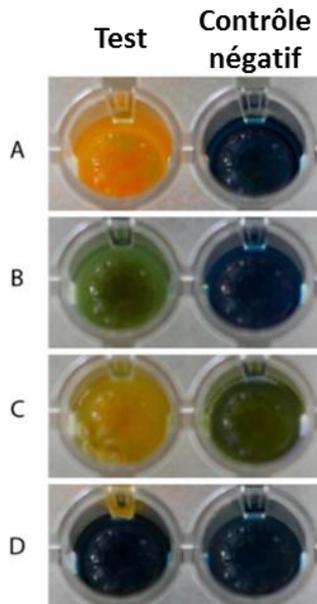
**Figure 31 : Principe et résultats du Carba NP**

D'après Dortet *et al*, 2014, Biomed Res Int. 2014: 249856.

Il faut toutefois noter que la sensibilité pour les souches exprimant une OXA-48-*like* est variable et peut donner des résultats négatifs (171). Des souches de *Providencia stuartii* ou *rettgeri* et *Proteus mirabilis* exprimant NDM peuvent aussi donner des résultats négatifs (172) avec ce test.

#### 4.2.3.3 Le test Blue Carba®

Ce test met aussi en évidence le changement de pH du milieu réactionnel en utilisant comme indicateur coloré le bleu de bromothymol. L'hydrolyse de l'imipénème est ainsi mise en évidence. Pour ce test il suffit d'inoculer le milieu (avec ou sans imipénème) avec une colonie, la réaction est réalisée dans des plaques de microtitration incubées à 37°C sous agitation pendant 2 heures. Ce test a montré une sensibilité et spécificité de 100% pour la détection des MBLs, KPC et Oxa-48 (173).



**Figure 32 : Résultats d'un tests blue Carba**

A, B, C : Résultats positifs, D : résultat négatif. Pires *et al.* 2013; J Clin Microbiol 51:4281–4283.

#### 4.2.4. Méthodes de détection moléculaires

Ces méthodes mettent en évidence la présence des gènes codant les carbapénémases. Elles impliquent une amplification de l'ADN par PCR. L'analyse de la PCR en point final se fait par visualisation du ou des produits de l'amplification s'il s'agit du mono-test ou d'un multi-tests respectivement (174), et les résultats sont obtenus en moins de 4 heures.

Quant à la PCR en temps réel, l'amplification du gène recherché est mise en évidence par une émission de fluorescence qui est mesurée au cours de la réaction.

Il existe plusieurs kits commerciaux utilisables sur colonies isolées, ou directement sur des échantillons cliniques (écouvillons rectaux ou hémocultures par exemple). Un multiplexage est possible, et les performances de ces tests sont en termes de sensibilité et de spécificité proches de 100 %, et ils permettent d'identifier la carbapénémase impliquée (175–178).

Cependant, ils ont des limitations. En effet, ils ne détectent que les gènes recherchés et donnent un résultat positif même si ces gènes sont silencieux. De plus, une mutation

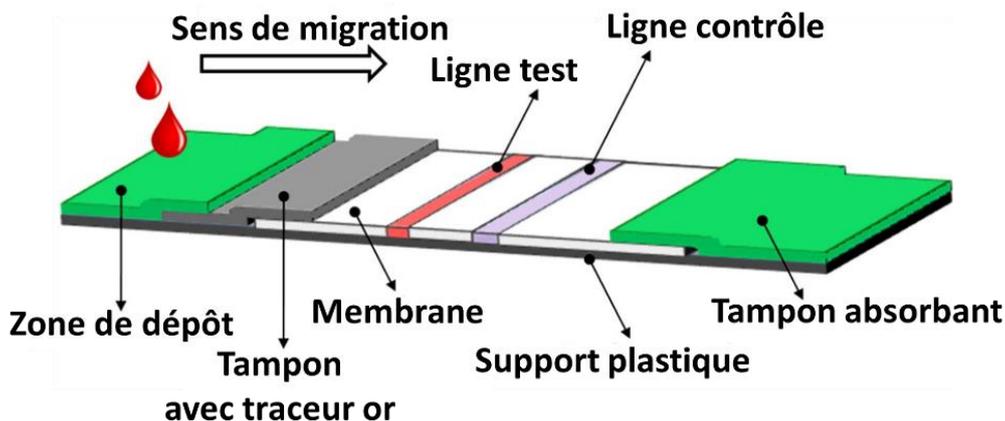
survenant au niveau du site d'hybridation des amorces conduira à de faux négatifs (179). Enfin, leur coût (environ 40 € pour le multiplex Cepheid Xpert Carba-R(180)) reste non négligeable pour une utilisation en routine.

#### **4.2.5. Détection avec des tests immunochromatographiques**

Les performances de cette méthode dépendent essentiellement des caractéristiques des anticorps monoclonaux (affinité, spécificité) dirigés contre les enzymes responsables des résistances aux antibiotiques. Tout comme les méthodes moléculaires, ces tests ne détectent que ce qui est recherché, et identifient la famille de la carbapénémase. Par contre, ils détectent directement la production de l'enzyme responsable de la résistance. De plus, contrairement aux tests phénotypiques et biochimiques, ils ne sont pas influencés par l'activité enzymatique même faible de l'enzyme. Un autre avantage est leur coût qui est compris entre 7 et 15 € (181, 182).

Une des limitations majeures de ces tests est la présence ou l'apparition de mutants avec modification du site de reconnaissance d'un des anticorps ce qui induira des résultats faussement négatifs.

Ces tests sont présentés sous forme de cassettes qui intègrent une bandelette qui permet la détection de l'enzyme recherchée (Figure 33). Pour réaliser ce test les bactéries sont mises en contact avec un tampon d'extraction puis l'extrait est déposé sur la cassette. Les résultats sont généralement obtenus dans un délai de 15 minutes.



**Figure 33 : Principe d'un test immunochromatographique**

D'après Koczula *et al.* 2016. Lateral flow assays. *Essays In Biochemistry* Jun 30, 60(1) 111-120

Différents tests ont déjà été décrits pour la détection spécifique de OXA-48 (181–183), IMP (184), KPC (182, 185) ou la détection simultanée de OXA-48, NDM et KPC (186). Ces tests montrent des spécificités et sensibilités proches de 100 % et sont considérés comme de bons tests de confirmation pour l'identification des CPEs. Leur utilisation est facile à mettre en place dans n'importe quel laboratoire de microbiologie.

A l'heure actuelle, ces tests ne permettent pas la détection des CTX-Ms et de l'ensemble des cinq principales carbapénémases chez les entérobactéries.

#### **4.3. Tableau comparatif : temps d'exécution et prix des tests**

Le tableau ci-dessous donne une estimation du temps nécessaire pour la confirmation d'une souche exprimant une carbapénémase en fonction du test mis en œuvre ainsi que le coût du test. Ces tests sont effectués à partir de colonies isolées sur gélose

Type de test	Test de Hodge	E-Test	MIC	Carba NP	Rapidec® Carba NP	Blue Carba	Maldi ToF	PCR RT-PCR*	LFIA
Temps (H)	16 à 24	16 à 24	16 à 24	2	2	2	0,5 à 2	1 à 4	0,25
Coût (€)	≤ 1	~ 6	≤ 1	≥ 2	~ 8	≥ 2	ND	≤ 40	5 à 15

**Tableau 1 : Temps d'exécution et prix des tests**

MIC : Méthode d'inhibition des carbapénémases. LFIA : test immunochromatographique. ND : non déterminé

\*Cette méthode peut être également effectuée directement sur des échantillons (écouvillons rectaux ou hémocultures par exemple).

D'après Tamma *et al.* 2017. A Comparison of Eleven Phenotypic Assays for the Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol JCM.02338-16.



# Projet de thèse



# Projet de thèse

Les travaux suivants ont été initiés suite à une demande émanant du Docteur Thierry Naas du Centre National de Référence de résistance aux antibiotiques du Kremlin Bicêtre lors d'une rencontre dans le cadre du Labex LERMIT.

L'objectif de cette thèse est le développement et la validation de tests immunochromatographiques pour la détection des CTX-M et des cinq principales carbapénémases chez les entérobactéries.

Pour ce faire différentes tâches ont été réalisées :

- ✓ **Production des  $\beta$ -lactamases recombinantes.** Le gène correspondant à chaque  $\beta$ -lactamase ciblée a été cloné dans un vecteur d'expression. Puis des bactéries ont été transformées avec la construction pour permettre la production en grande quantité des  $\beta$ -lactamases. Ces protéines recombinantes ont ensuite été purifiées et utilisées comme immunogènes chez des souris.
- ✓ **Production des anticorps monoclonaux.** Les splénocytes des souris montrant les meilleures réponses immunitaires sont fusionnés avec des cellules de myélome murin afin d'obtenir des cellules « immortelles » appelées hybridomes sécrétant des anticorps. Les hybridomes produisant les anticorps avec les meilleures capacités de capture pour leur cible subissent ensuite des étapes de clonage. Ce dernier processus permet d'obtenir une population de cellules ne sécrétant qu'un seul type d'anticorps : on parle d'anticorps monoclonal. Les anticorps monoclonaux sont enfin produits en grande quantité par expansion cellulaire et purifiés par chromatographie d'affinité à partir des surnageants de culture.
- ✓ **Développement et optimisation des tests.** Les anticorps monoclonaux produits pour une cible sont purifiés puis caractérisés (spécificité) en utilisant la protéine recombinante puis des bactéries exprimant la  $\beta$ -lactamase au moyen du format « laboratoire » du test immunochromatographique. Cette approche permet de sélectionner le couple d'anticorps avec les meilleures performances

pour la réalisation du test final. La préparation du produit fini sous sa forme commerciale est faite par notre partenaire industriel.

- ✓ **Validation de tests avec des souches cliniques.** Un lot de 1000 bandelettes au format commercial (membrane insérée dans une cassette) est préparé. La validation (approche rétrospective) se fait en utilisant des entérobactéries dont le contenu en  $\beta$ -lactamase a été caractérisé en PCR. Elles correspondent aux 180 souches de la collection du Centre National de Référence pour la résistance aux carbapénémases. Le test est réalisé avec des colonies isolées sur gélose. Une validation prospective est aussi menée avec les souches reçues quotidiennement au Centre National de Référence et qui montrent une susceptibilité diminuée à au moins un carbapénème.

# **Matériel et méthodes**



# Matériel et méthodes

## 1. Matériel biologique utilisé

### 1.1. Les souris

Les souris utilisées sont issues d'une lignée Biozzi et proviennent de l'animalerie du CEA de Saclay (Gif sur Yvette, France). Les souris Biozzi sont issues d'une lignée sélectionnée pour leur production élevée d'immunoglobulines lors d'une réponse immunitaire (187, 188). C'est cette caractéristique qui nous a conduit à utiliser cette lignée pour la production d'anticorps monoclonaux (189).

### 1.2. Les protéines recombinantes

Les protéines recombinantes utilisées au cours de cette thèse portent une étiquette poly-Histidine (6-His) et sont produites et purifiées au laboratoire.

Nom et spécificité de substrat	Taille en KDa
CTX-M-2 : $\beta$ -lactamase à spectre élargi	29.5
CTX-M-14 : $\beta$ -lactamase à spectre élargi	29
CTX-M-15 : $\beta$ -lactamase à spectre élargi	31.9
NDM-1 : carbapénémase	26.4
KPC-2 : carbapénémase	28.7
OXA-48 : carbapénémase de type oxacillinase	29

**Tableau 2 : Protéines recombinantes avec l'étiquette poly-histidine**

### 1.3. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux murins (AcM) utilisés pour ces travaux de thèse sont produits au laboratoire.

Nom	Immunogène	Nombre	Origine
CTX-(200 à 219)	CTX-M-15 (M1 à L291)	20	Ces travaux
CTX-(221 à 240)	CTX-M-2 (Q29 à F291)	20	Ces travaux
CTX-(241 à 262)	CTX-M-14 (Q29 à L291)	22	Ces travaux
NDM-(101 à 122)	NDM-1 (G29 à R270)	22	Ces travaux
OXA-(1 à 20)	OXA-48 (K23 à P265)	20	Ces travaux
KPC-(402, 404 à 412, 414 à 416, 418 à 422)	KPC-2 (A30 à Q293)	18	Ces travaux

**Tableau 3 : Anticorps monoclonaux produits**

### 1.4. Les bactéries

Les souches utilisées pour la caractérisation des anticorps au laboratoire du CEA (voir Annexe 1) ont été fournies par le Centre National de Référence (CNR) des résistances aux antibiotiques du Kremlin Bicêtre (Le Kremlin Bicêtre, France). Elles sont issues des collections du CNR.

Les souches utilisées pour les validations des tests industriels sont celles du soucier de référence « carbapénémases » (Voir Annexe 5).

Les 180 souches sont réparties comme suit :

#### **55 n'expriment pas de carbapénémase :**

- ✓ sur-“expression” d'une BLSE et/ou céphalosporinase associée à une perméabilité membranaire faible, oxacillinase à spectre élargi (OXA-163, OXA-405)

#### **125 “experiment” une carbapénémase :**

- ✓ 30 Ambler class A : 22 KPC, 3 IMI, 2 SME, 1 NMC-A, 1 FRI, 1 GES

- ✓ 52 metallo- $\beta$ -lactamases, Ambler class B : 23 NDM, 17 VIM, 11 IMP, 1 GIM
- ✓ 37 OXA-48-like, 1 OXA-372, Ambler class D

**5 co-expriment deux carbapénémases :**

- ✓ NDM et OXA-48-like

## 2. Tampons et réactifs utilisés pour les dosages

### 2.1. Composition des tampons

**Le tampon EIA**, composé de phosphate de potassium 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, d'albumine bovine (BSA) 0,1 % et d'azide de sodium 0,01%.

**Le tampon de lavage** des plaques de microtitration, composé de phosphate de potassium 10 mM pH 7,4 et Tween20 0,05 %.

**Le tampon d'extraction** pour la lyse des bactéries et la réalisation des tests sur bandelettes, composé de Tris 100 mM pH 8, NaCl 150 mM, CHAPS 1 %, Tween20 0,5 %, BSA 0,1 %, NaN<sub>3</sub> 0,01 %.

**Le tampon Laemmli (1X)** : Tris 62,5 mM pH 6,8, SDS 2 %, Glycérol 10 %, Béta-mercapto éthanol 5 %, Bleu de bromophénol 0,01 %

**Le tampon PBST** pour les immunoblots, composé de phosphate de potassium 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween20 0,1%.

### 2.2. Préparation des plaques CAS

Des anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de souris ou CAS (Jackson ImmunoResearch) sont immobilisés par adsorption passive (coating) sur des plaques de microtitration (Maxisorp, Nunc). 100  $\mu$ l d'une solution de CAS à 10  $\mu$ g/ml en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 sont déposés et incubés sur la nuit en pièce

tempérée (22°C). La plaque est ensuite vidée et 300 µl de tampon EIA sont déposés pour la saturation et la conservation des plaques.

### **2.3. Préparation des traceurs biotinylés**

Les protéines recombinantes diluées en tampon borate 0,1 M pH 9 sont couplées à de la biotine de façon covalente. A 100 µg de protéine dans un volume de 400 µl sont ajoutés des esters de biotine-N-hydroxysuccinimide (Sigma-Aldrich) avec un ratio (mol/mol) de 1:3 et incubés 30 min à température ambiante. 100 µl de Tris 1 M pH 8 sont ajoutés et après 20 min de réaction, 500 µl de tampon EIA sont ajoutés pour obtenir une concentration finale de 100 µg/ml de protéine biotinylée. Ces traceurs seront nommés CTX-M-2-biot, CTX-M-15-biot, CTX-M-14-biot, NDM-1-biot, KPC-2-biot et OXA-48-biot, OXA-162-biot, OXA-163-biot, OXA-181-biot, OXA-204-biot, OXA-232-biot, OXA-405-biot, OXA-427-biot, OXA-428-biot.

### **2.4. Préparation des traceurs AChE**

#### **2.4.1. Couplage à l'AChE**

L'acétylcholinestérase (AChE) est extraite des organes électriques de l'anguille *Electrophorus electricus*. De la streptavidine est couplée à sa forme tétramérique selon le protocole décrit par Pradelles *et al* (190) et sera nommée Strepta-AChE. Un anticorps dirigé contre l'étiquette poly-histidine est couplé à l'AChE selon le protocole décrit par Grassi *et al* (191) et sera nommé PolyHis24-AChE.

#### **2.4.2. Mesure de l'activité enzymatique**

L'activité enzymatique de l'AChE est mesurée par la méthode d'Ellman (192). Le réactif d'Ellman est utilisé comme substrat de l'AChE et est composé d'un mélange d'acéthylthiocholine iodide (Sigma Aldrich) à  $7,5 \cdot 10^{-4}$  M et d'acide dithio-bis-nitrobenzoïque (DTNB oxydé) à  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M dans du tampon phosphate de potassium

100 mM pH 7,4. Lors de l'hydrolyse par l'AChE de l'acéthylthiocholine, la thiocholine produite forme un pont disulfure avec le DTNB. Le produit formé en solution aqueuse à pH 7,4 a une couleur jaune qui absorbe à 414 nm. L'activité enzymatique est exprimée en Unités Ellman (UE). 1 UE est la quantité d'AChE induisant une augmentation de l'absorbance d'une unité en 1 minute dans 1 ml de réactif d'Ellman (substrat) pour un trajet optique de 1 cm à 25°C (192).

## **2.5. Préparation des anticorps traceurs or colloïdal**

1 ml d'une solution d'or colloïdal préparée comme décrit par Khreich *et al* (193) est centrifugé 15 min à 15000 g et le culot repris en H<sub>2</sub>O. 100 µl d'une solution d'AcM à 100 µg/ml en tampon phosphate de potassium 5 mM pH 7,4 sont ajoutés et incubés 1 H à 20°C sous agitation à l'abri de la lumière pour permettre l'adsorption des anticorps sur les particules d'or. 100 µl de tampon phosphate de potassium 20 mM pH 7,4 avec 1 % de BSA sont ajoutés et l'ensemble centrifugé 15 min à 15000 g. Le culot est ensuite repris par 1 ml de tampon phosphate de potassium 2 mM pH 7,4 avec 0,1 % de BSA et centrifugé 15 min à 15000 g après un bref traitement aux ultrasons. Le culot est repris par 250 µl de tampon phosphate de potassium 2 mM pH 7,4 avec 0,1 % de BSA et l'AcM-or est conservé à + 4°C à l'abri de la lumière.

## **3. Obtention des protéines recombinantes**

### **3.1. Clonage des gènes CTX-M-2, CTX-M-14**

#### **3.1.1. Amplification par PCR des gènes CTX-M-2 et CTX-M-14**

Les cycles de polymérisation en chaîne (PCR) sont réalisés avec le kit Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Biolabs). Des bactéries exprimant les gènes ont été cultivées sur géloses Luria Broth (LB). Une colonie est prélevée sur la gélose et reprise dans le milieu réactionnel (volume final de 50 µl) qui comprend 3 unités de Phusion DNA Polymerase, son tampon (1X), 0,3 µM de chaque amorce (voir Tableau 3) et 300

$\mu\text{M}$  de chaque dNTP. La PCR débute par une étape de lyse des bactéries de 5 minutes à  $95^{\circ}\text{C}$ . Par la suite, 30 cycles de dénaturation (30 s à  $95^{\circ}\text{C}$ ), hybridation (30 s à  $60^{\circ}\text{C}$ ), élongation (45 s à  $72^{\circ}\text{C}$ ) sont réalisés suivis d'une élongation finale de 5 min à  $72^{\circ}\text{C}$ . Ces étapes sont réalisées avec l'appareil Mastercycler® nexus (Eppendorf). L'électrophorèse du produit PCR est réalisée en agarose 1 % préparé en tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) contenant du Bromure d'éthidium (BET). Les amorces utilisées comportent un site *NdeI* avec codon d'initiation et un site *XhoI* supprimant le codon stop et permettant une lecture en phase avec l'étiquette poly-histidine dans le vecteur pET22b (+). La séquence amplifiée correspond à la protéine sans le peptide signal.

### **3.1.2. Digestion du produit PCR et du vecteur pET22b (+)**

Les séquences amplifiées sont purifiées à partir du gel d'agarose avec le kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific). Elles sont ensuite digérées avec l'enzyme *NdeI* pendant 2 h à  $37^{\circ}\text{C}$ , puis l'enzyme est inactivée à  $65^{\circ}\text{C}$  pendant 20 min. L'ADN est purifié avec le kit GeneJET PCR purification (Thermo Scientific) après migration sur gel d'agarose et la totalité est digérée avec l'enzyme *XhoI*. L'ADN correspondant aux inserts est purifié comme précédemment.

Le vecteur Pet22B (+) est aussi digéré et purifié selon le même protocole.

### **3.1.3. Clonage dans pET22b (+) et transformation d'*E. coli* DH5 $\alpha$**

La ligation du produit PCR purifié et de pET22b (+) linéarisé est réalisée avec le kit Quick Ligation (New England, Biolabs) selon les recommandations du fournisseur. A  $50\ \mu\text{l}$  de bactéries DH5 $\alpha$  chimio-compétentes produites au laboratoire, décongelées dans la glace, sont ajoutés  $12\ \mu\text{l}$  du produit PCR. Ce mélange est incubé 30 min dans la glace, puis 30 s à  $42^{\circ}\text{C}$  suivies de 2 min dans la glace.  $450\ \mu\text{l}$  de « Super Optimal Broth with Catabolite repression » (SOC, Invitrogen) sont ajoutés pour une incubation de 1 h à  $37^{\circ}\text{C}$ . La totalité de ce mélange est étalée sur une boîte LB agar contenant de l'ampiciline à  $100\ \mu\text{g/ml}$  (LB/ampi) et incubés une nuit à  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.4. Criblage des clones recombinants obtenus

Des colonies présentes sur la boîte LB/amp<sup>r</sup> sont criblées par PCR afin de vérifier l'internalisation du produit de ligature (pET22b (+) porteur des gènes CTX-M-2 ou CTX-M-14). Les colonies sélectionnées sont reprises dans 10 µl d'eau auxquels sont ajoutés 15 µl d'un mélange contenant 0,625 unités de Crimson Taq DNA Polymerase (New England Biolabs), son tampon (1,6X), 480 µM de chaque dNTP et de chaque amorce (T7 promoter et T7 terminator). La PCR débute par une étape de dénaturation de l'ADN de 5 min à 95°C. Par la suite, 30 cycles de dénaturation (30 s à 95°C), hybridation (30 s à 55°C), élongation (40 s à 68°C) sont réalisés suivis d'une élongation finale de 5 min à 68°C.

Gène ciblé	Noms des amorces	Séquence nucléotidique
CTX-M-2	CTX-M-2 forward CTX-M2 reverse	5'-GATATA <b>CATATG</b> CAGGCCGAACAGCGTGCAACAGCAG-3' 5'-GTGGTG <b>CTCGAG</b> GAAACCGTGGGTACGATTTTCGC-3'
CTX-M-14	CTX-M-14 forward CTX-M-14 reverse	5'-GATATA <b>CATATG</b> CAGACGAGTCGCGTGCAGCAAAG-3' 5'-GTGGTG <b>CTCGAG</b> CCCCTTCGGCGATGATTCTCGCCGC-3'
CTX-M-15	Muta CTX-M-15 forward  Muta CTX-M-15 reverse	5'-GTCACCGACGGTTTG <b>CACCACCACCACCAC</b> TAA <b>G</b> <b>AATTC</b> GGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGC-3'  5'-GCTTTGTTAGCAGCC <b>GAATTC</b> TTA <b>GTGGTGGTGGTGGT</b> <b>GGTG</b> CAAACCGTCCGGTACGATTTAGCCGC-3'
CTX-M-15	CTX-M-15 forward	5'-AGCTGGGAGACGAAA-3'
	T7 promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
	T7 terminator	5'-CTAGTTATTGCTAGCGGT-3'

**Tableau 4 : Amorces utilisées**

En gras, les sites de restriction : NdeI – CATATG, XhoI – CTCGAG, EcoRI – GAATTC, en bleu l'étiquette poly-histidine

### 3.1.5. Purification et contrôle de la séquence du gène d'intérêt.

Pour chaque gène, un clone exprimant pET22b avec l'insert correspondant est mis en culture en LB/amp<sup>r</sup> sur la nuit à 37°C. L'ADN plasmidique est purifié avec le kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific). L'ADN est ensuite envoyé en

séquençage (Eurofins) pour vérification de la séquence correspondant aux gènes CTX-M-2 et CTX-M-14.

### **3.1.6. Transformation d'*E. coli* BL21 (DE3) chimio-compétentes**

A 50 µl de bactéries BL21 produites au laboratoire, décongelées dans la glace, sont ajoutés 10 ng de pET22b (+) avec insert. Ce mélange est incubé 30 min dans la glace, puis 30 s à 42°C suivies de 2 min dans la glace. 450 µl de SOC sont ajoutés pour une incubation de 1 H à 37°C. 100 µl de ce mélange sont étalés sur une boîte LB/amp<sup>r</sup> et incubés à 37°C sur la nuit.

## **3.2. Clonage du gène CTX-M-15**

Une souche contenant le plasmide Pet9a porteur du gène CTX-M-15 (pET9a CTX-M-15) a été fournie par le CNR. Dans cette construction, l'enzyme n'est pas exprimée avec une étiquette 6-His qui faciliterait sa purification ultérieure. Une nouvelle construction est faite dans ce sens.

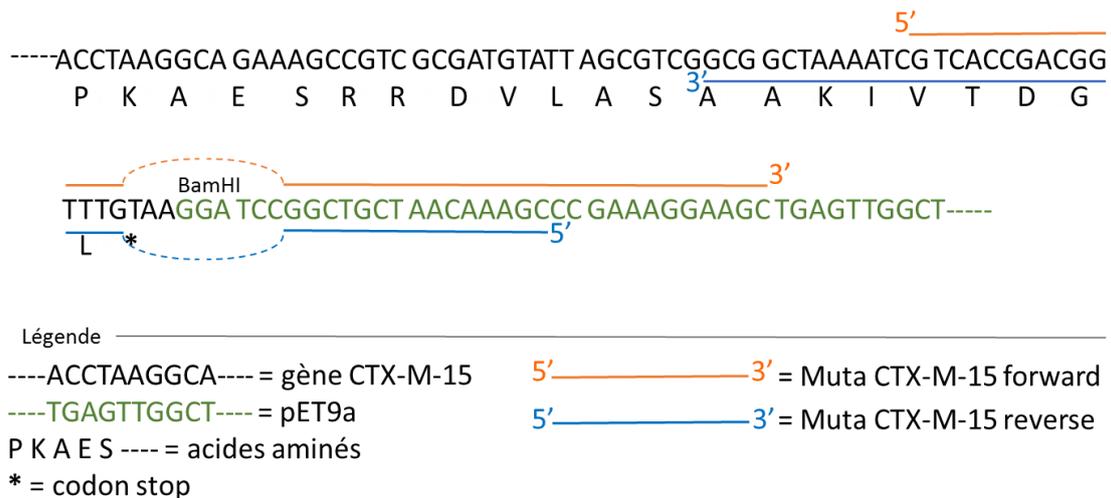
### **3.2.1. Purification du vecteur pET9a CTX-M-15**

La souche portant le vecteur est cultivée en LB contenant de la kanamycine (kana) à 50 µg/ml pendant une nuit à 37°C. L'ADN plasmidique est extrait et purifié en utilisant le kit NucleoBond® Xtra Midi (Macherey Nalgel).

### **3.2.2. Mutagénèse pour ajouter une étiquette poly-histidine**

Des amorces Muta CTX-M-15 forward et Muta CTX-M-15 reverse (voir Tableau 3) permettant de supprimer le site de restriction BamHI en le remplaçant par celui d'EcoRI et d'ajouter l'étiquette 6-His à la protéine sont utilisées. Le milieu réactionnel (volume final de 50 µl) comprend 100 ng de pET9a purifié, 3 unités de Phusion DNA

Polymerase, son tampon (1X), 0,3 µM de chaque amorce et 300 µM de chaque dNTP. La PCR débute par une étape de dénaturation de l'ADN de 5 min à 95°C. Par la suite, 18 cycles de dénaturation (30 s à 95°C), hybridation (30 s à 60°), élongation (5 min à 72°C) sont réalisés suivis d'une élongation finale de 5 min à 72°C. Ce protocole permet d'amplifier la totalité du vecteur (Figure 34).



**Figure 34 : Mutagenèse, schéma d'hybridation des amorces**

### 3.2.3. Digestion du produit PCR par DpnI

L'enzyme de restriction DpnI n'hydrolyse l'ADN que lorsqu'il est méthylé. Dans notre mélange réactionnel il ne s'agira donc que de l'ADN d'origine bactérienne (pET9a) introduit pour l'amplification. Cette digestion permet d'éliminer la matrice et de ne conserver sous leur forme circulaire que les plasmides nouvellement amplifiés lors des cycles de PCR.

### 3.2.4. Transformation de bactéries *E. coli* BL21 (DE3)

A 50 µl de bactéries BL21 chimio-compétentes produites au laboratoire, décongelées dans la glace, sont ajoutés 5 µl du produit PCR digéré par *DpnI*. Ce mélange est incubé 30 min dans la glace, puis 30 s à 42°C suivies de 2 min dans la glace. 450 µl de SOC

sont ajoutés pour une incubation de 1 H à 37°C. 200 µl de ce mélange sont étalés sur une boîte LB/kana (50 µg/ml) et incubés à 37°C sur la nuit.

### **3.2.5. Criblage des clones de bactéries recombinantes**

Des colonies présentes sur la boîte LB/kana sont criblées par PCR afin de vérifier l'internalisation du vecteur pET9a CTX-M-15. Les colonies sélectionnées sont reprises dans 10 µl d'eau auxquels sont ajoutés 15 µl d'un mélange contenant 0,625 unités de Crimson Taq DNA Polymerase (New England), son tampon (1,6X), 480 µM de chaque dNTP et de chaque amorce (T7 terminator et CTX-M-15 forward). La PCR débute par une étape de dénaturation de l'ADN de 5 min à 95°C. Par la suite, 30 cycles de dénaturation (30 s à 95°C), hybridation (30 s à 55°C), élongation (40 s à 68°C) sont réalisés suivis d'une élongation finale de 5 min à 68°C.

### **3.2.6. Digestion du produit PCR par EcoRI**

A 2 µl du produit PCR sont ajoutés 18 µl d'un mélange contenant 1,2 unités d'EcoRI et son tampon (1X), l'ensemble est incubé pendant 40 min à 37°C. Les deux amorces utilisées précédemment permettent d'amplifier la partie 3' du gène de CTX-M-15 qui comprend le site de restriction EcoRI nouvellement inséré et l'étiquette 6-His. Les clones pour lesquels le produit spécifique d'une digestion par EcoRI sera visible, seront ceux pour lesquels le gène aura été muté comme souhaité.

### **3.2.7. Purification et contrôle de la séquence du gène d'intérêt**

Un clone exprimant pET9a CTX-M-15 modifié est mis en culture en LB/kana sur la nuit à 37°C. L'ADN plasmidique est purifié avec le kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific). L'ADN est ensuite envoyé en séquençage (Eurofins) pour vérification de la séquence correspondant au gène CTX-M-15 en phase avec l'étiquette 6-His.

### **3.3. Production et purification des protéines recombinantes**

Remarque : les clones exprimant les protéines recombinantes NDM-1, KPC-2 et OXA-48 avec une étiquette 6-His ont été fournis par le CNR. Les gènes correspondants sont portés par un vecteur pET41b qui confère la résistance à la kanamicine.

#### **3.3.1. Sélection des conditions d'expression avec induction à IPTG**

Deux températures de culture et cinq concentrations en isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) soit 10 conditions différentes et quatre temps d'incubation sont évalués.

10 ml de pré-culture de chaque clone (*E coli* BL21) transformé permettant l'expression d'une des six protéines recombinantes sont réalisés en LB avec antibiotique (pET22b = ampi, pET41b = kana) sur la nuit à 37°C.

Une culture de 350 ml est lancée à partir de cette pré-culture (LB + antibiotique + pré-culture) à deux températures différentes, 30 et 37°C (ou 25 et 30°C pour KPC-2). Lorsque la  $DO_{600nm}$  atteint 0,6, la culture est séparée en cinq erlenmeyers de 30 ml auxquels sont ajoutés une solution d'IPTG pour obtenir les concentrations finales de 0, 50, 100, 500 et 1000  $\mu$ M. Les cultures sont lancées aux températures souhaitées et 5 ml de chaque condition sont prélevés toutes les deux heures.

#### **3.3.2. Préparation des extraits bactériens**

##### **La fraction soluble**

5 ml de culture sont prélevés toutes les deux heures et aussitôt centrifugés 15 min à 3000 g et le surnageant éliminé. Les culots obtenus sont congelés à -20°C. 500  $\mu$ l de tampon Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM et fluorure de 4-(2-aminoéthyl) benzène sulfonyle (AEBSF) à 1 mM sont ajoutés aux culots congelés et conservés dans la glace. Chaque tube est soumis aux ultrasons 3 fois 15 s à 14 W d'intensité (appareil Vibra cell 75185, Bioblock Scientific, Illkirch, France) avec passage dans la glace entre

chaque cycle. Le tube est ensuite centrifugé 15 min à 15000 g et le surnageant correspondant à la fraction soluble de l'extrait est conservé.

### **Les corps d'inclusion**

Le culot précédent est repris par 500 µl de tampon Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, Urée 8 M et AEBSF 1mM. Après 1 heure d'agitation à 37°C à 300 rpm, une centrifugation de 15 min à 20000 g est réalisée et le surnageant correspondant aux corps d'inclusion solubilisés est conservé.

### **3.3.3. Immobilisation des extraits bactériens sur phase solide**

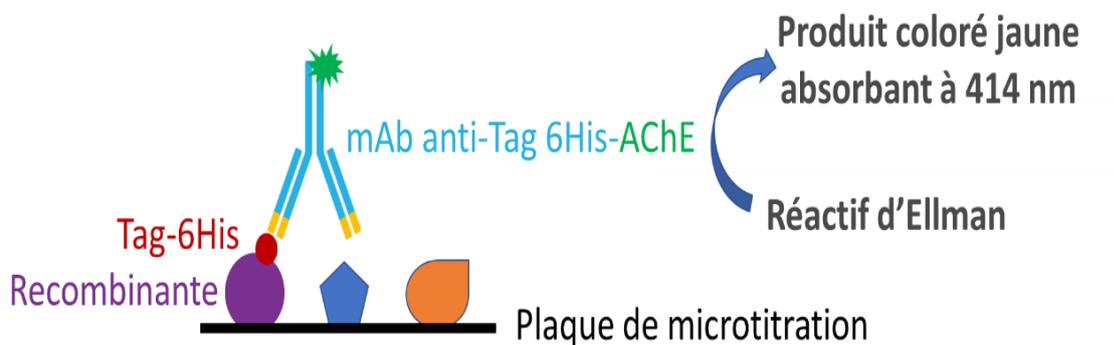
Les différentes fractions solubles et corps d'inclusion solubilisés sont diluées en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 (1/10, 1/100, 1/1000 et 1/10000). 100 µl de chaque dilution sont déposés en double dans des puits d'une plaque de microtitration (Maxisorb, Nunc). Les protéines de l'extrait sont immobilisées par adsorption passive sur la plaque lors d'une incubation sur la nuit à température ambiante. Le lendemain, les puits sont vidés et 300 µl de tampon EIA sont ajoutés pour une incubation à température ambiante de 3 H minimum puis si nécessaire elles sont stockées à 4°C.

### **3.3.4. Dosage des protéines recombinantes immobilisées**

Les protéines recombinantes sont exprimées en phase avec une étiquette 6-His. Cette étiquette est détectée lors d'un dosage immuno-enzymatique (Figure 35) qui permet dès lors de déterminer le niveau d'"expression" des protéines d'intérêt, et de déterminer la condition la plus favorable.

Les plaques sont lavées 3 fois avec du tampon de lavage (1 lavage correspond à 400 µl par puits avec un laveur ELX 405 (Biotek). Par la suite, 100 µl d'une solution de PolyHis24-AChE (anticorps dirigé contre l'étiquette poly-histidine et couplé à l'AChE) à une concentration de 5 UE/ml sont incubés 2 H à température ambiante sous

agitation. Les plaques sont à nouveau lavées trois fois et 200 µl de réactif d'Ellman ajoutés dans les puits. Les absorbances à 414 nm sont lues au spectrophotomètre (Multiskan EX, Thermo). L'absorbance sera proportionnelle à la quantité de protéine recombinante immobilisée.



**Figure 35 : Le dosage des protéines recombinantes sur phase solide**

### 3.3.5. Production en grande quantité des protéines recombinantes

Un litre de culture dans les conditions optimales d'expression déterminées est réalisé pour chaque protéine recombinante. Le traitement des bactéries et l'extraction de la fraction soluble (40 ml) sont faits dans les conditions précédemment décrites.

### 3.3.6. Purification des protéines recombinantes

La purification se fait sur une colonne « Chelating Sepharose Fast Flow » (Ni-NTA, GE Healthcare) chargée avec des ions  $Ni^{2+}$  selon les recommandations du fournisseur. La fraction soluble additionnée d'une solution d'imidazole (concentration finale 20 mM) est mise en contact avec le gel (2 ml) pendant 2 H sous agitation à température ambiante. Le gel est ensuite lavé avec du tampon de liaison (Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, Imidazole 20 mM). La protéine recombinante est éluée par ajout de 2 ml de tampon d'éluion (Tris 50mM pH 8, NaCl 100 mM, Imidazole 500 mM) laissé en contact 10 min avant collecte de la fraction, cette étape est répétée 5 fois. Les fractions éluées sont réunies et dialysées en tampon phosphate 50 mM pH 7,4.

### **3.3.7. Quantification et analyse SDS-PAGE**

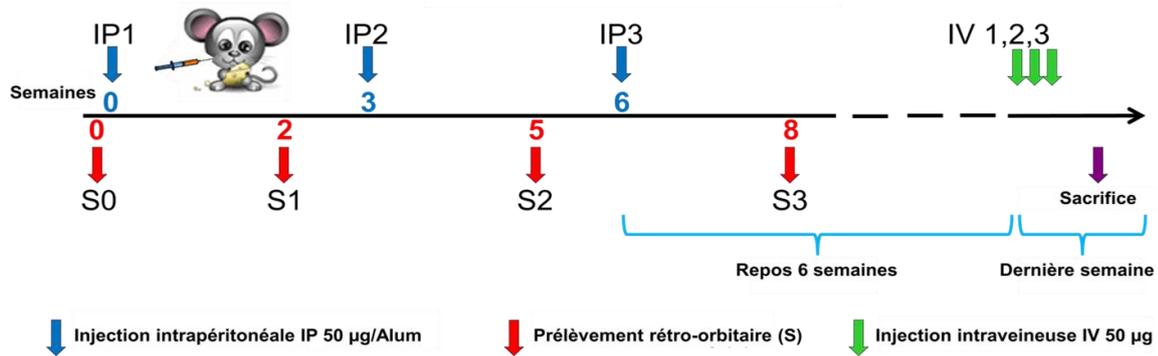
L'absorbance à 280 nm de chaque protéine recombinante purifiée est mesurée avec un spectrophotomètre Nanodrop ND1000 (Labtech). La concentration est ensuite calculée en utilisant la loi de Beer Lambert selon laquelle,  $A = \epsilon cL$  où  $A$  représente l'absorbance à 280 nm,  $\epsilon$  le coefficient d'extinction molaire de la protéine,  $c$  la concentration en mol/l et  $L$  la longueur du trajet optique (1cm en général).

Une électrophorèse en conditions réductrices et non-réductrices avec coloration en bleu de Coomassie est ensuite réalisée pour évaluer la pureté de la protéine purifiée. Elle est réalisée en utilisant un gel avec gradient d'acrylamide (4-15 %) et un appareil d'électrophorèse adapté (Phast system, GE Healthcare).

## **4. Obtention des anticorps monoclonaux**

### **4.1. Immunisation des souris**

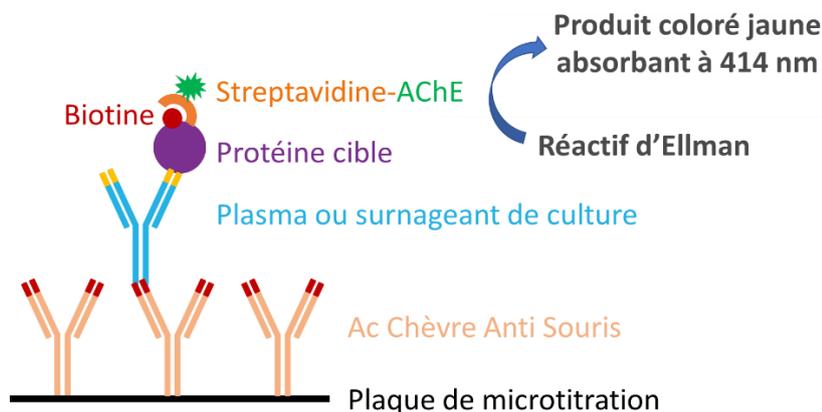
4 souris Biozzi âgées de 10 semaines reçoivent l'immunogène, dans notre cas les protéines recombinantes purifiées, injectées avec de l'hydroxyde d'aluminium (alun, Eurobio) comme adjuvant. 3 injections par voie intrapéritonéale de 50 µg de protéine + alun et espacées de trois semaines sont réalisées. Un prélèvement sanguin rétro orbitaire est fait le jour de la première injection (saignée pré-immune S0) puis deux semaines après chaque injection (saignées S1, S2 et S3). Ces prélèvements permettront d'évaluer ultérieurement la réponse immunitaire de chaque souris. Les animaux sont laissés au repos deux mois après la dernière injection, puis reçoivent 3 jours de suite 50 µg de protéine par injection intra veineuse avant de procéder au sacrifice et à la fusion, voir Figure 36.



**Figure 36 : Le protocole d'immunisation**

## 4.2. Evaluation des réponses immunitaires

Les prélèvements sanguins (plasma) sont dilués en tampon EIA (1/100, 1/1000, 1/10000 et 1/100000) et 50 µl de chaque dilution sont déposés en double sur une plaque de microtitration (Maxisorb, Nunc) où a été immobilisé du CAS. Ces dilutions sont incubées simultanément avec 50 µl de la protéine utilisée comme immunogène et biotinylée (protéine/biot à 100 ng/ml) également diluée en EIA. L'incubation est faite sur une nuit à +4°C avant de procéder à 2 x 3 lavages. 100 µl de Strepta-AChE à 1 UE/ml sont ensuite incubés 1 H à température ambiante, puis après 5 lavages, 200 µl du réactif d'Ellman sont ajoutés. Les plaques sont lues à 414 nm au bout de 30 min, voir Figure 37.



**Figure 37 : Le format des dosages immuno-enzymatiques**

### **4.3. Obtention des hybridomes et isotypage des anticorps**

La fusion se déroule selon le protocole décrit par Kohler G et Milstein C (194). Pour chaque immunogène, les deux souris ayant la meilleure réponse immunitaire sont sacrifiées et leurs rates prélevées et broyées. Après lavage des splénocytes, ils sont mélangés à des cellules de myélome murin (NS-1) avec un ratio de 3:1. Après centrifugation, le culot est repris par du polyéthylène glycol (PEG 400, Hybri Max®, Sigma Aldrich) qui favorise la fusion membranaire. Les cellules sont lavées et mises en milieu Hypoxanthine-Aminoptérine-Thyamidine (HAT, Gibco, Life Technologies), puis sont réparties dans des microplaques de culture (milieu RPMI 1640 et 15 % SVF, Gibco) et cultivées à 37°C et 7 % de CO<sub>2</sub>. Dans ce milieu sélectif, seules les cellules issues d'une hybridation entre les splénocytes et les NS-1, que l'on appelle hybridomes, vont être capables de proliférer. Après sept à dix jours de culture, la sécrétion d'anticorps spécifiques est évaluée avec un test immuno-enzymatique.

Ce test est réalisé dans les mêmes conditions que pour l'évaluation des réponses immunitaires, mais cette fois le plasma est remplacé par le surnageant de culture contenant les anticorps sécrétés.

Une centaine d'hybridomes, ceux avec les DO<sub>414 nm</sub> les plus fortes, sont présélectionnés et testés après une culture de 24 heures à différentes dilutions. Les 20 hybridomes pour lesquels on obtient les signaux les plus élevés sont conservés. Ces hybridomes sont clonés par la méthode de dilution limite afin d'obtenir une lignée cellulaire sécrétant un anticorps unique (anticorps monoclonal).

L'isotype de l'anticorps présent dans le milieu de culture est déterminé en utilisant le kit « Pierce Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping » (Thermo Scientific) selon les consignes du fournisseur.

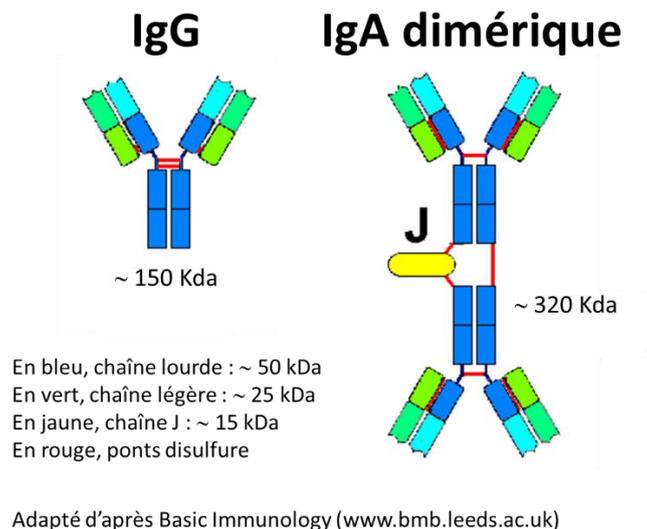
### **4.4. Production et purification des anticorps monoclonaux**

Les anticorps monoclonaux sont produits en grande quantité par culture in-vitro en milieu RPMI contenant 10 % de SVF « Low IgG » (Gibco). La purification, par chromatographie d'affinité est faite de manière automatique avec un appareil de

chromatographie, l'Äktaxpress (GE Healthcare) et des colonnes contenant de la protéine G greffée sur un gel (GE Healthcare). L'appareil injecte sur la colonne le surnageant de culture, le gel est ensuite lavé avec du tampon phosphate de potassium 20 mM pH 7,4, l'éluion des anticorps fixés sur le gel est faite avec du tampon glycine 100 mM pH 2,5. L'appareil collecte les fractions en fonction de l'absorbance à 280 nm. Les fractions collectées contenant l'anticorps purifié sont dialysées en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4.

#### 4.5. Concentration des anticorps purifiés et analyse SDS-PAGE

Après dialyse, la concentration des anticorps monoclonaux est mesurée en utilisant un Nanodrop ND1000 (Labtech) couplé à un programme dédié aux immunoglobulines qui permet d'obtenir directement la concentration à partir de la valeur de l'absorbance à 280 nm. La pureté des anticorps en solution, ainsi que leur intégrité sont vérifiées par SDS PAGE comme précédemment décrit. Structure des anticorps, voir Figure 38.



**Figure 38 : Structure des IgG et IgA dimérique**

## 4.6. Utilisation des anticorps en Western Blot

Les protéines recombinantes sont diluées en tampon Laemmli qui contient du dodécylsulfate de sodium (SDS). Le SDS se lie uniformément aux protéines sur toute leur longueur, conduisant à une perte de leur structure tertiaire et secondaire. Le SDS possède une tête polaire qui charge les protéines négativement. Le ratio charge/masse est constant d'une protéine à une autre. Lors d'une migration dans un gel de polyacrylamide, la migration ne dépendra que de la masse des protéines (195, 196). Après migration dans un gel d'acrylamide à 13 % de 250 et 25 ng de protéine recombinante, sous 100 volts pendant 90 minutes, les échantillons sont transférés sur une membrane de PVDF (Amersham Biosciences) sur la nuit à 30 volts.

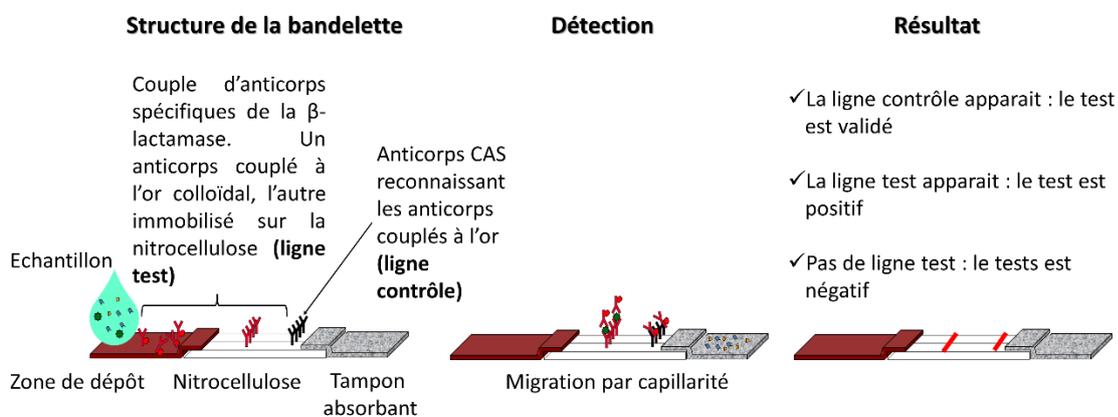
La membrane est ensuite saturée avec du tampon PBST et 5 % lait écrémé pendant 30 min sous agitation. Elle est ensuite lavée et incubée avec les AcMs dirigés contre la protéine recombinante (anticorps primaires) soit à partir de surnageant de culture au 1/100<sup>ème</sup>, soit de l'anticorps purifié à 4 µg/ml, en tampon PBST 0,1 % lait pendant 1H. Après 3 lavages en PBST, l'anticorps secondaire, « Stabilized Goat anti-mouse IgG (H + L) Horse Radish Peroxidase » (Thermo Fisher) au 1/2000<sup>ème</sup> en PBST 0,3 % lait, est incubé avec la membrane 30 min. Après 5 lavages, la révélation se fait consécutivement à l'ajout du substrat Luminata forte (Millipore) par la détection de chimioluminescence sur des films photographiques (X-omat, Kodak).

## 5. Les bandelettes pour détecter les $\beta$ -lactamases

### 5.1. Description

Les bandelettes sont formées de 3 zones fixées ensemble sur un support plastique : une zone d'absorption favorisant la migration, une zone de réaction (formée généralement d'une membrane de nitrocellulose) et une zone de dépôt recevant l'échantillon. On associe souvent à cette dernière une dernière zone sur laquelle a été déposé et séché l'anticorps « traceur ». Cet anticorps, dirigé contre la cible, est lié à des nanoparticules d'or colloïdal permettant d'obtenir un signal coloré.

Sur la membrane de nitrocellulose, sont déposées deux lignes d'anticorps. La première de ces lignes dite « ligne test » est réalisée par dépôt d'anticorps spécifiques de la cible (anticorps de capture). C'est le signal obtenu au niveau de cette ligne qui indiquera la présence ou non de la molécule à détecter. Dans certains cas ce signal permettra également la quantification. La deuxième ligne dite « ligne contrôle » est constituée par du CAS dirigé contre l'anticorps traceur. Cette ligne permet de vérifier que le test a été effectué dans des conditions compatibles avec le bon déroulement du test (Figure 39).



**Figure 39 : La description du test bandelette (une seule cible)**

## 5.2. Préparation des bandelettes

Avec un distributeur automatique (Biodot XYZ dispenser 3050, Biodot), une solution d'anticorps spécifique des bêta-lactamases à 1 mg/ml en tampon phosphate 50 mM pH 7,4 est déposée sous forme d'une ligne à raison de 1  $\mu$ l/cm sur une membrane Prima40. Du CAS à 500  $\mu$ g/ml est aussi distribué dans les mêmes conditions. L'anticorps spécifique déposé correspond à la « ligne test », et le CAS à la « ligne contrôle ».

La membrane est séchée 20 min à 37°C dans une étuve sèche, puis immergée dans une solution de saturation contenant 0,5 % de BSA en tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,4 et 150 mM de NaCl pendant 30 min sous agitation. Après 3 lavages avec de l'eau distillée, la membrane est immergée 20 min dans une solution de glucose 7,5 %, Tween20 0,1 % en tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,4 et 150 mM de

NaCl pendant 20 min sous agitation. La membrane est ensuite séchée 20 min à 37°C dans une étuve.

La zone de dépôt (0,7 mm de Standard 14, Whatman®) de l'échantillon et le tampon absorbant (2,5 cm) sont collés sur la membrane avant de découper des bandelettes de 5 mm de large avec une guillotine automatique (Guillotine Cutting, CM4000, Biodot).

### **5.3. Choix du couple d'anticorps pour le dosage**

#### **5.3.1. L'analyse combinatoire**

Tous les anticorps purifiés sont utilisés soit comme anticorps de capture soit comme anticorps traceur afin d'évaluer tous les couples permettant de détecter leur cible dans le format de test bandelette. Pour cela, deux bandelettes par couple sont nécessaires, une pour évaluer le signal spécifique en présence de la cible, et l'autre le signal non spécifique en absence de cible.

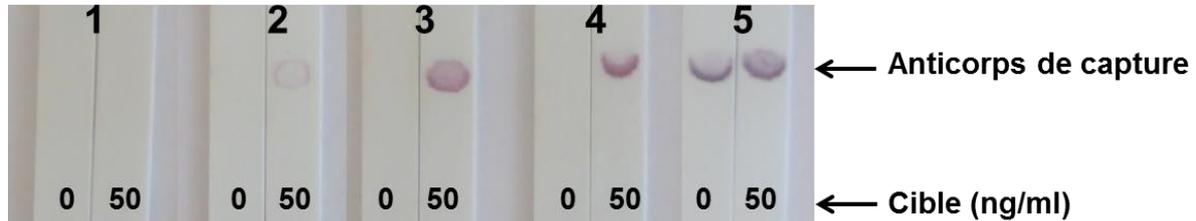
Pour une cible donnée on sélectionne en général 20 anticorps monoclonaux, ce qui correspond à 400 couples et donc à 800 bandelettes pour réaliser la combinatoire.

Du fait de ce nombre important, des bandelettes avec un format simplifié, décrit par O'Farrel (197) sont préparées. La membrane de nitrocellulose utilisée est la Prima40 avec support plastique de chez GE Healthcare. L'anticorps de capture y est déposé manuellement à raison de 1 µl à 100 µg/ml en tampon phosphate 50 mM pH 7,4, et laissé sécher à l'air libre.

10 µl d'anticorps traceur sont mélangés dans un puits de plaque de microtitration (Greiner) à 100 µl de tampon EIA-Tween20 à 0,5 % (signal non spécifique) ou la cible à 50 ng/ml dans le même tampon (signal spécifique). Une bandelette est déposée dans le puits et les résultats sont lus à l'œil après 30 min de migration.

Une illustration des différents résultats obtenus est présentée en Figure 40 .

L'objectif est de sélectionner les couples avec le signal spécifique le plus fort en absence de signal non spécifique. Par la suite, des bandelettes ainsi que des traceurs or sont préparés avec ces anticorps afin d'évaluer leurs sensibilité et spécificité.



**Figure 40 : Illustration des résultats de la combinatoire**

1- Pas de signal spécifique, 2 - Faible signal spécifique, 3 - Signal spécifique moyen, 4 - Fort signal spécifique, 5 - Forts signaux, spécifique et non spécifique

### **5.3.2. La limite de détection avec la protéine recombinante**

Des dilutions en série de la protéine recombinante en tampon EIA/Tween 0,5 % ou du tampon d'extraction sont testées. Dans une plaque de microtitration, 10  $\mu$ l d'anticorps traceur sont incubés avec 100  $\mu$ l de chaque dilution et la bandelette est déposée dans le puits. La limite de détection (LOD) pour chaque couple est déterminée à l'œil après 30 minutes de migration.

### **5.3.3. Limite de détection avec une souche exprimant la $\beta$ -lactamase**

Une suspension d'une souche exprimant la  $\beta$ -lactamase ciblée est réalisée en LB à 1  $DO_{600nm}$ , puis des dilutions sont réalisées en LB à partir de cette suspension, et l'on parlera d'équivalent  $DO_{600nm}$ . Les tubes sont centrifugés 15 min à 6000 g et le surnageant éliminé, le culot est repris par le même volume de tampon d'extraction pour la lyse des bactéries (voir page 83). 100  $\mu$ l de cet extrait sont déposés sur une plaque de microtitration avec 10  $\mu$ l de traceur puis ajout de la bandelette et lecture des résultats après 30 min de migration.

### 5.3.4. Détermination des épitopes des anticorps

Des peptides de 10 acides aminés couvrant la séquence des protéines recombinantes CTX-M-15, NDM-1, OXA-48 et KPC-2 sont synthétisés sous forme de plots successifs sur une membrane de cellulose selon la méthode SPOT (198) avec un AutoSpot (Intavis-AG). Un recouvrement de 8 acides aminés est appliqué entre chaque peptide successif (décalage de 2 acides aminés). Après la synthèse réalisée selon les recommandations du fabricant, la membrane est utilisée en immunoblot.

La membrane est ensuite traitée de la même façon que la membrane de PVDF après transfert des protéines comme décrit dans la partie décrivant l'utilisation des anticorps en Western blot.

## 6. Validation des tests au format commercial

Le couple d'anticorps qui permet d'atteindre la meilleure LOD avec la souche exprimant la  $\beta$ -lactamase cible est choisi pour préparer un lot de bandelettes commerciales disposées dans des cassettes (voir Figure 41).



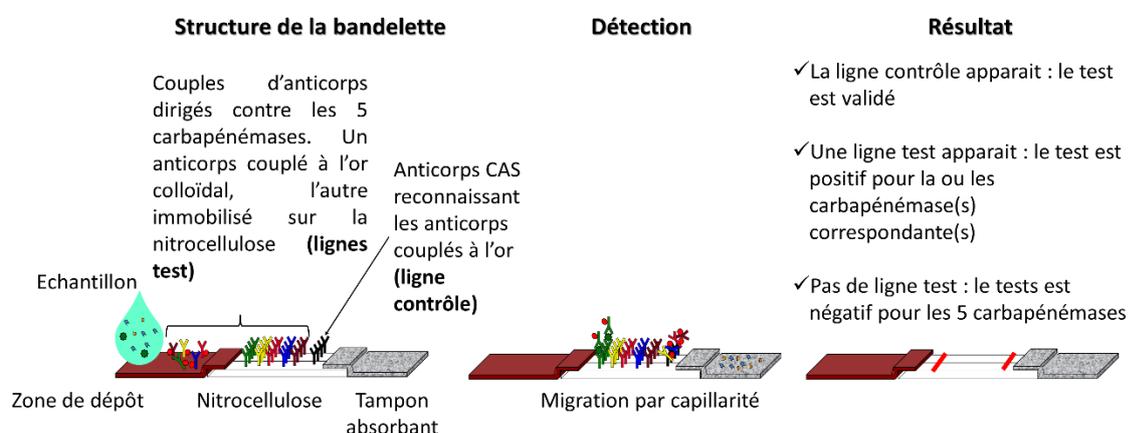
**Figure 41 : Illustration de cassettes commerciales « mono-test »**

O - Avant utilisation, N - Résultat négatif, P - Résultat positif

Il a été demandé à la société NG Biotech (Guipry, France) de préparer ces bandelettes pour :

- ✓ La détection des CTX-Ms du groupe 1 (CTX-M G1)
- ✓ La détection des NDMs
- ✓ La détection des OXA-48-like

- ✓ La détection simultanée des 5 principales carbapénémases. Les anticorps utilisés pour la préparation de ce test sont issus des travaux de cette thèse pour ceux qui ciblent NDM, KPC et OXA-48 et d'autres travaux réalisés au laboratoire pour VIM et IMP. Ce test sera appelé « Carba5 » et est décrit Figure 42.



**Figure 42 : La description du test bandelette 5 cibles ou « multiplexe »**

Il faut noter que le test pour la détection de KPC n'a pas été validé en format commercial sur l'ensemble du souchier du CNR, mais uniquement sur les souches présentes au laboratoire. En effet ce test a été intégré dans le format multiplexe avant cette validation.

## 6.1. Validation avec le souchier du CNR

La validation est faite avec le souchier « carbapénémases ».

Les souches sont cultivées sur un milieu gélosé pendant une nuit à 37°C. Une colonie est prélevée sur la boîte avec une œse d'ensemencement et reprise dans du tampon d'extraction (1 colonie/150 µl). 100 µl de l'extrait sont directement déposés sur la cassette, et après 15 min de migration, le résultat est lu à l'œil ou avec un lecteur (prototype) de la société NG Biotech.

### **Utilisation du lecteur :**

Le lecteur est relié à un ordinateur. Dans un premier temps, une image de la cassette est prise avec le lecteur. Il faut ensuite choisir le programme de lecture adéquat (test une cible ou multiplexe). L'image acquise est analysée et une valeur ne sera donnée par l'appareil que si le signal de la ligne test est positif. Concernant le multiplexe, en plus de la valeur, l'appareil donne également le nom de la ligne test correspondante, identifiant de ce fait la ou les carbapénémase(s) détectée(s).

## **6.2. Validation d'une utilisation en routine**

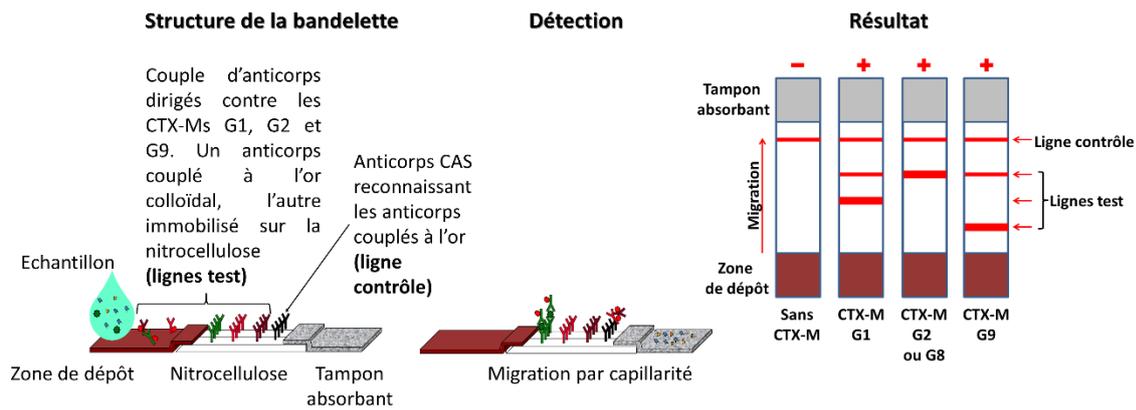
Le test CTX-M-G1 sous un format commercial a été testé avec 100 souches isolées sur boîtes, issues d'échantillons cliniques, du Service de bactériologie et hygiène du centre hospitalier du Kremlin Bicêtre.

Les mono-tests NDM, OXA-48 et le multiplex sous un format commercial ont été testés avec des souches reçues quotidiennement au CNR car présentant une sensibilité diminuée à au moins un carbapénème.

## **7. Détection dans l'urine et les hémocultures des CTX-Ms**

### **7.1. Préparation des bandelettes**

Des bandelettes avec un format laboratoire sont préparées comme déjà décrit en déposant sur la même membrane les anticorps de capture choisis pour la détection des CTX-M-2, -14 et -15. Il y aura donc sur la bandelette trois lignes test et la ligne contrôle, ce test sera nommé CTX-M 4G (voir Figure 43).



**Figure 43 : La description du test bandelette CTX-M 4G**

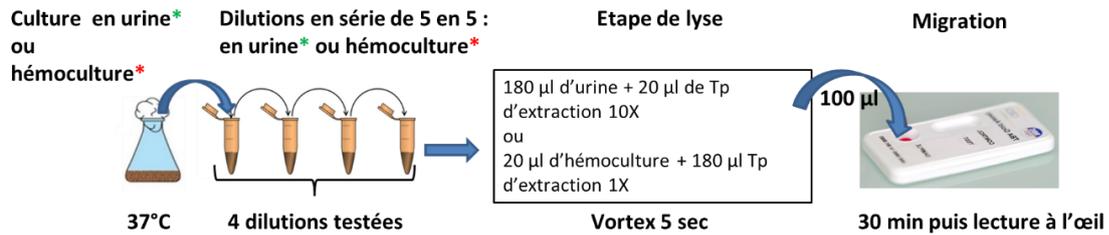
## 7.2. Préparation du traceur or colloïdal

Les trois anticorps choisis comme traceurs sont couplés à l'or colloïdal dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites. Ils sont ensuite réunis en une seule solution constituée d'1/3 de chaque traceur-or.

## 7.3. Préparation et dosage des échantillons en urine

L'urine utilisée est celle de l'expérimentateur. Les protéines recombinantes sont diluées dans cette urine avant les dosages. Des bactéries exprimant les CTX-Ms sont cultivées dans cette urine à 37°C sous agitation. Pour le dosage, 1 volume de tampon d'extraction (10X) est ajouté à 9 volumes d'échantillon. 100 µl de cet extrait sont ajoutés à 10 µl du traceur dans des puits de plaques de microtitration. La bandelette est déposée dans le mélange et les résultats lus au bout de 30 min (voir Figure 44).

## 7.4. Préparation et dosage des échantillons en hémoculture



**Figure 44 : Préparation et traitement d'échantillons en urine et hémoculture**

Urine\* - miction de l'expérimentateur, Hémoculture\* - hémoculture négative (Bact/Alert®FA Plus/Biomérieux)

Le contenu de flacons d'hémoculture négatifs (Bact/Alert®FA Plus/Biomérieux) est récupéré. Les protéines recombinantes sont diluées dans l'hémoculture avant les dosages. Des bactéries exprimant les CTX-Ms sont cultivées dans l'hémoculture à 37°C sous agitation. Pour le dosage, 1 volume d'échantillon est ajouté à 9 volumes de tampon d'extraction (1X) et 100 µl de cet extrait sont ajoutés à 10 µl du traceur. La bandelette est déposée dans le mélange et les résultats lus au bout de 30 min (voir Figure 44).

# **Résultats et discussions**



# Résultats et discussions

## 1. Production des protéines recombinantes

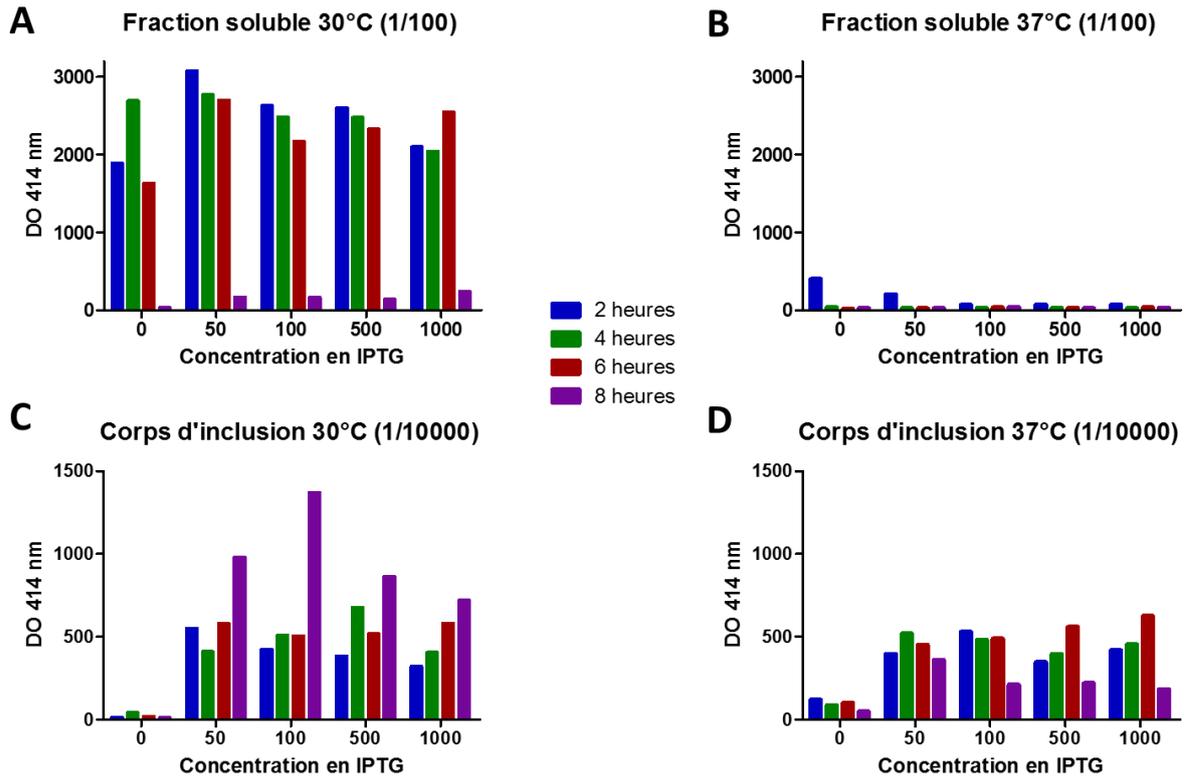
### 1.1. Bilan des conditions de culture et rendements.

Les bactéries *E coli* BL 21 (DE3) transformées avec des vecteurs portant les gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases ont été mises en culture dans deux conditions de température 30 et 37°C pour CTX-M-2 -14 et -15, NDM-1 et OXA-48. Les températures choisies pour KPC-2 sont 25 et 30°C. Après dosages des extraits bactériens, la condition « optimale » est sélectionnée. Les résultats obtenus pour les protéines sont très similaires. C'est pourquoi dans un esprit de clarté, nous avons fait le choix de ne présenter que les résultats obtenus avec CTX-M-15 (Figure 45).

Des deux températures testées, c'est à chaque fois la plus basse qui répond aux attentes (voir Figure 45A et Figure 45B).

Les conditions (température, concentration en IPTG et durée de culture) permettant d'obtenir le meilleur taux d'expression de protéine recombinante soluble ont été retenues pour une production à grande échelle.

Les quantités obtenues varient de 6,6 à 180 mg de protéine recombinante purifiée. Elles dépendent bien entendu du volume de culture mis en œuvre mais aussi de la protéine exprimée avec plus ou moins d'efficacité sous sa forme soluble avec le vecteur d'expression et l'hôte choisis. Cette efficacité est également dépendante de la concentration en IPTG. CTX-M-15 et KPC-2 sont les plus difficiles à produire sous leur forme soluble avec respectivement 0,45 et 0,33 mg pour 10 ml de culture et 50  $\mu$ M d'IPTG. Pour ces deux protéines, une accumulation rapide sous forme de corps d'inclusion est observée comme illustré pour CTX-M-15 avec la Figure 45C.



**Figure 45 : Cinétiques d'expression pour CTX-M-15 recombinante**

Signaux obtenus avec un lecteur de plaques de microtitration (lecture à 414 nm). **A** - dosage des fractions solubles au 1/100, culture à 30°C. **B** - dosage des fractions solubles au 1/100, culture à 37°C. **C** - dosages des corps d'inclusion au 1/10000, culture à 30°C. **D** - dosage des corps d'inclusion au 1/10000, culture à 37°C.

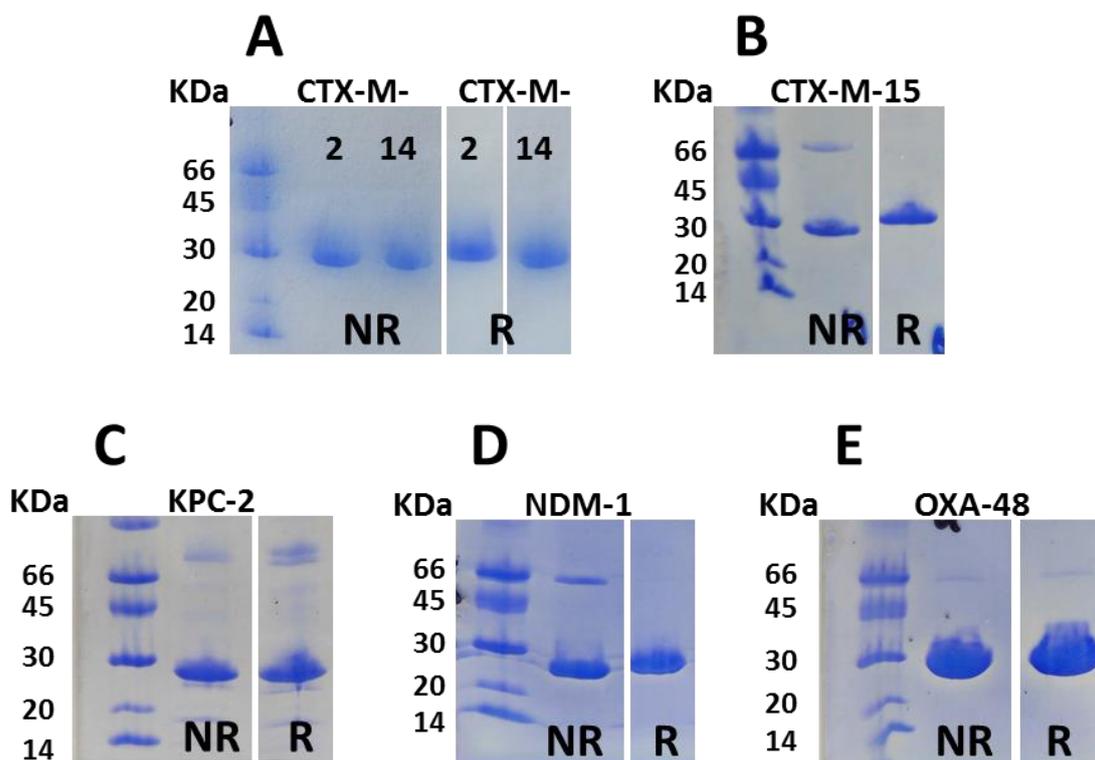
Le tableau ci-dessous rassemble les conditions « optimales » de culture définies ainsi que les quantités et rendements (après un seul passage sur colonne Ni-NTA) obtenus pour l'ensemble des protéines recombinantes produites.

Nom de la protéine	Température de culture (°C)	IPTG (μM)	Temps de culture (H)	Volume de culture (L)	Quantité purifiée (mg)	Rendement pour 100ml (mg)
CTX-M-2	30	1000	6	0,5	19	3,8
CTX-M-14	30	500	4	0,5	39	7,8
CTX-M-15	30	50	2	2	9	0,45
KPC-2	25	50	16	2	6.6	0,33
NDM-1	30	100	4	1	80	8
OXA-48	30	500	16	2	180	9

**Tableau 5 : Conditions et rendements de production des protéines recombinantes**

## 1.2. Analyse SDS-PAGE des protéines recombinantes

Pour être utilisable dans le cadre d'immunisations, une protéine recombinante purifiée doit avoir un degré de pureté élevé. En effet, si un contaminant est présent, le risque est de produire des anticorps dirigés contre ce dernier au détriment de ceux dirigés contre la protéine d'intérêt. Ces anticorps peuvent aussi être sélectionnés par la suite si le traceur est préparé à partir de cette même protéine contaminée.



**Figure 46 : Analyse SDS PAGE des protéines recombinantes purifiées**

NR : conditions non réductrices. R : conditions réductrices

Les protéines recombinantes purifiées ont été analysées sur gel d'acrylamide puis colorées au bleu de Coomassie. Pour chaque protéine, une bande majoritaire est observée proche de la masse théorique attendue (voir Tableau 2) en condition non réductrice et réductrice.

Figure 46A CTX-M-2 et CTX-M-14 montrent un taux de pureté supérieur à 95% dans ces conditions.

Concernant CTX-M-15, Figure 46B, et NDM-1 Figure 46D, en condition non réductrice une autre bande est présente à une masse correspondant approximativement au double de la masse attendue. Cette bande disparaît en condition réductrice laissant penser à la présence de dimères liés à la formation de ponts disulfures. La séquence en acides aminés de ces deux protéines comporte respectivement une et deux cystéines. Suite à une digestion trypsique, une analyse d'identification protéique au MALDI TOF réalisée sur la bande à 66 kDa pour NDM-1 a confirmé la présence suspectée de dimères.

Concernant OXA-48, Figure 46E, une bande de faible intensité à 66 kDa est présente dans les deux conditions de traitement de l'échantillon. S'il s'agit de dimères, ils ne peuvent dépendre de la formation de ponts disulfures sachant que cette protéine ne contient pas de cystéine. Du fait de sa proportion très faible par rapport à la protéine OXA-48 (ici à 9 mg/ml) et de la dilution nécessaire pour injecter 50 µg aux souris, son influence a été considérée comme négligeable.

Concernant KPC-2, Figure 46C, une bande d'une masse supérieure à 66 kDa est présente également dans les deux conditions de traitement des échantillons mais en proportion plus importante par rapport à OXA-48. Elle a été également observée après un deuxième passage sur gel d'affinité de la protéine déjà purifiée. Malgré tout cette contamination reste minoritaire, nous avons donc pris le risque d'utiliser cette protéine comme immunogène.

### **1.3. Discussion**

La condition « optimale » choisie pour l'expression d'une protéine recombinante dépend de l'utilisation envisagée pour la protéine. Cette utilisation conditionne la quantité et/ou la structure qui doit être privilégiée et donc la fraction à sélectionner : soluble ou corps d'inclusion. En effet la conformation des protéines solubles est plus proche de celle de la protéine native mais les rendements de production sont plus élevés avec les corps d'inclusion. Dans notre cas, il s'agissait de produire des anticorps monoclonaux pour la détection d'enzymes produites par des bactéries. Nous avons privilégié la structure en choisissant de ne conserver la protéine recombinante exprimée que sous sa forme soluble pour orienter la spécificité de nos anticorps. L'étiquette 6-HIS nous a permis de purifier rapidement et « spécifiquement » les protéines exprimées sans mises au point préalables car cette méthode est facilement transposable d'une protéine à une autre. Bien entendu, cette étiquette pourrait sensiblement modifier la structure, mais toutes les protéines recombinantes ont montré une activité enzymatique, indiquant une conformation proche de celle de l'enzyme « naturelle », nous confortant dans le choix du protocole utilisé. L'activité enzymatique de nos enzymes recombinantes a été vérifiée lors d'une mise en contact avec de la Nitrocéfine (Millipore).

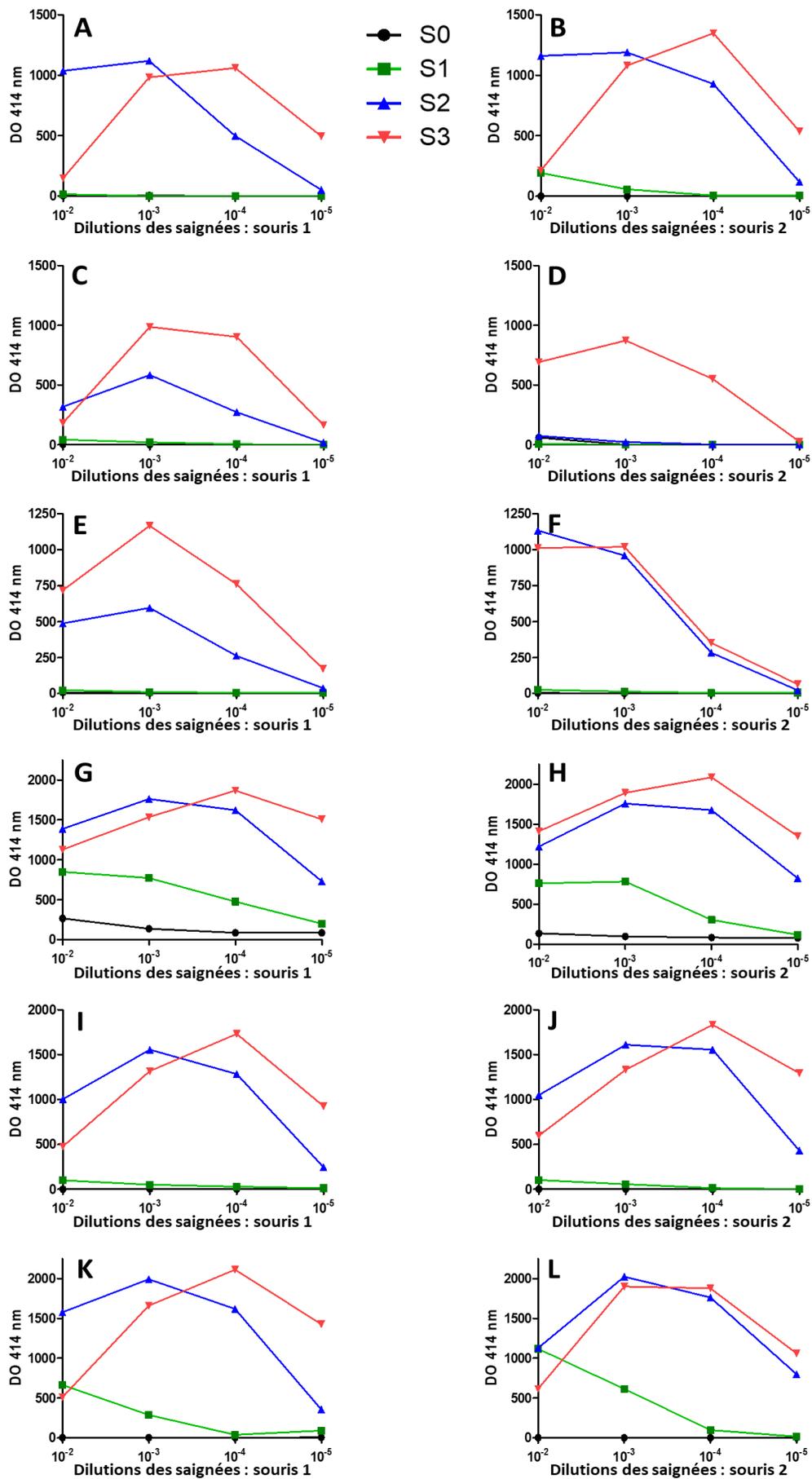
Ce constat fait, et associé à des degrés de pureté satisfaisants, l'utilisation de ces protéines recombinantes en tant qu'immunogènes était envisageable.

## **2. Obtention des anticorps monoclonaux**

L'objectif est d'obtenir des anticorps monoclonaux murins spécifiques des  $\beta$ -lactamases CTX-M-2, -14, -15, KPC-2, NDM-1 et OXA-48. Pour ce faire, 4 souris Biozzi âgées de 10 semaines ont été immunisées avec la protéine recombinante correspondante. Des prélèvements sanguins ont permis de suivre l'évolution des réponses immunitaires après chaque nouvelle injection.

### **2.1. Réponses immunitaires obtenues**

Un dosage réalisé en utilisant les prélèvements sanguins permet de suivre l'évolution de la "proportion" d'anticorps dirigés contre les protéines recombinantes circulant dans le sang des souris. Les résultats obtenus pour les deux souris avec le meilleur taux d'anticorps spécifiques pour chacune des cibles sont présentés Figure 47.

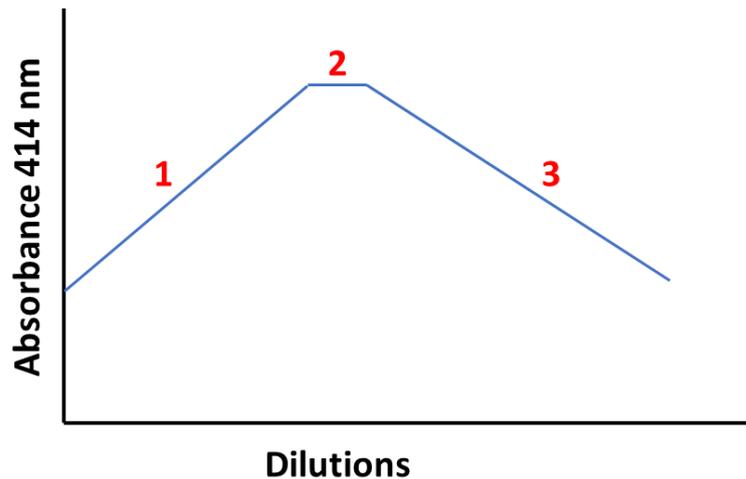


**Figure 47 : Réponses immunitaires des souris sélectionnées**

**A et B** - immunisation avec CTX-M-2, **C et D** - immunisation avec CTX-M-14, **E et F** - immunisation avec CTX-M-15, **G et H** - immunisation avec KPC-2, **I et J** - immunisation avec NDM-1, **K et L** - immunisation avec OXA-48

## 2.2. Interprétation des résultats

Si l'on considère l'ensemble des résultats obtenus (Figure 47), et principalement ceux concernant S2 et S3 on peut constater que l'allure générale des différentes courbes obtenues est celle de courbes dites en « cloche ».



**Figure 48 : Schéma des courbes illustrant les réponses immunitaires**

Comme le montre la Figure 48, on peut définir 3 zones sur ces courbes. Ces zones dépendent de la capacité de capture de la phase solide (quantité d'anticorps CAS immobilisée), de la quantité globale en anticorps, de la proportion des anticorps spécifiques par rapport à la quantité globale et de la dilution de l'échantillon. La présence en anticorps spécifiques est mise en évidence par l'utilisation de la protéine biotinylée dans le mélange réactionnel.

L'axe des abscisses correspond aux dilutions en tampon EIA des saignées testées, et l'axe des ordonnées correspond à l'intensité du signal obtenu après lecture à 414 nm.

Pour comprendre l'évolution du signal en fonction des dilutions il faut noter que deux paramètres sont constants dans ce format de dosage : la quantité de protéine biotinylée et la capacité de capture des immunoglobulines de souris sur la phase solide. Seule la quantité d'immunoglobulines totales et spécifiques diminue avec les dilutions.

**Partie 1** : dans le mélange réactionnel, la quantité totale d'immunoglobulines est en excès par rapport à la capacité de capture de la phase solide (CAS). Cependant la proportion d'immunoglobulines capturées et d'immunoglobulines spécifiques liées aux protéines biotinylées augmente avec la dilution de l'échantillon. Dans cette partie 1 le signal augmente avec la dilution de l'échantillon.

**Partie 2**, le début de cette zone correspond à la dilution qui permet d'avoir une quantité d'immunoglobulines dans le mélange réactionnel égale à la capacité maximale de notre phase solide. Cette partie peut former un plateau si la quantité d'immunoglobulines spécifiques est supérieure à la quantité de protéines biotinylées. La fin du plateau correspond à la dilution pour laquelle la quantité d'immunoglobulines spécifiques dans le milieu réactionnel correspond à la quantité de protéines biotinylées. La valeur du signal obtenu dans cette partie dépend de la "proportion" en anticorps spécifiques dans le sérum et de la quantité de protéine biotinylée présente dans le milieu réactionnel (identique pour une même enzyme).

**Partie 3** : La capacité de capture de la phase solide est supérieure à la quantité d'immunoglobulines présente et le nombre de protéines biotinylées est supérieur au nombre d'anticorps spécifiques. Dans cette partie le signal diminue lorsque la dilution augmente.

De manière générale, la proportion en anticorps spécifiques augmente au fur et à mesure des immunisations. En effet le signal correspondant au début de la partie 2 augmente le plus souvent avec le nombre d'immunisations. De même le décalage du début de la partie 2 vers des dilutions de plus en plus importantes démontre une augmentation de la concentration en immunoglobulines dans le plasma.

Considérant cela, les souris immunisées avec CTX-M-2 (Figure 47A et B), KPC-2 (Figure 47G et H), NDM-1 (Figure 47I et J) et OXA-48 (Figure 47K et L) montrent de bonnes réponses immunitaires.

Les réponses obtenues avec les souris immunisées avec CTX-M-14 (Figure 47C et D) et CTX-M-15 (Figure 47E et F) sont plus faibles. La proportion en anticorps spécifiques est soit moins importante, soit ils ont une moins bonne affinité.

Dans l'ensemble, les protéines recombinantes ont permis d'obtenir des réponses immunitaires correctes. Pour les immunogènes tels que CTX-M-2, CTX-M-14 et CTX-M-15 qui ont généré des réponses immunitaires plus modérées, un rendement de fusion élevé va être primordial pour envisager la sélection des meilleurs anticorps.

### **2.3. Fusions et criblage des anticorps monoclonaux**

Les splénocytes des deux souris avec les meilleures réponses polyclonales (Figure 47) sont fusionnés avec des cellules de myélome NS-1 et mises en culture sur 20 microplaques correspondant à 1916 puits.

Le premier criblage réalisé avec le dosage immuno-enzymatique permet de mettre en évidence les puits dans lesquels se trouvent des anticorps spécifiques, révélant la présence d'hybridomes sécrétant ces anticorps. Concernant les 6 fusions faites, le nombre de puits positifs par fusion est compris entre 827 et 1916.

Par la suite, une centaine d'hybridomes positifs sont présélectionnés et des dilutions en série, 1/10, 1/100, 1/1000, et 1/100000<sup>ème</sup>, des surnageants de culture correspondants sont analysées par dosage immuno-enzymatique. L'intensité des signaux obtenus dépendant de la concentration ainsi que de l'affinité des anticorps présents, il n'est pas possible par cette technique de comparer l'affinité des anticorps produits par les différents hybridomes car leur concentration dans les surnageants n'est pas connue. Les 20 ou 22 hybridomes avec lesquels nous avons obtenus les meilleurs signaux pour les dilutions les plus élevées sont conservés pour le clonage par dilution limite.

Le bilan des fusions et clonages est présenté dans le tableau ci-dessous.

Cible	Hybridomes positifs	Hybridomes présélectionnés	Hybridomes conservés	Anticorps monoclonaux
CTX-M-2	1640	115	20	20
CTX-M-14	1540	107	22	22
CTX-M-15	1913	100	20	20
KPC-2	1916	138	22	18
NDM-1	1520	126	22	22
OXA-48	827	171	20	20

**Tableau 6 : Bilan des fusions et clonages**

Les rendements de fusion obtenus (pourcentage de puits avec des hybridomes produisant des anticorps reconnaissant la cible) sont élevés pour l'ensemble des cibles. Par exemple on obtient un rendement de 100 % pour CTX-M-15 alors que les taux d'anticorps spécifiques pour cette cible dans les saignées étaient les plus faibles. Ces rendements permettent d'effectuer une sélection sur un très grand nombre d'hybridomes ce qui augmente la probabilité d'avoir des anticorps avec les caractéristiques recherchées (affinité et spécificité). Concernant les anticorps KPC, 4 hybridomes ont été perdus au cours des étapes de clonage (mort des cellules, perte ou mutation du gène codant pour l'anticorps).

## 2.4. Isotypes et classe des anticorps monoclonaux

La classe d'un anticorps est déterminée par l'isotype de la région constante de ses chaînes lourdes. Il existe 5 types de chaînes lourdes ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ) qui définissent 5 classes d'immunoglobulines (IgM, IgD, IgG, IgA, IgE). Il existe pour les IgG et IgA des sous classes  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$  ou  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  correspondant aux IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ou IgA1 et IgA2.

Concernant les 122 anticorps produits lors de ces travaux, il y a 121 IgG1s et un IgA (KPC 411). Le test d'isotypage utilisé ne permet pas d'identifier la sous classe des IgA.

## **2.5. Obtention des anticorps monoclonaux purifiés**

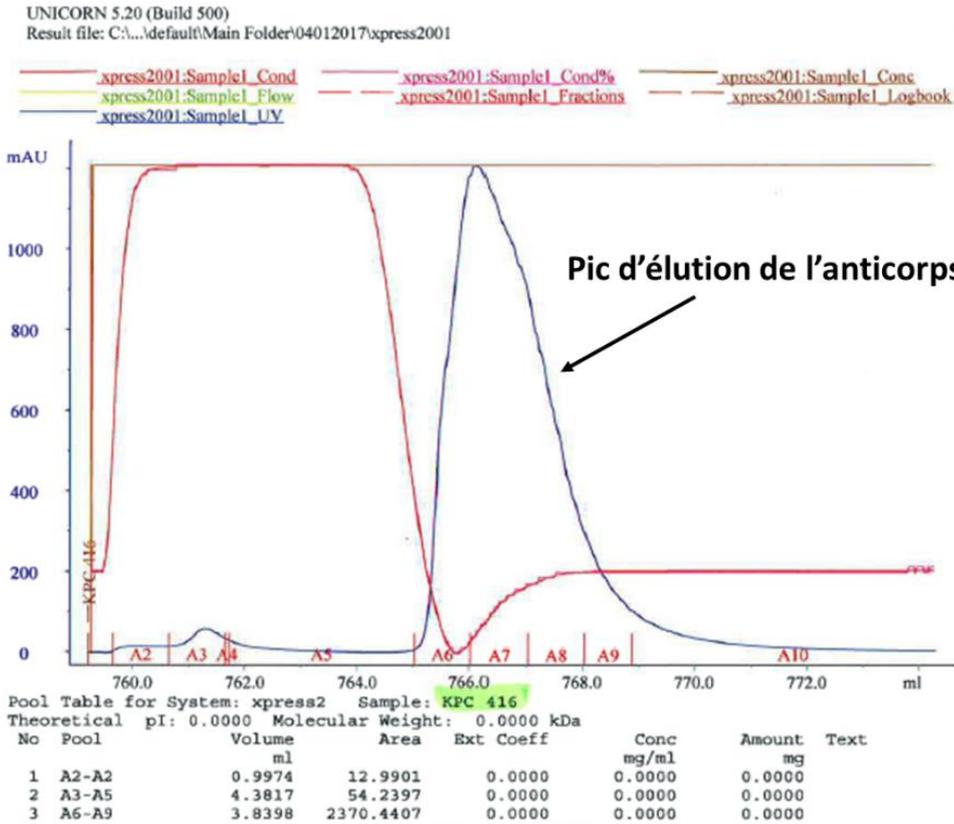
Il ne sera présenté dans cette partie que les résultats concernant les anticorps KPC car ils sont représentatifs de l'ensemble des anticorps produits lors de ces travaux.

### **2.5.1. Production et purification des anticorps**

Pour chaque AcM, 100 ml de surnageant de culture sont produits. Les AcM contenus dans le surnageant sont purifiés par la méthode appropriée en fonction de leur classe.

Les IgG1 sont purifiées par chromatographie d'affinité, avec un gel sur lequel est couplé de la protéine G. L'ensemble des étapes de cette purification est réalisé à l'aide d'un automate (Äktaxpress, GE Healthcare). La protéine G lie les chaînes lourdes des IgG, mais pas celles des IgA comme KPC 411. Par conséquent, cet anticorps a été purifié manuellement avec un gel sur lequel a été couplé de la protéine L (GE Healthcare) qui lie les chaînes légères, en respectant les mêmes étapes que la méthode automatisée et avec les mêmes tampons.

Les anticorps purifiés sont ensuite dialysés en tampon phosphate 50 mM pH 7,4.



**Figure 49 : Résultat d'une purification d'anticorps avec l'Äktaxpress**

Capture d'écran des résultats obtenus pour la purification de l'anticorps KPC 416. Courbe bleue, absorbance à 280 nm. Dans ce cas, les fractions contenant l'anticorps purifié sont A6, A7, A8 et A9.

### 2.5.2. Concentration des anticorps purifiés

Nom	mg/ml	Nom	mg/ml
KPC 402	1,64	KPC 412	0,86
KPC 404	1,00	KPC 414	1,51
KPC 405	1,40	KPC 415	1,12
KPC 406	0,76	KPC 416	1,06
KPC 407	0,94	KPC 418	1,13
KPC 408	1,43	KPC 419	0,73
KPC 409	1,38	KPC 420	0,66
KPC 410	1,05	KPC 421	2,17
KPC 411	1,09	KPC 422	1,19

**Tableau 7 : Concentrations des anticorps KPC purifiés**

L'absorbance de chaque solution d'anticorps est mesurée au Nanodrop et sa concentration est donnée par l'appareil. Les concentrations obtenues sont comprises

entre 0,86 et 2,17 mg/ml par exemple pour les anticorps dirigés contre KPC. Des valeurs similaires ont également été obtenues pour les anticorps dirigés contre les autres cibles. Les volumes obtenus se situent entre 1,5 et 3 ml, et les quantités d'anticorps sont suffisantes pour permettre la suite des expérimentations.

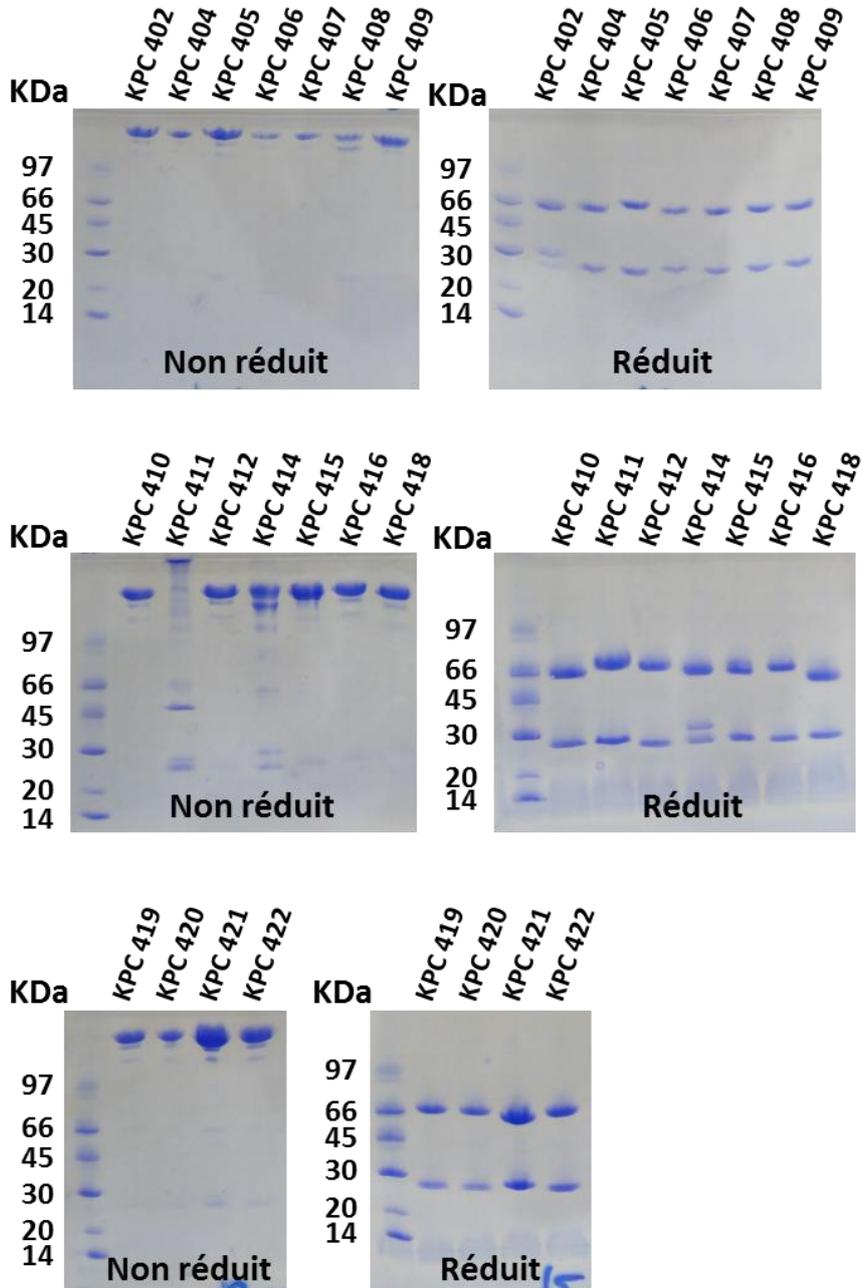
### **2.5.3. Analyse SDS-PAGE des anticorps KPC purifiés**

Les anticorps purifiés sont analysés sur gel d'acrylamide (gradient 4-15 %) en conditions non réductrices et réductrices afin d'évaluer leur pureté et leur intégrité (présence de dégradations ou non). La masse moléculaire moyenne d'une IgG ou IgA est proche de 150 kDa. Elle correspond aux 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères de 50 et 25 kDa chacune respectivement, qui sont observables en conditions réductrices. Voir structure Figure 38.

Les résultats obtenus lors de cette analyse qualitative pour les 20 anticorps KPC montrent pour la plupart une bande majoritaire à 150 kDa en conditions NR et deux bandes proches de 25 et 50 kDa en conditions R. La pureté de ces anticorps purifiés est évaluée comme > à 95 %, sans modification majeure de leur intégrité.

Il faut noter que KPC 411 (IgA) est sécrété majoritairement sous une forme dimérique (320 kDa), qui ne migre pas dans le gel, et une forme tronquée proche de 45 kDa, toutes deux identifiables sur la Figure 50 en conditions NR.

Pour l'anticorps KPC 414, deux bandes sont visibles au niveau de la masse théorique de la chaîne légère. Cette observation a déjà été décrite. Les cellules de NS-1 produisent une chaîne légère mais sa sécrétion n'est possible que si elle est associée à une chaîne lourde (Hs). Lors du réarrangement chromosomique, si la chaîne légère du NS-1 (Lm) est impliquée au même titre que la chaîne légère provenant du lymphocyte B (Ls), trois sortes d'anticorps peuvent être sécrétées par l'hybridome, Hs<sub>2</sub>Ls<sub>2</sub>, Hs<sub>2</sub>LsLm, Hs<sub>2</sub>Lm<sub>2</sub> (199, 200). C'est certainement le cas pour KPC 411 et les deux chaînes légères observées et de tailles différentes proviennent pour l'une du lymphocyte B et pour l'autre du myélome.



**Figure 50 : Analyse SDS PAGE des anticorps KPC purifiés**

Résultats après coloration au bleu de Coomassie

La production et la purification des anticorps monoclonaux à partir de surnageants de culture nous a permis d'obtenir des quantités d'anticorps répondant à nos besoins pour la suite de nos travaux.

#### 2.5.4. Western blot avec les protéines recombinantes

Ce test a pour but de mettre en évidence la capacité des anticorps sélectionnés à détecter la protéine recombinante dans ce format d'analyse (western blot). Cette capacité est un prérequis pour envisager d'identifier l'épitope reconnu par les anticorps à partir de peptides synthétisés sur membrane.

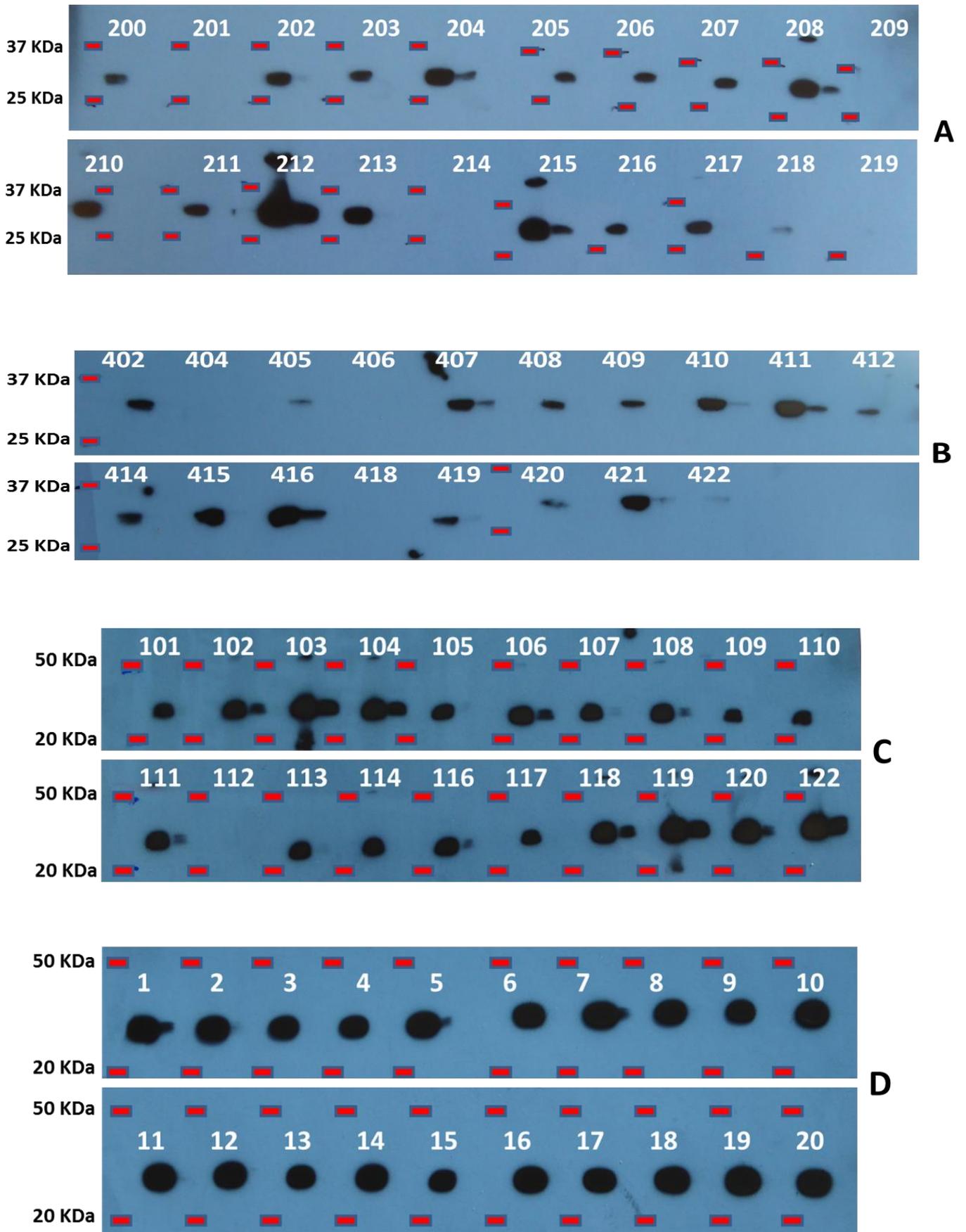
En ce qui concerne les anticorps dirigés contre CTX-M-15 (Figure 51A), NDM-1 (Figure 51C) et OXA-48 (Figure 51D), les surnageants de culture (dilution au 1/100) ont été utilisés pour réaliser le test alors que les anticorps dirigés contre KPC (Figure 51B) étaient purifiés et ont été testés à une concentration de 5 µg/ml.

Pour la majorité des anticorps testés, une bande d'une masse apparente proche de celle de la protéine recombinante est observable. Concernant les anticorps CTX 201 - 209 -214 -219 (Figure 51A), KPC 404 -406 (Figure 51B), NDM 112 (Figure 51C) aucune bande n'est observable.

Les anticorps pour lesquels il y a un signal positif dans ces conditions de dosage reconnaissent la protéine même après dénaturation par le SDS. L'épitope de ces anticorps correspond donc à une partie non ou peu structurée de la protéine native.

Concernant ceux pour lesquels il n'y a pas de signal positif observé, l'anticorps ne reconnaît pas la protéine dans ce format de dosage soit car la structure de l'épitope a été modifiée par la dénaturation, soit car l'affinité de l'anticorps pour la protéine est trop faible dans ce format de dosage.

Tous les anticorps donnant des résultats positifs pourront être testés pour tenter d'identifier leur épitope par la méthode SPOT.



**Figure 51 : Les résultats d'immunoblot avec les protéines recombinantes**

**A** - avec les anticorps dirigés contre CTX-M-15, **B** - avec les anticorps dirigés contre KPC-2, **C** - avec les anticorps dirigés contre NDM-1, **D** - avec les anticorps dirigés contre OXA-48. En blanc, numéro de chaque anticorps

## **2.6. Discussion**

Nous avons choisi de produire des anticorps monoclonaux car contrairement aux anticorps polyclonaux on peut obtenir des quantités illimitées sans que leurs caractéristiques ne soient modifiées. En effet à chaque production il faut requalifier les polyclonaux (spécificité et affinité). D'autre part les anticorps monoclonaux sont des réactifs homogènes avec des caractéristiques (spécificité et affinité) bien définies et ne contenant que des anticorps spécifiques. Ces caractéristiques des anticorps monoclonaux sont essentielles pour envisager une valorisation ultérieure de ces tests via un transfert industriel et une commercialisation.

Les anticorps produits pourraient servir d'outils dans le développement de dosages tels que l'ELISA, le western blot, ou être couplés à des techniques comme la spectrométrie de masse, afin d'effectuer des analyses de quantification d'enzymes. Ils pourraient également servir à la détection et caractérisation de souches et l'identification de mécanismes de résistance afin d'aider la communauté médicale à lutter contre leur dissémination et à mettre en place des traitements adaptés. Leur application dans un dosage type bandelette a été choisi pour répondre aux attentes des biologistes en termes de facilité de mise en place en milieu hospitalier et de leur coût réduit qui permettent un accès à ce type de test au plus grand nombre.

## **3. Les étapes de développement et de validation de nos tests**

### **3.1. Les analyses combinatoires**

Pour détecter une cible dans ce type de test, il est nécessaire de déterminer des couples d'anticorps capables de se fixer simultanément à la cible, donc reconnaissant des épitopes différents et suffisamment éloignés. Cette évaluation est faite lors de l'analyse combinatoire.

Lors de cette analyse, un format de bandelette simplifié est utilisé. Tous les anticorps dirigés contre une  $\beta$ -lactamase sont utilisés simultanément en tant qu'anticorps de capture et anticorps traceur. 324, 400 ou 484 combinaisons (en fonction du nombre

d'anticorps disponibles). Pour chaque combinaison on teste un contrôle positif (protéine recombinante à 50 ng/ml) et un contrôle négatif, ce qui correspond donc à 648, 800 et 968 bandelettes.



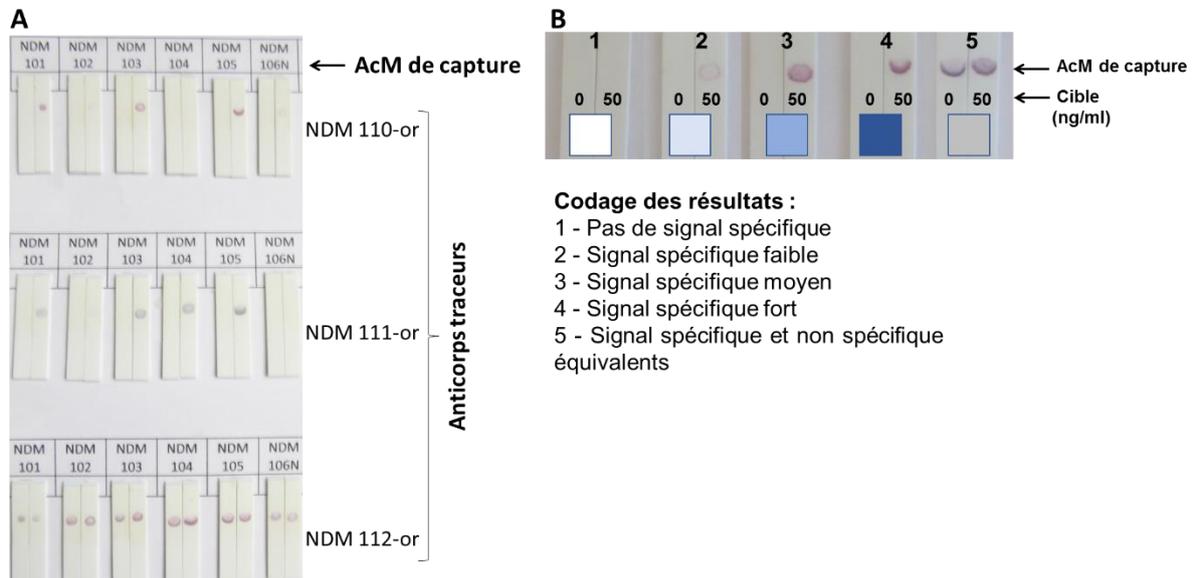
**Figure 52 : Les 800 bandelettes préparées pour une analyse combinatoire**

### **3.2. Les résultats des tests combinatoires**

Les résultats obtenus (Figure 53A) reflètent la compatibilité des anticorps en termes de reconnaissance épitopique. En effet, deux anticorps avec des épitopes identiques ou trop proches ne pourront pas lier la protéine simultanément, il n'y aura donc pas de signal spécifique en présence de la cible. De plus la capacité de l'anticorps à lier la protéine dans ce format de dosage aura une influence sur l'intensité du signal spécifique obtenu. Contrairement à un ELISA où les temps d'incubation peuvent varier d'une à plusieurs heures, dans ce format de test le temps de contact entre la cible et les anticorps est très court. En effet, pour générer un signal il faut que la cible se lie à l'anticorps traceur avant d'avoir atteint la ligne test. De plus, le complexe formé entre la cible et l'anticorps traceur doit être fixé par l'anticorps de capture au moment où il passe au niveau de la ligne test. Ce sont donc les anticorps avec la plus forte constante d'association qui donneront les meilleurs résultats.

Les signaux obtenus sont codifiés (Figure 53B) afin de remplir un tableau bilan des tests combinatoires (Figure 54, Figure 56, Figure 59, Figure 67, Figure 71, Figure 74).

Ces tableaux permettent de mettre en évidence les meilleurs anticorps de phase solide et anticorps traceurs. Ils sont identifiables par respectivement les lignes ou colonnes dont les cases avec le bleu le plus foncé sont majoritaires.



**Figure 53 : Illustration des résultats d'un test combinatoire.**

**A** : Exemple, résultats obtenus avec 5 anticorps de capture et 3 anticorps traceurs NDM. **B** : Interprétation et codage des résultats en fonction du signal obtenu.

### 3.3. Les groupes de similarité épitopique

Deux anticorps d'un couple qui ne sont pas compatibles (absence de signal) pour la détection d'une cible seront considérés comme ayant des épitopes similaires ou très proches et feront partie du même groupe. Le recoupement de tous les résultats obtenus lors du test combinatoire permet en général de classer les anticorps dans des groupes correspondants aux régions reconnues de la cible. Les groupes de similarité épitopiques sont présentés en Annexe 4 pour les anticorps CTX, NDM et KPC. Les résultats obtenus lors du test combinatoire avec les anticorps OXA ne nous ont pas permis de définir les groupes de similarité pour ces anticorps.

### **3.4. Sélection du meilleur couple pour chaque $\beta$ -lactamase**

Parmi tous les couples sélectionnés lors de l'analyse combinatoire, il faut choisir le couple qui permet de détecter les bactéries exprimant sa cible avec la meilleure sensibilité et la plus large spécificité vis-à-vis des variants dans notre format de test.

Le cheminement pour la sélection du meilleur couple a été sensiblement différent d'une cible à l'autre. Il s'est fait en fonction de l'avancée des travaux et donc des expériences acquises et constats passés, mais aussi en fonction de la disponibilité au laboratoire de souches exprimant les diverses  $\beta$ -lactamases.

Une fois ce couple choisi, ses performances sont évaluées dans un format industriel du test.

### **3.5. Préparation des bandelettes au format commercial**

L'objectif de ces travaux est de valider des tests qui permettent la détection et l'identification de souches exprimant les enzymes CTX-Ms, NDMs, KPCs, OXA-48-like ainsi que IMP et VIM.

Afin de faciliter le transfert industriel de ces tests, les anticorps sélectionnés pour les différents tests ont été fournis à un partenaire industriel (NG Biotech, Guipry). Un pré-lot industriel (1000 tests) a été produit. Des bandelettes ont été préparées pour la détection en mono-test des CTX-Ms du groupe 1, NDMs, OXA-48-like et un dosage multiplex permettant la détection simultanée des cinq principales carbapénémases (NDM, KPC, OXA-48, VIM et IMP) ainsi que de leurs variants respectifs. Ces bandelettes sont par la suite insérées dans des cassettes plastiques qui sont elles-mêmes conservées dans un sachet plastique scellé et contenant un sachet déshydratant.

Ces tests ont été évalués avec le soucier « carbapénémases » du CNR du Kremlin Bicêtre et lors d'utilisation en routine.

### **3.6. Validation des tests au format commercial**

#### **Avec le souchier « carbapénémases » du CNR**

L'ensemble des tests au format commercial a été utilisé dans des conditions proches de celles qui seront préconisées pour le futur kit à partir de colonies isolées sur gélose.

#### **Lors d'une utilisation en routine**

Les cassettes CTX-M groupe 1 ont été utilisées sur des souches, avec un phénotype BLSE, issues du laboratoire de bactériologie de l'hôpital du Kremlin Bicêtre. Les cassettes pour la détections des NDMs, OXA-48 et le multiplex ont été testées sur des souches reçues quotidiennement au CNR et ayant une sensibilité diminuée pour au moins un carbapénème.

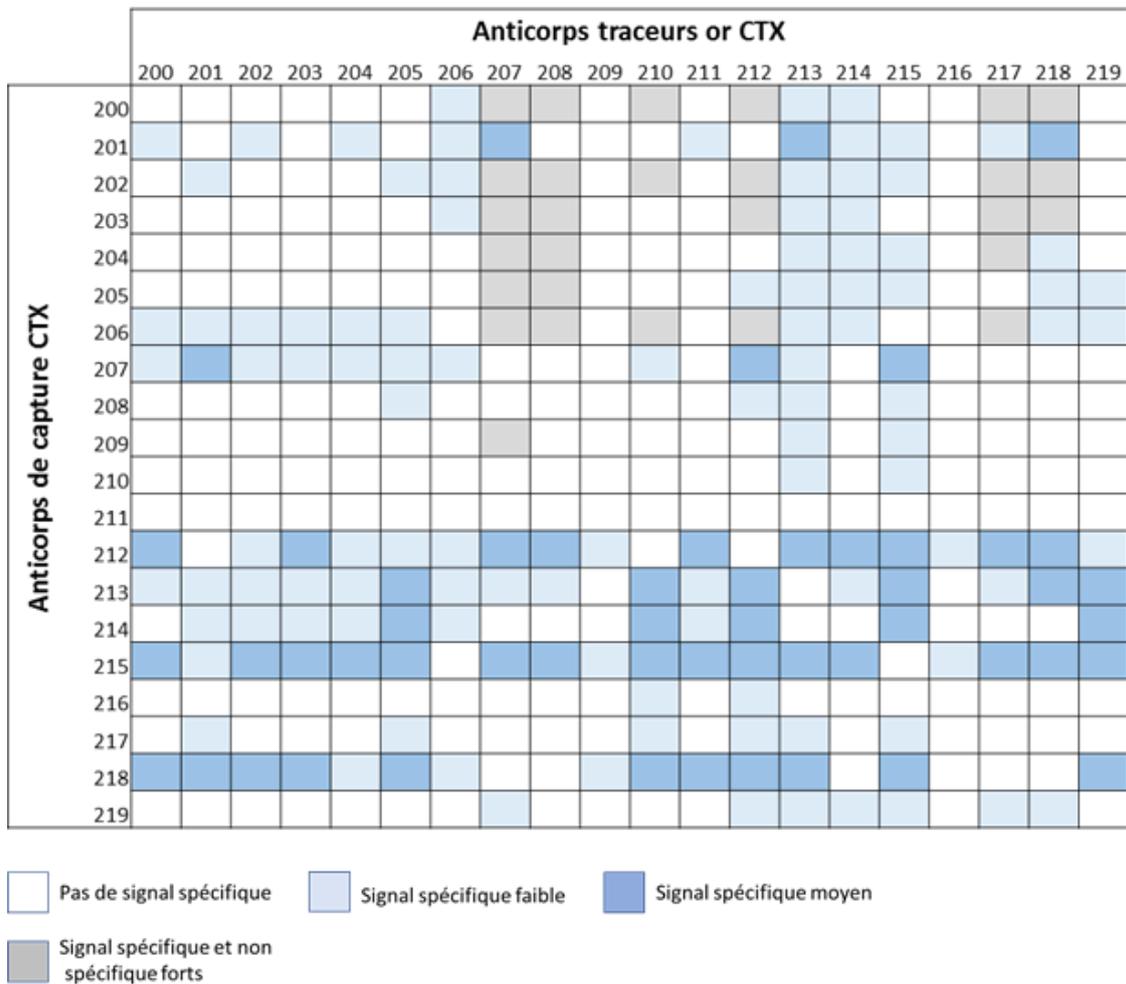
## **4. Préparation et validation des tests pour la détection des CTX-M**

CTX-M-15 est une BLSE de la famille des CTX-Ms et appartient au sein de cette famille au groupe 1. Les immunisations ont été réalisées avec la protéine recombinante correspondant à la protéine entière, avec son peptide signal (voir Annexe 2). CTX-M-15 a été choisie comme cible, et donc comme immunogène car il s'agit de la BLSE avec la plus forte prévalence, en France et dans le monde.

### **4.1. Préparation du test pour la détection de CTX-M-15**

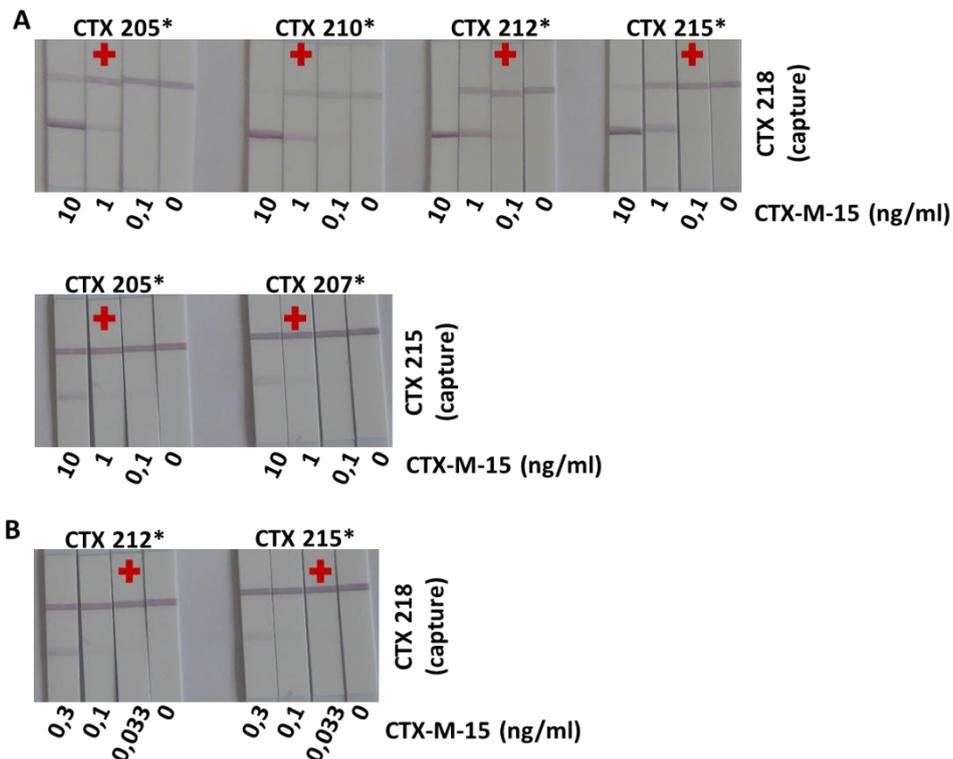
#### **4.1.1. Evaluation des anticorps avec la protéine recombinante.**

20 anticorps ont été produits puis purifiés dans le but de mettre au point ce test.



**Figure 54 : Bilan du test combinatoire pour la détection de CTX-M-15**

La Figure 54 met principalement en évidence 3 phases solides, CTX 212, 215 et 218 et 6 anticorps traceurs, CTX 205, 207, 210, 212, 215 et 219 compatibles avec ces phases solides.



**Figure 55 : Evaluation des couples pour la détection de CTX-M-15.**

**A** – Couples d’anticorps testés avec une gamme de 10 en 10 de CTX-M-15 recombinante en tampon EIA-Tween20 0,5 %. **B** – Meilleurs couples testés avec une gamme de dilutions plus resserrées de CTX-M-15 en EIA-Tween 0,5 %. \*anticorps marqué à l’or colloïdal. + plus petite concentration détectée.

Par la suite, 6 des couples identifiés ont été utilisés dans un format de test classique (lignes test et contrôle) afin de déterminer celui qui montre la limite de détection la plus faible avec la protéine recombinante. La Figure 55A montre les performances obtenues ces couples (2 mAbs en phases solides et 5 mAbs traceurs). Deux couples permettent d’obtenir un signal positif à une concentration de 0,1 ng/ml de CTX-M-15 recombinante diluée en EIA-Tween 0,5 %. Il s’agit de CTX 218/CTX 212\* et CTX 218/CTX 215\* qui semblent équivalents dans ces conditions. Ces deux couples sont ensuite testés avec une nouvelle gamme de CTX-M-15 (Figure 55B) afin de faire le choix du meilleur couple. Un signal positif est obtenu pour les deux couples pour une concentration de 0,033 ng/ml de CTX-M-15.

**Le couple CTX 218/CTX 212\* montre un signal légèrement plus intense et sera choisi.**

C'est ce couple et une souche d'*E. coli* exprimant CTX-M-15 qui seront utilisés pour la validation du tampon d'extraction. Cette validation sera décrite ultérieurement.

#### **4.1.2. Validation du test CTX-M (G1) avec le soucier « carbapénémases »**

Lors de cette étude des discordances sont apparues entre les résultats obtenus précédemment par PCR et ceux obtenus avec les tests bandelettes. L'ensemble des souches posant problème a été de nouveau analysé par PCR. Cette nouvelle analyse a confirmé l'ensemble des résultats obtenus avec les tests bandelettes. En conclusion, toutes les souches exprimant une CTX-M du groupe 1 ont donné un résultat positif, et toutes les souches exprimant une CTX-M d'un autre groupe ou n'exprimant pas de CTX-M n'ont pas été détectées (Annexe 5, colonne mono-test CTX-M). Nous avons donc obtenu **100 % sensibilité et spécificité pour la détection des CTX-M du groupe 1.**

#### **4.1.3. Utilisation du mono-test CTX-M (G1) en routine**

Les résultats obtenus sont présentés dans l'Annexe 6. Des résultats positifs n'ont été obtenus que lorsqu'une CTX-M du groupe 1 était exprimée. Ces tests ont permis de montrer également que des variants tels que CTX-M-55, -82, -101 et -182 sont également détectés.

Cette étude confirme la forte prévalence des CTX-Ms parmi les souches cliniques exprimant des BLSE. Pendant une semaine dans ce laboratoire, elle est de l'ordre de 97 %. Parmi ces 97 % on a 85,4 % de CTX-Ms du groupe 1. La proportion de CTX-Ms des groupes 2 et 9 étant de 14,5 %, le développement et la validation d'un test permettant de les détecter est primordiale.

Les anticorps monoclonaux dirigés contre CTX-M-2 (groupe 2) et CTX-M-14 (groupe 9) ont été produits pour permettre d'élargir la spécificité des tests de détection des CTX-Ms jusqu'ici limitée aux membres du groupe 1. Les immunisations ont été réalisées en utilisant les protéines recombinantes correspondant aux enzymes sans leur peptide signal.



La Figure 56 met principalement en évidence 3 anticorps de capture avec de bonnes performances dans ce format de dosage pour la détection de CTX-M-2. Il s'agit de CTX 221, 231 et 234 qui sont compatibles avec 12 anticorps traceurs.

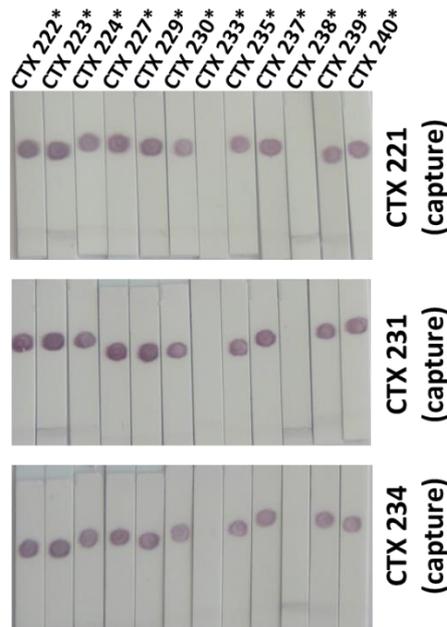
#### 4.2.2. Détection de CTX-M-2 exprimée par *E. coli*.

Une souche *E. coli* exprimant CTX-M-2 est disponible au laboratoire et un test rapide a permis de vérifier si les couples sélectionnés après le test combinatoire sont capables de la détecter. La Figure 57 montre que CTX 233 et CTX 238 ne reconnaissent pas la protéine CTX-M-2 native.

Nous disposons donc de 10 anticorps traceurs potentiels, mais seulement 5 seront testés avec des gammes d'une souche *E. coli* exprimant CTX-M-2 (Figure 58A). La phase solide CTX 231 présente énormément de signal non spécifique (NS) quel que soit le traceur utilisé dans ces conditions de dosage, et ne sera donc plus utilisée. Concernant les couples impliquant les phases solides CTX 221 et CTX 234, leurs limites de détection sont très similaires, de l'ordre de 0,01 équivalent DO<sub>600nm</sub>. Néanmoins, les signaux obtenus avec le traceur CTX 227\* semble légèrement plus intenses, ce dernier sera donc sélectionné pour la suite.

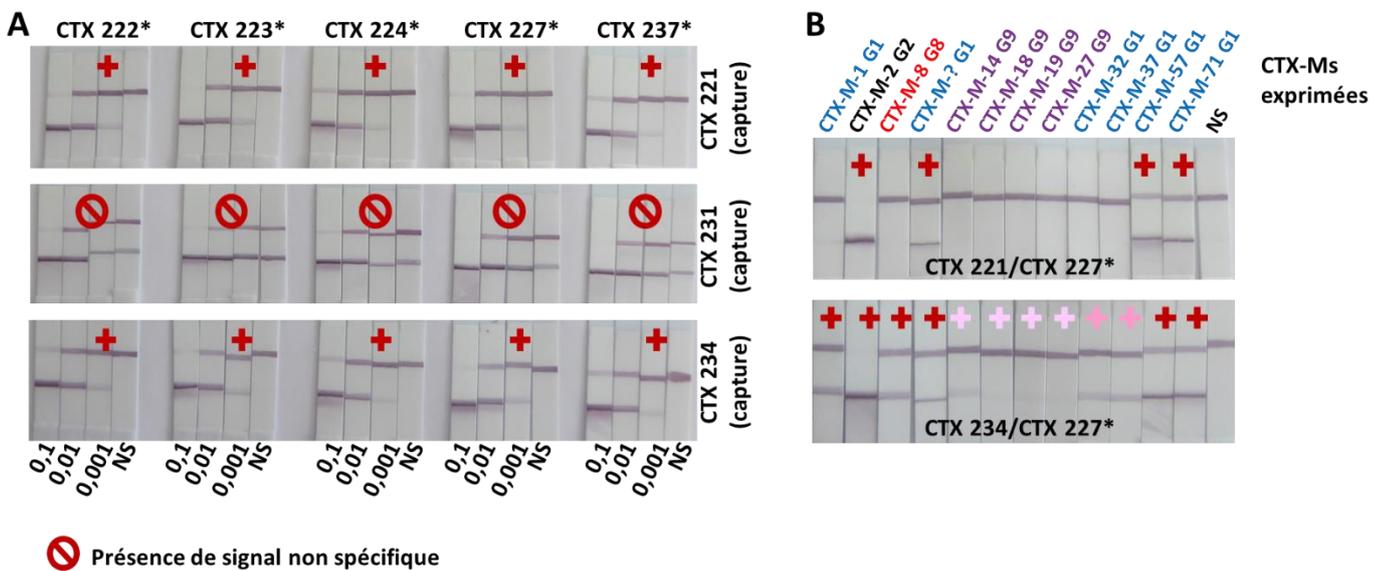
La Figure 58B montre que, bien que faisant partie du même groupe de similarité épitopique, les anticorps CTX 221 et 234 n'ont pas exactement le même épitope. En effet, lorsqu'ils sont utilisés avec le même anticorps traceur, ils ne présentent pas les mêmes spécificités pour les différents variants de CTX-Ms. Par rapport au couple CTX 221/CTX 234\*, le couple CTX 234/CTX 227\* a une spécificité plus large. En effet il reconnaît l'ensemble des variants du groupe 1 testés et plus faiblement les variants du groupe 9. Mais surtout, il reconnaît CTX-M-8 qui appartient au groupe 8 pour lequel aucune immunisation n'a été initiée.

**Le couple CTX 234/CTX 227\* est sélectionné pour sa reconnaissance de CTX-M-2 et sa polyvalence envers les autres groupes.**



**Figure 57 : Test prédictif pour la détection de CTX-M-2**

Bandelettes avec un format simplifié testées avec un extrait d'*E. coli* exprimant CTX-M-2 en tampon d'extraction 1X. \* anticorps traceur.



**Figure 58 : Spécificité des couples pour la détection de CTX-M-2**

**A** - 0,1 ; 0,01 ; 0,001 : gamme en tampon d'extraction 1X en équivalent DO<sub>600nm</sub> de *E. coli* exprimant CTX-M-2. + plus petite concentration détectée. **B** - Extraits de souches exprimant divers CTX-Ms testés avec les deux meilleurs couples. + signal fort, + signal moyen, + signal faible. \*anticorps marqué à l'or colloïdal. NS : signal non spécifique (absence de bactéries)



### **4.3.2. Tests de spécificité de tous les anticorps CTX**

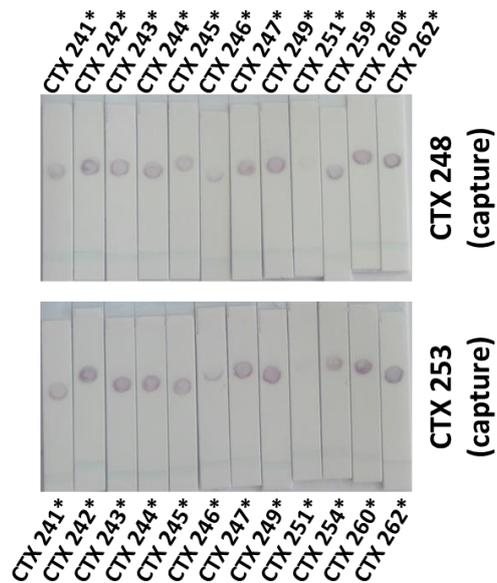
En parallèle de la combinatoire, un test de spécificité de tous les anticorps CTX a été réalisé avec les protéines recombinantes CTX-M-15, CTX-M-2 et CTX-M-14. Le but était d'identifier les anticorps capables de reconnaître les enzymes d'un autre groupe que celui pour lequel ils ont été produits. Le format utilisé pour ce test est celui du criblage en utilisant les différentes protéines recombinantes biotinylées. Ce test a révélé que certains anticorps obtenus après immunisation avec CTX-M-9 reconnaissaient ces trois CTX-M donc potentiellement 3 groupes, voir Annexe 7. Cette spécificité sera prise en compte pour le choix des anticorps pour la suite de la sélection.

### **4.3.3. Détection de CTX-M-14 exprimée par *E. coli***

Une souche *E. coli* exprimant CTX-M-14 est disponible au laboratoire et un test rapide a permis de vérifier si les couples sélectionnés après le test combinatoire sont capables de la détecter.

Sur les 6 meilleurs anticorps de capture identifiés, seuls deux seront évalués :

- ✓ CTX 248, pour mettre au point un couple capable de détecter les trois groupes de CTX-Ms (1, 2 et 9)
- ✓ CTX 253, pour mettre au point un couple spécifique du groupe 9 si les performances avec CTX 248 ne sont pas satisfaisantes pour tous les groupes

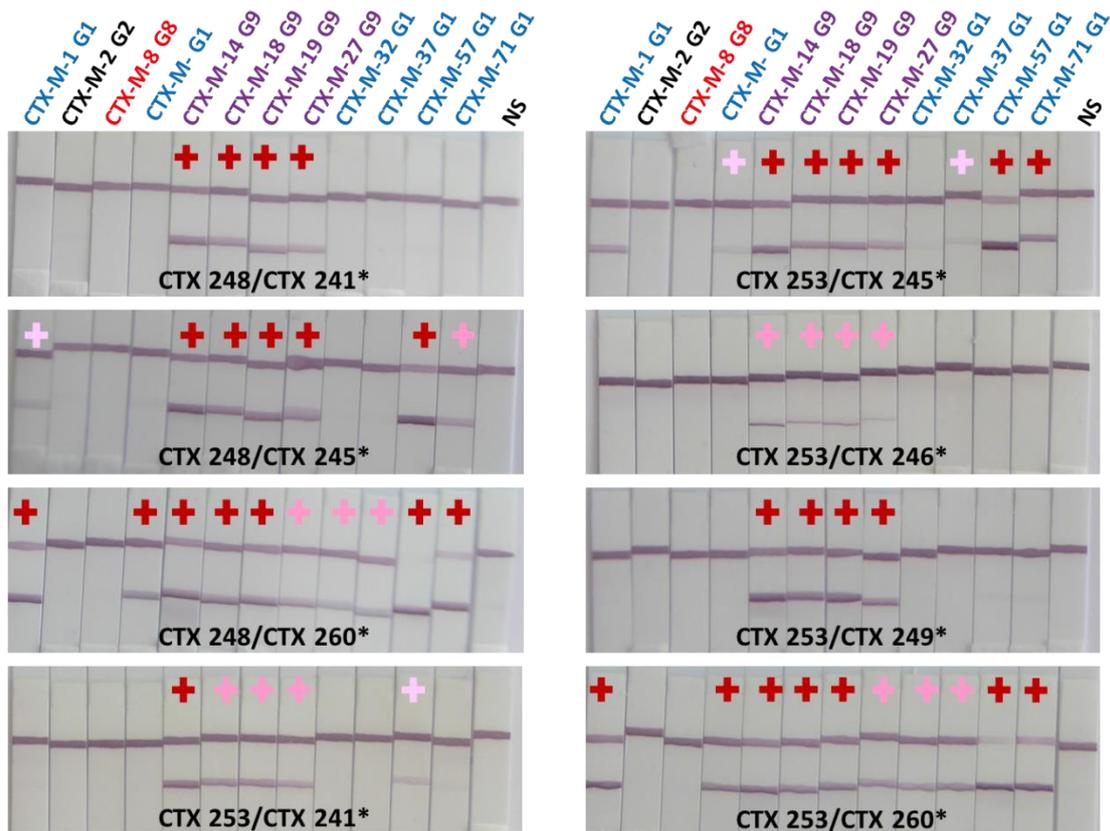


**Figure 60 : Tests prédictifs pour la détection de CTX-M-14**

Extraits concentrés de *E. coli* exprimant CTX-M-14 en tampon d'extraction. \* anticorps traceur.

La Figure 60 montre que CTX 246 et CTX 251 ne reconnaissent pas très bien la protéine CTX-M-14 native.

Au regard des résultats obtenus lors de la combinatoire et des tests de spécificité nous avons choisi de combiner CTX 248 avec les AcMs CTX 241 et 245 qui reconnaissent les trois groupes (Annexe 7) ainsi que l'AcM CTX 260 qui reconnaît le groupe 1 et 9. CTX 253 a été testé avec les trois traceurs précédents, mais aussi CTX 246 et 249 spécifiques du groupe 9.



**Figure 61 : Spécificité des couples pour la détection de CTX-Ms du groupe 9**

Extraits de souches exprimant divers CTX-Ms testés avec les deux meilleurs couples. + signal fort, + signal moyen, + signal faible. \*anticorps marqué à l'or colloïdal. NS : signal non spécifique (absence de bactéries).

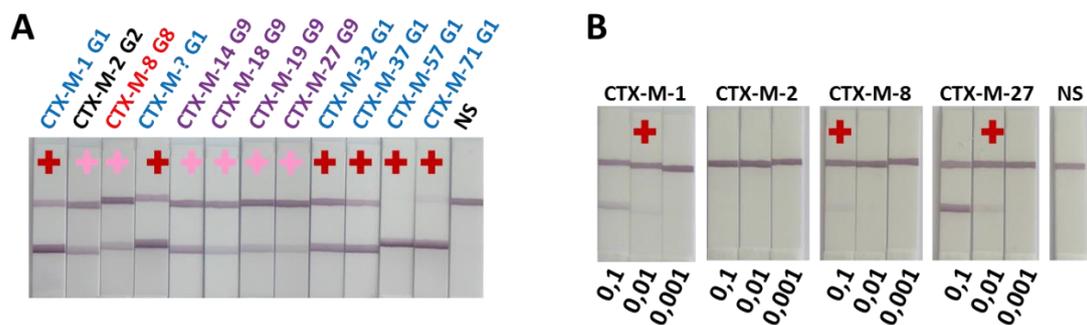
La Figure 61 montre que les couples CTX 248/ CTX 241\* et CTX 253/ CTX 241\*, CTX 253/CTX 249\* et CTX 253/ CTX 246\* sont spécifiques du groupe 9, CTX 248/CTX 260\* et CTX 253/CTX 260\* sont spécifiques des groupes 1 et 9. CTX 248/CTX 245\* et CTX 253/CTX 245\* permettent la détection des CTX-Ms du groupe 9 et de certains variants du groupe 1. Malheureusement aucun de ces couples ne reconnaît CTX-M-2 et CTX-M-8.

Il est intéressant de noter que les prédictions de spécificité des anticorps faites avec les protéines recombinantes ne sont pas toujours vérifiées lorsque l'on s'intéresse aux enzymes natives. En effet, CTX 248/CTX 241\* ne reconnaît que le groupe 9 alors qu'il reconnaissait les 3 groupes en protéines recombinantes. Inversement CTX 253 qui ne devait reconnaître que le groupe 9 permet également la détection de certains variants du groupe 1.

**Le couple CTX 253/CTX 249\* semble être le meilleur couple spécifique des CTX-Ms du groupe 9.**

La Figure 58B montre que CTX 234 reconnaît les quatre groupes alors que CTX 260 reconnaît l'ensemble des variants des groupes 1 et 9 (Figure 61). On a donc testé ces deux anticorps ensemble. Il s'avère que le couple CTX 234/ CTX 260\* est capable de reconnaître tous les groupes lorsque l'on utilise des extraits concentrés des souches (Figure 62A), par contre lorsque la quantité de bactéries est normalisée pour chaque variant, seul CTX-M-27 (Figure 62B) appartenant au groupe 9 est reconnu avec des performances acceptables pour ce type de test.

**L'idée du couple polyvalent a été abandonnée au profit d'un couple spécifique au groupe 9.**

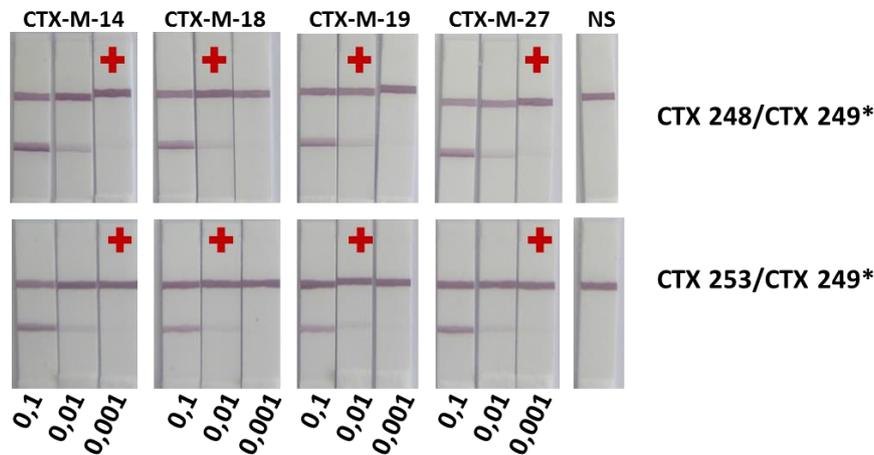


**Figure 62 : L'éventualité d'un couple « universel » CTX 234/CTX 260\***

**A** - Extraits concentrés de souches exprimant divers CTX-Ms. + signal fort, + signal moyen. **B** - 0,1 ; 0,01 ; 0,001 gamme en tampon d'extraction 1X en équivalent DO<sub>600nm</sub> de souches exprimant des CTX-Ms. + plus petite concentration détectée. \*anticorps marqué à l'or colloïdal. NS : signal non spécifique (absence de bactéries).

CTX 249 est le meilleur anticorps en tant que traceur mais le couple CTX 248/CTX 249\* qui semble donner de bon résultats (Figure 60) n'a pas été testé lors de la dernière expérience. C'est pourquoi le couple précédemment identifié, CTX 253/CTX 249\* est comparé au couple CTX 248/CTX 249\*. La Figure 63 montre des performances très proches en termes de limite de détection pour ces deux couples. Cependant, le signal obtenu lorsque CTX 248 est en capture étant légèrement plus

intense, le couple retenu pour la détection des CTX-Ms du groupe 9 sera CTX 248/ CTX 249\*.



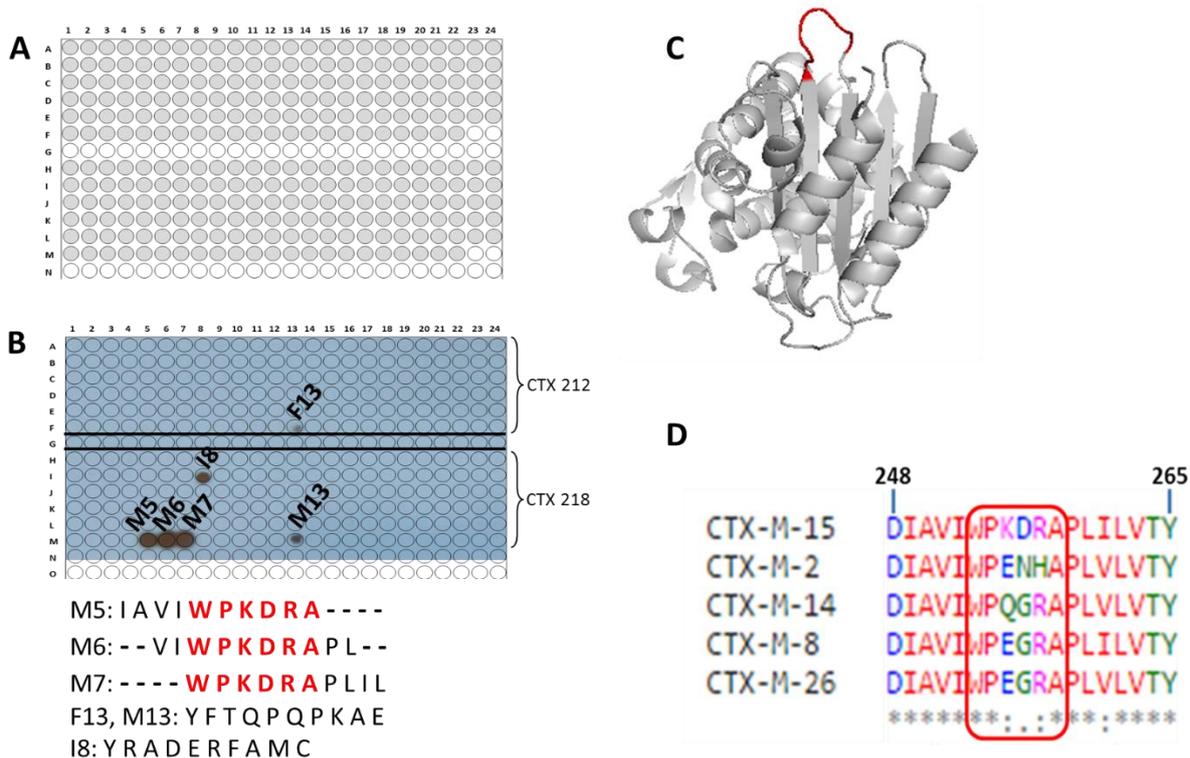
**Figure 63 : Choix final du couple pour la détection de CTX-Ms du groupe 9**  
0,1, 0 01, 0 001, gamme en équivalent  $DO_{600nm}$  de souches exprimant des CTX-Ms du groupe 9 reprises en tampon d'extraction 1X. + plus petite concentration détectée.

#### 4.4. Identification des épitopes des anticorps choisis

L'objectif était de déterminer l'épitope des anticorps impliqués dans les différents couples choisis pour les tests par la méthode SPOT. La synthèse sur membrane de peptides couvrant la séquence de la protéine a été réalisée seulement pour CTX-M-15 pour déterminer les épitopes des anticorps CTX.

L'épitope d'un anticorps peut être identifié par la méthode SPOT, si un signal positif est obtenu pour plusieurs plots consécutifs. L'épitope correspond aux acides aminés communs aux différents plots. Lorsqu'un plot isolé est positif, il s'agit d'une interaction non spécifique entre les anticorps (primaire ou secondaire) utilisés et les résidus présents sur le plot incriminé.

Sur l'ensemble des anticorps utilisés (CTX 212, CTX 218, CTX 227, CTX 234, CTX 248 et CTX 249) seul CTX 218 (Figure 64B) donne des résultats permettant l'identification d'un épitope. Cet épitope a une longueur de 6 résidus (WPKDRA) qui correspond à la séquence W253-A258 de la protéine CTX-M-15.



**Figure 64 : Identification des épitopes par la méthode SPOT.**

**A** - Masque de la membrane, les plots gris correspondent à l'emplacement des peptides couvrant la séquence de CTX-M-15. **B** - superposition du film Kodak et du masque de la membrane CTX-M-15 avec identification des peptides reconnus par CTX 218. **C** - CTX-M-15 et en rouge épitope de CTX 218 (Pymol). **D** - alignement CTX-Ms des 5 groupes avec l'épitope de CTX 218.

#### 4.5. Détection directe des CTX-Ms dans l'urine et les hémocultures

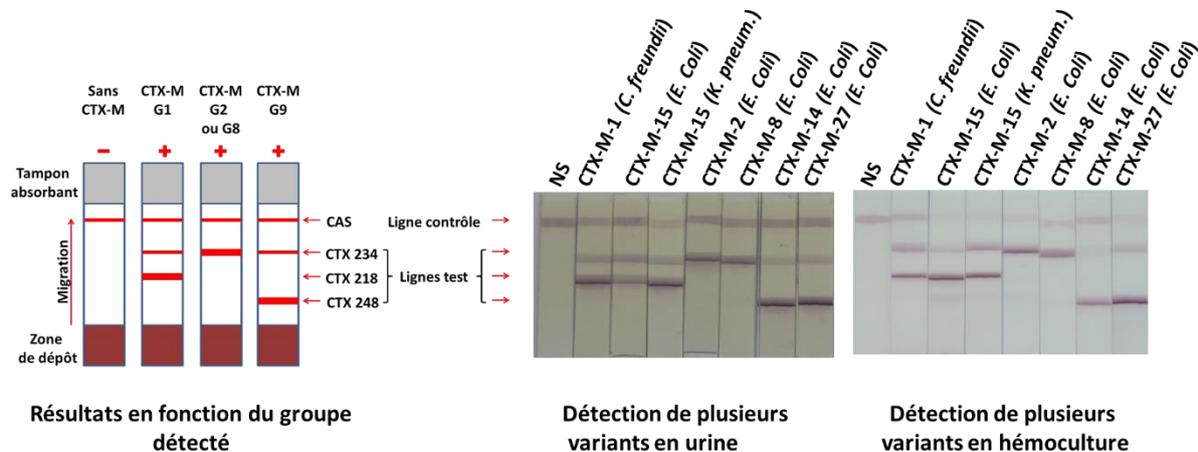
L'annexe 6 montre les 102 isolats avec un profil BLSE isolés sur une période d'une semaine au laboratoire de bactériologie de l'hôpital du Kremlin Bicêtre. Les urines (ECBU pour examen cyto bactériologique des urines) et les hémocultures sont les principaux échantillons traités et représentent respectivement 69 et 12 % des échantillons. Considérant le taux d'incidence de 96 % des CTX-Ms (pour cette semaine donnée) parmi les souches exprimant des BLSE, la détection directe de cette famille d'enzymes dans de tels échantillons sans l'étape de culture sur gélose serait un gain de temps considérable.

#### 4.5.1. La bandelette CTX-M 4G : trois lignes test

Un couple unique ne permettant pas de détecter l'ensemble des variants de ces quatre groupes, nous avons choisi un format avec trois lignes test distinctes. Ce format implique les trois phases solides choisies ultérieurement, CTX 218 (G1), CTX 234 (G2) et CTX 248 (G9) ainsi que les trois anticorps traceurs CTX 212\* (G1), CTX 227\* (G2) et CTX 249\* (G9) en mélange.

#### 4.5.2. Détection de souches CTX-M dans l'urine et les hémocultures

Après 1 heure de culture en hémoculture et 3 heures en urine de souches exprimant des CTX-Ms de différents groupes, la détection de ces dernières est effectuée après traitement de l'échantillon avec le tampon d'extraction.



**Figure 65 : Résultats obtenus avec la bandelette CTX-M 4G**

Partie de gauche, illustration des résultats obtenus avec la bandelette. Partie du milieu, résultats de détection directe dans l'urine. Partie de droite, résultats de détection directe dans l'hémoculture.

La Figure 65 met en évidence que l'utilisation de l'urine comme échantillon modifie légèrement l'aspect général de la membrane (coloration jaunâtre) par rapport à l'utilisation des hémocultures, mais sans avoir d'influence sur l'interprétation des

résultats. Toutes les souches testées représentant 4 des 5 groupes de CTX-Ms sont détectées dans les deux types d'échantillons et leur groupe d'appartenance identifiable par rapport au profil de signal attendu sur la bandelette. Ces deux matrices, dans ces conditions de dosage n'entraînent pas de signal non spécifique préjudiciable à l'interprétation des résultats.

Les limites de détections obtenues pour ce format de test en diluant la protéine recombinante soit en tampon d'extraction 1X, soit en hémoculture soit en urine sont de 32 pg/ml, 320 ng/ml et 160 pg/ml respectivement. Quant à celles obtenues pour des souches exprimant des CTX-Ms des divers groupes, elles sont proches de  $1.10^6$  cfu/ml en tampon d'extraction et en urine et de  $1.10^7$  cfu/ml en hémoculture (résultats non présentés).

## **4.6. Mise au point et sélection du tampon d'extraction**

### **4.6.1. Caractéristiques du tampon d'extraction**

Chez les bactéries Gram négatif, les  $\beta$ -lactamases sont localisées dans l'espace périplasmique. Pour que les anticorps puissent interagir avec ces dernières lors du test, il faut donc extraire ces enzymes en lysant les bactéries. Le protocole d'extraction doit être simple à mettre en place dans un laboratoire de routine et ne doit pas nécessiter de matériel spécifique. Ce tampon doit être également compatible avec des tests impliquant des anticorps.

Nous avons choisi l'utilisation d'un tampon qui désorganise la paroi bactérienne libérant ainsi les  $\beta$ -lactamases dans le milieu.

### **4.6.2. Mise au point d'un tampon d'extraction**

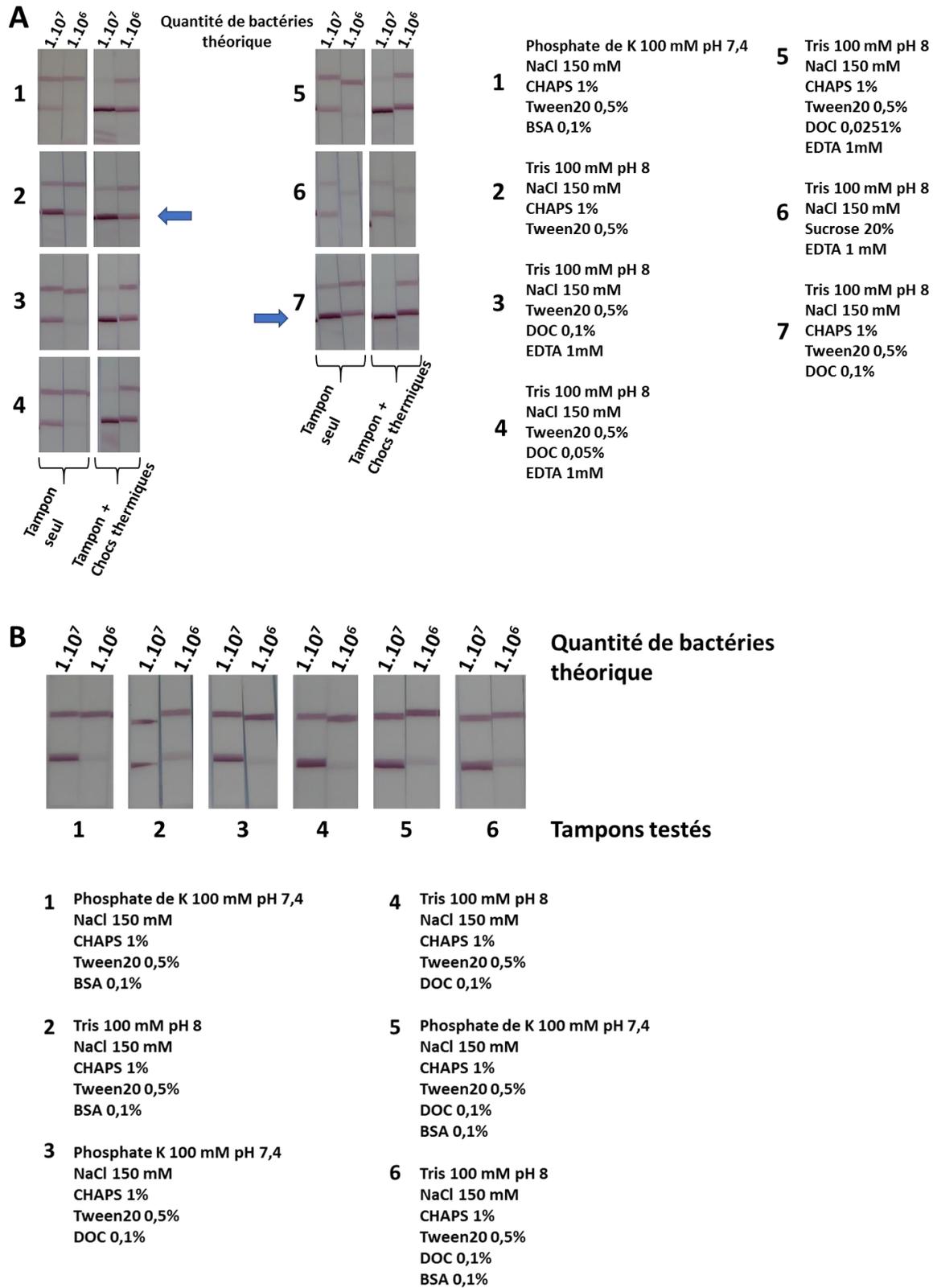
La mise au point du tampon d'extraction a été faite en utilisant une souche d'*E. coli* exprimant CTX-M-15. La quantité de bactéries traitées est normalisée par rapport à l'absorbance obtenue à 600 nm. On a considéré que 1  $DO_{600nm}$  correspondrait à  $1.10^9$

bactéries/ml de milieu. Le couple d'anticorps utilisé pour cette évaluation est CTX 218/CTX 212\*. Il s'agit du couple choisi pour la détection des CTX-Ms du groupe 1.

La Figure 66A met en évidence les performances d'extraction de 7 tampons, dans les conditions normales de leur future utilisation « Tampon seul », mais aussi après 5 cycles de congélation et décongélation « Tampon + chocs thermiques ». Les cycles de congélation et décongélation sont une méthode reconnue pour lyser les bactéries. Ainsi les tampons pour lesquels les signaux obtenus dans les deux conditions sont les plus proches sont considérés comme les plus adaptés au test. C'est-à-dire ceux qui permettent une bonne efficacité d'extraction tout en étant compatibles avec les tests immunochromatographiques.

Figure 66A montre qu'avec les tampons 2 et 7 la différence de signal entre l'utilisation du tampon seul et avec les chocs thermiques est la moins importante. Ces deux tampons sont donc les plus efficaces pour extraire les  $\beta$  lactamases tout en maintenant des conditions adéquates à la reconnaissance de la cible par les anticorps. Ces tampons sont à base de Tris 100 mM pH 8, 150 mM NaCl, 1 % CHAPS, 0,5 % Tween20 pour le tampon 2, et la même composition additionnée de 0,1 % DOC pour le 7.

Par la suite de nouveaux tampons proches de cette composition ont été évalués dans les mêmes conditions mais cette fois sans procéder aux chocs thermiques. Les résultats sont présentés sur la Figure 66B. Dans cette étude, pour une quantité théorique de  $1.10^6$  bactéries ce sont les tampons 2 et 6 qui donnent les meilleurs signaux. La seule différence entre ces deux tampons est la présence dans le tampon 6 de DOC qui ne permet donc pas d'obtenir une meilleure sensibilité. Le tampon 2 sera le tampon utilisé pour l'extraction des  $\beta$ -lactamases.



**Figure 66 : Choix du tampon d'extraction**

**A** : Première série de tampons testés. **B** : Deuxième série de tampons testés, définis à partir des résultats de la 1<sup>ère</sup> série.

Souche *E. coli* exprimant CTX-M-15 reprise dans les différents tampons.

## 4.7. Bilan et discussion

### Caractérisation et sélection des anticorps CTX

La diversité et le nombre des anticorps produits pour chaque famille de CTX-M nous permet d'obtenir des couples pour la détection de chaque protéine recombinante, avec 3, 4 ou 6 régions reconnues par les anticorps pour CTX-M-2, CTX-M-15 et CTX-M-14 respectivement, (Annexe 4).

L'analyse combinatoire a été réalisée directement dans un format bandelette avec un format simplifié mais plus proche du format final que le format ELISA qui auparavant était utilisé en première intention. Cette approche est essentielle car nous avons constaté que les meilleurs couples sélectionnés lors de combinatoires en ELISA n'étaient pas forcément les meilleurs dans un format bandelette.

L'utilisation de protéines recombinantes pour la caractérisation des anticorps et l'évaluation des couples permet de disposer de l'enzyme cible sans avoir de souche bactérienne productrice de cette enzyme. D'autre part la solution de protéine recombinante étant calibrée cela permet d'évaluer les limites de détections, et de sélectionner les couples avec les meilleures performances.

Par contre, ces résultats ne sont pas directement transposables pour la détection de la même protéine sous sa forme native. En effet, certains anticorps bien que reconnaissant la protéine recombinante ne reconnaissent pas la protéine native (CTX 233 et CTX 238 par exemple). Ces discordances sont dues à des différences de conformations entre la protéine native et la protéine recombinante, même si elle est issue de la fraction soluble.

Par conséquent l'utilisation de souches exprimant naturellement la cible doit se faire très tôt dans les étapes de sélection afin de ne choisir que des anticorps reconnaissant la cible sous sa forme native et avec la meilleure affinité possible. D'autre part l'utilisation de souches produisant différents variants (identifiés et caractérisés) nous permet d'affiner l'étude de la spécificité de nos anticorps. L'utilisation des souches nous permet également d'être plus proche des conditions réelles d'utilisation car elle prend en compte également les capacités d'extraction du tampon de lyse.

L'utilisation de souches produisant les  $\beta$ -lactamases d'intérêt ont permis de choisir des couples avec des limites de détection comprises entre  $1.10^5$  et  $1.10^6$  cfu/ml ce qui est comparable à des tests déjà décrits et développés au laboratoire (201).

### **Détermination des épitopes**

Les cibles de ces dosages sont des protéines bactériennes dont le nombre de variants est en constante augmentation. Une mutation entraînant la modification de l'épitope d'un des anticorps du couple conduirait à de faux négatifs préjudiciables pour la prise en charge du patient porteur d'une souche avec une telle mutation. Pour anticiper ce problème, nous avons tenté de déterminer les épitopes des anticorps choisis pour les différents couples. Bien que tous les anticorps soient capables de reconnaître leur cible en western blot, donc sous une forme dénaturée, la méthode SPOT qui présente des épitopes linéaires n'a permis d'identifier l'épitope que pour un seul des 6 anticorps testés. Les 5 autres anticorps nécessitent donc une structure a minima conservée par la protéine en western blot pour reconnaître leur épitope. Une autre technique devrait être mise en œuvre pour identifier les épitopes reconnus par ces anticorps. Une approche en spectrométrie de masse après digestion ménagée des anticorps et de l'enzyme seuls ou du complexe cible/anticorps, et analyse différentielle des peptides obtenus, est actuellement à l'étude au sein du service. Néanmoins, les premiers résultats montrent que l'épitope défini par cette méthode est moins précis que par la méthode SPOT, et identifie une région d'une taille comprise entre 30 et 50 résidus.

L'épitope identifié pour CTX 218 correspond à un épitope de surface et est spécifique des CTX-Ms du groupe 1 (Figure 64C). Il est donc logique que le couple CTX 218/CTX 212\* ne reconnaisse que ce groupe de  $\beta$ -lactamases.

Concernant les anticorps dirigés contre CTX-M-2, certains anticorps appartenant au même groupe de similarité épitopique que les anticorps CTX 227 et CTX 234 n'ont pas les mêmes spécificités vis-à-vis des groupes de CTX-Ms ni entre les variants d'un même groupe. Par exemple, CTX 221 et CTX 234 associés au même anticorps traceur (CTX 227\*) ne reconnaissent pas les mêmes variants, voir Figure 58B. Ces anticorps ont certainement des épitopes différents que CTX 227 et CTX 234 mais trop proches pour permettre leur fixation simultanée sur la protéine.

Jusque-là, l'ensemble des souches exprimant des variants de chaque enzyme ont été reconnues par les couples choisis pour la préparation de bandelettes commerciales. Les épitopes reconnus seraient donc assez conservés au sein de chaque « famille ».

### **Validation du mono-test CTX-M G1**

Le mono-test CTX-M (G1) a donné 100 % de spécificité et de sensibilité, lors de la validation et de l'utilisation en routine, pour la détection de souches exprimant une CTX-M du groupe 1 qui représentent environ 82 % des souches cliniques exprimant des BLSEs.

Dans un contexte où CTX-M-15 et les autres membres du groupe 1 sont prédominants, ce test présente un grand intérêt pour le diagnostic rapide des BLSEs, et un produit commercial est d'ores et déjà commercialisé.

Dans le cadre d'une étude épidémiologique, il permettrait d'orienter les tests PCR de confirmation par le choix des amorces appropriées avant l'étape de séquençage.

### **Utilisation du test CTX-M 4G**

Concernant le test CTX-M 4G, il a également été testé sur des colonies isolées sur géloses avec 100 % de sensibilité et de spécificité envers les 4 groupes de CTX-M. On peut supposer que ces performances seraient les mêmes dans un format commercial. Son utilisation directe avec des échantillons cliniques serait un atout majeur et semble envisageable car dans nos conditions d'utilisation, les matrices comme l'urine et l'hémoculture influencent peu la visualisation et l'analyse des résultats. L'urine entraîne une baisse de sensibilité en ce qui concerne la protéine recombinante par rapport à une détection en tampon d'extraction seul. Cette baisse pourrait être due à l'effet de l'urine sur les capacités de capture des anticorps, ou à un changement de la conformation de la protéine recombinante dans ces conditions. Par contre lors de la culture d'une souche exprimant CTX-M-15 dans l'urine, aucune baisse de signal n'a été observée par rapport à la même souche cultivée en tampon. Il

semblerait donc que l'enzyme sous sa forme native soit moins sensible aux effets induits par l'urine. D'autre part ce résultat montre que l'urine n'a pas d'effet sur la capacité de capture des anticorps.

Par contre une limite de détection de  $1.10^6$  cfu/ml semble insuffisante pour pouvoir détecter toutes les urines de patients contaminées. Les tests ont été faits avec l'urine d'une personne saine inoculée. Il faut noter que les urines de patients présentent des aspects différents avec possibilité de présence de cellules et ou cristaux par exemple qui pourraient avoir des répercussions sur notre dosage, et ce point nécessite d'être évalué. Une étude plus approfondie devrait être réalisée avec un nombre conséquent d'urines de patients afin de valider la méthode et estimer la proportion de porteurs de BLSE qui ne serait pas détectée par notre test.

Concernant le test avec des hémocultures, la coloration de l'échantillon ne pose pas de problème car la dilution au 1/10 dans le tampon d'extraction limite la coloration de la membrane. Nos limites de détection devraient être compatibles avec les concentrations atteintes dans une hémoculture positive. Lors d'une bactériémie la rapidité de prise en charge du patient est primordiale et conditionne la réussite du traitement. Avec ce test réalisable directement sur l'hémoculture, on se soustrait de l'étape supplémentaire de culture sur milieu gélosé. Ce délai supplémentaire de 16 heures dans ce contexte de pathologie grave est préjudiciable pour le patient.

Ce test CTX-M 4G serait capable de détecter 99 % des souches exprimant une CTX-M.

### **Validation du tampon d'extraction**

Les travaux précédemment décrits montrent que la limite de détection est directement liée à l'efficacité de la lyse de la paroi bactérienne par le tampon de lyse afin de rendre la cible du test accessible aux anticorps. Le tampon utilisé est à base de Tris qui déstabilise la membrane bactérienne (202), et de CHAPS, un détergeant qui solubilise la membrane des bactéries Gram<sup>-</sup> sans dénaturer les protéines ce qui rend son utilisation compatible avec notre test. Les résultats présentés montrent que le rendement d'extraction des  $\beta$ -lactamases n'est pas de 100 % puisque le signal obtenu en tampon seul est toujours inférieur en intensité à celui obtenu avec la combinaison

tampon extraction + chocs thermiques. Si l'on considère les limites de détection de nos tests (environ  $10^6$  cfu/ml), les performances du tampon choisi ne devraient pas être une limitation. En effet ces tests sont actuellement appliqués à des colonies isolées sur milieux gélosés qui correspondent à plus de  $1.10^9$  cfu par colonie.

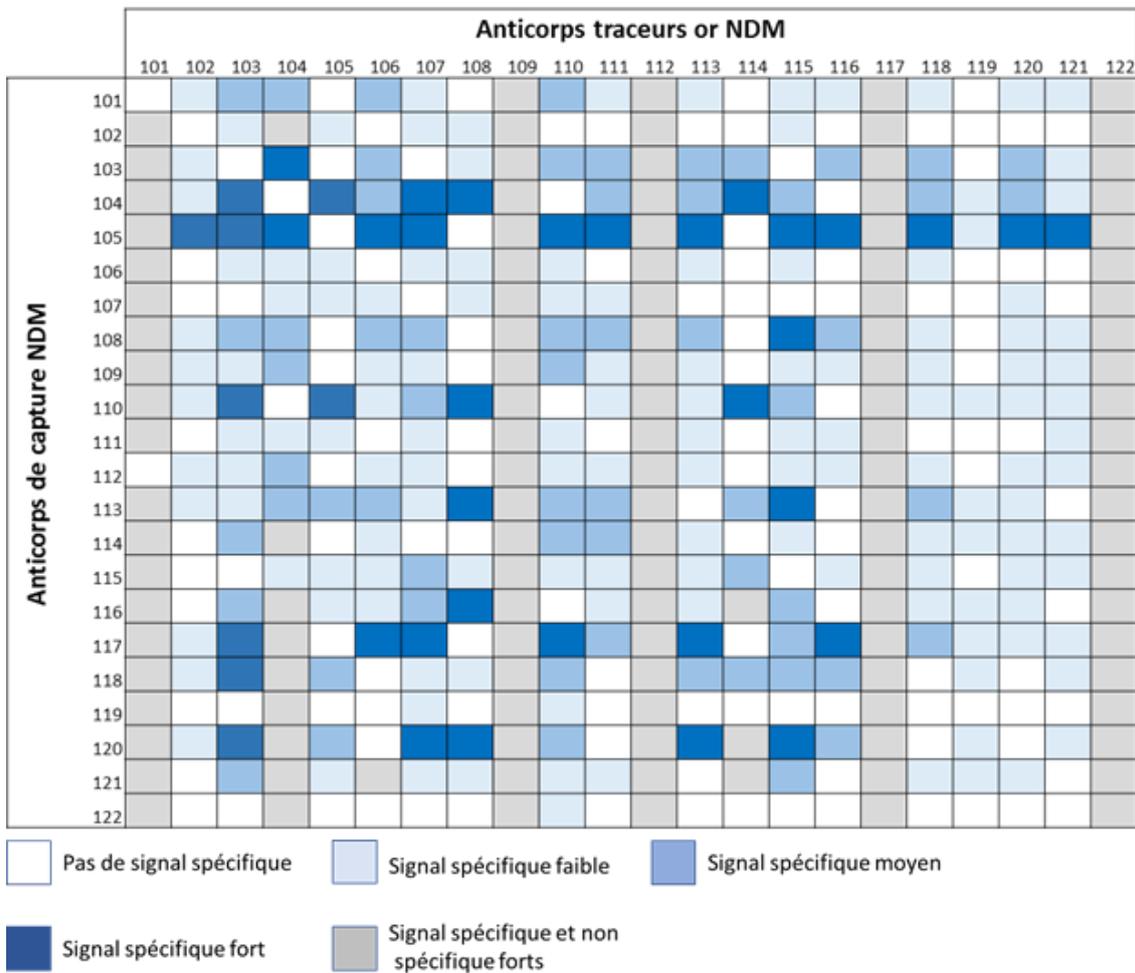
## **5. Développement et validation des tests pour la détection des carbapénémases**

### **5.1. Préparation du test pour la détection de NDM**

NDM-1 est une carbapénémase de la famille de métallo- $\beta$ -lactamase (classe de Ambler B). Les immunisations ont été réalisées en utilisant la protéine recombinante correspondant à l'enzyme sans son peptide signal (voir Annexe 2)

#### **5.1.1. Evaluation des anticorps avec la protéine recombinante**

22 anticorps ont été produits puis purifiés dans le but de mettre au point un test.

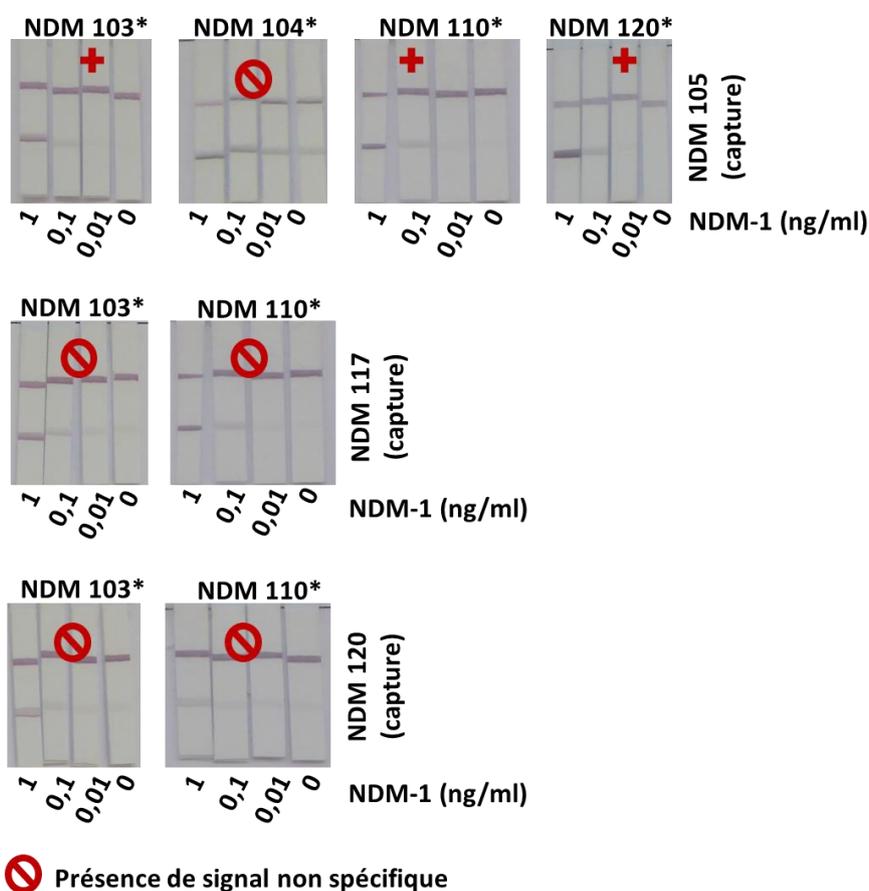


**Figure 67 : Bilan du test combinatoire pour la détection de NDM-1**

La Figure 67 met en évidence principalement une phase solide NDM 105, ainsi que NDM 104, 110, 117 et 120. Les traceurs les plus polyvalents sont NDM 103, 107, 108, et 115. De nombreux couples testés montrent la présence d'un signal non spécifique incompatible avec une utilisation pour un dosage et sont exclus des tests suivants. Les couples homologues ne montrent pas de signal positif auquel on aurait pu s'attendre du fait de la présence de dimères observée lors de l'analyse en SDS-PAGE.

23 couples ont été testés en utilisant le format de bandelette classique et une gamme de NDM-1 recombinante en EIA-Tween 0,5 %. La Figure 68 montre les résultats obtenus uniquement pour les couples présentant les meilleures limites de détection. Cette étude a permis de sélectionner deux couples NDM 105/NDM 103\* et NDM 105/NDM 120\* qui ont une limite de détection de 10 pg/ml dans ces conditions de dosage.

En considérant ces résultats, nous avons choisi le couple NDM 105/NDM 120\*.



**Figure 68 : Evaluation des couples pour la détection de NDM-1**

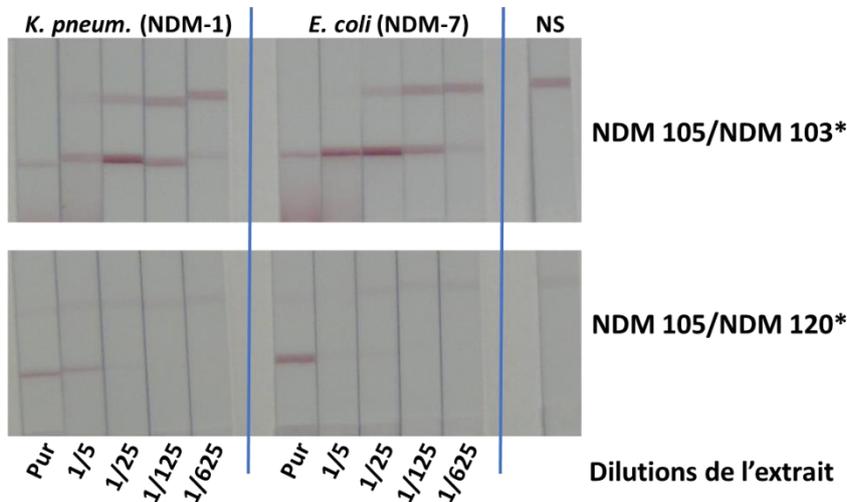
Gamme de NDM-1 recombinante (ng/ml) en tampon EIA-Tween 0,5 %. \* anticorps marqué à l'or colloïdal. + plus petite concentration détectée.

### 5.1.2. Evaluation des anticorps avec des souches NDM

Lors de la sélection du couple NDM 105/NDM 120\*, aucune souche exprimant NDM n'était alors disponible au laboratoire et le tampon d'extraction n'avait pas encore été validé. Quatre mois plus tard, les premiers tests effectués avec des souches exprimant des variants de NDM ont montré des limites de détection  $\geq 1.10^8$  cfu. Cette limite de détection (LOD) est très supérieure à nos objectifs ( $LOD \leq 10^6$  cfu).

Un nouveau couple NDM 105/NDM 103\*, qui permettait d'obtenir une LOD similaire à celle obtenue avec le couple NDM 105/NDM 120\* avec NDM-1 recombinante, a été

évalué pour la détection de deux variants, NDM-1 et NDM-7, exprimés respectivement par *K. pneumoniae* et *E. coli*.



**Figure 69 : Sélection du meilleur couple pour détecter des variants de NDM.**

Souches *K. pneumoniae* exprimant NDM-1 (partie de gauche) et *E. coli* exprimant NDM-7 (partie de droite) concentrées en LB puis diluées en tampon d'extraction 1X. NS, signal non spécifique, test en absence de bactéries

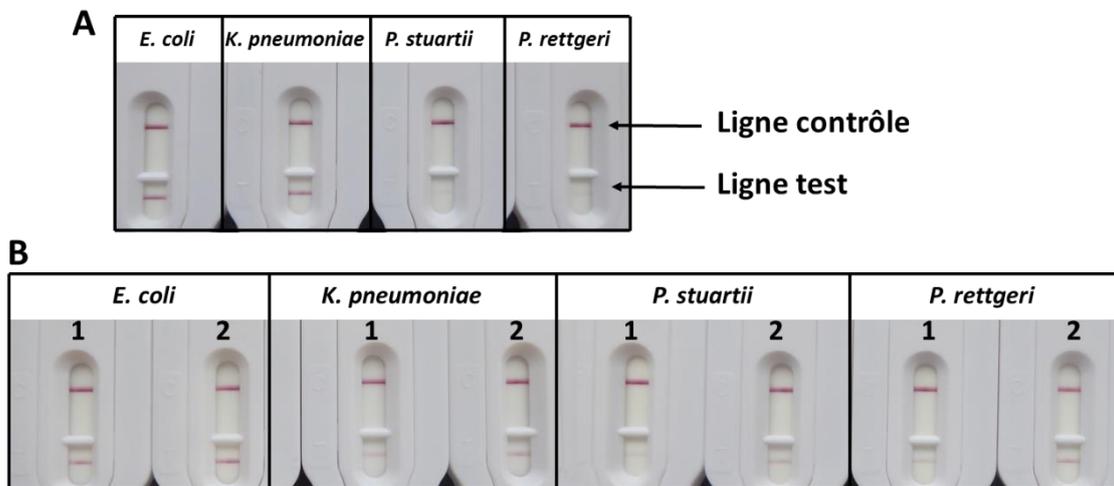
La Figure 69 montre qu'à concentration équivalente en bactérie, le couple NDM 105/NDM 103\* permet d'obtenir des signaux très supérieurs à ceux obtenus avec le couple NDM 105/NDM 120\*. Cela se traduit par une limite de détection 100 fois inférieure pour le couple NDM 105/NDM 103\* ce qui nous permet d'atteindre notre objectif pour la sensibilité de notre test. Pour ce couple, les signaux obtenus pour les premières dilutions (pur, 1/5<sup>ème</sup>) sont plus faibles que pour la dilution au 1/25<sup>ème</sup>. Pour ces premières dilutions, la quantité d'enzyme extraite est importante et certainement en excès par rapport à la quantité de traceur disponible. De ce fait, une partie des molécules de NDM qui sont fixées par l'anticorps de capture ne sont pas liées à l'anticorps-or. Inversement des molécules de NDM liées à l'anticorps traceur ne peuvent pas être capturées par l'anticorps de capture dont tous les sites accessibles sont occupés. Dans cette gamme de dilution, le signal n'est pas proportionnel à la quantité de molécules de NDM présentes.

**Le couple NDM 105/NDM 103\* qui reconnaît également les variants NDM-4, NDM-5 et NDM-6 (résultats non présentés) est sélectionné.**

### **5.1.3. Validation du mono-test NDM avec le souchier « carbapénémases »**

Au cours de cette validation seules les souches exprimant un variant de NDM ont donné des résultats positifs (Annexe 5, colonne mono-test NDM) avec pour la plupart une ligne test de couleur très intense. Pour ce test nous obtenons donc 100 % de sensibilité et de spécificité. Au cours de cette étude nous avons observé que les lignes tests positives obtenues avec deux souches, *Providencia stuartii* et *Providencia rettgeri*, productrices de NDM, avaient une plus faible intensité (Figure 70A). Les signaux plus faibles obtenus avec ces souches pourraient être dus à une quantité plus faible d'enzyme accessible par les anticorps. Cela pourrait être dû à la localisation du gène *bla<sub>NDM-1</sub>*. En effet, une localisation chromosomique ou plasmidique sous contrôle d'un promoteur faible pourrait générer un niveau d'expression plus faible. Une mauvaise extraction pourrait aussi en être la cause. En effet, un rendement d'extraction plus faible dans ces souches est observé (Figure 70B), mais c'est aussi le cas pour la souche *K. pneumoniae* qui par contre montre un fort signal positif. La première hypothèse semble donc être la plus plausible.

#### 5.1.4. Efficacité du tampon d'extraction en fonction de l'espèce bactérienne



**Figure 70 : Illustration des résultats obtenus avec les *Providencia***

**A** - Résultats obtenus avec une colonie d'*E. coli* exprimant NDM-4, *K. pneumoniae* exprimant NDM-1 et *P. rettgeri* et *stuartii* exprimant NDM-1. **B** - performance du tampon d'extraction. Pour *E. coli* et *K. pneumoniae*, 1 colonie reprise dans 1 ml de tampon d'extraction, pour *P. rettgeri* et *stuartii*, 10 colonies reprises dans 300  $\mu$ l de tampon d'extraction. L'extrait est séparé en deux et traité, 1 : seulement avec le tampon, 2 : avec le tampon et 5 cycles de congélation/décongélation puis 1 minute de sonication (14 W).

La Figure 70B montre une différence de signal moins importante entre la condition en tampon d'extraction seul et celle avec les chocs thermiques lors de l'utilisation d'une souche *E. coli* par rapport à l'utilisation d'une *K. pneumoniae* ou *Providencia*. Bien que n'atteignant pas un rendement de 100 %, le tampon d'extraction est plus efficace pour la souche *E. coli* que pour les autres souches présentées, ce qui paraît logique puisqu'une telle souche a servi à sa sélection.

#### 5.1.5. Utilisation du mono-test NDM en routine

Le mono-test NDM a été testé avec des souches montrant une sensibilité diminuée à au moins un carbapénème et reçues au CNR au moment de la validation en juin 2016.

Des PCR de confirmation ainsi qu'un séquençage ont été faits par la suite afin de valider les résultats.

71 souches ont été testées avec le test (voir Annexe 8). Les tests PCR et le Carba NP ont mis en évidence la présence d'une carbapénémase pour 34 de ces souches. Pour les 37 autres souches, la sensibilité diminuée était certainement due à la surexpression d'une BLSE et/ou céphalosporinase associée à une diminution de la perméabilité membranaire, mais ceci n'a pas été vérifié. Le mono-test NDM test a permis de détecter les 7 souches produisant des NDMs (2 NDM-1 et 5 NDM-5) dont deux souches exprimaient simultanément NDM et OXA-48 ou OXA-181. Les 27 isolats n'exprimant pas de NDM (24 OXA-48, 2 KPC et 1 VIM) ont donné des résultats négatifs ainsi que les 40 souches n'exprimant pas de carbapénémase.

La validation du test NDM a donné lieu à une publication scientifique présentée en Annexe 11 (Boutal H *et al.* Development and Validation of a Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of NDM-Producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2017 Jul;55 (7):2018–29).

## **5.2. Préparation du test pour la détection de OXA-48**

OXA-48 est une carbapénémase de type oxacillinase (Ambler classe D). Les immunisations ont été réalisées avec la protéine recombinante correspondant à l'enzyme sans son peptide signal (voir Annexe 2).

Dans la famille des OXA-48, certains variants tels que OXA-163 et OXA-405 par exemple, du fait d'une délétion de 4 acides aminés au niveau du site actif n'ont pas d'activité carbapénémase. L'idéal serait de sélectionner un couple capable de discriminer ce type de variants de ceux ayant une activité carbapénémase.

### **5.2.1. Spécificité des anticorps pour des variants d'OXA-48**

Avant les étapes de clonage, les surnageants des 20 hybridomes sélectionnés ont été testés avec des protéines recombinantes biotinylées de variants de OXA-48 (OXA-

162, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232) et deux OXA non apparentés (OXA-427, OXA-428). Le test a été fait dans les mêmes conditions qu'un dosage immuno-enzymatique décrit Figure 37. Les résultats sont présentés en Annexe 9.

Le but était d'identifier des anticorps qui ne reconnaissent pas OXA-163 et OXA-405. OXA 1, OXA 2, OXA 3, OXA 6, OXA 8, OXA 9 et OXA 13 ne semblent pas reconnaître OXA-163 et OXA 405 dans les conditions du test. Par contre, nous avons choisi de ne pas tenir compte de ce critère car les anticorps qui ne reconnaissent pas OXA-163 et OXA-405 ne reconnaissent pas non plus OXA-232.

### 5.2.2. Evaluation des anticorps avec la protéine recombinante

20 anticorps ont été produits puis purifiés dans le but de mettre au point un test.

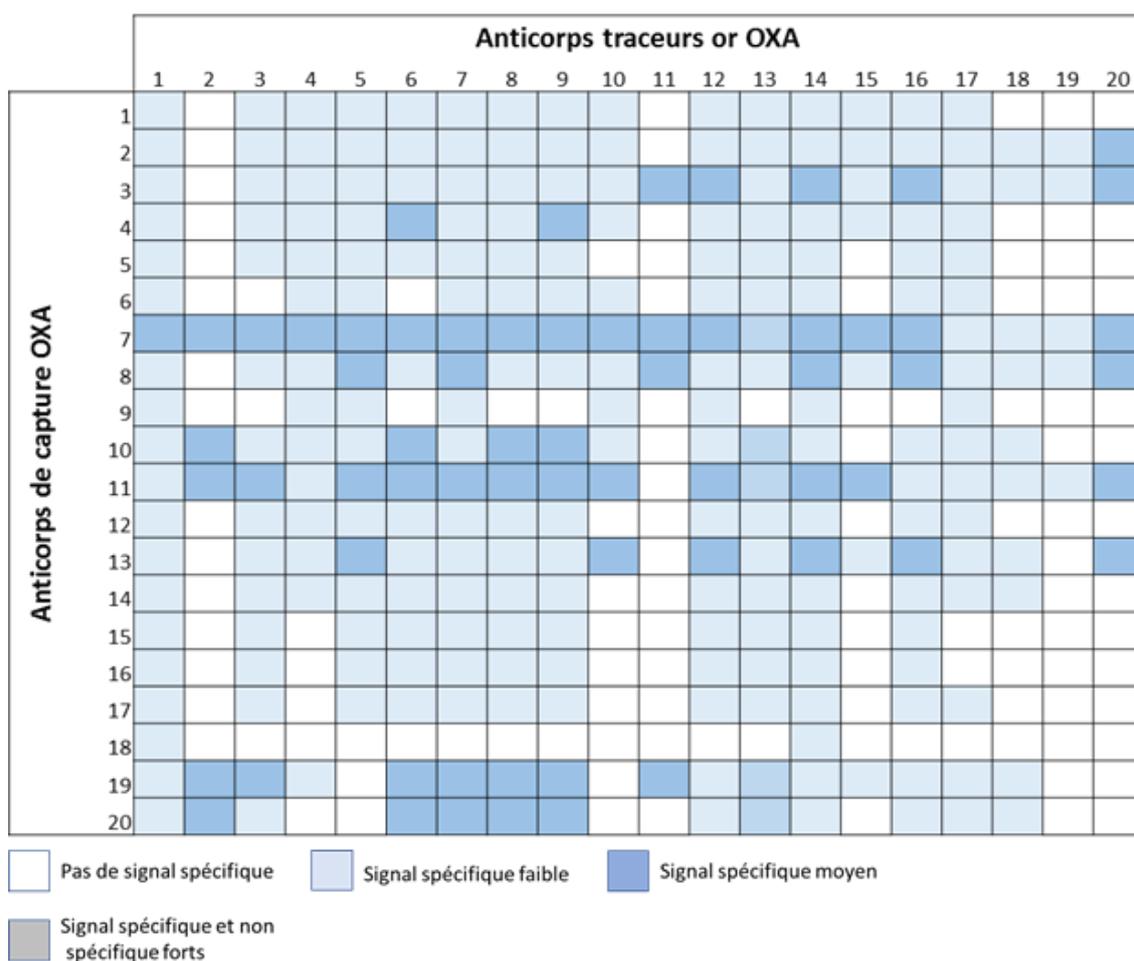


Figure 71 : Bilan du test combinatoire pour la détection de OXA-48

Le Figure 71 met en évidence 8 phases solides OXA 3, 7, 8, 10, 11, 13, 19 et 20 et la majorité des anticorps peuvent être utilisés en tant que traceur. Lors de ce test combinatoire, les couples homologues (même anticorps en phase solide et en traceur) ont donné un signal spécifique faible. Ceci n'est possible que si des dimères sont présents en solution. Bien que la Figure 46E montre une bande qui pourrait correspondre à des dimères en proportion faible, la concentration de 9 mg/ml de la solution d'OXA-48 pourrait engendrer la formation d'agrégats. Ces agrégats seraient majoritairement dissociés dans les conditions dénaturantes du SDS-PAGE mais seraient présents lors de nos tests en plus grande quantité. Nous avons par la suite évalué 49 couples, mais par souci de clarté nous ne présenterons que les résultats de 18 d'entre eux (Figure 72).

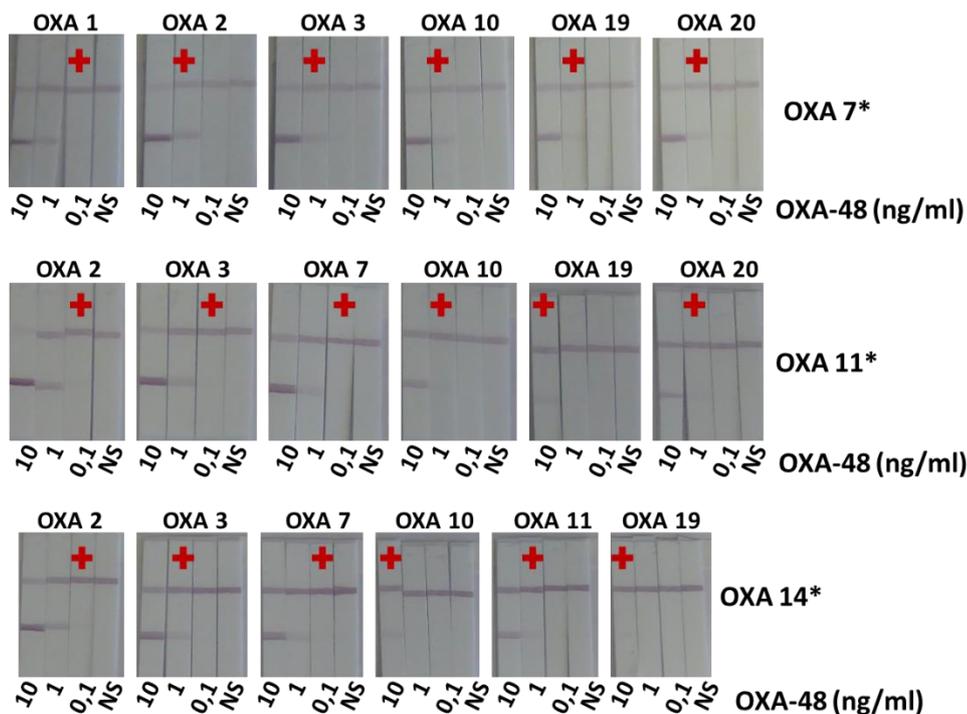
La Figure 72 met en évidence 6 couples capables de détecter OXA-48 recombinante à une concentration de 0,1 ng/ml en tampon EIA/Tween 0,5 %. Il s'agit de OXA 1/OXA 7\*, OXA 2/OXA 11\*, OXA 3/OXA 11\*, OXA 7/OXA 11\*, OXA 2/OXA 14\*, OXA 7/OXA 14\*.

Nous avons choisi de ne conserver pour la suite que les anticorps OXA 7, OXA 11 et OXA 14 qui reconnaissent tous les variants de OXA-48 testés.

### **5.2.3. Evaluation des anticorps avec des souches OXA-48-like**

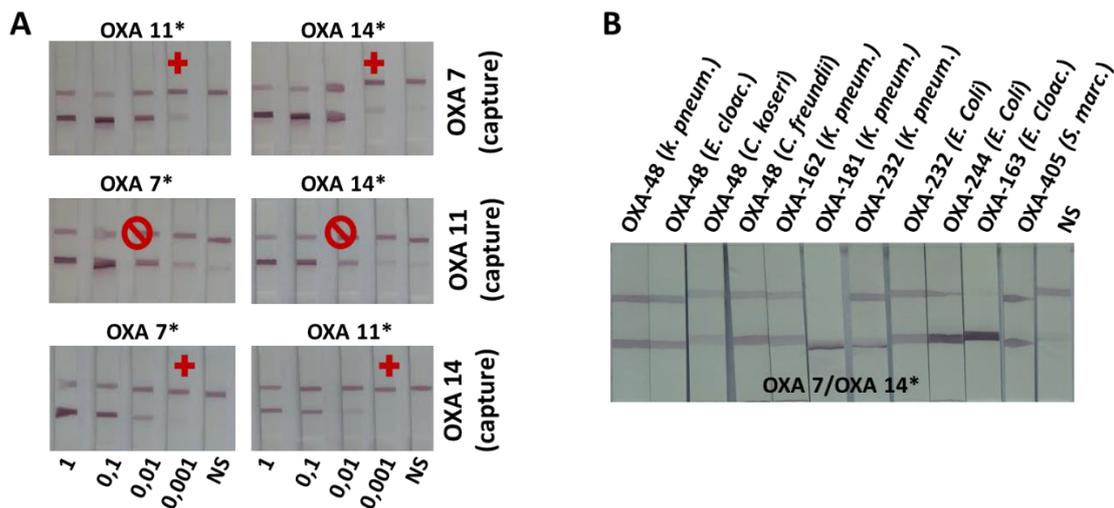
Les anticorps OXA 7, OXA 11 et OXA 14 ont été utilisés soit en capture soit en tant que traceur avec une souche *K. pneumoniae* exprimant OXA-232, voir Figure 73A. Les couples OXA 11/OXA 7\* et OXA 11/OXA 14\* montrent un signal non spécifique important. Les autres couples ont tous une LOD de 0.001 équivalent DO<sub>600nm</sub>.

**Le couple OXA 7/OXA 14\* semble avoir un signal légèrement plus fort et sera choisi pour la détection d'OXA-48 et de ses variants.**



**Figure 72 : Evaluation des couples pour la détection d'OXA-48.**

Gamme d'OXA-48 recombinante (ng/ml) en tampon EIA/Tween 0,5 %. \*anticorps marqué à l'or colloïdal. + Plus petite concentration détectée



**Figure 73 : Choix du meilleur couple pour détecter OXA-48 et ses variants**

**A** - extraits d'une souche *K. pneumoniae* exprimant OXA-232 en tampon d'extraction 1X (en équivalent DO<sub>600nm</sub>). **B** - extraits concentrés en tampon d'extraction 1X de souches exprimant OXA-48 ou des variants. \*anticorps marqué à l'or colloïdal. + plus petite concentration détectée.

#### **5.2.4. Validation du mono-test OXA-48 avec le souchier « carbapénémases »**

Seules les souches exprimant un variant de OXA-48 ont donné des résultats positifs (Annexe 5, colonne mono-test OXA) avec une ligne test de couleur très intense. Parmi ces souches détectées, 3 expriment des variants de OXA-48 pas encore décrits dans la littérature au moment des tests. Il s'agit de OXA-517, OXA-519 et OXA-535 exprimés respectivement par deux *K. pneumoniae* et une *S. bicestrii*. Trois souches exprimant des variants sans activité carbapénémase (2 OXA-163 et 1 OXA-405) ont aussi été détectées.

#### **5.2.5. Utilisation en routine du mono-test OXA-48**

Le mono-test OXA-48 a été testé avec des souches montrant une sensibilité diminuée à au moins un carbapénème et reçues au CNR au moment de la validation en octobre 2016. Des PCR de confirmation ainsi qu'un séquençage ont été faits par la suite afin de valider les résultats.

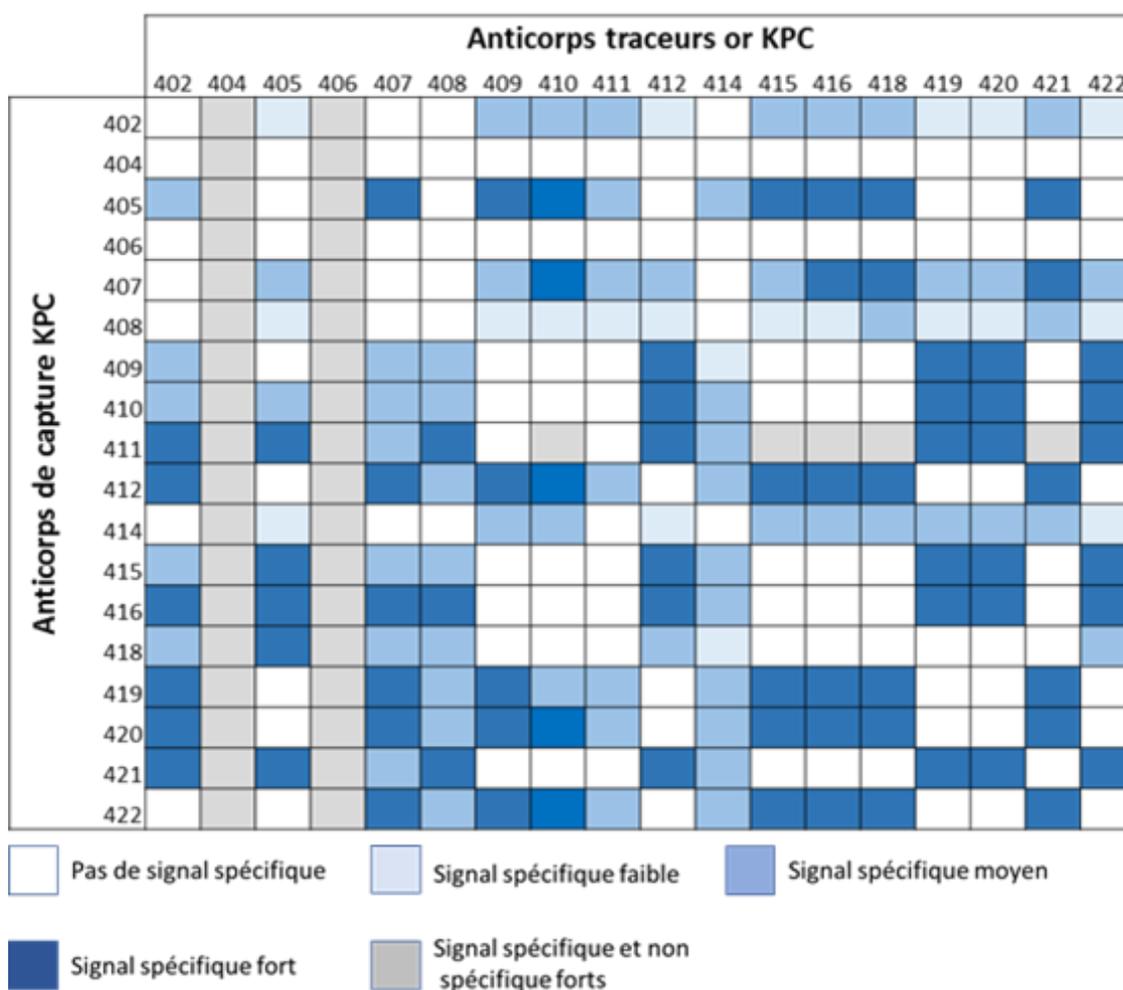
41 souches ont été testées avec le test (voir Annexe 10). Les tests PCR et le Carba NP ont mis en évidence la présence d'une carbapénémase pour 22 de ces souches. Pour les 19 autres souches, la susceptibilité diminuée était certainement due à la surexpression d'une BLSE et/ou céphalosporinase associée à une perméabilité membranaire faible, mais ceci n'a pas été évalué. Dans ces conditions, le test a permis de détecter les 16 souches produisant des OXA-48-like. Les isolats n'exprimant pas de OXA-48-like (3 NDM, 2 KPC et 1 VIM) ont donné des résultats négatifs ainsi que les 19 souches sans carbapénémase. Deux souches exprimaient simultanément NDM-1 et OXA-48.

### 5.3. Préparation du test pour la détection de KPC

KPC est une carbapénémase (Ambler classe A). Les immunisations ont été réalisées en utilisant la protéine recombinante correspondant à l'enzyme sans son peptide signal (voir Annexe 2).

#### 5.3.1. Evaluation des anticorps avec la protéine recombinante

18 anticorps ont été clonés puis purifiés dans le but de mettre au point le dosage.



**Figure 74 : Bilan du test combinatoire pour la détection de KPC-2**

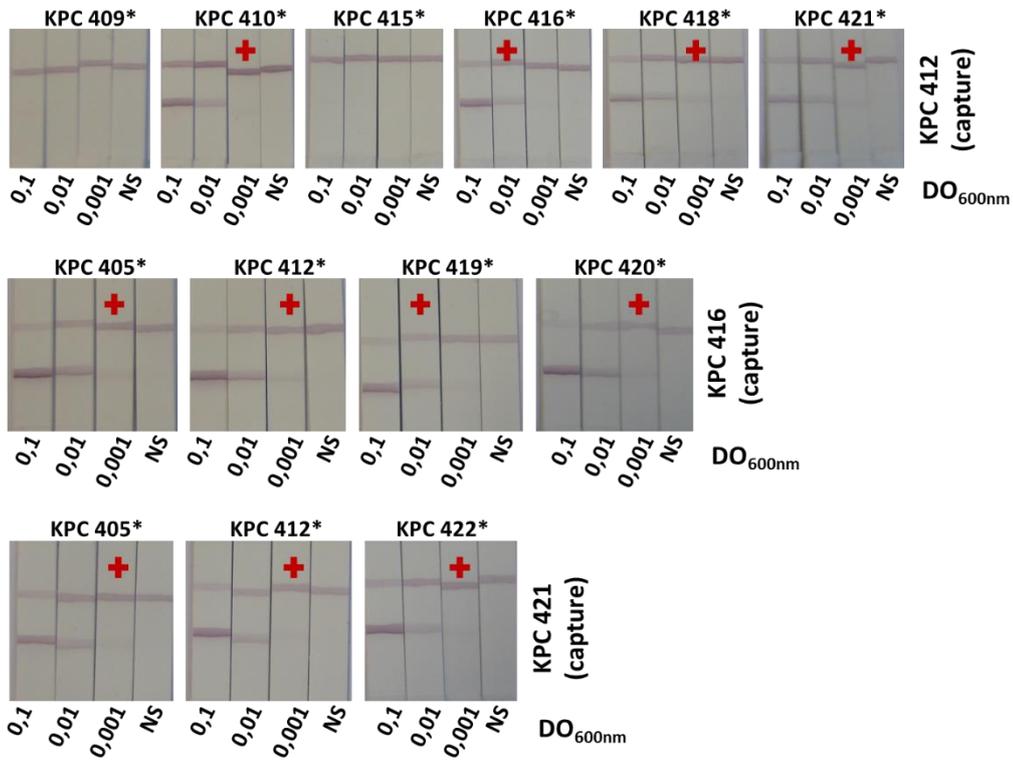
La Figure 74 met en évidence 10 phases solides compatibles avec 14 traceurs. Pour la suite, nous n'avons choisi d'évaluer que KPC 412, 416 et 421 en anticorps de capture, et 11 anticorps traceurs répartis sur ces trois anticorps.

### 5.3.2. Evaluation des anticorps avec des souches KPC

Lors de l'utilisation d'une souche exprimant KPC-3, la Figure 75 montre que deux couples KPC 412/KPC 409\* et KPC 412/KPC 415\* ne reconnaissent pas cette enzyme sous sa forme native. Le mAb KPC 412 utilisé avec d'autres mAbs permet la détection de KPC, on peut donc en conclure que les mAbs KPC 409 et 415 ne reconnaissent pas la KPC native. L'ensemble des autres couples ont des performances semblables pour la détection de la souche exprimant KPC-3 avec une limite de détection de l'ordre de 0,01 équivalent  $DO_{600nm}$ . Cette étude ne permet donc pas de sélectionner le meilleur couple.

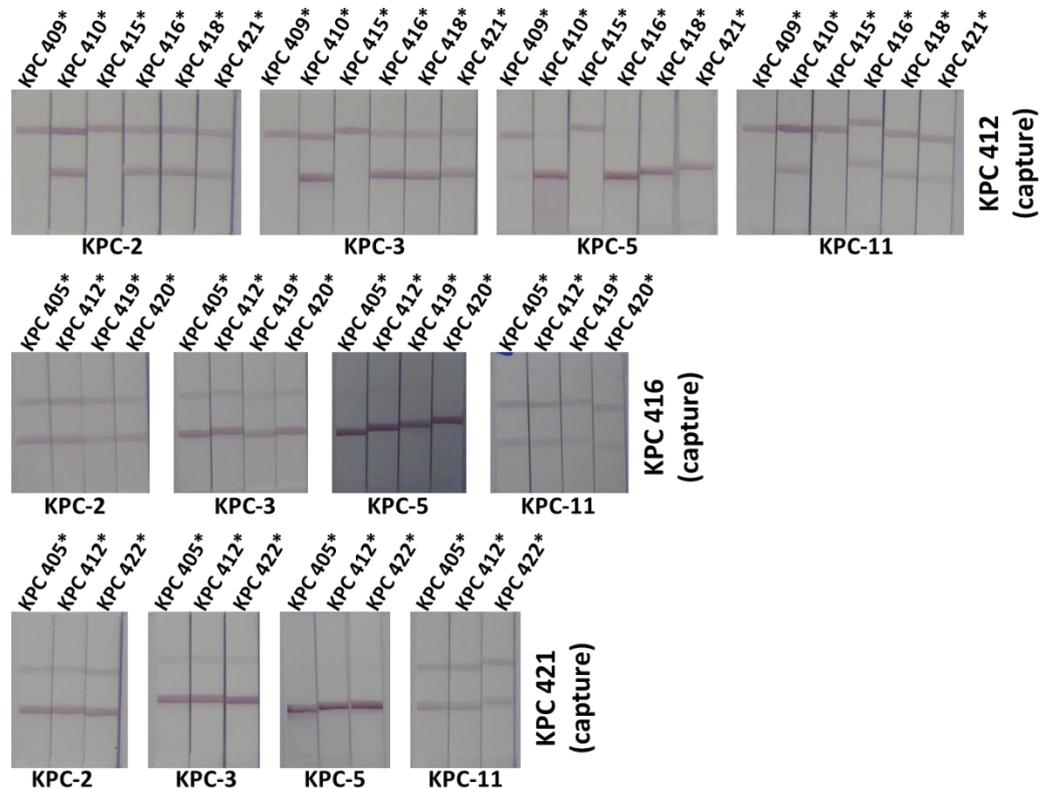
La Figure 76 montre que les couples testés exceptés ceux pour lesquels KPC 409 et 415 sont utilisés comme traceurs reconnaissent tous les variants de KPC disponibles au laboratoire (KPC -2, -3, -5 et -11) à une dilution équivalant à 0,01  $DO_{600nm}$  en tampon d'extraction. Pour un variant donné, les signaux sont similaires d'un couple à l'autre.

Pour chaque phase solide, deux traceurs sont choisis afin d'évaluer les performances des couples avec une gamme plus précise de la souche exprimant KPC-2 qui semble la moins bien reconnue. Une fois encore, les couples KPC 412/KPC 410\*, KPC 412/KPC 416\*, KPC 416/KPC 405\*, KPC 416/KPC 412\*, KPC 421/KPC 405\*, KPC 421/KPC 412\* (résultats non présentés) ne montrent pas de différence de performance.



**Figure 75 : Choix du meilleur couple avec une souche exprimant KPC-3**

0,1; 0,01; 0,001 gamme en équivalent  $DO_{600nm}$  en tampon d'extraction 1X de *K. pneumoniae* exprimant KPC-3. \*anticorps marqué à l'or colloïdal. + plus petite concentration détectée.



**Figure 76 : Spécificité des couples avec plusieurs variants de KPC**

Extraits à 0,01 équivalent  $DO_{600nm}$  de souches exprimant des variants de KPC

**Le couple choisi pour la détection des KPCs sera KPC 421/KPC 405\*** car il semble donner le meilleur signal pour la détection de KPC-11 (Figure 76).

Remarque : un mono-test au format commercial n'a pas été préparé pour la détection de KPC. Le couple KPC 421/KPC 405\* n'a été utilisé que pour préparer le test multiplex dont les performances vont être décrites par la suite.

#### **5.4. Détermination des épitopes pour les anticorps NDM, OXA et KPC**

Les synthèses sur membrane de peptides couvrant les séquences des protéines NDM-1, OXA-48 et KPC-2 (sans leur peptide signal) ont été réalisées pour déterminer les épitopes des anticorps NDM, OXA et KPC.

Les anticorps NDM 103, NDM 105, OXA 7, OXA 14, KPC 421 et KPC 405 ont été testés avec les membranes correspondantes. Aucun de ces anticorps n'a donné de résultats positifs.

Les anticorps faisant partie du même groupe de similarité épitopique que les anticorps sélectionnés pour les tests ont également été testés avec les membranes correspondantes. Ces anticorps n'ont pas donné de résultats positifs.

#### **5.5. Validation du test multiplex Carba5**

##### **5.5.1. Préparation du Carba5**

Pour rappel les tests VIM et IMP ont été développés dans le laboratoire en parallèle des travaux de cette thèse.

Les limites de détection de ce test avec les protéines recombinantes sont de 150 pg/ml pour NDM-1, 200 pg/ml pour IMP-1, 300 pg/ml pour VIM-1, 300 pg/ml pour OXA-48 et 600 pg/ml pour KPC-2. Ces résultats obtenus par NG Biotech ont déterminé l'ordre de

disposition des lignes test pour la préparation du multiplex. Les lignes test sont placées par ordre décroissant de sensibilité à partir de la zone de dépôt, ceci afin d'augmenter le temps de contact entre l'anticorps traceur et sa cible pour les moins performants.

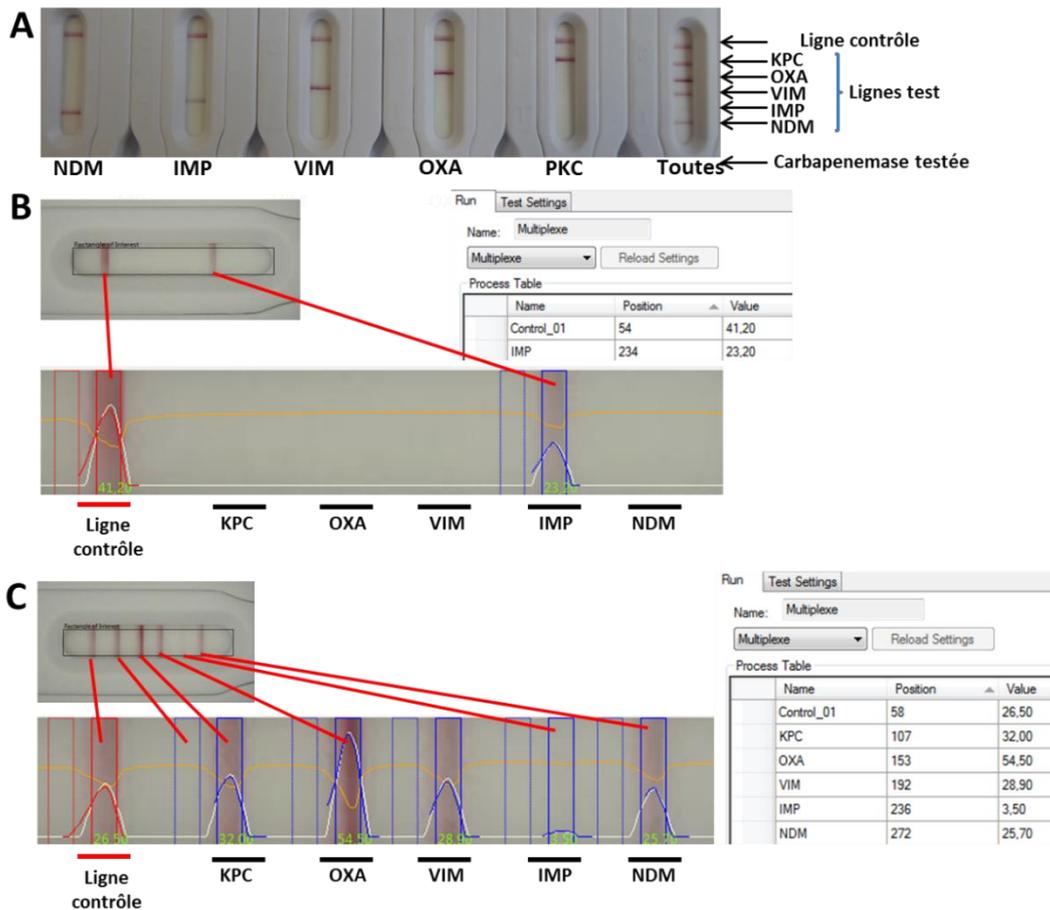
### **5.5.2. Lecture des cassettes au lecteur**

Les lignes tests correspondant aux 5 carbapénémases ciblées par le Carba5 n'étaient pas identifiées sur les cassettes fournies par la société NG Biotech. Pour faciliter l'interprétation des résultats, l'acquisition a été faite avec un lecteur (prototype).

La Figure 77 montre des exemples de résultats obtenus avec ce lecteur. Les résultats obtenus sont comparables en termes d'intensité de signal à ceux d'un mono-test (Figure 77A). La carbapénémase détectée est identifiée (Figure 77B) ce qui facilite l'interprétation. La détection simultanée de plusieurs cibles n'a pas d'influence sur la qualité des signaux observés (Figure 77C).

### **5.5.3. Validation du Carba5 avec le souchier « carbapénémases »**

Lors de cette évaluation, un signal positif localisé au niveau de la ligne test spécifique n'a été obtenu que si un variant une ou plusieurs des cinq principales carbapénémases était exprimé par la souche (Annexe 5 colonnes Multiplex). L'identification des carbapénémases au cours de cette étude est identique à 100% à celles effectuées par PCR ou un mono-test. Les 52 souches qui n'expriment pas de carbapénémases ni d'oxacillinase à spectre élargi apparentées à OXA-48 ont donné des résultats négatifs. Il en a été de même pour les 9 souches exprimant des carbapénémases ne faisant pas partie de la famille des 5 cibles du multiplex.



**Figure 77 : Illustration de résultats du multiplex avec le lecteur**

**A** - NDM, IMP, VIM, OXA, KPC : une colonie reprise dans 150 µl de tampon d'extraction et 100 µl déposés sur la cassette. Toutes : 25 µl de chaque extrait précédent mélangés et 100 µl déposés sur la cassette. **B** – Résultat avec la souche IMP et lecture de la cassette. **C** - Résultats avec toutes les souches détectées simultanément et lecture de la cassette.

#### 5.5.4. Utilisation du Carba 5 en routine.

116 souches ont été testées (voir Annexe 12). 70 ont donné des résultats positifs (5 NDM-1, 3 NDM-5, 1 NDM-9, 1 VIM-1, 1 VIM-4, 1 KPC, 52 OXA-48, 3 OXA-181, 2 OXA-244 et 1 NDM-1/OXA-48). Les tests PCR ont identifié 71 souches portant le gène d'une carbapénémase. La souche surnuméraire en PCR porte le gène *bla<sub>IMI</sub>*, dont l'enzyme correspondante ne fait pas partie des carbapénémases ciblées par notre du test. L'ensemble des autres souches se sont révélées négatives dans notre test et en PCR pour la présence d'une carbapénémase.

Les résultats de validation et d'utilisation en routine du Carba5 ont donné lieu à la rédaction d'un article scientifique en cours de soumission. (Voir Annexe 13).

## **5.6. Bilan et discussion**

La diversité et le nombre des anticorps produits pour chaque famille de carbapénémase nous permettent d'obtenir des couples avec des spécificités suffisamment étendues pour reconnaître l'ensemble des variants disponibles pour chaque famille. L'analyse combinatoire nous a permis de mettre en évidence 3 régions reconnues pour KPC et 4 pour NDM.

Une fois encore, l'utilisation de la protéine recombinante a montré ses limites. En effet, le couple sélectionné en première intention (NDM 105/NDM 120\*) en utilisant la protéine recombinante pour la détection de NDM avait finalement des performances assez médiocres pour la détection de la protéine native. L'utilisation de souches exprimant les carbapénémases reste donc l'approche à privilégier pour la sélection des anticorps dans le développement d'un test.

Les tests préparés par la société NG Biotech sont sous le format qui sera commercialisé. Ces tests ne nécessitent pas de matériel particulier ni de compétences techniques élevées pour leur mise en œuvre, et entre le prélèvement de la colonie, son traitement et l'interprétation des résultats seulement 20 minutes au maximum sont nécessaires.

A partir de souches isolées sur milieux gélosés, ils permettent de détecter la plupart des souches résistantes aux principaux antibiotiques utilisés en milieu clinique via une enzyme.

Les mono-test NDM et OXA-48 ont montré 100 % de sensibilité et de spécificité lors des validations et utilisation en routine. Ces deux carbapénémases sont celles principalement rencontrées en France et leur détection permet de caractériser 52 % des souches suspectées d'exprimer une carbapénémase et d'identifier 88 % des carbapénémases impliquées. La détection de OXA-48 par les méthodes habituellement mises en œuvre dans les laboratoires de bactériologie est souvent peu spécifique, le mono-test OXA-48 pallie ce manque. La détection de OXA-163 et OXA-

405 qui rappelons-le n'ont qu'une très faible activité carbapénémase n'est pas un problème dans un pays comme le nôtre où leur incidence est très faible.

Depuis la validation du multiplex Carba5, l'intérêt de ces deux mono-tests est moindre.

Le multiplex Carba5 montre les mêmes performances que les mono-tests qui ont été validés avec le souchier « carbapénémases » en permettant d'identifier simultanément des souches exprimant au moins l'une des cinq principales carbapénémases, NDM, IMP, VIM, KPC ou OXA-48 (ou leurs variants respectifs). Sur l'ensemble des 190 souches testées au CNR, ces enzymes représentent 99 % des carbapénémases rencontrées. A l'heure actuelle, mis à part les tests moléculaires, il n'existe pas d'autre test capable de détecter simultanément ces cinq carbapénémases et de discriminer l'une par rapport à l'autre aussi facilement et dans un tel délai.

Ces carbapénémases disséminent rapidement au sein des entérobactéries qui sont facilement transmissibles entre individus. Notre multiplex Carba5 permet d'identifier les patients porteurs et ainsi de mettre en place des mesures d'isolement. En identifiant les carbapénémases dont les modes d'action sont différents il est aussi possible d'adapter avec plus de pertinence les traitements des patients.

La mise sur le marché de ce test est aussi prévue pour la fin de cette année.

# **Discussion générale**



# Discussion générale

Notre objectif était de développer des tests immunochromatographiques permettant la détection de bactéries exprimant les  $\beta$ -lactamases de la famille des CTX-M et des carbapénémases NDM, OXA-48 et KPC.

Les anticorps monoclonaux sont des molécules qui ont montré depuis des années leur fort potentiel dans le domaine du diagnostic. Nous avons immunisé des souris avec les principales  $\beta$ -lactamases rencontrées chez les entérobactéries afin de produire des anticorps monoclonaux. Ces protéines se sont révélées être de bons immunogènes et nous avons obtenu des panels d'anticorps monoclonaux dirigés contre les BLSE de la famille des CTX-M (quatre groupes sur les cinq décrits) ainsi que les cinq principales carbapénémases. La diversité des d'anticorps produits pour chaque cible a permis de développer des tests avec une spécificité qui à l'heure actuelle permet de détecter les principaux variants, pour chacune des  $\beta$ -lactamases à partir de souches isolées sur gélose.

Les tests pour la détection des CTX-M du groupe 1, NDM, OXA-48 et le Carba5, validés lors de ces travaux de thèse montrent 100 % de sensibilité et de spécificité avec des limites de détection proches de  $1.10^6$  cfu/ml. Du prélèvement de la colonie à tester jusqu'à l'obtention des résultats, seulement 20 minutes sont nécessaires. Comparés aux autres méthodes de confirmation disponibles, ces tests sont plus rapides et plus performants et avec un coût compatible avec une utilisation en routine.

Il faut toutefois garder en mémoire que de nouveaux mutants de ces protéines modifiant les épitopes des anticorps impliqués pourraient apparaître, et conduire à de faux négatifs. Les groupes de similarité épitopiques mettent en évidence, en fonction de la cible, 3 à 6 régions de la protéine reconnues par nos anticorps. En s'appuyant sur les méthodes moléculaires suivies d'un séquençage, on pourra identifier les sites de mutations et donc les régions impliquées. Ces données nous permettront d'adapter nos tests en intégrant de nouveaux anticorps dont l'épitope n'est pas modifié et ainsi conserver un niveau analytique acceptable. Bien entendu, l'identification précise des épitopes de nos anticorps sera une donnée indispensable pour anticiper la spécificité de nos tests vis-à-vis de nouveaux variants.

Pendant cette thèse, nous n'avons pas eu la possibilité de réaliser la caractérisation cinétique des interactions de nos anticorps avec leur cible. L'acquisition d'un appareillage Octet (Pallfortebio), devrait prochainement le permettre. Nous pourrions ainsi vérifier que les anticorps donnant les meilleurs résultats dans notre format de test bandelette sont bien ceux avec les meilleures constantes d'association.

A l'heure actuelle, nos tests ne sont validés que pour une utilisation avec des colonies isolées après une étape de culture sur gélose. Pour augmenter la pertinence de leur utilisation, l'idéal serait une utilisation directe avec des échantillons cliniques. La faisabilité avec l'urine et les hémocultures a été montrée pour le test CTX-M 4G mais uniquement avec des bandelettes sous un format laboratoire. De premières évaluations avec le Carba5 dans un format industriel ont mis en évidence la présence de signal non spécifique lié au milieu de culture contenu dans les flacons testés.

Pour pallier ces désagréments, un dispositif faisant l'objet d'un dépôt de brevet est en cours de développement et validation au sein du laboratoire. Il permettra d'augmenter le volume d'urine testée, afin d'améliorer la sensibilité des tests dans ce type de milieu. Il pourra aussi permettre de se soustraire à l'effet matrice observé lors de l'utilisation directe d'hémocultures en séparant par filtration les bactéries des autres éléments : milieu et cellules sanguines. Ce dispositif pourrait également permettre, le prélèvement sur des surfaces, une étape d'amplification de quelques heures avant le test, mais aussi de stocker et transporter tout échantillon. Ce dispositif sera compatible avec les cassettes pour permettre le dépôt de l'échantillon sans étape supplémentaire.

Ce travail de thèse n'est que le début d'un programme de recherche plus vaste visant au diagnostic et à l'étude de différents facteurs de l'antibiorésistance chez différentes espèces bactériennes. En effet de nombreux défis restent à relever.

Ainsi, peu de molécules thérapeutiques restent actives pour traiter les infections impliquant des entérobactéries résistantes aux carbapénémases. La colistine fait partie de l'une d'elles, mais il existe un mécanisme de résistance contre cet antibiotique lié à l'expression d'une protéine appelée Mcr-1 (plus des variants Mcr-2 à 5). Les gènes correspondant à ces protéines sont désormais portés par des éléments mobiles. Pour éviter le mésusage de cette molécule, et aussi permettre un suivi

épidémiologique de leur dissémination, un test immunochromatographique permettant la détection de bactéries portant cette résistance est en cours de validation.

Des anticorps monoclonaux dirigés contre AmpC ont aussi été produits et des tests pour mettre en évidence la surexpression de cette protéine devraient être mis au point. Ces derniers seront des outils prédictifs quant à l'efficacité de traitements avec des  $\beta$ -lactamines lors d'infections pulmonaires causées par *Pseudomonas aeruginosa* et rencontrées chez des patients atteints de mucoviscidose.

Un projet de recherche sur l'implication des porines dans la résistance aux antibiotiques est aussi envisagé.

Jusque-là, les tests s'appliquent uniquement à des bactéries à Gram négatif. Nous souhaitons élargir la gamme vers les bactéries à Gram positif avec la mise au point de tests permettant de mettre en évidence la résistance à la vancomycine chez les entérocoques. Pour ce faire, des anticorps dirigés contre les protéines VanA et VanB sont en cours de production.

Le concept « One Health » en antibiorésistance met en évidence que les bactéries liées à l'Homme, et les résistances aux antibiotiques qui y sont associées, sont en connexion avec celles rencontrées chez nos animaux d'élevage et de compagnie. Bien qu'il ne s'agisse pas de développer des tests immunochromatographiques pour tous les mécanismes de résistance, une réflexion est en cours au sein du laboratoire pour identifier des cibles avec une pertinence vétérinaire.



# **Conclusion générale**



# Conclusion générale

L'apparition de résistances aux antibiotiques chez les microorganismes est un phénomène naturel, et l'usage bon ou mauvais de ces médicaments chez l'Homme ou chez l'animal accélèrent le phénomène. En fonction de la classe de l'antibiotique, 20 à 80 % de la molécule administrée sont éliminés dans l'urine et les fèces (9), et son accumulation dans les écosystèmes y maintient une pression de sélection favorable à l'évolution des bactéries.

Chez les entérobactéries la résistance aux antibiotiques est principalement due à l'expression de  $\beta$ -lactamases. Dans un premier temps, ces bactéries résistantes ont été traitées en utilisant des céphalosporines de troisième génération puis suite à l'apparition de résistance à ces dernières par l'utilisation des carbapénèmes. Actuellement, l'émergence et la dissémination d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes dans la population est un problème sanitaire majeur et mondialement répandu. Ces bactéries peuvent être responsables d'infections pulmonaires, des voies urinaires, liées à l'utilisation de matériel médical ou de bactériémies par exemple et engendrent des taux de mortalité élevés.

Leur identification rapide est primordiale, et les méthodes accessibles à tout laboratoire de bactériologie nécessitent des étapes de culture qui peuvent prendre plusieurs jours. Ces délais ne sont pas compatibles avec la mise en place d'une thérapie appropriée.

Nous avons développé et/ou validé des tests immunochromatographiques qui permettent la détection de 99 % des CTX-M, qui sont les BLSE les plus souvent rencontrées, et des cinq principales carbapénémases. Ces tests devraient à l'avenir, nous l'espérons, prendre une place privilégiée dans l'arsenal de lutte contre la résistance aux antibiotiques.

L'ensemble des tests validés lors de cette thèse sont ou seront très prochainement commercialisés.



# **Références Bibliographiques**



# Références bibliographiques

1. M. Awad H, Y.L.EL-Shahed K, Aziz R, Sarmidi MR, A. El-Enshasy H. 2012. Antibiotics as microbial secondary metabolites: Production and Application *Jurnal Teknologi*.
2. Demain AL, Fang A. 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 69:1–39.
3. Gillings MR. 2013. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. *Front Microbiol* 4:4.
4. Davies J, Ryan KS. 2012. Introducing the Parvome: bioactive compounds in the microbial world. *ACS Chem Biol* 7:252–259.
5. Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427:72.
6. López E, Blázquez J. 2009. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3411–3415.
7. Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. 2010. Sub-lethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell* 37:311–320.
8. Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. 2011. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* 473:216–220.

9. Andersson DI, Hughes D. 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 12:465–478.
10. Romero D, Traxler MF, López D, Kolter R. 2011. Antibiotics as signal molecules. *Chem Rev* 111:5492–5505.
11. Nemeth J, Oesch G, Kuster SP. 2015. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 70:382–395.
12. Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, Andersson DI. 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog* 7:e1002158.
13. Kardos N, Demain AL. 2013. Ernst Chain: a great man of science. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:6613–6622.
14. Robbins Schug G, Blevins KE, Cox B, Gray K, Mushrif-Tripathy V. 2013. Infection, disease, and biosocial processes at the end of the Indus civilization. *PLoS ONE* 8(12):e84814.
15. Callaway E. 2017. Collapse of Aztec society linked to catastrophic salmonella outbreak. *Nat News* 542:404.
16. Fleming A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 10:226–236.
17. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis*. 2002 Jun 1;34 Suppl 3:S93-S106.

18. Kadurugamuwa JL, Clarke AJ, Beveridge TJ. 1993. Surface action of gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 175:5798–5805.
19. Preston SL, Briceland LL. 1995. Single daily dosing of aminoglycosides. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* 15:297–316.
20. Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM. 1999. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1003–1012.
21. Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:232–260.
22. Mao JC-H, Putterman M. 1968. Accumulation in Gram-positive and Gram-negative bacteria as a mechanism of resistance to erythromycin. *J Bacteriol* 95:1111–1117.
23. George DP. The macrolide antibiotic renaissance. *Br J Pharmacol* 2017 Sep;174(18):2967-2983.
24. van Bambeke F, Mingeot-Leclercq M-P, Glupczynski Y, Tulkens PM. 2017. Mechanisms of action, p. 1162–1180.e1. *In* *Infectious Diseases*. Elsevier.
25. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA. 2001. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 104:901–912.
26. Emmerson AM. 2003. The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother* 51:13–20.

27. Ravat F, Latarjet J, Robert H, Gosshans H, Comparin J.P., Vasseur C., Foyatier J.L. 2000. Pharmacologie clinique des fluoroquinolones chez le brûlé. *Brûlures* Vol 1 N°4 P 20 1-205.
28. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53:1565–1574.
29. Dortet L, Bonnin R, Jousset A, Gauthier L, Naas T. 2016. Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance ! *J Anti-Infect* 18:139–159.
30. Abdelraouf K, Braggs KH, Yin T, Truong LD, Hu M, Tam VH. 2012. Characterization of polymyxin B-induced nephrotoxicity: implications for dosing regimen design. *Antimicrob Agents Chemother* 56:4625–4629.
31. Gleckman R, Blagg N, Joubert DW. 1981. Trimethoprim: mechanisms of action, antimicrobial activity, bacterial resistance, pharmacokinetics, adverse reactions, and therapeutic indications. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* 1:14–19.
32. VIDAL - Triméthoprime. <https://www.vidal.fr/substances/3582/trimethoprime/>.
33. Bartholomew JW, Mittwer T. 1952. The Gram strain. *Bacteriol Rev* 16:1–29.
34. Nanninga N. 1998. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:110–129.
35. Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. 2006. Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev* 30:673–691.

36. Ruiz N. 2016. Lipid flippases for bacterial peptidoglycan biosynthesis. *Lipid Insights* 8:21–31.
37. Lee M, Heseck D, Suvorov M, Lee W, Vakulenko S, Mobashery S. 2003. A mechanism-based inhibitor targeting the DD<sup>+</sup>-transpeptidase activity of bacterial Penicillin-Binding Proteins. *J Am Chem Soc* 125:16322–16326.
38. Binda E, Marinelli F, Marcone G. 2014. Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance. *Antibiotics* 3:572–594.
39. Hendlin D., Stapley EO, Jackson M, Wallick H, Miller AK, Wolf FJ, Miller TW, Chalet L, Kahan FM, Foltz EL, Woodruff HB, Mata JM, Hernandez S, Mochales S. 1969. Phosphomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomyces. *Science*. 166(3901):122-3.
40. Eschenburg S, Priestman M, Schönbrunn E. 2005. Evidence that the fosfomycin target Cys<sup>115</sup> in UDP- *N*-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) is essential for product release. *J Biol Chem* 280:3757–3763.
41. Michalopoulos AS, Livaditis IG, Gougoutas V. 2011. The revival of fosfomycin. *Int J Infect Dis* 15:e732–e739.
42. Cai Y, Fan Y, Wang R, An M-M, Liang B-B. 2009. Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and biofilm infections in a rat model. *J Antimicrob Chemother* 64:563–566.
43. Kardos N, Demain AL. 2011. Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:677–687.

44. Kaasgaard SG, Poulsen PB. 1991. Production of beta-lactams: a mixture of organic synthesis processes and enzymatic processes, p. 149–160. *In* *Bioorganic Chemistry in Healthcare and Technology*. Springer, Boston, MA.
45. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, Laxminarayan R. 2014. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis* 14:742–750.
46. 2016. Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union. ESAC-Net surveillance data.  
[https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/antibiotics-ESAC-Net%20Summary%202016\\_0.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/antibiotics-ESAC-Net%20Summary%202016_0.pdf)
47. A. D. Deshpande, K. G. Baheti, N. R. Chatterjee. 2004. Degradation of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Curr Sci*. 87(12) 1684-1695
48. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. 2008. Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 32:361–385.
49. Kong K-F, Schneper L, Mathee K. 2010. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 118:1–36.
50. Fernandes R, Amador P, Prudêncio C. 2013.  $\beta$ -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev Med Microbiol* 24:7–17.
51. Paladino JA, Sunderlin JL, Singer ME, Adelman MH, Schentag JJ. 2008. Influence of extended-spectrum  $\beta$ -lactams on gram-negative bacterial resistance. *Am J Health Syst Pharm* 65:1154–1159.

52. Bodey GP. 1990. Penicillins, monobactams, and carbapenems. *Tex Heart Inst J* 17:315–329.
53. Pitout JD, Laupland KB. 2008. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 8:159–166.
54. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. 2006. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 59:165–174.
55. Drawz SM, Bonomo RA. 2010. Three decades of  $\beta$ -Lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 23:160–201.
56. Burnichon N, Texier A. 2003. L'antibiogramme: la détermination des sensibilités aux antibiotiques. DES bactériologie – Semestre été 2003. Exposé du 20 juin 2003. [http://microcsb.net/IMG/pdf/Antibiogramme\\_csb.pdf](http://microcsb.net/IMG/pdf/Antibiogramme_csb.pdf)
57. World bank group. 2016. Drug-resistant infections. A threat to our economic future. <http://documents.worldbank.org/curated/en/323311493396993758/pdf/114679-REVISED-v2-Drug-Resistant-Infections-Final-Report.pdf>
58. O'Neill J. 2014. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)

59. WHO. 2014. Antimicrobial resistance. Global report on surveillance.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1)
60. Ferber D. 2003. Antibiotic resistance: WHO advises kicking the livestock antibiotic habit. *Science* 301:1027–1027.
61. Larson E. 2007. Community factors in the development of antibiotic resistance. *Annu Rev Public Health* 28:435–447.
62. Munita JM, Arias CA. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr* April 4(2).
63. Pagès J-M, James CE, Winterhalter M. 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6:893–903.
64. Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 56:20–51.
65. Yasufuku T, Shigemura K, Shirakawa T, Matsumoto M, Nakano Y, Tanaka K, Arakawa S, Kinoshita S, Kawabata M, Fujisawa M. 2011. Correlation of Overexpression of efflux pump genes with antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains clinically isolated from urinary tract infection patients. *J Clin Microbiol* 49:189–194.
66. Dönhöfer A, Franckenberg S, Wickles S, Berninghausen O, Beckmann R, Wilson DN. 2012. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:16900–16905.

67. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. 2014. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr* Oct 2(5).
68. Hooper DC. 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis* 2:530–538.
69. Leclercq R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 34:482–492.
70. Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, Katayama Y, Matsuo M, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T. 2013. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect Chemother* 45:117–136.
71. Ramirez MS, Tolmasky ME. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat Rev* 13:151–171.
72. Bonomo RA. 2017.  $\beta$ -Lactamases: a focus on current challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7:a025239.
73. Fournier S, Brun-Buisson C, Jarlier V. 2012. Twenty years of antimicrobial resistance control programme in a regional multi hospital institution, with focus on emerging bacteria (VRE and CPE). *Antimicrob Resist Infect Control* 1:9.
74. Jarlier V. 2010. Curbing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French Hospitals Through a 15-Year Institutional Control Program. *Arch Intern Med* 170:552.

75. Doublet B, Bousquet-Mélou A, Madec JY. Le concept « One Health » en antibiorésistance et les flux de gènes. *Innovations agronomiques* 24 (2012), 79-90.
76. Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, Consigny P-H, Mniai AE, Boussadia Y, Goujon C, Ralaimazava P, Campa P, Girard P-M, Wyplosz B, Vittecoq D, Bouchaud O, Loup GL, Pialoux G, Perrier M, Wieder I, Moussa N, Esposito-Farèse M, Hoffmann I, Coignard B, Lucet J-C, Andremont A, Matheron S. 2015. High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae After Travel to the Tropics. *Clin Infect Dis* 61:593–600.
77. Abraham EP, Chain. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146,837
78. Massova I, Mobashery S. 1998. Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1–17.
79. Medeiros AA. 1997. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis Suppl* 1:S19-45.
80. Perez F, Endimiani A, Hujer K, Bonomo R. 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* 7:459–469.
81. Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54:969–976.

82. Jacoby GA. 2006.  $\beta$ -Lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1123–1129.
83. Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18:657–686.
84. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 18:294–298.
85. Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1–14.
86. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. 2000. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 14:137–142.
87. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. 2012. CTX-M Enzymes: Origin and diffusion. *Front Microbiol* Apr 2;3:110
88. Coque TM, Novais Â, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, Baquero F, Cantón R, Nordmann P. 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* 14:195–200.
89. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. 2012. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect* 18:646–655.

90. Guenther S, Ewers C, Wieler LH. 2011. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front Microbiol* Dec 19;2:246.
91. Tacão M, Correia A, Henriques I. 2012. Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of blaCTX-M-like genes. *Appl Environ Microbiol* 78:4134–4140.
92. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. 2013. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* 303:305–317.
93. Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A. 2013. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? *Drug Resist Updat* 16:22–45.
94. Zhao W-H, Hu Z-Q. 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 39:79–101.
95. Doi Y, Park YS, Rivera JI, Adams-Haduch JM, Hingwe A, Sordillo EM, Lewis JS, Howard WJ, Johnson LE, Polsky B, Jorgensen JH, Richter SS, Shutt KA, Paterson DL. 2013. Community-Associated Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase–Producing *Escherichia coli* Infection in the United States. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 56:641–648.
96. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Claeys G, Lontie M, Van Meensel B, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P. 2010. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by *Escherichia coli* isolated from

hospitalized and nonhospitalized patients: emergence of CTX-M-15-producing strains causing urinary tract infections. *Microb Drug Resist* 16:129–134.

97. Chaubey VP, Pitout JD, Dalton B, Ross T, Church DL, Gregson DB, Laupland KB. 2010. Clinical outcome of empiric antimicrobial therapy of bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Res Notes* 3:116.
98. Poirel L. 2002. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother* 50:1031–1034.
99. Elliott E, Brink AJ, van Greune J, Els Z, Woodford N, Turton J, Warner M, Livermore DM. 2006. In Vivo Development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum -lactamase. *Clin Infect Dis* 42:e95–e98.
100. Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20:440–458.
101. Sacha P, Ostas A, Jaworowska J, Wieczorek P, Ojdana D, Ratajczak J, Trynieszewska E. 2009. The KPC type beta-lactamases: new enzymes that confer resistance to carbapenems in Gram-negative bacilli. *Folia Histochem Cytobiol* 47(4):537-43.
102. Papp-Wallace KM, Bethel CR, Distler AM, Kasuboski C, Taracila M, Bonomo RA. 2010. Inhibitor resistance in the KPC-2  $\beta$ -lactamase, a preeminent property of this class A  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 54:890–897.

103. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1151–1161.
104. Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM. 2004. Comparative activities of doripenem versus isolates, mutants, and transconjugants of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* spp. with characterized  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1313–1319.
105. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 9:228–236.
106. Borer A, Saidel-Odes L, Riesenberk K, Eskira S, Peled N, Nativ R, Schlaeffer F, Sherf M. 2009. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30:972–976.
107. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. 2008. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29:1099–1106.
108. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas M-V, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Navon-Venezia S, Quinn JP, Nordmann P. 2010. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce  $\beta$ -lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg Infect Dis* 16:1349–1356.
109. Doi Y, Paterson DL. 2015. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Semin Respir Crit Care Med* 36:74–84.

110. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, Carey RB, Thompson A, Stocker S, Limbago B, Patel JB. 2007. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 45:2723–2725.
111. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, Pournaras S, Sofianou D. 2009. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 47:362–367.
112. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP, Carey RB, Stocker S, Lonsway D, Rasheed JK, Biddle JW, McGowan JE, Hanna B. 2006. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis* 12:1209–1213.
113. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. 2011. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? *Lancet Infect Dis* 11:381–393.
114. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. 1995. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 39:824–829.
115. Mojica MF, Bonomo RA, Fast W. 2016. B1-Metallo-beta-lactamases: where do we stand? *Curr Drug Targets* 17:1029–1050.
116. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Épidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénèmases. *Feuillets de Biologie Vol Liv N° 312 - Mai 2013*.

117. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. 1999. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1584–1590.
118. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 2009. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5046–5054.
119. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. 2012. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med* 18:263–272.
120. Walsh TR. 2010. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 36:S8–S14.
121. Woodford N, Johnson AP. 2013. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol* 62:499–513.
122. Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 17:1791–1798.
123. Patel G, Bonomo RA. 2013. “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol* Mar 14;4:48.
124. Moellering Jr RC. 2010. NDM-1, a cause for worldwide concern. *N Engl J Med* 363:2377–2379.

125. Shenoy KA, Jyothi EK, Ravikumar R. 2014. Phenotypic identification & molecular detection of bla<sub>NDM-1</sub> gene in multidrug resistant Gram-negative bacilli in a tertiary care centre. *Indian J Med Res* 139:625–631.
126. Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. 2011. Therapeutic options for infections with *Enterobacteriaceae* producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol* 6:653–666.
127. Rogers BA, Sidjabat HE, Silvey A, Anderson TL, Perera S, Li J, Paterson DL. 2013. Treatment options for New Delhi metallo-beta-lactamase-harboring *Enterobacteriaceae*. *Microb Drug Resist* 19:100–103.
128. Karlowsky JA, Kazmierczak KM, Jonge BLM de, Hackel MA, Sahm DF, Bradford PA. 2017. In vitro activity of Aztreonam-Avibactam against *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated by clinical laboratories in 40 countries from 2012 to 2015. *Antimicrob Agents Chemother* AAC.00472-17.
129. Jacoby GA. 2009. AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22:161–182.
130. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. 2002. Plasmid-determined AmpC-type - lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1–11.
131. Harris P. 2015. Clinical management of infections caused by *Enterobacteriaceae* that express extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and AmpC enzymes. *Semin Respir Crit Care Med* 36:056–073.
132. Freitas F, Machado E, Ribeiro TG, Novais â., Peixe L. 2014. Long-term dissemination of acquired AmpC  $\beta$ -lactamases among *Klebsiella* spp. and

- Escherichia coli in Portuguese clinical settings. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33:551–558.
133. Reuland EA, Hays JP, de Jongh DMC, Abdelrehim E, Willemsen I, Kluytmans JAJW, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, al Naiemi N. 2014. Detection and occurrence of plasmid-mediated AmpC in highly resistant Gram-negative rods. *PLoS ONE* 9:e91396.
134. Rodríguez-Baño J, Miró E, Villar M, Coelho A, Gozalo M, Borrell N, Bou G, Conejo MC, Pomar V, Aracil B, Larrosa N, Agüero J, Oliver A, Fernández A, Oteo J, Pascual A, Navarro F. 2012. Colonisation and infection due to Enterobacteriaceae producing plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases. *J Infect* 64:176–183.
135. Evans BA, Amyes SGB. 2014. OXA  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 27:241–263.
136. Poirel L, Potron A, Nordmann P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 67:1597–1606.
137. Oueslati S, Nordmann P, Poirel L. 2015. Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 70:1059–1063.
138. Poirel L, Castanheira M, Carrër A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, Nordmann P. 2011. OXA-163, an OXA-48-Related Class D  $\beta$ -Lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins $\nabla$ . *Antimicrob Agents Chemother* 55:2546–2551.

139. 2017. Recommandations 2017 V2.0 Mai. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
140. McFARLAND J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J Am Med Assoc* XLIX:1176–1178.
141. 2010. Recommandations relatives aux mesures à mettre en œuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE et lutter contre leur dissémination. Haut Conseil de la Santé Publique.  
<https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=162>
142. Willems E, Cartuyvels R, Magerman K, Verhaegen J. 2013. Evaluation of 3 different agar media for rapid detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae from surveillance samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 76:16–19.
143. Reglier-Poupet H, Naas T, Carrer A, Cady A, Adam J-M, Fortineau N, Poyart C, Nordmann P. 2008. Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Med Microbiol* 57:310–315.
144. Jolyguillou M. 2006. Intérêt du E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Réanimation* 15:237–240.
145. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 14:90–103.

146. Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kemeroglou A, Tsakris A. 2000. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 38:542–546.
147. Naas T, Oxacelay C, Nordmann P. 2007. Identification of CTX-M-Type extended-spectrum- $\beta$ -lactamase genes using Real-Time PCR and pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 51:223–230.
148. Pitout JDD, Hossain A, Hanson ND. 2004. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- $\beta$ -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 42:5715–5721.
149. Tamma PD, Huang Y, Opene BNA, Simner PJ. 2016. Determining the optimal carbapenem MIC that distinguishes carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:6425–6429.
150. Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. 2014. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect* 20:839–853.
151. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Cantón R. 2010. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 16:112–122.
152. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. 2008. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae*

- carbapenemase-type  $\beta$ -lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol* 46:4083–4086.
153. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. 2011. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* 17:552–556.
154. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JDD. 2012. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol* 50:3877–3880.
155. van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, Leverstein-Van Hall MA, Stuart JWTC. 2014. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect* 20:345–349.
156. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. 2011. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 37:415–419.
157. Girlich D, Halimi D, Zambardi G, Nordmann P. 2013. Evaluation of Etest® strips for detection of KPC and metallo-carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 77:200–201.
158. Asthana S, Mathur P, Tak V. 2014. Detection of carbapenemase production in Gram-negative bacteria. *J Lab Physicians* 6:69–75.

159. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. 2001. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 7:88–91.
160. Sun K, Xu X, Yan J, Zhang L. 2017. Evaluation of six phenotypic methods for the detection of carbapenemases in Gram-negative bacteria with characterized resistance mechanisms. *Ann Lab Med* 37:305–312.
161. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. 2008. Do CTX-M  $\beta$ -lactamases hydrolyse ertapenem? *J Antimicrob Chemother* 62:1155–1156.
162. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. 2012. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 50:477–479.
163. Zwaluw K van der, Haan A de, Pluister GN, Bootsma HJ, Neeling AJ de, Schouls LM. 2015. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-Negative rods. *PLOS ONE* 10:e0123690.
164. Gauthier L, Bonnin RA, Dortet L, Naas T. 2017. Retrospective and prospective evaluation of the Carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *PLoS ONE* 12(2): e0170769.
165. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, Hrabák J. 2015. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight mass spectrometry Meropenem hydrolysis assay with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol* 53:1731–1735.

166. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y, Naas T, Tandé D. 2015. Efficient detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol* 53:2163–2171.
167. Hrabák J, Chudáčková E, Walková R. 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 26:103–114.
168. Hrabák J, Študentová V, Walková R, Žemličková H, Jakubů V, Chudáčková E, Gniadkowski M, Pfeifer Y, Perry JD, Wilkinson K, Bergerová T. 2012. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 50:2441–2443.
169. Le Carba NP test à partir de colonies d'entérobactéries. CNR Résistance Aux Antibiotiques. [http://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Improved\\_Carba\\_NP\\_test\\_colo\\_FV.pdf](http://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Improved_Carba_NP_test_colo_FV.pdf).
170. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. 2015. Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 70:3014–3022.
171. Österblad M, Hakanen AJ, Jalava J. 2014. Evaluation of the Carba NP Test for Carbapenemase Detection. *Antimicrob Agents Chemother* 58:7553–7556.

172. Maurer FP, Castelberg C, Quiblier C, Bloemberg GV, Hombach M. 2015. Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with Enterobacteriaceae and development of a practical diagnostic algorithm. *J Clin Microbiol* 53:95–104.
173. Pires J, Novais Â, Peixe L. 2013. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 51:4281–4283.
174. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal* 16:47–51.
175. Singh P, Pfeifer Y, Mustapha A. 2016. Multiplex real-time PCR assay for the detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and carbapenemase genes using melting curve analysis. *J Microbiol Methods* 124:72–78.
176. Findlay J, Hopkins KL, Meunier D, Woodford N. 2015. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* 70:1338–1342.
177. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. 2012. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother* 67:1865–1869.
178. Smiljanic M, Kaase M, Ahmad-Nejad P, Ghebremedhin B. 2017. Comparison of in-house and commercial real time-PCR based carbapenemase gene detection

methods in Enterobacteriaceae and non-fermenting gram-negative bacterial isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* Jul 10;16(1):48

179. Lutgring JD, Limbago BM. 2016. The problem of carbapenemase-producing-carbapenem-resistant-Enterobacteriaceae detection. *J Clin Microbiol* 54:529–534.
180. Smith M, Diederer B, Scharringa J, Leversteijn-van Hall M, Fluit AC, Cohen Stuart J. 2016. Rapid and accurate detection of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae with the Cepheid Xpert Carba-R assay. *J Med Microbiol* 65:951–953.
181. Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Momin MHFA. 2016. Evaluation of an immunochromatographic lateral flow assay (OXA-48 K-SeT) for rapid detection of OXA-48-like carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 54:471–473.
182. Meunier D, Vickers A, Pike R, Hill RL, Woodford N, Hopkins KL. 2016. Evaluation of the K-SeT R.E.S.I.S.T. immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 71:2357–2359.
183. Dortet L, Jousset A, Sainte-Rose V, Cuzon G, Naas T. 2016. Prospective evaluation of the OXA-48 K -SeT assay, an immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 71:1834–1840.
184. Notake S, Matsuda M, Tamai K, Yanagisawa H, Hiramatsu K, Kikuchi K. 2013. Detection of IMP metallo- $\beta$ -lactamase in carbapenem-nonsusceptible

Enterobacteriaceae and non-glucose-fermenting Gram-negative rods by immunochromatography assay. *J Clin Microbiol* 51:1762–1768.

185. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang T-D, Leclipteux T, Bogaerts P. 2016. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* 71:1217–1222.
186. Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Jul 1;72(7):1955-1960
187. Prouvost-Danon A, Stiffel C, Mouton D, Biozzi G. 1971. Anaphylactic antibodies in mice genetically selected for antibody production. *Immunology* 20:25–27.
188. Doria G, Agarossi G, Biozzi G. 1978. In vitro immune response of spleen cells from mice genetically selected for high or low antibody production. *Immunology* 34:999–1005.
189. Boumsell L, Bernard A. 1980. High efficiency of Biozzi's high responder mouse strain in the generation of antibody secreting hybridomas. *J Immunol Methods* 38:225–229.
190. Pradelles P, Grassi J, Maclouf. 1985. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem*. Jun;57(7):1170-3.

191. Grassi J, Frobert Y, Pradelles P, Chercuitte F, Gruaz D, Dayer JM, Poubelle PE. 1989. Production of monoclonal antibodies against interleukin-1 alpha and -1 beta. Development of two enzyme immunometric assays (EIA) using acetylcholinesterase and their application to biological media. *J Immunol Methods* 123:193–210.
192. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.*
193. Khreich N, Lamourette P, Boutal H, Devilliers K, Créminon C, Volland H. 2008. Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing. *Anal Biochem* 377:182–188.
194. Köhler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495–497.
195. Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. 2009. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci* 106:1760–1765.
196. Weber K, Osborn M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244:4406–4412.
197. O'Farrell B. 2013. Lateral Flow Immunoassay Systems, p. 89–107. *In* The Immunoassay Handbook. 4<sup>th</sup> ed Elsevier.

198. Frank R. 2002. The SPOT-synthesis technique: synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *J Immunol Methods* 267:13–26.
199. Abe N, Inouye K. 1993. Purification of monoclonal antibodies with light-chain heterogeneity produced by mouse hybridomas raised with NS-1 myelomas: application of hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 27:215–227.
200. Ohnaka S, Soga E, Inouye K. 1997. Deletion of the  $\kappa$  genes from mouse hybridomas established with NS-1 myelomas. *Cytotechnology* 24:213–218.
201. Laporte J, Savin C, Lamourette P, Devilliers K, Volland H, Carniel E, Créminon C, Simon S. 2015. Fast and sensitive detection of enteropathogenic *Yersinia* by immunoassays. *J Clin Microbiol* 53:146–159.
202. Irvin RT, MacAlister TJ, Costerton JW. 1981. Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer modification of *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J Bacteriol* 145:1397–1403.

# Annexes



## Annexe 1 Souches utilisées au Laboratoire du CEA

Espèce	Nomenclature CNR	Beta-lactamases d'intérêt exprimées
<i>C. freundii</i>	2009-47	CTX-M-1
<i>E. coli</i>	2008-85	CTX-M-2
<i>E. coli</i>		CTX-M-8
<i>C. freundii</i>	2010-135	CTX-M-? (groupe 1)
<i>K. oxytoca</i>	2009-85	CTX-M-14
<i>E. coli</i>	ST131	CTX-M-15
<i>K. pneum.</i>	G1R4	CTX-M-18
<i>K. pneum.</i>	19/08/15	CTX-M-19
<i>E. coli</i>	2010-73	CTX-M-27
<i>E. coli</i>	2008-87	CTX-M-32
<i>E. coli</i>	A3031	CTX-M-37
<i>E. coli</i>	2010-231	CTX-M-57
<i>P. mirabilis</i>	2011-11c	CTX-M-71
<i>E. coli</i>	D1040	CTX-M-93
<i>K. pneum.</i>		IMP-1
<i>E. coli</i>		IMP-1
<i>E. aerogenes</i>	C6052	IMP-2
<i>E. coli</i>	1D10	IMP-8
<i>S. marcescens</i>	1E9	IMP-11
<i>K. pneum.</i>	1F9	KPC-2
<i>K. pneum.</i>	Meaux	KPC-3
<i>K. pneum.</i>	D3R10	KPC-11
<i>K. pneum.</i>	ST158	KPC-?
<i>C. koseri</i>	2B9	OXA-48
<i>C. freundii</i>	2C1	OXA-48
<i>K. pneum.</i>	2A9	OXA-162
<i>E. cloacae</i>	2J4	OXA-163
<i>E. coli</i>	2D9	OXA-244

<i>S. marcescens</i>	2J5	OXA-405
<i>K. pneum.</i>		VIM-1
<i>K. pneum.</i>		VIM-1
<i>E. coli</i>	1C3	VIM-1
<i>C. freundii</i>	1D7	VIM-2
<i>C. freundii</i>		VIM-2
<i>E. cloacae</i>	1D6	VIM-4
<i>K. pneum.</i>	1D4	VIM-19
<i>E. coli</i>	1A6	CTX-M-15, NDM-4
<i>E. coli</i>	1A8	CTX-M-15, NDM-5
<i>E. coli</i>	1A9	CTX-M-15, NDM-6
<i>K. pneum.</i>	1B1	CTX-M-15 , NDM-1
<i>P. stuartii</i>	1B9	NDM-1
<i>P. rettgeri</i>	1B10	CTX-M-15, NDM-1
<i>K. pneum.</i>	2A9	CTX-M-15, OXA-48
<i>E. cloacae</i>	2B6	CTX-M-15, OXA-48
<i>K. pneum.</i>	2C9	CTX-M-15, OXA-181
<i>K. pneum.</i>	2D8	CTX-M-15, OXA-232
<i>E. coli</i>	CNR60 A6	NDM-1 ; OXA-48
<i>K. pneum.</i>	2C10	CTX-M-15, NDM-1, OXA-181
<i>A. baumannii</i>		
<i>C. freundii</i>		
<i>E. aerogenes</i>		
<i>E. cloacae</i>		
<i>E. coli</i>		
<i>K. pneum.</i>		
<i>P. mirabilis</i>		
<i>P. aeruginosa</i>		
<i>S. marscecens</i>		

## Annexe 2 Séquences des protéines recombinantes avec leur étiquette 6-His

D'après ExPASy Protparam

### CTX-M-2 (Q29 à F291) 272 acides aminés (Masse moléculaire : 29483.3 Da)

```

    10      20      30      40      50      60
MQANSVQQQL EALEKSSGGR LGVALINTAD NSQILYRADE RFAMCSTSKV MAAAAVLKQS

    70      80      90     100     110     120
ESDKHLLNQR VEIKKSDLVN YNPIAEKHVN GTMTLAEELG AALQYSDNTA MNKLIHLGG

    130     140     150     160     170     180
PDKVTAFARS LGDETFRLDR TEPTLNLAIP GDPRDTTTP LAMAQTLKNLT LGKALAEQQR

    190     200     210     220     230     240
AQLVTWLKGN TTGSASIRAG LPKSWVVGDK TGSGDYGTTN DIAVIWPNH APLVLVTFYFT

    250     260     270
QPEQKAESRR DILAAAIV THGFLEHHHH HH
```

### CTX-M-14 (Q29 à L291) 271 acides aminés (Masse moléculaire : 29056.7 Da)

```

    10      20      30      40      50      60
MQTSVAVQKL AALEKSSGGR LGVALIDTAD NTQVLYRGDE RFPFCSTSKV MAAAAVLKQS

    70      80      90     100     110     120
ETQKQLLNQP VEIKPADLVN YNPIAEKHVN GTMTLAEELSA AALQYSDNTA MNKLIHLGG

    130     140     150     160     170     180
PGGVTAFAARA IGDFTFRLDR TEPTLNLAIP GDPRDTTTPR AMAQTLRQLT LGHALGETQR

    190     200     210     220     230     240
AQLVTWLKGN TTGAASIRAG LPTSWTVGDK TGSGDYGTTN DIAVIWPQGR APLVLVTFYFT

    250     260     270
QPQQNAESRR DVLASAARI AEGLEHHHHH H
```

### CTX-M-15, 297 acides aminés (Masse moléculaire 31966.4 Da)

```

    10      20      30      40      50      60
MVKKSLRQFT LMATATVTL LGSVPLYAQT ADVQQKLAEL ERQSGGRLGV ALINTADNSQ

    70      80      90     100     110     120
ILYRADERFA MCSTSKVMAA AAVLKKSESE PNLLNQRVEI KKSVDLVNYP IAEKHVNGTM

    130     140     150     160     170     180
SLAELSAAL QYSDNVAMNK LIAHVGGPAS VTAFARQLGD ETFRLDRTEP TLNLAIPGDP

    190     200     210     220     230     240
RDTTSPRAMA QTLRNLTLGK ALGDSQRAQL VTWMKGNTTG AASIQAQLPA SWVVGDKTGS

    250     260     270     280     290
GGYGTTNDIA VIWPKDRAPL ILVTFYFTQPQ PKAESRRDVL ASAAKIVTDG LHHHHHH
```

### KPC-2 (A30 à Q293) 271 acides aminés (Masse moléculaire : 28890.55 Da)

10            20            30            40            50            60  
MAEPFAKLEQ DFGGSIGVYA MDTGSGATVS YRAEERFPLC SSFKGFLAAA VLARSQQQAG

70            80            90            100            110            120  
LLDTPIRY GK NALVPWSPIS EKYLTTGMTV AELSAAAVQY SDNAAANLLL KELGGPAGLT

130            140            150            160            170            180  
AFMRSIGD TT FRLDRWELEL NSAIPGDARD TSSPRAV TES LQKLT LGSAL AAPQRQQFVD

190            200            210            220            230            240  
WLKGNTTGNH RIRAAVPADW AVGDKTGT CG VYGTANDYAV VWPTGRAPIV LAVYTRAPNK

250            260            270  
DDKHSEAVIA AAARLALEGL GVNGQH HHHHH H

### NDM-1 (G29 à R270) 249 acides aminés (Masse moléculaire : 26559.1 Da)

10            20            30            40            50            60  
MGEIRPTIGQ QMETGDQRF G DLVFRQLAPN VWQHTSYLDM PGFGAVASNG LIVRDGGRVL

70            80            90            100            110            120  
VVDTAWTDDQ TAQILNWI KQ EINLPVALAV VTHAHQDKMG GMDALHAAGI ATYANALSNQ

130            140            150            160            170            180  
LAPQEGMVAA QHSLTFAANG WVEPATAPNF GPLKVFY PGP GHTSDNITVG IDGTDIAFGG

190            200            210            220            230            240  
CLIKDSKAKS LGNLGDADTE HYAASARAF G AAFFKASMIV MSHSAPDSRA AITHTARMAD

KLRHHHHHH

### OXA-48 (K23 à P265) 250 acides aminés (Masse moléculaire : 29101 Da)

10            20            30            40            50            60  
MKEWQENKSW NAHFTEHKSQ GVVVLW NENK QQGFTNNLKR ANQAF LPAST FKIPNSLI AL

70            80            90            100            110            120  
DLGVVKDEHQ VFKWDGQTRD IATWNRDHNL ITAMKYSVVP VYQEFARQIG EARM SKMLHA

130            140            150            160            170            180  
FDYGNEDISG NVDSFWLDGG IRISATEQIS FLRKLYHNKL HVSERSQRIV KQAMLTEANG

190            200            210            220            230            240  
DYIIRAKTGY STRIEPKIGW WVGWVELDDN VWFFAMNMDM PTSDGLGLRQ AITKEVLKQE

250  
KIIPH HHHHHH

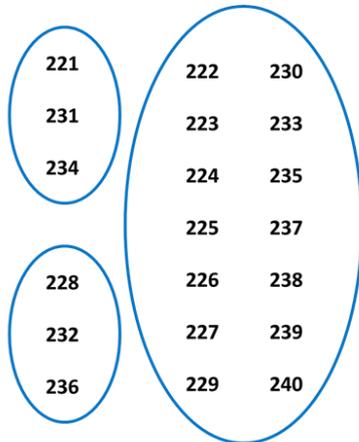
## Annexe 3 Isotypes des anticorps monoclonaux produits

Les tableaux ci-dessous présentent les noms et isotypes des anticorps monoclonaux obtenus en fonction des protéines recombinantes utilisées comme immunogènes.

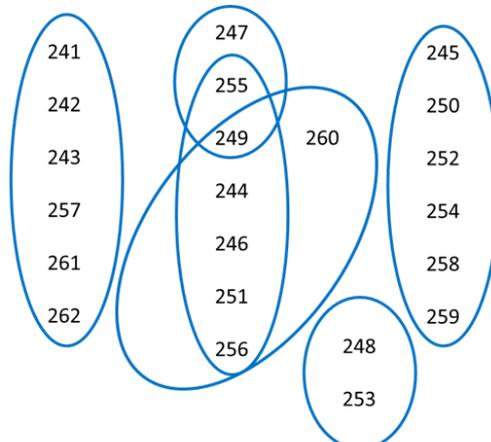
CTX-M-2		CTX-M-14		CTX-M-15	
Nom	Isotype	Nom	Isotype	Nom	Isotype
CTX 200	IgG1	CTX 221	IgG1	CTX 241	IgG1
CTX 201	IgG1	CTX 222	IgG1	CTX 242	IgG1
CTX 202	IgG1	CTX 223	IgG1	CTX 243	IgG1
CTX 203	IgG1	CTX 224	IgG1	CTX 244	IgG1
CTX 204	IgG1	CTX 225	IgG1	CTX 245	IgG1
CTX 205	IgG1	CTX 226	IgG1	CTX 246	IgG1
CTX 206	IgG1	CTX 227	IgG1	CTX 247	IgG1
CTX 207	IgG1	CTX 228	IgG1	CTX 248	IgG1
CTX 208	IgG1	CTX 229	IgG1	CTX 249	IgG1
CTX 209	IgG1	CTX 230	IgG1	CTX 250	IgG1
CTX 210	IgG1	CTX 231	IgG1	CTX 251	IgG1
CTX 211	IgG1	CTX 232	IgG1	CTX 252	IgG1
CTX 212	IgG1	CTX 233	IgG1	CTX 253	IgG1
CTX 213	IgG1	CTX 234	IgG1	CTX 254	IgG1
CTX 214	IgG1	CTX 235	IgG1	CTX 255	IgG1
CTX 215	IgG1	CTX 236	IgG1	CTX 256	IgG1
CTX 216	IgG1	CTX 237	IgG1	CTX 257	IgG1
CTX 217	IgG1	CTX 238	IgG1	CTX 258	IgG1
CTX 218	IgG1	CTX 239	IgG1	CTX 259	IgG1
CTX 219	IgG1	CTX 240	IgG1	CTX 260	IgG1
				CTX 261	IgG1
				CTX 262	IgG1

KPC-2		NDM-1		OXA-48	
Nom	Isotype	Nom	Isotype	Nom	Isotype
KPC 402	IgG1	NDM 101	IgG1	OXA 1	IgG1
KPC 404	IgG1	NDM 102	IgG1	OXA 2	IgG1
KPC 405	IgG1	NDM 103	IgG1	OXA 3	IgG1
KPC 406	IgG1	NDM 104	IgG1	OXA 4	IgG1
KPC 407	IgG1	NDM 105	IgG1	OXA 5	IgG1
KPC 408	IgG1	NDM 106	IgG1	OXA 6	IgG1
KPC 409	IgG1	NDM 107	IgG1	OXA 7	IgG1
KPC 410	IgG1	NDM 108	IgG1	OXA 8	IgG1
KPC 411	IgGA	NDM 109	IgG1	OXA 9	IgG1
KPC 412	IgG1	NDM 110	IgG1	OXA 10	IgG1
KPC 414	IgG1	NDM 111	IgG1	OXA 11	IgG1
KPC 415	IgG1	NDM 112	IgG1	OXA 12	IgG1
KPC 416	IgG1	NDM 113	IgG1	OXA 13	IgG1
KPC 418	IgG1	NDM 114	IgG1	OXA 14	IgG1
KPC 419	IgG1	NDM 115	IgG1	OXA 15	IgG1
KPC 420	IgG1	NDM 116	IgG1	OXA 16	IgG1
KPC 421	IgG1	NDM 117	IgG1	OXA 17	IgG1
KPC 422	IgG1	NDM 118	IgG1	OXA 18	IgG1
		NDM 119	IgG1	OXA 19	IgG1
		NDM 120	IgG1	OXA 20	IgG1
		NDM 121	IgG1		
		NDM 122	IgG1		

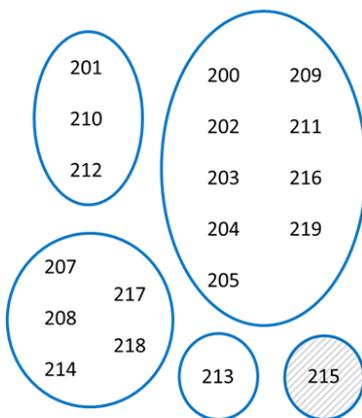
## Annexe 4 Groupes de « similarité épitopique » des anticorps produits



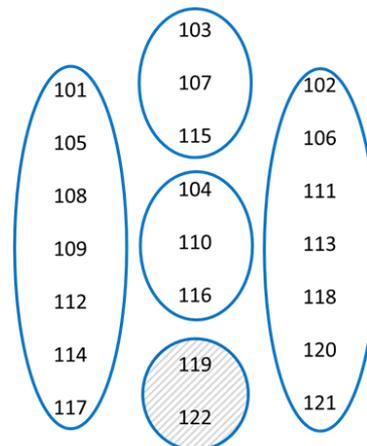
Anticorps dirigés contre CTX-M-2, CTX 221 à 240 :  
- 3 groupes de « similarité épitopique »



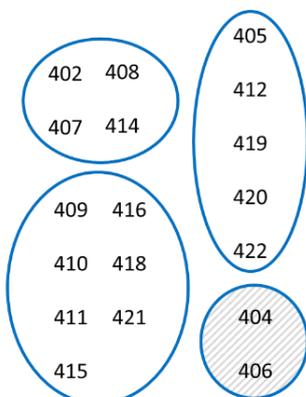
Anticorps dirigés contre CTX-M-14, CTX 241 à 262 :  
- 6 groupes de « similarité épitopique »



Anticorps dirigés contre CTX-M-15, CTX 200 à 219 :  
- 4 groupes de « similarité épitopique »



Anticorps dirigés contre NDM-1, NDM 101 à 122 :  
- 4 groupes de « similarité épitopique »



Anticorps dirigés contre KPC-2,  
KPC 402, 404 à 412, 414 à 416, 418 à 422 :  
- 4 groupes de « similarité épitopique »



Anticorps non attribuable  
à un groupe

Remarque : impossible de constituer des  
groupes pour les anticorps OXA



## Annexe 5 Validations des tests avec le soucier « Carbapénémases »

Mécanisme de résistance aux β-lactamines	Souche	Nombre d'isolats	Contenu en β-lactamase	Mono-test			Multiplex					
				CTX-M	NDM	OXA	NDM	IMP	VIM	OXA	KPC	
Carbapénémases (Ambler class B)	NDM-type	<i>E. coli</i>	1	NDM-1 + OXA-1 + OXA-10 + CMY-16 + TEM-1	N	P	N	P	N	N	N	N
		<i>E. coli</i>	1	NDM-1 + OXA-1 + TEM-1	N	P	N	P	N	N	N	N
		<i>E. coli</i>	1	NDM-1 + CTX-M-15 + TEM-1	P	P	N	P	N	N	N	N
		<i>E. coli</i>	1	NDM-1 + OXA-1 + OXA-2 + CTX-M-15 + TEM-1	P	P	N	P	N	N	N	N
		<i>E. coli</i>	1	NDM-1 + CTX-M-15 + TEM-1	P	P	N	P	N	N	N	N
		<i>E. coli</i>	1	NDM-4 + CTX-M-15 + OXA-1	P	P	N	P	N	N	N	N
		<i>E. coli</i>	1	NDM-4 + CTX-M-15 + CMY-6	P	P	N	P	N	N	N	N
		<i>E. coli</i>	1	NDM-5 + TEM-1 + CTX-M-15	P	P	N	P	N	N	N	N
		<i>E. coli</i>	1	NDM-6 + CTX-M-15 + OXA-1	P	P	N	P	N	N	N	N
		<i>E. coli</i>	1	NDM-7 + CTXM-15	P	P	N	P	N	N	N	N
		<i>E. coli</i>	2	NDM-9	NT	NT	NT	P	N	N	N	N
		<i>K. pneum.</i>	1	NDM-1 + CTX-M-15 + SHV-11 + OXA-1	P	P	N	P	N	N	N	N
		<i>K. pneum.</i>	1	NDM-1 + CTX-M-15 + CMY-4 + OXA-1	P	P	N	P	N	N	N	N
		<i>K. pneum.</i>	1	NDM-1 + CTX-M-15 + OXA-1 + OXA-9 + SHV-28 + SHV-11	P	P	N	P	N	N	N	N
		<i>K. pneum.</i>	1	NDM-1 + OXA-1 + SHV-11	N	P	N	P	N	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	1	NDM-1 + OXA-1 + CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-28 + OXA-9 + CMY-6	P	P	N	P	N	N	N	N	
	<i>K. pneum.</i>	1	NDM-1 + TEM-1 + CTX-M-15 + SHV-12 + OXA-9	P	P	N	P	N	N	N	N	
	<i>K. pneum.</i>	1	NDM-1 + TEM-1 + CTX-M-15 + SHV-12 + OXA-9	P	P	N	P	N	N	N	N	
	<i>K. pneum.</i>	1	NDM-1 + TEM-1 + CTX-M-15 + SHV-11 + OXA-1	P	P	N	P	N	N	N	N	
	<i>P. stuartii</i>	1	NDM-1 + OXA-1 + CMY-6 + TEM-1	N	P	N	P	N	N	N	N	
	<i>P. rettgeri</i>	1	NDM-1 + CTXM-15	P	P	N	P	N	N	N	N	
	<i>S. enterica</i>	1	NDM-1 + CTX-M-15 + TEM-1 + OXA-1 + OXA-9 + OXA-10	P	P	N	P	N	N	N	N	
	VIM-type	<i>E. coli</i>	1	VIM-1	N	N	N	N	N	P	N	N
		<i>E. coli</i>	1	VIM-1 + CMY-13	N	N	N	N	N	P	N	N
		<i>E. coli</i>	1	VIM-4	N	N	N	N	N	P	N	N
		<i>K. pneum.</i>	3	VIM-1	N	N	N	N	N	P	N	N
		<i>K. pneum.</i>	4	VIM-1 + SHV-5	N	N	N	N	N	P	N	N
		<i>K. pneum.</i>	1	VIM-1 + SHV-12	N	N	N	N	N	P	N	N
		<i>K. pneum.</i>	1	VIM-1 + TEM-1 + SHV-5	N	N	N	N	N	P	N	N
		<i>K. pneum.</i>	1	VIM-19 + CTX-M-3 + TEM-1 + SHV-1	P	N	N	N	N	P	N	N
		<i>E. cloacae</i>	1	VIM-1 + SHV-70	N	N	N	N	N	P	N	N
		<i>E. cloacae</i>	1	VIM-4 + TEM-1 + SHV-31	N	N	N	N	N	P	N	N
	IMP-type	<i>C. freundii</i>	1	VIM-2 + TEM-1 +	N	N	N	N	N	P	N	N
<i>C. freundii</i>		1	VIM-2 + TEM-1 + OXA-9 + OXA-10	N	N	N	N	N	P	N	N	
<i>E. coli</i>		1	IMP-1	N	N	N	N	P	N	N	N	

	<i>E. coli</i>	1	IMP-8 + SHV -12	N	N	N	N	P	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	1	IMP-1	N	N	N	N	P	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	1	IMP-1 + TEM-15	N	N	N	N	P	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	1	IMP-1 + TEM-15	N	N	N	N	P	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	1	IMP-1 + SHV-5	N	N	N	N	P	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	1	IMP-8	N	N	N	N	P	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	1	IMP-8 + SHV -12	N	N	N	N	P	N	N	N
	<i>E. cloacae</i>	1	IMP-8	N	N	N	N	P	N	N	N
	<i>E. cloacae</i>	1	IMP-8 + SHV-12	N	N	N	N	P	N	N	N
	<i>S. marces.</i>	1	IMP-11	N	N	N	N	P	N	N	N
GIM-type	<i>E. cloacae</i>	1	GIM-1	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Carbapénémases (Ambler class A)</b>											
KPC-2	<i>E. coli</i>	1	KPC-2	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>E. coli</i>	1	KPC-2 + CTXM-15	P	N	N	N	N	N	N	P
	<i>E. coli</i>	1	KPC-2 + TEM-1 + OXA-9	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>E. coli</i>	1	KPC-2 + CTX-M-9 + TEM-1	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>K. pneum.</i>	1	KPC-2 + SHV-11 + TEM-1 + CTX-M-2	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>K. pneum.</i>	1	KPC-2 + SHV-11 + TEM-1 + CTX-M-2 + OXA-9	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>K. pneum.</i>	1	KPC-2 + SHV-11	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>K. pneum.</i>	1	KPC-2 + TEM-1 + SHV-1 + CTX-M-15	P	N	N	N	N	N	N	P
	<i>K. pneum.</i>	1	KPC-2 + SHV-11 + TEM-1 + SHV-12 + OXA-9	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>K. pneum.</i>	1	KPC-2 + SHV-11	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>K. pneum.</i>	1	KPC-2 + SHV-11 + TEM-1	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>E. cloacae</i>	1	KPC-2	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>E. cloacae</i>	1	KPC-2 + TEM-1	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>E. cloacae</i>	1	KPC-2 + TEM-1 + OXA-1 + CTXM-15	P	N	N	N	N	N	N	P
	<i>E. cloacae</i>	1	KPC-2 + TEM-1 + SHV-11	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>E. cloacae</i>	1	KPC-2 + TEM-3	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>C. freundii</i>	1	KPC-2 + TEM-1	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>S. marces.</i>	1	KPC-2 + TEM-1 + SHV-12	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>S. marces.</i>	1	KPC-2 + TEM-1	N	N	N	N	N	N	N	P
KPC-3	<i>K. pneum.</i>	1	KPC-3 + TEM-1 + SHV-1 + OXA-9	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>K. pneum.</i>	1	KPC-3 + SHV-11 + OXA-9 + TEM-1	N	N	N	N	N	N	N	P
	<i>K. ozoenae</i>	1	KPC-3 + OXA-9 + TEM-1	N	N	N	N	N	N	N	P
IMI-type	<i>E. cloacae</i>	1	IMI-1	N	N	N	N	N	N	N	N
	<i>E. asburiae</i>	1	IMI-2	N	N	N	N	N	N	N	N
	<i>E. asburiae</i>	1	IMI-2	N	N	N	N	N	N	N	N
NmcA	<i>E. cloacae</i>	1	NmcA	N	N	N	N	N	N	N	N
Sme-type	<i>S. marces.</i>	1	Sme-1	N	N	N	N	N	N	N	N
	<i>S. marces.</i>	1	Sme-2	N	N	N	N	N	N	N	N
GES-type	<i>E. cloacae</i>	1	GES-5	N	N	N	N	N	N	N	N
FRI	<i>E. cloacae</i>	1	FRI-1	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Carbapénémases (Ambler class D)</b>											

OXA-48	<i>E. coli</i>	4	OXA-48 + CTX-M-15	P	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>E. coli</i>	1	OXA-48 + CTX-M-24 + TEM-1	N	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>E. coli</i>	1	OXA-48 + TEM-1 + CTX-M-1	P	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>K. pneum.</i>	4	OXA-48	N	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>K. pneum.</i>	1	OXA-48 + CTX-M-15	P	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>K. pneum.</i>	1	OXA-48 + TEM-1	N	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>K. pneum.</i>	1	OXA-48 + SHV-11	N	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>K. pneum.</i>	2	OXA-48 + CTX-M-15 + TEM -1	P	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>E. cloacae</i>	2	OXA-48 + TEM-1 + CTX-M-15 + OXA-1	P	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>E. cloacae</i>	1	OXA-48 + SHV-5	N	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>C. koseri</i>	1	OXA-48	N	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>C. koseri</i>	1	OXA-48 + TEM-1	N	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>C. freundii</i>	1	OXA-48 + SHV-12 + TEM-1	N	N	P	N	N	N	P	N	
	OXA-162	<i>K. pneum.</i>	1	OXA-162 + TEM-1 + SHV-11 + CTXM-15	P	N	P	N	N	N	P	N
	OXA-181	<i>E. coli</i>	2	OXA-181	N	N	P	N	N	N	P	N
		<i>K. pneum.</i>	1	OXA-181 + SHV-11 + TEM-1 + CTX-M-15 + NDM-1 + OXA-1	P	P	P	P	N	N	P	N
<i>K. pneum.</i>		1	OXA-181 + SHV-27 + CTX-M-15 + TEM-1 + NDM-1 + OXA-1	P	P	P	P	N	N	P	N	
<i>K. pneum.</i>		1	OXA-181 + SHV-11 + CTX-M-15 + NDM-1 + OXA-1	P	P	P	P	N	N	P	N	
<i>K. pneum.</i>		1	OXA-181 + SHV-11 + TEM-1 + CTX-M-15 + NDM-1 + OXA-9	P	P	P	P	N	N	P	N	
<i>K. pneum.</i>		1	OXA-181 + SHV-11 + CTX-M-15 + OXA-1	P	N	P	N	N	N	P	N	
<i>K. pneum.</i>		1	OXA-181 + NDM-1 + SHV-2 + CTX-M-15 + OXA-1	P	P	P	P	N	N	P	N	
OXA-204	<i>K. pneum.</i>	1	OXA-204 + CMY-4	N	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>E. coli</i>	1	OXA-204 + CMY-2 + CTX-M-15 + OXA-1	P	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>E. coli</i>	1	OXA-204 + CMY-4 + CTX-M-15 + OXA-1	P	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>E. coli</i>	1	OXA-204 + CMY-4 + CTX-M-15	P	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>K. pneum.</i>	1	OXA-204 + SHV-28 + TEM-1 + CTX-M-15	P	N	P	N	N	N	P	N	
OXA-232	<i>E. coli</i>	1	OXA-232 + CTX-M-15 + OXA-1	P	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>K. pneum.</i>	1	OXA-232 + SHV-1 + TEM-1 + CTX-M-15 + OXA-1	P	N	P	N	N	N	P	N	
OXA-244	<i>E. coli</i>	1	OXA-244 + TEM-1 + CMY-2	N	N	P	N	N	N	P	N	
	<i>E. coli</i>	1	OXA-244 + TEM-1 + CMY-2	N	N	P	N	N	N	P	N	
OXA-517	<i>K. pneum.</i>	1	OXA-517	NT	NT	P	N	N	N	P	N	
OXA-519	<i>K. pneum.</i>	1	OXA-519	NT	NT	P	N	N	N	P	N	
OXA-535	<i>S. bicestri</i>	1	OXA-535	NT	NT	P	N	N	N	P	N	
OXA-372	<i>C. freundii</i>	1	OXA-372	NT	NT	N	N	N	N	N	N	
<b>Pas de carbapénémases</b>												
Souche sauvage	<i>K. pneum.</i>	1	SHV-11	N	N	N	N	N	N	N	N	
Céphalosporinase acquise	<i>E. coli</i>	1	DHA-1	N	N	N	N	N	N	N	N	
	<i>E. coli</i>	1	ACC-1	N	N	N	N	N	N	N	N	
	<i>K. pneum.</i>	1	DHA-2	N	N	N	N	N	N	N	N	
	<i>P. mirab.</i>	1	ACC-1	N	N	N	N	N	N	N	N	
	<i>E. coli</i>	1	CTX-M-1	P	N	N	N	N	N	N	N	
BLSE	<i>E. coli</i>	1	CTX-M-3	P	N	N	N	N	N	N	N	
	<i>K. pneum.</i>	1	CTX-M-3	P	N	N	N	N	N	N	N	
	<i>E. coli</i>	2	CTX-M-14	N	N	N	N	N	N	N	N	
	<i>K. pneum.</i>	1	CTX-M-14	N	N	N	N	N	N	N	N	
	<i>E. coli</i>	2	CTX-M-15	P	N	N	N	N	N	N	N	

Céphalosporinase + imperméabilité	<i>K. pneum.</i>	3	CTX-M-15	P	N	N	N	N	N	N
	<i>E. cloacae</i>	1	CTX-M-15	P	N	N	N	N	N	N
	<i>E. cloacae</i>	1	VEB-1	N	N	N	N	N	N	N
BLSE + imperméabilité	<i>E. coli</i>	1	⚡⚡⚡ Céphalosporinase	N	N	N	N	N	N	N
	<i>E. cloacae</i>	13	⚡⚡⚡ Céphalosporinase	N	N	N	N	N	N	N
	<i>E. cloacae</i>	1	⚡⚡⚡ Céphalosporinase + CTX-M-15	P	N	N	N	N	N	N
	<i>E. aerog.</i>	1	⚡⚡⚡ Céphalosporinase	N	N	N	N	N	N	N
	<i>M. morg.</i>	1	⚡⚡⚡ Céphalosporinase	N	N	N	N	N	N	N
	<i>E. coli</i>	1	CTX-M-15	P	N	N	N	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	1	CTX-M-15 + SHV-1	P	N	N	N	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	2	CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-1	P	N	N	N	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	1	CTX-M-15 + SHV-11	P	N	N	N	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	1	CTX-M-15 + SHV-28 - TEM-1	P	N	N	N	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	1	TEM-1 + SHV-28	N	N	N	N	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	4	CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-11	P	N	N	N	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	1	CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-12	P	N	N	N	N	N	N
	<i>K. pneum.</i>	1	CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-1 + OXA-1	P	N	N	N	N	N	N
	BLSE + céphalosporinase + imperméabilité	<i>E. cloacae</i>	3	⚡⚡⚡ Céphalosporinase + CTX-M-15	P	N	N	N	N	N
<i>C. freundii</i>		1	⚡⚡⚡ Céphalosporinase + TEM-3	N	N	N	N	N	N	N
Oxacillinases à spectre étendu	<i>K. pneum.</i>	1	OXA-163	N	N	P	N	N	N	P
	<i>E. cloacae</i>	1	OXA-163	N	N	P	N	N	N	P
	<i>S. marces.</i>	1	OXA-405	N	N	P	N	N	N	P

P indique un résultat positif, N indique un résultat négatif, NT indique que la souche n'a pas été testée

⚡⚡⚡ Indique céphalosporinase surexprimée

## Annexe 6 Validation en routine du test CTX-M G1

ECBU : Examen cyto bactériologique des urines. LBA : lavage broncho-alvéolaire

N°	Souche	Site d'isolement	CTX-M G1	bla-CTX-M	Autres $\beta$ -lactamases
1	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	SHV-11
2	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-1
3	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
4	<i>E. coli</i>	Hémoculture	Négatif	CTX-M-27	
5	<i>E. coli</i>	ECBU	Négatif	CTX-M-14	
6	<i>E. coli</i>	ECBU	Négatif	CTX-M-14	
7	<i>K. pneumoniae</i>	Coproculture	Négatif	Négatif	SHV-27
7bis	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-1
8	<i>E. coli</i>	Hémoculture	Négatif	CTX-M-27	
9	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-1
10	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
11	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
12	<i>E. cloacae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1
13	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1
14	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-1	
15	<i>E. cloacae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
16	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-32
17	<i>K. pneumoniae</i>	Bile	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-1
18	<i>E. cloacae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1
19	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-28
20	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-1	
21	<i>E. coli</i>	ECBU	Négatif	CTX-M-14	TEM-1
22	<i>K. pneumoniae</i>	Per op Urinaire	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-1
23	<i>K. pneumoniae</i>	Hémoculture	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-11
24	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-1
25	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-11
26	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1
27	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-1	
28	<i>K. pneumoniae</i>	Hémoculture	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-1
29	<i>K. pneumoniae</i>	Cutané	Positif	CTX-M-15	SHV-52
30	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
31	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
32	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
33	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-1
34	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-1
35	<i>E. coli</i>	Bile	Positif	CTX-M-15	TEM-1
36	<i>K. pneumoniae</i>	Bile	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-76

37	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-28
38	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-55	TEM-1
39	<i>E. coli</i>	ECBU	Négatif	CTX-M-27	
40	<i>E. coli</i>	Hémoculture	Négatif	CTX-M-14	
41	<i>E. coli</i>	Hémoculture	Négatif	CTX-M-14	
42	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
43	<i>E. coli</i>	Peritoine	Positif	CTX-M-15	TEM-1
44	<i>E. coli</i>	ECBU	Négatif	Négatif	Négatif
44bis	<i>K oxytoca</i>	Coproculture	Positif	CTX-M-15	TEM-1
45	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1
46	<i>E. coli</i>	Cicatrice abdomen	Positif	CTX-M-55	
47	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1
48	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-82	
49	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-1	TEM-1
50	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-27
51	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
52	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1
53	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-182	TEM-1
54	<i>E. coli</i>	Bile	Positif	CTX-M-15	TEM-1
55	<i>E. cloacae</i>	Drain	Négatif	Négatif	TEM-1+SHV-12
56	<i>E. cloacae</i>	Redon	Positif	CTX-M-15	TEM-1
57	<i>E. coli</i>	Bile	Positif	CTX-M-1	
58	<i>E. coli</i>	Hémoculture	Positif	CTX-M-15	
59	<i>K. pneumoniae</i>	Cutané : cicatrice	Positif	CTX-M-15	SHV-1
60	<i>E. coli</i>	ECBU	Négatif	CTX-M-17	
61	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
62	<i>E. cloacae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
63	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-11
64	<i>E. coli</i>	Aspiration bronchique	Positif	CTX-M-15	TEM-1
65	<i>E. cloacae</i>	Drain	Positif	CTX-M-15	TEM-1
66	<i>E. cloacae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
67	<i>E. coli</i>	Bile	Positif	CTX-M-3	
68	<i>E. coli</i>	Hémoculture	Positif	CTX-M-4	
69	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-101	
70	<i>E. coli</i>	Hémoculture	Positif	CTX-M-15	
71	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1
72	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
73	<i>E. coli</i>	ECBU	Négatif	CTX-M-14	
74	<i>E. coli</i>	Hémoculture	Positif	CTX-M-15	
75	<i>K. pneumoniae</i>	LBA	Positif	CTX-M-15	SHV-1
76	<i>E. coli</i>	ECBU	Négatif	CTX-M-14	
77	<i>E. coli</i>	ECBU	Négatif	CTX-M-14	
78	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
79	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	

80	<i>E. cloacae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
81	<i>K. pneumoniae</i>	Cutané : flanc	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-28
82	<i>E.coli</i>	Sécrétions vaginales	Négatif	CTX-M-14	TEM-1
83	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-11
84	<i>C. freundii</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
85	<i>E.coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-1	
86	<i>E.coli</i>	ECBU	Négatif	CTX-M-27	
87	<i>E. cloacae</i>		Négatif	Négatif	TEM-1+SHV-12
88	<i>E.coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
89	<i>K. pneumoniae</i>	Hémoculture	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-1
90	<i>K. oxytoca</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1
91	<i>E.coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1
92	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-1
93	<i>K. oxytoca</i>	Hémoculture	Positif	CTX-M-15	
94	<i>E.coli</i>	ECBU	Négatif	CTX-M-27	
95	<i>K. pneumoniae</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1+SHV-1
96	<i>E.coli</i>	ECBU	Négatif	CTX-M-14	TEM-1
97	<i>E.coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1
98	<i>E.coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-55	
99	<i>E.coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	
100	<i>E. coli</i>	ECBU	Positif	CTX-M-15	TEM-1



## Annexe 7 Bilan des tests de spécificité avec les anticorps CTX-M

### Anticorps produits contre CTX-M-15 testés avec les trois protéines recombinantes

CTX	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219
CTX-M-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CTX-M-2	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+/-	+	-	-	-	-	-	-
CTX-M-14	-	+	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

### Anticorps produits contre CTX-M-2 testés avec les trois protéines recombinantes

CTX	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
CTX-M-15	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
CTX-M-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CTX-M-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### Anticorps produits contre CTX-M-14 testés avec les trois protéines recombinantes

CTX	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262
CTX-M-15	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+/-
CTX-M-2	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
CTX-M-14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Protéine recombinante très bien reconnue. – : Protéine recombinante non reconnue

+/- : Protéine recombinante faiblement reconnue



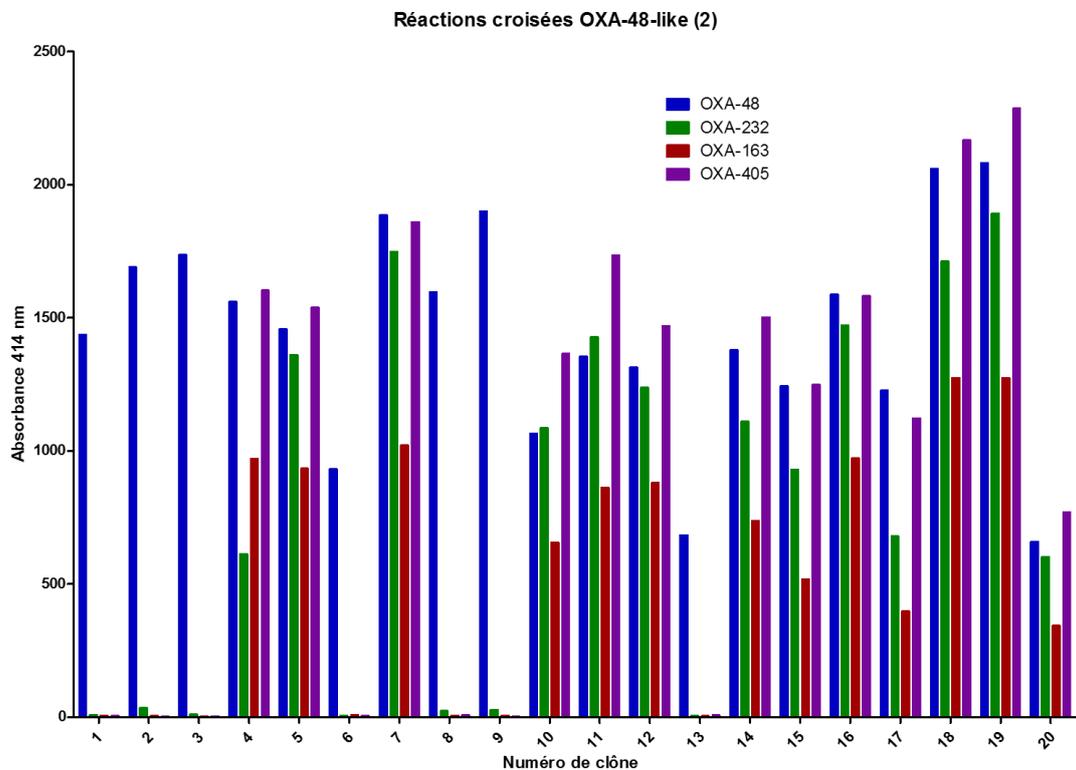
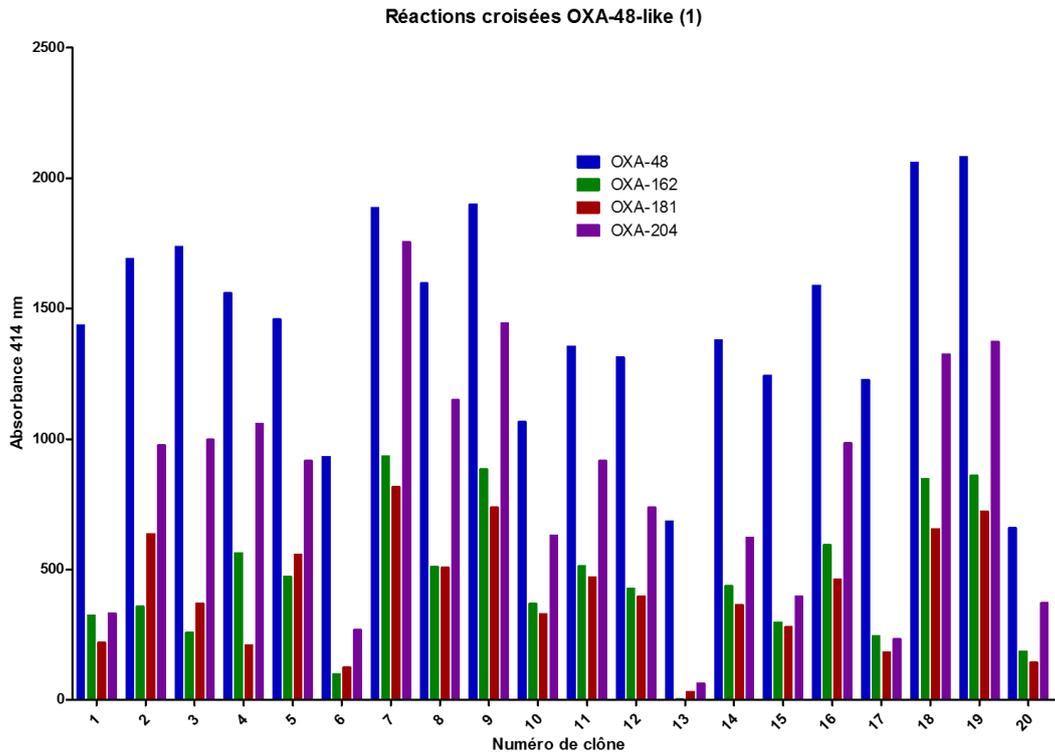
## Annexe 8 Validation en routine du mono-test NDM

	Espèces	Nombre d'isolats	Contenu en $\beta$ -lactamase (PCR)	Mono-test NDM		
<b>Carbapénémases</b>	NDM-type	<i>E. coli</i>	2	NDM-5	<b>P</b>	
		<i>K. pneumoniae</i>	2	NDM-1	<b>P</b>	
		<i>E. cloacae</i>	1	NDM-5	<b>P</b>	
	OXA-48 like	<i>E. coli</i>	10	OXA-48	<b>N</b>	
		<i>E. coli</i>	1	NDM-5 + OXA-48	<b>P</b>	
		<i>E. coli</i>	1	NDM-5 + OXA-181	<b>P</b>	
		<i>K. pneumoniae</i>	7	OXA-48	<b>N</b>	
		<i>K. pneumoniae</i>	2	OXA-181	<b>N</b>	
		<i>E. coli</i>	1	OXA-181	<b>N</b>	
		<i>E. cloacae</i>	3	OXA-48	<b>N</b>	
		<i>S. marcescens</i>	1	OXA-48	<b>N</b>	
		KPC	<i>K. pneumoniae</i>	2	KPC-like	<b>N</b>
			<i>E. cloacae</i>	1	VIM-like	<b>N</b>
	<b>Pas de carbapénémase produite</b>	<i>E. coli</i>	6		<b>N</b>	
		<i>K. pneumoniae</i>	17		<b>N</b>	
<i>E. cloacae</i>		9		<b>N</b>		
<i>K. oxytoca</i>		2		<b>N</b>		
<i>H. alvei</i>		1		<b>N</b>		
<i>S. marcescens</i>		1		<b>N</b>		
<i>C. freundii</i>		1		<b>N</b>		

P indique un résultat positif, N indique un résultat négatif



## Annexe 9 Spécificité des anticorps OXA



Signaux obtenus lors de la détection de variants d'OXA-48 avec des protéines recombinantes biotinylées.



## Annexe 10 Validation en routine du mono-test OXA-48

	Espèce	Nombre d'isolats	Contenu en $\beta$ -lactamase (PCR)	Mono-test OXA
<b>Carbapénémases</b>	NDM-type	<i>E. coli</i>	1 NDM-5	N
		<i>K. pneumoniae</i>	1 NDM-1	N
		<i>E. cloacae</i>	1 NDM-5	N
	OXA-48 like	<i>E. coli</i>	8 OXA-48	P
		<i>E. coli</i>	1 NDM-1 + OXA-48	P
		<i>K. pneumoniae</i>	3 OXA-48	P
		<i>K. pneumoniae</i>	2 OXA-181	P
		<i>E. cloacae</i>	1 OXA-48	P
	KPC	<i>K. pneumoniae</i>	2 KPC-like	N
	VIM	<i>E. cloacae</i>	1 VIM-like	N
<b>Pas de carbapénémase produite</b>	<i>E. coli</i>	2	N	
	<i>K. pneumoniae</i>	8	N	
	<i>E. cloacae</i>	7	N	
	<i>K. oxytoca</i>	1	N	
	<i>H. alvei</i>	1	N	
	<i>C. freundii</i>	1	N	

P indique un résultat positif, N indique un résultat négatif



# Annexe 11 Article « Validation du mono-test NDM »

J Clin Microbiol. 2017 Jul;55(7):2018-2029. doi: 10.1128/JCM.00248-17. Epub 2017 Apr 12.

## Development and Validation of a Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of NDM-Producing Enterobacteriaceae.

Boutal H<sup>1</sup>, Naas T<sup>2,3</sup>, Devilliers K<sup>1</sup>, Oueslati S<sup>2</sup>, Dortet L<sup>2,3</sup>, Bernabeu S<sup>2</sup>, Simon S<sup>2</sup>, Volland H<sup>4</sup>.

### ⊕ Author information

#### Abstract

The global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) that are often resistant to most, if not all, classes of antibiotics is a major public health concern. The NDM-1 carbapenemase is among the most worrisome carbapenemases given its rapid worldwide spread. We have developed and evaluated a lateral flow immunoassay (LFIA) (called the NDM LFIA) for the rapid and reliable detection of NDM-like carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from culture colonies. We evaluated the NDM LFIA using 175 reference enterobacterial isolates with characterized  $\beta$ -lactamase gene content and 74 nonduplicate consecutive carbapenem-resistant clinical isolates referred for expertise to the French National Reference Center (NRC) for Antibiotic Resistance during a 1-week period (in June 2016). The reference collection included 55 non-carbapenemase producers and 120 carbapenemase producers, including 27 NDM producers. All 27 NDM-like carbapenemase producers of the reference collection were correctly detected in less than 15 min by the NDM LFIA, including 22 strains producing NDM-1, 2 producing NDM-4, 1 producing NDM-5, 1 producing NDM-7, and 1 producing NDM-9. All non-NDM-1 producers gave a negative result with the NDM LFIA. No cross-reaction was observed with carbapenemases (VIM, IMP, NDM, KPC, and OXA-48-like), extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) (TEM, SHV, and CTX-M), AmpCs (CMY-2, DHA-2, and ACC-1), and oxacillinases (OXA-1, -2, -9, and -10). Similarly, among the 74 referred nonduplicate consecutive clinical isolates, all 7 NDM-like producers were identified. Overall, the sensitivity and specificity of the assay were 100% for NDM-like carbapenemase detection with strains cultured on agar. The NDM LFIA was efficient, rapid, and easy to implement in the routine workflow of a clinical microbiology laboratory for the confirmation of NDM-like carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*.

**KEYWORDS:** NDM-1; detection; lateral flow immunoassay

PMID: 28404680 PMID: [PMC5483903](#) DOI: [10.1128/JCM.00248-17](#)



## Annexe 12 Validation en routine du Carba5

	Espèce	Nombre d'isolats	Contenu en $\beta$ -lactamase (PCR)	Multiplex					
				NDM	IMP	VIM	OXA	KPC	
<b>Carbapénemases</b>									
NDM-type	<i>E. coli</i>	1	NDM-1	<b>P</b>	N	N	N	N	
	<i>E. coli</i>	3	NDM-5	<b>P</b>	N	N	N	N	
	<i>E. coli</i>	1	NDM-9	<b>P</b>	N	N	N	N	
	<i>K. pneumoniae</i>	3	NDM-1	<b>P</b>	N	N	N	N	
	<i>M. morgannii</i>	1	NDM-1	<b>P</b>	N	N	N	N	
OXA-48 like	<i>E. coli</i>	1	NDM-1 + OXA-48	<b>P</b>	N	N	<b>P</b>	N	
	<i>E. coli</i>	13	OXA-48	N	N	N	<b>P</b>	N	
	<i>K. pneumoniae</i>	24	OXA-48	N	N	N	<b>P</b>	N	
	<i>K. oxytoca</i>	3	OXA-48	N	N	N	<b>P</b>	N	
	<i>E. cloacae</i>	3	OXA-48	N	N	N	<b>P</b>	N	
	<i>C. koseri</i>	2	OXA-48	N	N	N	<b>P</b>	N	
	<i>C. freundii</i>	6	OXA-48	N	N	N	<b>P</b>	N	
	<i>E. aerogenes</i>	1	OXA-48	N	N	N	<b>P</b>	N	
	<i>E. coli</i>	2	OXA-181	N	N	N	<b>P</b>	N	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-181	N	N	N	<b>P</b>	N	
	<i>E. coli</i>	2	OXA-244	N	N	N	<b>P</b>	N	
	KPC	<i>K. pneumoniae</i>	1	KPC-3	N	N	N	N	<b>P</b>
	VIM	<i>K. pneumoniae</i>	1	VIM-1	N	N	<b>P</b>	N	N
<i>E. cloacae</i>		1	VIM-4	N	N	<b>P</b>	N	N	
IMI	<i>E. cloacae</i>	1	IMI	N	N	N	N	N	
<b>Pas de carbapénémase produite</b>									
	<i>E. coli</i>	4		N	N	N	N	N	
	<i>K. pneumoniae</i>	15		N	N	N	N	N	
	<i>E. cloacae</i>	17		N	N	N	N	N	
	<i>E. aerogenes</i>	3		N	N	N	N	N	
	<i>H. alvei</i>	2		N	N	N	N	N	
	<i>P. mirabilis</i>	1		N	N	N	N	N	
	<i>C. freundii</i>	1		N	N	N	N	N	
	<i>M. morgannii</i>	2		N	N	N	N	N	

P indique un résultat positif, N indique un résultat négatif



## Annexe 13 Article « Validation du Carba5 »

*J. Antimicrob. Chemother.* 2018 Jan 22. doi: 10.1093/jac/dkx521. [Epub ahead of print]

### **A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.**

Boutal H<sup>1</sup>, Voqel A<sup>1</sup>, Bernabeu S<sup>2</sup>, Devilliers K<sup>1</sup>, Creton E<sup>2,3</sup>, Cotillon G<sup>2,3</sup>, Plaisance M<sup>1</sup>, Oueslati S<sup>2</sup>, Dortet L<sup>2,3</sup>, Jousset A<sup>2,3</sup>, Simon S<sup>1</sup>, Naas T<sup>2,3</sup>, Volland H<sup>1</sup>.

#### ⊕ Author information

#### **Abstract**

**OBJECTIVES:** The global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae represents a substantial challenge in clinical practice and rapid and reliable detection of these organisms is essential. The aim of this study was to develop and validate a lateral flow immunoassay (Carba5) for the detection of the five main carbapenemases (KPC-, NDM-, VIM- and IMP-type and OXA-48-like).

**METHODS:** Carba5 was retrospectively and prospectively evaluated using 296 enterobacterial isolates from agar culture. An isolated colony was suspended in extraction buffer and then loaded on the manufactured Carba5.

**RESULTS:** All 185 isolates expressing a carbapenemase related to one of the Carba5 targets were correctly and unambiguously detected in <15 min. All other isolates gave negative results except those producing OXA-163 and OXA-405, which are considered low-activity carbapenemases. No cross-reaction was observed with non-targeted carbapenemases, ESBLs, AmpCs or oxacillinases (OXA-1, -2, -9 and -10). Overall, this assay reached 100% sensitivity and 95.3% (retrospectively) to 100% (prospectively) specificity.

**CONCLUSIONS:** Carba5 is efficient, rapid and easy to implement in the routine workflow of a clinical microbiology laboratory for confirmation of the five main carbapenemases encountered in Enterobacteriaceae.

PMID: 29365094 DOI: [10.1093/jac/dkx521](https://doi.org/10.1093/jac/dkx521)





**Titre :** Développement et validation de tests de détection rapide de la résistance aux antibiotiques.

**Mots clés :** Béta-lactamases, entérobactéries, tests immunochromatographiques

Les béta-lactamines sont les antibiotiques préférentiellement utilisés contre les bactéries à Gram négatif responsables d'infections. La dissémination mondiale d'organismes produisant des béta-lactamases à spectre élargi (BLSE) ou des carbapénémases est une préoccupation générale ainsi qu'une menace économique.

Parmi ces organismes, les entérobactéries jouent un rôle important dans les infections nosocomiales (ainsi que les infections communautaires pour *E. coli*). L'émergence et la dissémination d'entérobactéries productrices de BLSE (E-BLSE), exprimant principalement des béta-lactamases de la famille des CTX-Ms, et dans une mesure plus inquiétante de carbapénémases (EPC), principalement les enzymes NDM, KPC, IMP, VIM et OXA-48, sont sans le moindre doute un problème de santé publique majeur.

Les CTX-Ms hydrolysent les céphalosporines à large spectre et sont les BLSEs principalement rencontrées chez les entérobactéries lors d'infections urinaires communautaires, mais aussi les bactériémies à *E. coli* qui peuvent en découler. Ces infections sévères sont traitées avec des carbapénèmes, considérés comme les antibiotiques de dernier recours. Malheureusement, leur utilisation croissante a soumis les entérobactéries à une pression de sélection conduisant à de plus en plus de souches montrant une sensibilité réduite aux carbapénèmes pouvant aboutir à un échec thérapeutique.

Si l'on considère les possibilités de traitement limitées pour les E-BLSEs, que les EPCs sont souvent résistantes à plusieurs si ce n'est toutes les classes d'antibiotiques, et que pour certaines peu ou pas de traitements antibiotiques sont disponibles, leur rapide détection et identification est essentielle. Des tests fiables sont nécessaires pour aider les biologistes à, rapidement mettre en place des mesures de contrôle de ces infections, adapter les traitements antibiotiques et optimiser les stratégies de soins et leur issue favorable.

Lors de la détection des E-BLSEs et des EPCs, il est aussi crucial d'identifier la béta-lactamase impliquée pour la mise en place d'une thérapie adaptée. Les méthodes basées sur la spécificité des anticorps sont sans aucun doute parmi les plus appropriées pour atteindre cet objectif.

Pour répondre aux besoins actuels, les méthodes de détection des résistances aux antibiotiques doivent être peu coûteuses (coûts réduits des consommables et des équipements) et faciles à mettre en place (technicité faible) pour l'utilisateur. C'est pourquoi nous avons décidé de développer des tests immunochromatographiques qui répondent parfaitement à ce cahier des charges. Pour atteindre cet objectif, nous avons produit des anticorps monoclonaux dirigés contre les CTX-Ms, et les familles de carbapénémases NDM, KPC, VIM, IMP et OXA-48. Les tests immunochromatographiques correspondants ont été développés et validés. Nos tests sont robustes, facilement transférables dans une version commerciale et stables pour 24 mois sans réfrigération. Ils sont conviviaux, performants en termes de spécificité et sensibilité, et peu coûteux, de 7€ (pour un mono-test) à moins de 15€ (pour un multiplex). De plus les résultats sont obtenus dans un court délai sans la nécessité d'un équipement particulier pour la lecture. Nous avons validé un mono-test pour la détection des CTX-Ms du groupe 1, et évalué la détection des groupes 1, 2, 8 et 9 directement dans des échantillons cliniques comme les hémocultures ou l'urine. Des mono-tests pour la détection des NDMs et des OXA-48 et un multiplex pour la détection simultanée des cinq principales carbapénémases ont également été validés. Pour ce faire, nous avons utilisés 180 souches isolées sur boîtes, provenant du Centre National de Référence pour la résistance aux carbapénémases chez les entérobactéries, dont le contenu en béta-lactamase est caractérisé.

**Title:** Development and validation of rapid detection tests for antibiotic resistance.

**Keywords :** Beta-lactamases, Lateral flow immunoassay, Enterobacteriaceae

Beta-lactams are antibiotics preferentially used against gram-negative bacilli infections. The worldwide spread of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) or carbapenemase-producing organisms is a global concern and also an economic threat.

Within those organisms, Enterobacteriaceae have a major role as causes of nosocomial infections (and, for *E. coli*, also of community-acquired infections). The emergence and dissemination of ESBL-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E), mainly expressing beta-lactamases from the CTX-M family, and in a worrier aspect of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE), mainly NDM, KPC, IMP, VIM and OXA-48 like enzymes, are undoubtedly a matter of great public health concern.

CTX-Ms hydrolyze broad-spectrum cephalosporins and are the most encountered BLSE in Enterobacteriaceae, and CTX-Ms producers have been reported as the most prevalent ESBL producers in community-onset urinary tract infections (UTIs). Moreover, CTX-M-producing *E. coli* are a major cause of bloodstream infections that are often secondary to UTIs. These severe infections are treated with carbapenems, considered as last resort antibiotics. Unfortunately, their increasing use put a selective pressure on Enterobacteriaceae, leading to more and more strains showing decreased susceptibility to carbapenems and potentially leading to therapeutic failure. Considering the limited treatment options for ESBL-E and that CPE are often resistant to several if not all classes of antibiotics, and for which very few (or no) antibiotic options remain available, their rapid detection and identification is essential. Reliable tests are needed to help physicians, to quickly provide appropriate infection control measures, to adapt rapidly antibiotic treatments and optimize care strategies and outcomes.

While detecting ESBL-Es or EPCs, it is also crucial to identify the implicated beta-lactamase for accurate therapy implementation. To do so, the antibody-specificity based methods are undoubtedly appropriate. To respond to the current needs, antimicrobial drug resistance detection methods must be cheap (reduced costs of consumables and equipment) and easy to use (reduced technical complexity) for the end user, and LFIA respond to this requirements. Our objective was to develop such tests, and this led us to produce monoclonal antibodies against CTX-Ms, NDM, KPC, IMP, VIM and OXA-48 carbapenemase families and to develop and validate the corresponding LFIA. Our tests are robust assays, easily transferable in a commercialized version, stable for more than 24 months without refrigeration, user-friendly (no requirement of trained staff), high performance (sensitive and specific), low cost, from 7€ (monotest) to less than 15€ (multiplex). Moreover, the detection results are obtained in short delay without the need for highly technical equipment for the readout.

Here, we validated a LFIA for the detection of CTX-Ms (from group 1) and to a wider extent evaluated the direct detection of CTX-Ms from groups 1, 2, 8 and 9 in clinical samples such as blood culture and urine. Monotests to detect NDMs and OXA-48-like, and a multiplex for the simultaneous detection of the five main carbapenemases were also validated. These validations were conducted using 180 well characterized isolates in terms of their beta-lactamase content from the French National Reference Centre for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae.

