



**HAL**  
open science

# Génomique des bactéries multirésistantes aux antibiotiques en Normandie : investigations épidémiques, études populationnelles, mécanismes de résistance aux antibiotiques

François Gravey

► **To cite this version:**

François Gravey. Génomique des bactéries multirésistantes aux antibiotiques en Normandie : investigations épidémiques, études populationnelles, mécanismes de résistance aux antibiotiques. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMC428 . tel-04128969

**HAL Id: tel-04128969**

**<https://theses.hal.science/tel-04128969v1>**

Submitted on 15 Jun 2023

**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.



Normandie Université

## THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Génomique des bactéries multirésistantes aux antibiotiques en Normandie : investigations épidémiques, études populationnelles, mécanismes de résistance aux antibiotiques**

**Présentée et soutenue par  
FRANCOIS GRAVEY**

**Thèse soutenue le 14/12/2022  
devant le jury composé de**

MME LAURENCE ARMAND LEFEVRE	Professeur des universités, Hôpital Bichat - Claude Bernard	Rapporteur du jury
M. AXEL CLOECKAERT	Directeur de recherche à l'INRA, UNIVERSITE DE TOURS	Rapporteur du jury
M. SYLVAIN BRISSE	Directeur de recherche, Institut Pasteur	Membre du jury
MME SYLVIE DARGERÉ	MEDECIN, CHU de Caen	Membre du jury
MME MARTINE PESTEL-CARON	Professeur des universités, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. VINCENT CATTOIR	Professeur des universités PraticienHosp, UNIVERSITE RENNES 1	Président du jury

**Thèse dirigée par SIMON LE HELLO (Dynamique Microbienne associée aux Infections Urinaires et Respiratoires) et OLIVIER JOIN-LAMBERT (Dynamique Microbienne associée aux Infections Urinaires et Respiratoires)**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement





A ma maman  
« *Merci pour tout* »  
*me semble être un bon début...*

## REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Laurence Armand Lefevre et Monsieur le Docteur Axel Cloeckaert, merci beaucoup de me faire l'honneur et le plaisir d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

A Monsieur le Professeur Vincent Cattoir, merci beaucoup de me faire l'immense plaisir de présider mon jury de thèse de science. Tout a commencé par ton accueil il y a presque dix ans d'un jeune externe en médecine et la caractérisation de la résistance à la lincomycine d'une souche de *Streptococcus anginosus*. Merci de ta bienveillance permanente et de m'avoir transmis ta passion pour la recherche qui sans nul doute a orienté ma carrière telle qu'elle est aujourd'hui.

A Madame le Professeur Martine Pestel-Caron, merci beaucoup de votre présence aujourd'hui qui m'honore, merci beaucoup de tous nos échanges au cours des projets auxquels nous avons collaborés. Je me réjouis de savoir que tout cela n'est qu'un début.

A Madame le Docteur Sylvie Dargère, merci beaucoup d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse. Les échanges entre biologistes et cliniciens seront au centre de la médecine de demain, j'espère que les approches développées au cours de cette thèse auront un impact au sein des services cliniques.

A Monsieur le Docteur Sylvain Brisse, merci beaucoup de me faire le plaisir et l'honneur de venir évaluer ce travail de recherche. Merci beaucoup de tes accueils bienveillants et chaleureux pour discuter de génomique et de projets autour de *Klebsiella*. Je suis très heureux de savoir qu'il nous reste encore beaucoup à collaborer.

A Monsieur le Professeur Olivier Join-Lambert, merci beaucoup pour les échanges que nous avons eu au cours de ces quatre années de thèse. Merci beaucoup de la confiance que vous me témoignez en m'associant dans les projets de recherche à venir, nous n'avons pas terminé de comparer les matrices de distance entre la génomique et le typage infrarouge.

A Monsieur le Professeur Simon Le Hello, merci beaucoup pour toutes les aventures scientifiques que nous avons partagé depuis le Master 2. C'est un réel plaisir de travailler à vos côtés, de développer la génomique bactérienne au sein du CHU de Caen et de la région Normandie. Merci de nous partager votre capacité à voir en toute chose une opportunité. Merci de toujours nous pousser à devenir meilleur. Merci de votre confiance. Il nous reste encore beaucoup de route mais je pense que nous pouvons être fiers du travail accompli.

A Monsieur le Docteur François Guérin, merci infiniment de ta gentillesse, de tous les moments que nous avons passés ensemble à discuter science et résistance aux antibiotiques. Tes tours du labo avec les antibiogrammes les plus complexes avec lesquels tu m'étais tout le monde en échec sont de grands souvenirs. Allé je me lance, c'est une AmpC hyperproduite associée une hyper-expression de *l'aac(6')-Ib-cr* et une mutation dans OmpK36 ? Non ?! Mince... J'aurai tenté...

A Monsieur le Professeur Richard Bonnet, merci beaucoup de me faire le plaisir de venir évaluer ce travail. Merci beaucoup de nos échanges autour des projets *Enterobacter cloacae* complexe.

A Monsieur Michel Auzou, merci pour toutes les heures passées ensemble à échanger, travailler, refaire le monde. Merci beaucoup pour ta gentillesse, ton accueil, ta passion communicative. Tes connaissances en bactériologie sont très difficilement égalables, tu nous manque, mais je me réjouis de te savoir heureux avec tes petits enfants.

A Monsieur le Professeur Jean-Christophe Giard, merci beaucoup de tous les projets que nous avons partagé ensemble ces dernières années. J'apprends toujours tellement sur le fonctionnement des systèmes à deux composants, des régulateurs transcriptionnels, ..., merci beaucoup de me faire sortir ma bio-info pour discuter clonage, complémentation et doubles mutants. Je me réjouis de toutes les aventures qui nous attendent.

A Madame le Professeur Catherine Etchebest, à Monsieur le Professeur Patrick Fuchs et Monsieur le Professeur Jean-Christophe Gelly, merci infiniment de m'avoir ouvert les portes du Master deux biologie informatique. Merci de ne pas avoir eu trop peur devant ce jeune interne qui se targuait de connaître « Excel scolaire » et qui appelait Python « typhon ». Sans votre main tendue, jamais cette thèse n'aurait été possible.

A mes amis, Alexis, Arnaud, Guillaume, Romain vous êtes tous des champions, c'est un immense plaisir que de partager des heures de complicités et d'amitié à vos côtés.

A Paula et Guillaume, merci pour tous ce que nous avons partagés à Paris, vous avez fait de notre année de M2 un plaisir de tous les jours et êtes devenus des amis sincères et précieux.

A Bénédicte, merci beaucoup de tous les échanges scientifiques que nous avons au quotidien, c'est un plaisir que de co-encadrer ton travail de thèse. Allé courage, les écouvillons c'est bientôt fini !

A mes collègues du laboratoire de bactériologie du CHU de Caen, merci beaucoup pour ces moments de partagent et d'échanges professionnels. Merci beaucoup à toi Julie, de m'avoir accueilli dans ton bureau.

A l'ensemble des membres du service d'hygiène hospitalière du CHU de Caen. Merci beaucoup pour tous ces échanges. A Mesdames les Docteurs Camille Jeanne-Leroy et Margo Fevre, il ne fait aucun doute que l'algorithme va fonctionner, mais pas trop vite sinon je n'aurais plus rien à séquencer !

A tous les membres de l'équipe Dynamycure, merci beaucoup pour nos échanges scientifiques, merci beaucoup à Anne, Mamadou et Sébastien pour votre gentillesse au quotidien, être avec vous est toujours un plaisir.

Merci beaucoup à Isabelle, Anaïs et Guillaume, les trois mousquetaires de la paillasse de génomique. Merci de votre gentillesse, merci de votre implication, merci de votre professionnalisme. Votre investissement à nos côtés rend ce projet tellement meilleur.

Merci beaucoup à tous les étudiants que j'ai eu le plaisir d'encadrer depuis quatre ans. Votre gentillesse, votre curiosité et votre travail rendent mon poste d'assistant hospitalo-universitaire passionnant.

A toute ma famille, merci infiniment d'être toujours là avec moi dans tous ces projets un peu fous qui n'en finissent jamais. Je mesure tous les jours la chance qu'est la mienne.

A toi Elsa, merci de partager ma vie, merci de toujours croire que tout est possible même quand mon pessimisme est au rendez-vous. Merci de transformer les années en heures, merci de tout ton amour.

A toi Paul, qui a changé ma vie le 22 juillet 2021.

## TABLE DE MATIERES

<u>1</u>	<u>Introduction</u> .....	<u>1</u>
1.1	Résistance aux antibiotiques – État des lieux et conséquences.....	1
1.2	Résistances acquises aux $\beta$ -lactamines chez les entérobactérales.....	6
1.2.1	$\beta$ -lactamines .....	6
1.2.2	$\beta$ -lactamases .....	6
1.2.3	$\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE).....	8
1.2.4	Céphalosporinases.....	14
1.2.4.1	Céphalosporinases hyper-produites.....	14
1.2.4.2	Céphalosporinases plasmidiques.....	18
1.2.4.3	Céphalosporinases à spectre étendu .....	22
1.2.5	Carbapénèmases .....	22
1.2.5.1	Carbapénèmases de classe A.....	23
1.2.5.2	Carbapénèmases de classe B – Metallo- $\beta$ -lactamases (MLB) .....	26
1.2.5.3	Carbapénèmases de classe D – paragraphe issu du texte « La saga de l’OXA-48 : voyage express chez les entérobactérales » newsletter SFM Juin 2022 ....	28
1.2.6	Résistance non enzymatique aux $\beta$ -lactamines : diminution d’accès à la cible	33
1.3	Apport du séquençage à haut débit dans le suivi de la diffusion des BMR.....	35
1.3.1	Rappels historiques .....	35
1.3.2	Typage bactérien à l’ère de la génomique.....	37
1.3.2.1	Recherche d’éléments connus au sein d’un génome.....	37
1.3.2.2	Typage bactérien à l’échelle de la cellule .....	40
1.3.2.3	Analyses populationnelles.....	43
1.3.2.3.1	Approche gènes par gène : core genome Multi Locus Sequence Type (cgMLST) :.....	44
1.3.2.3.2	SNP typing : .....	44
1.3.2.3.3	Kmer comparaisons.....	45
1.4	Objectifs de la thèse de science.....	47
<u>2</u>	<u>Résultats</u> .....	<u>48</u>
2.1	Mise en place d’un système de surveillance des bactéries multirésistantes, présentation de la stratégie et des solutions d’analyses mise en place.....	48
2.1.1	Sélection des patients et des souches bactériennes .....	48
2.1.2	Surveillance basée sur des données phénotypiques .....	49
2.1.3	Séquençage des génomes .....	49
2.1.4	Développement des solutions d’analyses.....	51
2.1.4.1	Vérification de la qualité de séquençage et profondeur des génomes.....	51
2.1.4.2	Dresser la carte d’identité du génome .....	52

2.1.5	Analyses populationnelles.....	55
2.1.5.1	Approches core genome MLST : .....	55
2.1.5.2	Comparaison des génomes au sein d'un même séquence-type : <i>variants calling</i> 57	
2.2	Suivi des épidémies intra-hospitalières .....	58
2.2.1	Investigation of <i>Serratia marcescens</i> surgical site infection outbreak associated with peroperative ultrasonography probe.....	58
2.2.2	Highlighting extended-spectrum beta-lactamase-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> outbreak by routine genomic typing .....	66
2.3	Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	76
2.3.1	<i>ramR</i> Deletion in an <i>Enterobacter hormaechei</i> Isolate as a Consequence of Therapeutic Failure of Key Antibiotics in a Long-Term Hospitalized Patient.....	76
2.3.2	Mutations within the <i>ramAR</i> Operon are Correlated with Additional Antibiotic Resistance in ESBL <i>Enterobacteriales</i> Isolated in Intensive Care Units.....	88
2.4	Étude des populations bactériennes.....	114
2.5	Valorisations scientifiques collaboratives en lien avec le développement du séquençage .....	154
2.5.1	Articles publiés :.....	154
2.5.2	Articles soumis .....	155
2.5.3	Articles en preparation .....	155
2.5.4	Communications orales dans des congrès nationaux ou internationaux .....	156
2.5.5	Communication affichées.....	157
<u>3</u>	<u>Conclusion et perspectives .....</u>	<u>160</u>
3.1	Mise en place d'un système de surveillance institutionnel et régional .....	160
3.1.1	Développement institutionnel du système de surveillance .....	160
3.1.2	Une surveillance génomique à l'échelle de la région Normandie.....	161
3.2	Naissance de nombreux projets de recherche .....	163
3.2.1	Place de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier dans le système de surveillance des E-BLSE ? .....	163
3.2.2	Mieux comprendre la dissémination des E-BLSE .....	164
3.2.3	Caractériser l'opéron <i>ramAR</i> chez <i>Enterobacter cloacae</i> et <i>Klebsiella variicola</i>	165
3.2.4	Une approche « one Health » du système de surveillance de la diffusion des BMR	165
<u>4</u>	<u>Bibliographie.....</u>	<u>167</u>
<u>5</u>	<u>Annexes.....</u>	<u>185</u>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Conséquences des infections secondaires aux bactéries résistantes aux antibiotiques en Europe en 2015 .....	5
Figure 2 : Antibiogrammes en diffusion de trois souches d'Entérobactérales productrices de BLSE .....	9
Figure 3 : principaux résultats de la méta-analyse « <i>Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum b-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis</i> » réalisée par Schwaber et Carmeli .....	13
Figure 4 : Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines de deux souches de <i>Enterobacter hormaechei</i> ayant des expressions de ampC différentes .....	15
Figure 5 : Représentation de la régulation d'expression de ampC d'après « <i>Clinical Management of Infections Caused by Enterobacteriaceae that Express Extended-Spectrum <math>\beta</math>-Lactamase and AmpC Enzymes</i> » Harris 2015 .....	17
Figure 6 : Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamases d'une souche de <i>Escherichia coli</i> sauvage et une souche de <i>Escherichia coli</i> produisant la céphalosporinase plasmidique DHA-1 .....	20
Figure 7 : Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines de trois Entérobactérales productrices de carbapénémases de type KPC, NDM et OXA.....	24
Figure 8 : Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines de trois espèces d'Entérobactérales productrices de la carbapénémase OXA-48 .....	30
Figure 9 : Organisation des différents transposons Tn1999 porteurs de la carbapénémase OXA-48 .....	31
Figure 10 : Présentation des deux approches permettant de rechercher des informations à partir des données de séquençage .....	38
Figure 11 : Présentation du fonctionnement de l'assemblage <i>de novo</i> basé sur le chevauchement des kmers d'une longueur 4 et la formation de graphes de De Bruijn .....	39
Figure 12 : clustering de 54 118 génomes issus de ncbi RefSeq via l'algorithme Mash .....	46
Figure 13 : Antibiogramme élargi réalisé avant le séquençage de toute souche bactérienne ..	50
Figure 14 : Exemple des résultats du typage génomique pour des souches de <i>Escherichia coli</i> .....	54
Figure 15 : Analyses cgMLST des populations d'entérobactérales productrices de BLSE isolées dans les services de réanimation du CHU de Caen entre 2019 et 2021, impact de la pandémie de covid-19 sur la diversité de souches circulantes.....	56
Figure 16 : Antibiogrammes en diffusion illustrant l'évolution phénotypique de d'une souche clinique de <i>Enterobacter hormaechei</i> .....	77
Figure 17 : Compte rendu d'une analyse de typage génomique pour une souche de <i>Escherichia coli</i> .....	162

## TABLE DE TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des $\beta$ -lactamases proposée en 2010 dans l'article intitulé « <i>Updated Functional Classification of <math>\beta</math>-Lactamases</i> » Bush et Jacoby 2010.....	8
--	---

## LISTE DES ABREVIATIONS :

BES : *Brazil extended-spectrum  $\beta$ -lactamase*  
BLSE :  $\beta$ -lactamase à spectre étendu  
BMR : bactérie multi-résistante  
CARD : *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*  
C1G : Céphalosporines de première génération  
C3G : Céphalosporines de troisième génération  
CC : *Complex Clonal*  
CDC : *Centers for Disease Control and Prevention*  
cgMLST : *core genome MLST*  
CHU : Centre Hospitalo-Universitaire  
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice  
CTX-M : *cefotaxim-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase*  
DALYs : *Disability-adjusted life years*  
E-BLSE : Entérobactérie productrice de BLSE  
ECDC: *European Centre for Disease Prevention*  
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique  
ESAC-Net : *European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network*  
ERV : *Enterococcus* résistants à la vancomycine  
EVCI : Espérance de Vie Corrigée de l'Incapacité  
GES : *Guiana extended-spectrum  $\beta$ -lactamase*  
IBL : inhibiteurs de beta-lactamases  
IC<sub>95%</sub> : Intervalle de confiance à 95%  
IBL : Inhibiteur de  $\beta$ -lactamase  
IMI : IMIpenemase  
IMP : *IMipenem-resistant Pseudomonas*  
Inc : groupes d'incompatibilité  
IS : *Insertion sequence*  
JH : Journée d'hospitalisation  
KPC : *Klebsiella Pneumoniae* Carbapénèmase  
NDM : *New Delhi metallo- $\beta$ -lactamases*  
MLB : Metallo- $\beta$ -lactamases  
MLST : *Multi-Locus Sequence Typing*  
OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques  
PA $\beta$ N : Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide  
PB : Paire de Bases  
PER *Pseudomonas extended resistant  $\beta$ -lactamase*  
PCR : *Polymerase Chain Reaction*  
PLP : Protéines de Liaison aux Pénicillines

PFGE : *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*  
PRB : protéine responsable de la résistance à la bléomycine  
Q : *Phred score*  
QRDR : *Quinolones Resistance Determining Region*  
qRT-PCR : *quantitative reverse transcription PCR*  
SIL : système d'information du laboratoire  
SME : *Serratia Marcescens* Enzyme  
rep-PCR : *Repetitive-element polymerase chain reaction*  
RR : Risque relatif  
RND : *Resistance-Nodulation-cell Division*  
SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline  
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline  
SFO : *Serratia fonticola*  $\beta$ -lactamase  
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*  
SHV : sulfhydryl reagent variable  $\beta$ -lactamase  
ST : *Sequence-Type*  
TEM : Temoneira  $\beta$ -lactamase  
TLE : TEM-like enzyme  
VIM : *Verona IMipenemase*  
VFDB : Virulence Finder DataBase  
XDR : *eXtensively Drug Resistant*

# 1 Introduction

## 1.1 Résistance aux antibiotiques – État des lieux et conséquences

La résistance aux antibiotiques est un défi majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Les institutions supranationales ont publié différents plans de lutte contre ce fléau dont l'organisation mondiale de la santé (2015), soutenue par une déclaration des Nations Unies (2016) mais aussi la Commission Européenne (2017) ou encore différents forums internationaux tels que le G7 et le G20 (World Health Organization 2015; European commission 2017; Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) 2019; World Health Organization 2011; 2017). Ces plans d'action ont pour but de dresser la liste des pathogènes les plus résistants aux antibiotiques critiques, d'inciter la recherche de nouvelles molécules actives mais aussi de coordonner et rationaliser l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine, vétérinaire, ainsi qu'en agriculture et filières d'élevage.

La résistance aux antibiotiques par les bactéries n'est pas un phénomène récent (Levy et Marshall 2004; Tran-Dien et al. 2018). Avant même l'utilisation des antibiotiques en thérapeutique, des souches capables d'hydrolyser la pénicilline étaient décrites (Abraham et Chain 1940). Dès les années 1930 – 1940, des souches de *Streptococcus pyogenes* résistantes aux sulfamides ont été rencontrées en clinique, tout comme des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la pénicilline (Levy et Marshall 2004). Les premières bactéries décrites comme multi-résistante étaient les souches d'Entérobactérales dont *Shigella* et *Salmonella* isolées au milieu des années 1950 au Mexique qui présentaient des résistances vis-à-vis du chloramphénicol, de la streptomycine et de la tétracycline (Levy 2001). Ces bactéries présentaient alors des résistances concomitantes vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines dont les céphalosporines, des aminosides, du chloramphénicol ou encore de la tétracycline (Levy 2001). Par la suite, la résistance aux antibiotiques, dont le principal vecteur est l'utilisation massive de ces molécules, n'a fait que progresser en fréquence, mais a aussi diffusé à l'ensemble de la planète (Laxminarayan et al. 2013).

Une évaluation de la consommation en antibiotiques entre 2000 et 2010 de 71 pays a retrouvé une augmentation globale de 35% dont 45% pour les carbapénèmes et de 13% pour les polymyxines ; deux classes antibiotiques de dernier recours (Van Boeckel et al. 2014). Les

antibiotiques sont aujourd'hui parmi les molécules les plus achetées à l'échelle mondiale dont les taux de consommation varient profondément entre les pays (Laxminarayan et al. 2013; Van Boeckel et al. 2014). *L'European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network* (ESAC-Net) retrouvait en 2020 une consommation d'antibiotiques de 8,5 doses journalières pour 1000 habitants par jour aux Pays Bas contre 28,9 à Chypre. Par ailleurs, en dehors de l'Europe et de l'Amérique du Nord, 19 à 100% de la consommation d'antibiotiques se fait sans aucune prescription médicale (Morgan et al. 2011). Les plus hauts taux de consommation par automédication ont été retrouvés en Afrique, Nigéria et Soudan (100%), puis au Brésil 46%, en Turquie 44% ou encore en Chine 36% (Morgan et al. 2011).

Cependant, la délivrance médicale n'est pas une assurance de l'utilisation à bon escient de ces molécules. En plus des prescriptions réalisées par excès et/ou pour la prise en charge d'infections non bactériennes, les revenus de certains hôpitaux dépendent de leurs ventes pharmaceutiques pour lesquelles les antibiotiques ont une part très importante pouvant atteindre jusqu'à 25% (Laxminarayan et al. 2013). En Inde, il existe des accords financiers entre les prescripteurs et les pharmaciens. Ces derniers payent les médecins qui adressent leurs patients à leur officine, ceci pouvant questionner sur l'intégrité et le bien fondé des prescriptions réalisées (Laxminarayan et al. 2013). Les différents acteurs de la médecine humaine ne sont pas les seuls responsables de l'utilisation massive d'antibiotiques à travers le monde. En effet, de 1000 à 2000 tonnes d'antibiotiques sont utilisés par les secteurs de médecine humaine, vétérinaire et les différents acteurs de l'agriculture (Wise 2002).

Pour la médecine humaine, il existe trois grandes conséquences de l'antibiorésistance (i) une augmentation des taux de mortalité des infections secondaires à bactéries résistantes, (ii) une augmentation de la durée de séjour et des coûts de la prise en charge de ces infections, (iii) une annulation de certains actes tels que les transplantations d'organes, les chimiothérapies ou encore certaines interventions chirurgicales pour cause de colonisations et/ou infections à bactéries résistantes aux antibiotiques (Levy et Marshall 2004; Laxminarayan et al. 2013; Cassini et al. 2019; Laxminarayan et al. 2010).

Le *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) a estimé en 2019 que 2 868 700 infections et 35 900 décès, soit 100 patients par jour aux USA ont été causés par des micro-organismes (bactéries et levures) résistants aux biocides (Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) 2019). Une étude réalisée au sein de 31 pays Européens s'est intéressée aux bactériémies à *S. aureus* et *E. coli*. Les souches étaient résistantes ou non à la méticilline : *S. aureus* sensibles à la méticilline (SASM) et *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) ; résistantes ou non aux céphalosporines de troisième génération (C3G) : *E. coli*-C3GS et *E. coli*-

C3GR. Les odds ratio ajustés de mortalité à 30 jours étaient de 2,4 pour les SASM contre 4,4 pour les SARM et de 1,9 pour les *E. coli*-C3GS et 4,6 pour les *E. coli*-C3GR ayant pour conséquence une surmortalité par an de 5503 et 2712 patients pour les SARM et les *E. coli*-C3GR respectivement. Dans les pays en voie de développement, les conséquences sont encore plus tragiques car l'accès aux antibiotiques de seconde ligne y est plus difficile (Laxminarayan et al. 2013). Au sein d'une cohorte de 300 sepsis néonataux suivie en Tanzanie, 19% des nouveau-nés sont décédés de leurs infections dont 52% des nouveau-nés infectés par une Entérobactérie productrice de BLSE (E-BLSE) contre 25% de ceux infectés par une Entérobactérie sauvage et 55% de ceux infectés par un SARM contre 21% de ceux infectés par un SASM (Kayange et al. 2010).

Un rapport publié par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) en 2018 a estimé que 2,4 millions de personnes en Europe, en Amérique du Nord et en Australie vont mourir d'une infection à bactérie multi-résistante (BMR) ces 30 prochaines années (Hofer 2019). Ces mêmes infections seront responsables d'une dépense de santé estimée à 3,5 milliards de dollars par an (Hofer 2019).

La situation est encore plus alarmante au Brésil ou en Russie, où les taux d'infections à BMR sont actuellement de 40 à 60%. Ces dernières sont estimées à augmenter sept fois plus vite que dans les pays de l'OCDE.

Un rapport demandé en 2014 par le Premier ministre anglais David Cameron à un groupe de travail dirigé par Jim O'Neill et publié en 2016 sur la crise de l'antibiorésistance dans le monde estimait à 700 000 le nombre actuels de décès en 2014 attribuables à la résistance aux chimiothérapies infectieuses de six pathogènes : VIH, *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ; ce chiffre atteindrait 10 millions de décès par an en 2050 si rien n'est fait (Review on Antimicrobial Resistance et Jim O'Neill, s. d.).

Le *European Centre for Disease Prevention* (ECDC) a récemment présenté des données de mortalité en Europe basées sur le réseau ESAC-Net de 2015. Les chiffres présentés sont en accord avec les précédentes études : environ 700 000 infections par an en Europe causées par des BMR dont plus de 60% sont associées aux soins (Cassini et al. 2019). Ces infections se compliquent de plus de 30 000 morts par an et touchent particulièrement les enfants en bas âge <1 an et les personnes de plus de 65 ans (Cassini et al. 2019). En France, 124 806 infections à BMR ont été recensées dont 5 534 décès, soit le deuxième pays le plus touché en nombre de décès derrière l'Italie qui comptait 10 762 décès la même année (Cassini et al. 2019). En plus d'une description par origine géographique, ce travail associe à chaque grand groupe de BMR sa part dans le nombre d'infections observées, la mortalité attribuable ainsi que les *Disability-*

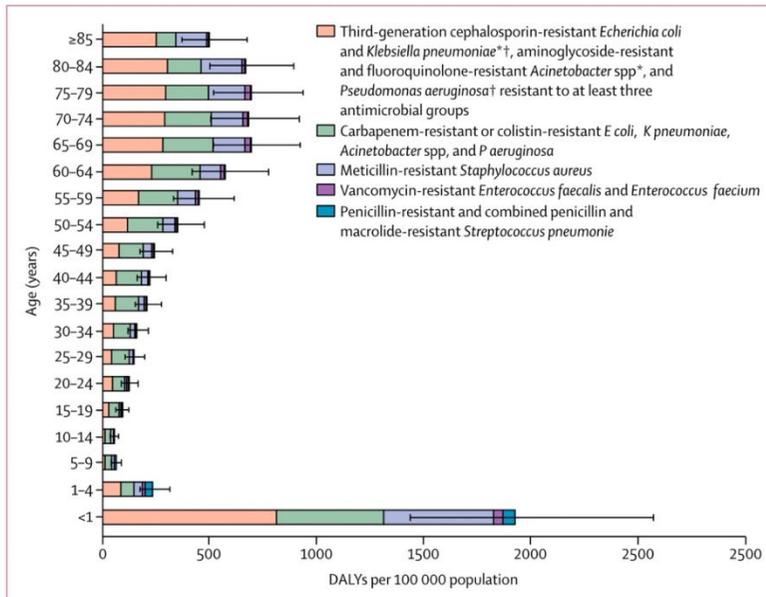
*adjusted life years* (DALYs) ou Espérance de Vie Corrigée de l'Incapacité (EVCI). Les DALYs correspondent à la morbidité globale d'une maladie qui associe le nombre cumulé d'années perdues en raison d'une mauvaise santé, d'un handicap ou d'une mort précoce. Tous pays, toutes espèces et tous mécanismes de résistance confondus, les décès attribuables aux infections à BMR ont augmenté d'un facteur de 2,46 entre 2007 et 2015 en Europe (Cassini et al. 2019). Ainsi, en 2015, en Europe, il a été estimé que 671 689 [IC<sub>95%</sub> 583 148 – 763 966] infections ont été causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques responsables de 33 110 décès [IC<sub>95%</sub> 28 480 – 38 430] et 874 541 DALYs [IC<sub>95%</sub> 768 837 – 989 068].

Les enfants âgés de moins d'un an ainsi que les patients de plus de 65 ans sont les plus touchés par la morbi-mortalité liée à la résistance aux antibiotiques (Figure 1-A).

Il est important de constater que la dynamique est très différente en fonction des espèces bactériennes. Les bactéries *cocci* à Gram positif telles que les SARM, les *Enterococcus* résistants à la vancomycine (ERV) ou les *Streptococcus pneumoniae* résistants à la pénicilline ne donnent pas plus d'infections mortelles entre 2007 et 2015 (Cassini et al. 2019). En revanche, les données sont tout autre pour les décès causés par bacilles à Gram négatif tels que les *Pseudomonas aeruginosa* résistants aux carbapénèmes, augmentation d'un facteur 3, les *E. coli*-C3GR et *Klebsiella pneumoniae*-C3GR, augmentation d'un facteur 4 pour les deux espèces, et augmentation de facteurs 5 et 6 des *E. coli* résistants aux carbapénèmes *E. coli*-CarbaR et *K. pneumoniae*-CarbaR. Ainsi, les souches de *E. coli*-C3GR étaient responsables du plus grand nombre de décès causés par des souches résistantes aux antibiotiques en Europe au cours de l'année 2015 (Cassini et al. 2019). Ces données ont été confirmées par une étude réalisée à l'échelle de 204 pays qui a estimé le nombre de décès en 2019 attribuables à la résistance aux antibiotiques à 1,27 millions de personnes [IC<sub>95%</sub> 911 000 – 1 710 000] pour lesquels *E. coli* et *K. pneumonie* étaient premières et troisièmes espèces en cause (Murray et al. 2022).

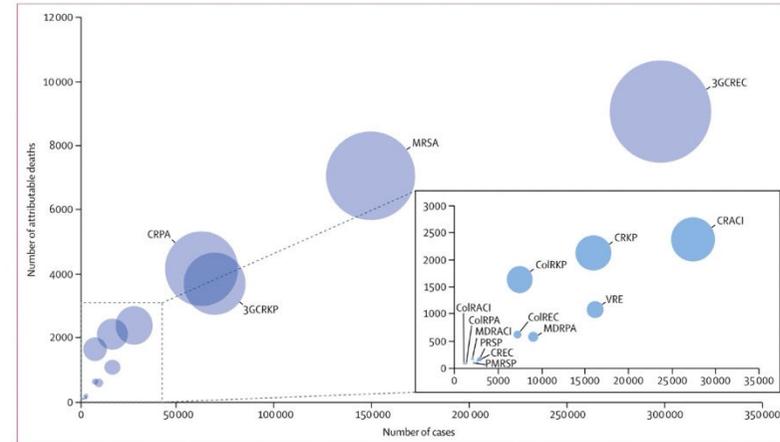
Au regard de ces chiffres publiés, en accord avec les données des institutions publiques (Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) 2019), les Entérobactérales résistantes aux  $\beta$ -lactamines représentent LA nouvelle menace de l'antibiorésistance vis-à-vis desquels des systèmes de surveillance à l'échelle de la planète sont déployés (World Health Organization 2021).

A



**Figure 2: Model estimates of the burden of infections with antibiotic-resistant bacteria of public health importance in DALYs, by age group, EU and European Economic Area, 2015**  
 Error bars are 95% uncertainty intervals. DALYs=disability-adjusted life-years. \*Excludes those resistant to carbapenem or colistin. †In 2015, most of the third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* (88.6%) and *K pneumoniae* (85.3%) isolates reported to the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network produced an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase.<sup>9</sup>

B



**Figure 1: Infections with antibiotic-resistant bacteria, EU and European Economic Area, 2015**  
 Diameter of bubbles represents the number of disability-adjusted life-years. ColRACI=colistin-resistant *Acinetobacter* spp. CRACI=carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. MDRACI=multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. VRE=vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. ColREC=colistin-resistant *Escherichia coli*. CREC=carbapenem-resistant *E. coli*. 3GCREC=third-generation cephalosporin-resistant *E. coli*. ColRKP=colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. CRKP=carbapenem-resistant *K pneumoniae*. 3GCRKP=third-generation cephalosporin-resistant *K pneumoniae*. ColRPA=colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. CRPA=carbapenem-resistant *P aeruginosa*. MDRPA=multidrug-resistant *P aeruginosa*. MRSA=meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PRSP=penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. PMRSP=penicillin-resistant and macrolide-resistant *S pneumoniae*.

Figure 1 : Conséquences des infections secondaires aux bactéries résistantes aux antibiotiques en Europe en 2015

Figures issues de l'article « Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis » de (Cassini et al. 2019) publié dans le *Lancet Infectious Diseases*. Figure 1-A Répartition des DAILYs en fonction de l'âge des patients, Figure 1-B, Nombre d'infections, de morts et de DAILYs attribuables à différents groupes de bactéries résistantes aux antibiotiques.

## 1.2 Résistances acquises aux $\beta$ -lactamines chez les entérobactérales

### 1.2.1 $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines stoppent la croissance bactérienne en inhibant la synthèse de la paroi par interaction avec les transpeptidases nommées Protéines de Liaison aux Pénicillines (PLP) (Bush et Bradford, s. d.; De Angelis et al. 2020). Ceci empêche la transpeptidation des peptidoglycanes qui ne peuvent plus venir constituer la paroi bactérienne (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012; Radkov et al. 2018). Cette famille d'antibiotiques est divisée en quatre groupes, pénicillines, céphalosporines, monobactam et carbapénèmes dont les spectres d'actions anti bactériens varient (De Angelis et al. 2020; Nordmann, Dortet, et Poirel 2012). Leur bonne tolérance, leur caractère bactéricide en font les molécules les plus utilisées pour le traitement des infections bactériennes (Bush et Bradford, s. d.; De Angelis et al. 2020). Entre 2004 et 2014, cette classe thérapeutique représentait 65% de toutes les prescriptions intra veineuses d'antibiotiques réalisées aux USA. Les principales molécules administrées étaient les céphalosporines (47%), suivies des associations pénicillines – inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases dont piperacilline – tazobactam, ticarcillin – ou ampicilline – acide clavulanique (37%) puis les carbapénèmes (11%). Cette consommation massive d'une même classe antibiotique s'est soldée par le rapide développement de nombreuses résistances associées à une importante variété de mécanismes impliqués, mais aussi, par la diversité des supports génomiques. Parmi les Entérobactérales, trois mécanismes sont décrits comme entraînant la résistance aux  $\beta$ -lactamines : (i) inactivation enzymatique des  $\beta$ -lactamines qui représente de très loin la part la plus importante de la résistance, (ii) augmentation de l'efflux des molécules via des pompes actives, (iii) diminution de la perméabilité membranaire par modification quantitative et/ou qualitative des porines (Bush et Bradford, s. d.; Nordmann, Dortet, et Poirel 2012; Blair et al. 2015).

### 1.2.2 $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes capables d'hydrolyser le noyau  $\beta$ -lactame des molécules inactivant l'antibiotique. Elles sont synthétisées par différentes bactéries dont de nombreuses espèces d'Entérobactérales. Leur existence est bien antérieure à l'utilisation des antibiotiques

en médecine humaine ; comme en témoigne l'origine de la  $\beta$ -lactamase de *Klebsiella oxytoca* estimée dater de plus de 100 millions d'années (Fevre et al. 2005). En revanche, l'hyper consommation d'antibiotiques a précipité (i) une diversification de ces enzymes, (ii) leur diffusion à différentes espèces bactériennes et (iii) un élargissement du spectre enzymatique (Bush 2013). Plus de 4900 beta-lactamases sont recensées dans les bases de données (Naas et al. 2017). Deux classifications de ces enzymes co-existent. La première, nommée classification de Ambler, définissait quatre classes basées sur les homologues de séquences (Ambler 1980). Trois classes (A, C et D) y sont définies comme des sérines hydrolases, alors que la quatrième, la classe B, est une metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) (Ambler 1980). La seconde, fonctionnelle, a été proposée et réactualisée à plusieurs reprises (Bush et Jacoby 2010). Elle regroupe les enzymes en trois classes : groupe 1 Céphalosporinases, groupe 2 sérine- $\beta$ -lactamases et groupe 3 les MBL (Bush et Jacoby 2010). Cette catégorisation s'appuie sur les substrats des enzymes, mais aussi sur leurs sensibilités aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Bush et Jacoby 2010). Le Tableau I ci-dessous illustre les interconnexions entre les classifications de Ambler et de Bush – Jacoby.

Les  $\beta$ -lactamases regroupent différentes enzymes dont la nature des substrats est variable (Bush et Jacoby 2010). Certaines n'hydrolysent que les pénicillines et ne présentent alors pas de réel problème thérapeutique, alors que d'autres sont capables d'inactiver les antibiotiques ayant un large spectre d'action tels que les céphalosporines de troisième génération (C3G) et/ou les carbapénèmes : ce sont celles-ci qui font toute la problématique de l'antibiorésistance.

Tableau 1 : Classification des  $\beta$ -lactamases proposée en 2010 dans l'article intitulé « Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases » Bush et Jacoby 2010

TABLE 1. Classification schemes for bacterial  $\beta$ -lactamases, expanded from Bush et al. (16)

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB <sup>a</sup>	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI <sup>b</sup>	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxyimino- $\beta$ -lactams	GCl1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxyimino- $\beta$ -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxyimino- $\beta$ -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftiprome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxyimino- $\beta$ -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxyimino- $\beta$ -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					LI, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

<sup>a</sup> CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

<sup>b</sup> NI, not included.

### 1.2.3 $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Parmi les  $\beta$ -lactamases de classe A, les groupes 2be, 2ber sont capables d'hydrolyser les C3G, l'aztréonam et les céphalosporines de quatrième génération, le céfépime et le ceftiprome. Il existe trois principales enzymes, les *Temoneira*  $\beta$ -lactamase (TEM), les *sulphydryl reagent variable*  $\beta$ -lactamase (SHV) et les *cefotaxim-hydrolyzing*  $\beta$ -lactamase (CTX-M) (De Angelis et al. 2020; Bush et Jacoby 2010; Wilson et Török 2018). La plupart sont sensibles aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Bush et Jacoby 2010). Cette sensibilité aux inhibiteurs est utilisée pour leurs détections au sein des laboratoires de biologie via la méthode des disques (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, s. d.). La figure 2 représente trois antibiogrammes en diffusion d'Entérobactérales productrices de BLSE de nature différente.

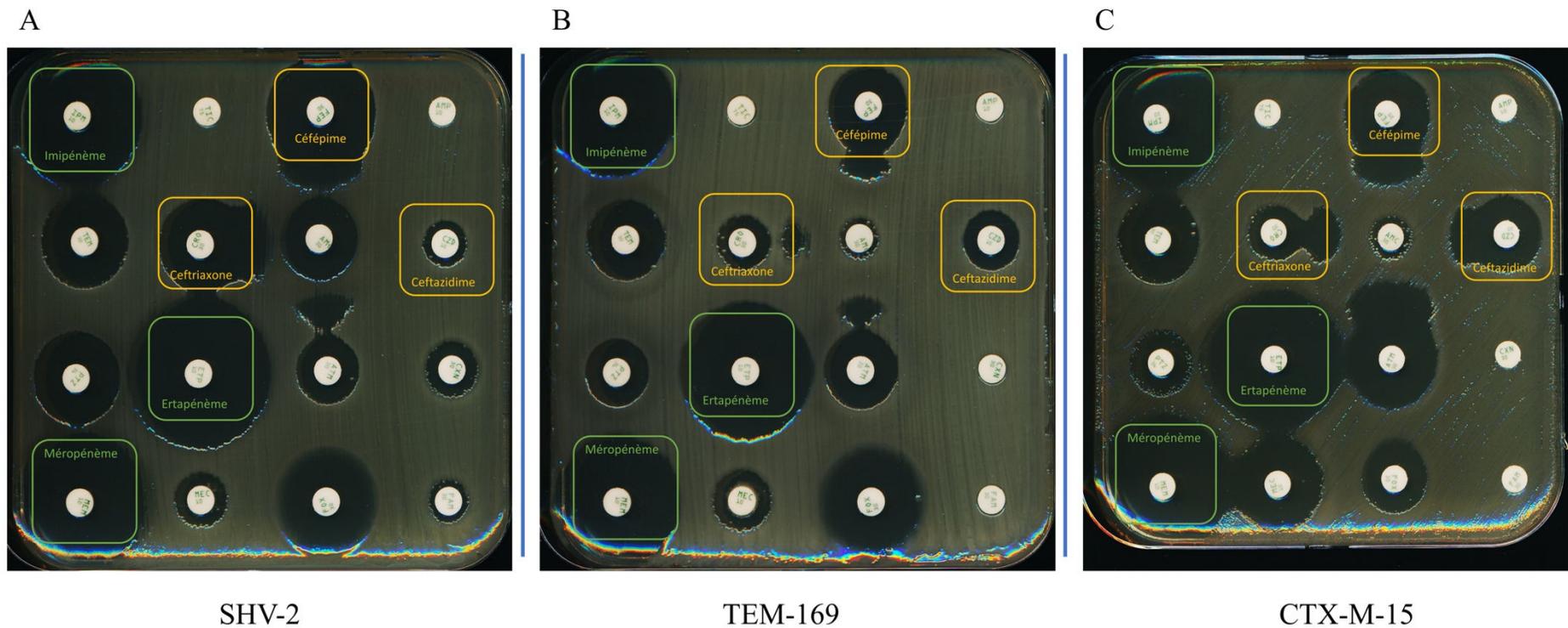


Figure 2 : AntibioGrammes en diffusion de trois souches d'Entérobactérales productrices de BLSE

Abréviations IMP : Imipénème, TIC : Ticarcilline, FEP : Céfépime, AMP : Ampicilline, TEM : Témocilline, CRO : Ceftriaxone, AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique, CZD : Ceftazidime, PTZ : Pipéracilline – Tazobactam, ETP : Ertapénème, ATM : Aztréonam, CXN : Céfalexine, MEM : Méropénème, MEC : Mécillinaam, FOX : Céfoxitine, FAM : Céfamandole

Figure 2-A, synthèse de la BLSE SHV-2 qui a une affinité supérieure pour la ceftazidime que pour la ceftriaxone.

Figure 2-B, hydrolyses similaires de la ceftriaxone et de la ceftazidime retrouvées chez une souche productrice de TEM-169.

Figure 2-C, hydrolyse plus marquée de la ceftriaxone par rapport à la ceftazidime chez une souche productrice de la CTX-M-15.

Photographie : laboratoire de microbiologie, CHU de Caen Normandie, Crédits : Gravey François

Les variants TEM et SHV de phénotype BLSE évoluent par mutation ponctuelle à partir des enzymes originelles (SHV-1, TEM-1 et TEM-2) ; tandis que les enzymes de type CTX-M ont pour origine les  $\beta$ -lactamases chromosomiques présentes au sein des différentes espèces de *Kluyvera* dont *Kluyvera ascorbata* et *Kluyvera georgiana* qui auraient été transférées sur des plasmides conjugatifs par le jeu de séquences d'insertion (De Angelis et al. 2020; Wilson et Török 2018). L'apparition de ces enzymes est concomitante à l'utilisation des molécules telles que l'aztréonam et les C3G dans les années 1980 (De Angelis et al. 2020; Sougakoff et al. 1988). Quelle que soit l'enzyme considérée, il existe une très grande diversité génomique ; plus de 230 variants pour chacune de ces enzymes ont été décrits (De Angelis et al. 2020). A noter que tous les variants TEM et SHV n'ont pas un phénotype de BLSE. Les variants des CTX-M sont eux subdivisés, au regard des diversités de séquences, en cinq clusters : CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25.

L'épidémiologie des BLSE de classe A était initialement dominée par les enzymes TEM et SHV dont le réservoir était hospitalier et fréquemment associées à des clones épidémiques notamment de *K. pneumoniae* (Cantón et Coque 2006). Au cours des années 2000, la fréquence d'isolement des entérobactériales produisant des enzymes de type CTX-M a augmenté de façon exponentielle ; ces enzymes sont devenues les plus fréquentes BLSE rencontrées (Cantón et Coque 2006). Par ailleurs, ces enzymes étaient volontiers synthétisées par des bactéries hospitalières, mais aussi par des souches communautaires de *E. coli* (Cantón et Coque 2006). La diffusion des enzymes de type CTX-M n'est pas secondaire à la diffusion épidémique d'un clone bactérien. Les enzymes de type CTX-M se propagent au sein de différents clones de *E. coli* et de différents éléments génétiques mobiles (Cantón et Coque 2006). A noter néanmoins la forte association épidémiologique entre les souches de *E. coli* ST131 et l'enzyme CTX-M-15 (Wilson et Török 2018; Castanheira, Simner, et Bradford 2021).

Bien que capables d'hydrolyser les mêmes familles de substrats, les CTX-M ne partagent que 40% d'homologie de séquence avec les TEM et SHV de phénotype BLSE (De Angelis et al. 2020). Elles présentent une affinité pour la ceftriaxone qui est supérieure aux autres enzymes (Figure 2) ; affinité potentiellement expliquée par la présence des résidus Ser237 et Arg276 qui sont propres aux CTX-M (De Angelis et al. 2020).

La dissémination des enzymes de type CTX-M est associée à différents éléments génétiques mobiles telles que les séquences d'insertion de type ISEcp1-like, associées principalement aux clusters CTX-M-1, CTX-M-2 et CTX-M-19 et les transposases ISCR1 (Wilson et Török 2018; Cantón et Coque 2006). Les séquences de type ISEcp1-like sont capables de *one-ended transpositional mechanism* ce qui permet de reconnaître une plus grande variété de séquences

d'ADN que les structures ne reconnaissant que les séquences inversées - répétées (Cantón et Coque 2006). Ainsi, les séquences de type ISEcp1-like participent fortement à la diversité génomique. En plus de permettre la transposition des gènes associés à la résistance aux antibiotiques dont les *bla*<sub>CTX-M</sub>, les séquences ISEcp1-like et ISCR1 jouent un rôle de promoteurs forts permettant une expression génique de haut niveau d'où d'importantes concentrations enzymatiques intracellulaires responsables de l'hydrolyse massive des C3G (Cantón et Coque 2006; Lallement et al. 2018). ISCR1 fait partie intégrante d'intégrons de classe 1 tels que ceux de la famille des Tn402 dont le Tn21 et le Tn402. Le Tn21 a été retrouvé dans de nombreux plasmides conjugatifs au sein des Entérobactérales (Cantón et Coque 2006). Les gènes *bla*<sub>SHV</sub> et *bla*<sub>TEM</sub> ont été décrits au sein d'un faible nombre de plasmides aux pouvoirs de conjugaison variables, appartenant à quelques groupes d'incompatibilité (Inc) dont IncM, IncF1 et IncHI2 ; tous, mis à part IncC, incapables de diffuser en dehors des souches de la famille des Entérobactérales : *narrow host range plasmids* (Cantón et Coque 2006; Dmowski, Gołębiewski, et Kern-Zdanowicz 2018). Les gènes de types *bla*<sub>CTX-M</sub> ont été retrouvés au sein de très nombreux plasmides aux pouvoirs de diffusion variables : IncFI, IncFII, IncHI2 et IncI pour les *narrow host-range* plasmides et IncN, IncP-1-a, IncL/M et IncA/C pour les *broad host-range* plasmides (Cantón et Coque 2006). Ces derniers permettent la diffusion des enzymes de type CTX-M aux *Pseudomonas aeruginosa* mais aussi au sein des *Acinetobacter* spp (Cantón et Coque 2006).

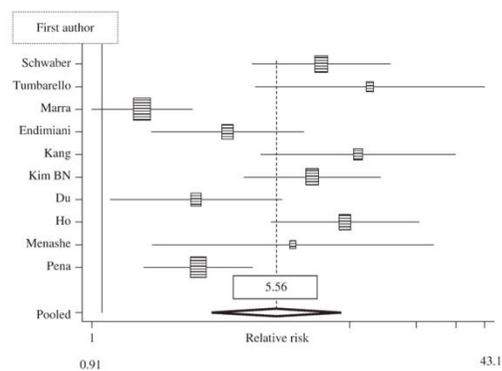
Les enzymes de type CTX-M ont été retrouvées partout dans le monde, et dans tous types de prélèvements, humains, vétérinaires et environnementaux (De Angelis et al. 2020; Wilson et Török 2018; Cantón et Coque 2006). Des données issues d'un suivi réalisé au sein de 18 hôpitaux français, répartis sur tout le territoire, retrouvaient une prédominance des enzymes de type CTX-M dont CTX-M-15 (46%), CTX-M-14 (15%) et CTX-M-1 (14,5%) (Robin et al. 2017). La diversité des CTX-M était retrouvée au sein des souches de *E. coli*, tandis qu'il existait une association forte entre l'enzyme CTX-M-15 et les souches de *K. pneumoniae* (Robin et al. 2017).

Enfin, d'autres BLSE de classe A ont été décrites parmi les Enterobactéries mais sont restées plus marginales : *Serratia fonticola* β-lactamase SFO, TEM-like enzyme TLE, *Pseudomonas* extended resistant β-lactamase PER, Brazil extended-spectrum β-lactamase BES, and Guiana extended-spectrum β-lactamase GES (De Angelis et al. 2020).

Les conséquences cliniques des BLSE sont sombres. Une méta-analyse réalisée sur 16 différentes études cliniques retrouvait que les E-BLSE étaient, dans des contextes de bactériémies, des facteurs indépendants d'une augmentation des coûts d'hospitalisation, de la

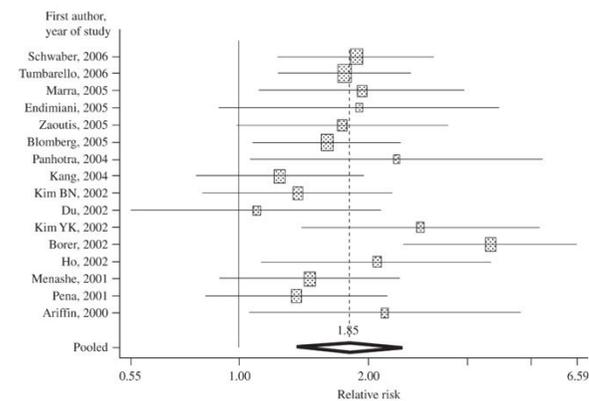
durée de séjour, du délai d'obtention d'une antibiothérapie efficace risque relatif (RR) de 5.56 [IC<sub>95%</sub> CI 2,94–10,51] et de la mortalité RR 1,85 [IC<sub>95%</sub> CI 1,39– 2,47] (Schwaber et Carmeli 2007). Les taux de mortalité des bactériémies à E-BLSE pouvaient atteindre plus de 60% des patients inclus contre un maximum de 40% pour les souches sensibles aux C3G au sein d'une population pédiatrique en Tanzanie. (Schwaber et Carmeli 2007)

A



**Figure 2.** Meta-analysis of delay in effective therapy in ESBL-associated versus non-ESBL-associated Enterobacteriaceae bacteraemia. Forest plot summary of the unadjusted results of the 10 studies included in the meta-analysis. The relative risk (RR) and 95% confidence intervals (CIs) are shown for each study. The pooled RR, represented by the diamond at the bottom of the figure, is 5.56 (95% CI 2.94–10.51,  $P < 0.001$ ). There was significant heterogeneity among the study results ( $P < 0.001$ ).

B



**Figure 1.** Meta-analysis of mortality in ESBL-producing versus non-ESBL-producing Enterobacteriaceae bacteraemia. Forest plot summary of the unadjusted results of the 16 studies included in the meta-analysis. The relative risk (RR) and 95% confidence intervals (CIs) are shown for each study. The pooled RR, represented by the diamond at the bottom of the figure, is 1.85 (95% CI 1.39–2.47,  $P < 0.001$ ). There was significant heterogeneity among the study results ( $P = 0.001$ ).

*Figure 3 : principaux résultats de la méta-analyse « Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum b-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis » réalisée par Schwaber et Carmeli*

Figure 3-A, illustre que le nombre limité de molécules actives sur les E-BLSE engendre une augmentation du délai d'obtention d'une antibiothérapie efficace d'un RR 5,56 [IC95% CI 2,94–10,51]. A noter que sur les dix études considérées, neuf retrouvaient l'allongement du délai d'obtention d'une thérapeutique adaptée.

Figure 3-B démontre l'augmentation du RR de 1,85 [IC95% CI 1,39– 2,47] au regard de la mortalité parmi les patients ayant des bactériémies à E-BLSE. A noter que les conclusions individuelles des différentes études incluses étaient parfois discordantes.

## 1.2.4 Céphalosporinases

### 1.2.4.1 Céphalosporinases hyper-produites

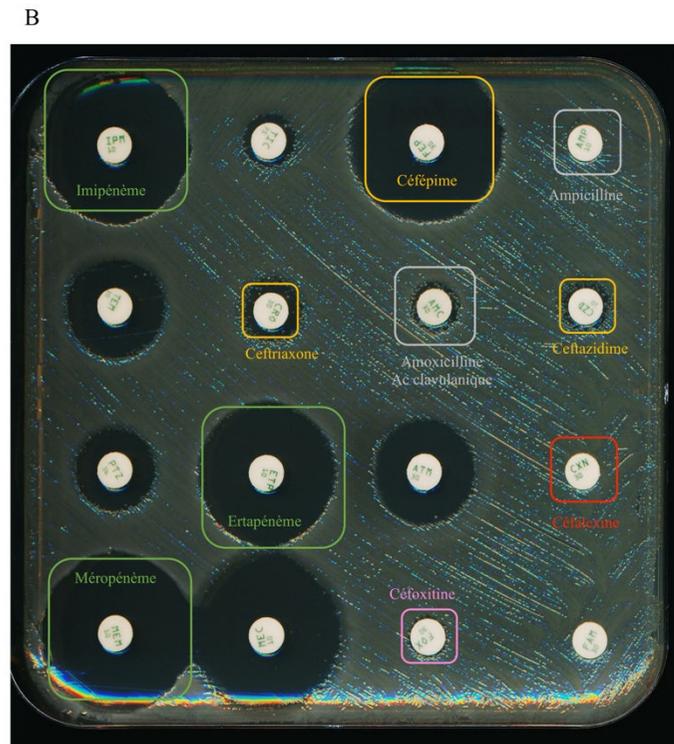
Les céphalosporinases appartiennent à la classe C de Ambler et la classe 1 de Bush et Jacoby (Ambler 1980; Bush et Jacoby 2010). Différentes nomenclatures existent pour les gènes codant pour les céphalosporinases, mais le terme générique *ampC* est communément admis, quelle que soit l'espèce dont le gène est issu (Jacoby 2009). Ces enzymes ne sont pas spécifiques de la famille des Entérobactérales, elles sont également produites par de très nombreuses espèces bactériennes dont la plupart appartiennent au phylum des Protéobactéries dont les *Aeromonas* spp, les *Acinetobacter* spp, les *Pseudomonas* spp mais aussi au sein des Actinobactéries, l'espèce *Mycobacterium smegmatis* (Jacoby 2009).

Ces enzymes ne sont pas inhibées par les inhibiteurs de beta-lactamases (IBL) de classe A tels que l'acide clavulanique, le sulbactam ou le tazobactam. En revanche, la cloxacilline, l'oxacilline, et l'aztreonam sont de bons inhibiteurs de AmpC (Jacoby 2009). Par ailleurs, différentes molécules ont été décrites comme responsables de l'induction de *ampC* ; ce sont l'amoxicilline, les C3G, la cefoxitine et l'imipénème mais aussi les IBL dont principalement l'acide clavulanique (Jacoby 2009).

En dehors de toute modification de l'expression de *ampC*, les molécules hydrolysées sont l'ampicilline, des céphalosporines de première génération et des céphamycines. A noter que l'hydrolyse des céphamycines est variable selon l'espèce bactérienne et le niveau de production de l'enzyme. En effet, la quantité de céphalosporinase produite peut augmenter entraînant une augmentation du nombre de molécules hydrolysées dont les C3G (c.f infra). Il est alors question de *ampC* dé-réprimée ou AmpC hyper-produite. Les différents phénotypes observés sont présentés sur la Figure 4.



Phénotype de résistance « classique » d'une souche productrice de AmpC.



Phénotype de résistance étendue d'une souche hyper-productrice de AmpC.

Figure 4 : Phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines de deux souches de *Enterobacter hormaechei* ayant des expressions de *ampC* différentes

Figure 4-A, la souche synthétise une quantité basale de AmpC, les molécules hydrolysées sont l'ampicilline, la céfalexine et la céfoxitine.

Figure 4-B, la souche est hyper-productrice de AmpC, il y a un élargissement du spectre d'hydrolyse : atteinte de la ticarcilline, des céphalosporines de seconde génération (céfamandole) et de troisième génération (ceftriaxone et ceftazidime). Abréviations IMP : Imipénème, TIC : Ticarcilline, FEP : Céfépime, AMP : Ampicilline, TEM : Témocilline, CRO : Ceftriaxone, AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique, CZD : Ceftazidime, PTZ : Pipéracilline – Tazobactam, ETP : Ertapénème, ATM : Aztréonam, CXN : Céfalexine, MEM : Méropénème, MEC : Mécillina, FOX : Céfoxitine, FAM : Céfamandole Photographie : laboratoire de microbiologie, CHU de Caen Normandie, Crédits : Gravey François

A l'état basal, l'expression de AmpC chez les Entérobactérales est réprimée ; le nombre de molécules hydrolysées est faible Figure 4-A. Néanmoins, il existe un système de régulation capable d'augmenter la transcription de *ampC* et donc la production de l'enzyme ; l'expression est dite inductible (Jacoby 2009). Ce système de régulation est complexe (Guérin et al. 2015). Il fait intervenir différents acteurs dont AmpG une perméase située dans la membrane interne de la cellule, AmpD une amidase cytoplasmique, AmpR un régulateur transcriptionnel de la famille des Lys-R, NagZ, DacB et les composés issus du recyclage des peptidoglycane (Jacoby 2009; Guérin et al. 2015; Philippon, Arlet, et Jacoby 2002; Harris 2015).

Au cours du cycle de recyclage de la membrane bactérienne, les mucopeptides qui sont des GlcNAc-MurNAc-tripeptides gagnent le cytoplasme à partir de l'espace périplasmique via la perméase AmpG (Figure 5) (Jacoby 2009; Guérin et al. 2015). Le résidu GlcNAc- est clivé du mucopeptide par une N- $\beta$ -acetylglucosaminidase codé par *nacZ* et le MurNAc-tripeptide est hydrolysé par AmpD pour libérer les peptides libres qui doivent être assemblés en UDP-MurNAc-pentapeptides avant de réintégrer le cycle synthèse des peptidoglycane (Figure 5-1) (Jacoby 2009; Guérin et al. 2015). Il y a une constante compétition entre les UDP-MurNAc-pentapeptides et les mucopeptides pour la liaison à AmpR. Dans les conditions physiologiques cellulaires la liaison majoritaire est UDP-MurNAc-pentapeptides – AmpR. Ce dernier se comporte alors comme un inhibiteur transcriptionnel de *ampC* ; l'expression enzymatique est faible (Figure 5-1) (Jacoby 2009; Guérin et al. 2015; Harris 2015).

En cas de destruction massive de la paroi bactérienne, par exemple secondairement à un traitement par  $\beta$ -lactamines, il y a une forte augmentation des mucopeptides dans la cellule qui ne pourront pas être transformés car l'enzyme AmpD est saturée (Figure 5-2). Ceci va décaler l'équilibre de liaison de AmpR qui sera préférentiellement lié avec les mucopeptides (Figure 5-2). Dans ce cas, AmpR se comporte comme un inducteur fort de *ampC*, responsable d'une concentration enzymatique intra-cellulaire élevée (Jacoby 2009; Guérin et al. 2015; Harris 2015). Il y a donc augmentation du nombre de molécules hydrolysées dont les C3G (Figure 4-B).

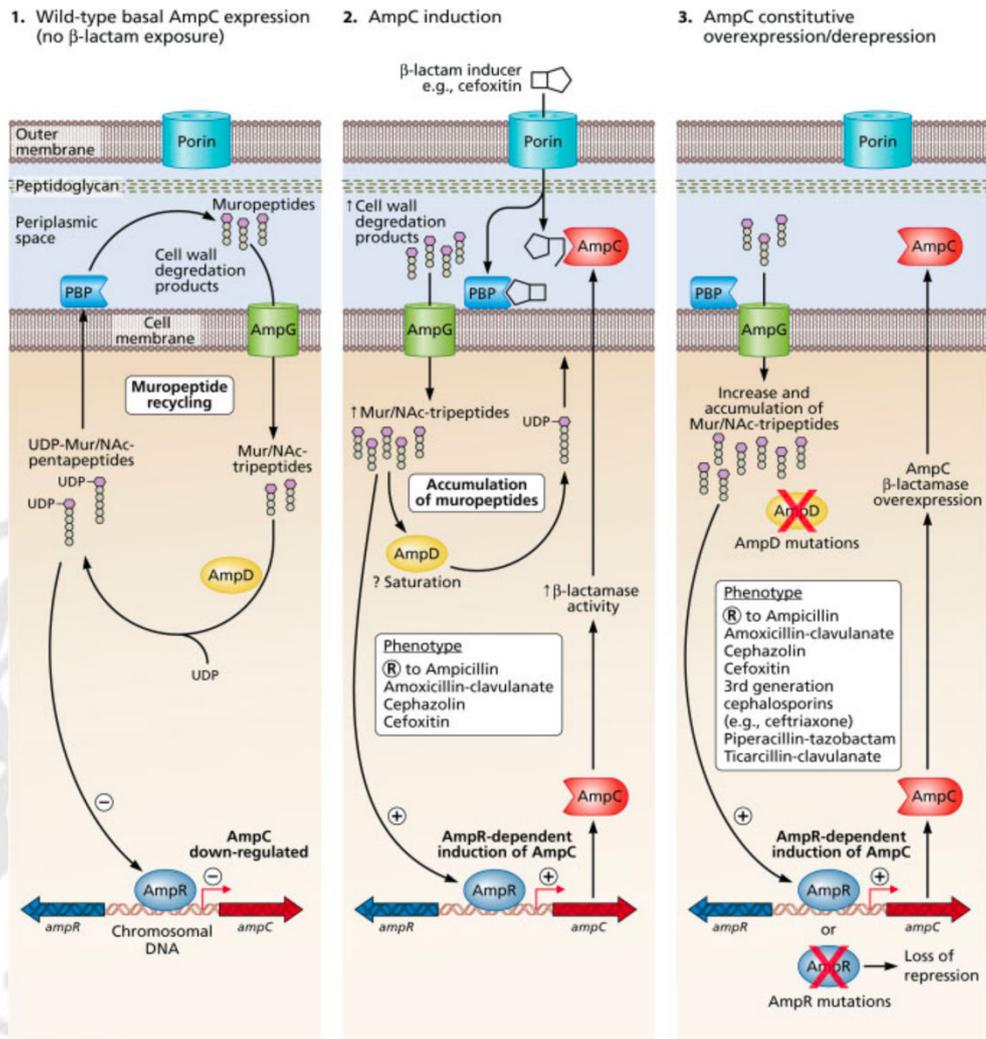


Figure 5 : Représentation de la régulation d'expression de *ampC* d'après « Clinical Management of Infections Caused by Enterobacteriaceae that Express Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase and AmpC Enzymes » Harris 2015

Figure 5-1, dans les conditions physiologiques, la concentration intracellulaire de muropeptides est telle que AmpD est capable de les hydrolyser pour permettre la formation de UDP-MurNac-pentapeptides. Ces derniers sont fortement liés à AmpR qui se comporte comme un inhibiteur transcriptionnel de *ampC*, le niveau d'expression est faible.

Figure 5-2 en cas d'augmentation des taux cytoplasmiques de muropeptides, AmpD ne sera plus en mesure de tous les hydrolyser. AmpR va être préférentiellement lié à ces muropeptides, il se comporte alors comme un inducteur fort de *ampC*.

Figure 5-3, des mutations inactivatrices de AmpD et AmpR sont décrites. L'absence de AmpD engendre une conformation permanente de AmpR sous sa forme activatrice étant donné la forte concentration intracellulaire de muropeptides. AmpR muté se comporte de façon constitutive en un inducteur fort : la céphalosporinase est alors hyper-produite.

Des mutations au sein du système de régulation de *ampC* ont été décrites, notamment *ampD* et *ampR*. Lorsque AmpD n'est plus fonctionnelle cela engendre une concentration intracellulaire de muopeptides élevée qui vont se lier à AmpR, ce dernier va se comporter comme un inducteur fort de *ampC*.

Les mutations décrites dans AmpR modifient la conformation de la protéine en une structure systématiquement activatrice. Quelle que soit la cible, les conséquences sont une hyper production de AmpC qui va se traduire par un phénotype de résistance aux antibiotiques marqué par l'hydrolyse de toutes les pénicillines mais aussi des céphalosporines de troisième génération dont préférentiellement la ceftazidime (Figure 4-B) (Jacoby 2009; Guérin et al. 2015).

Ces souches ayant une AmpC hyper produite restent majoritairement sensibles au céfépime (Figure 4-B) (Jacoby 2009). A l'inverse, les mutations de *ampG* engendrent des expressions constitutivement très faibles de AmpC (Jacoby 2009).

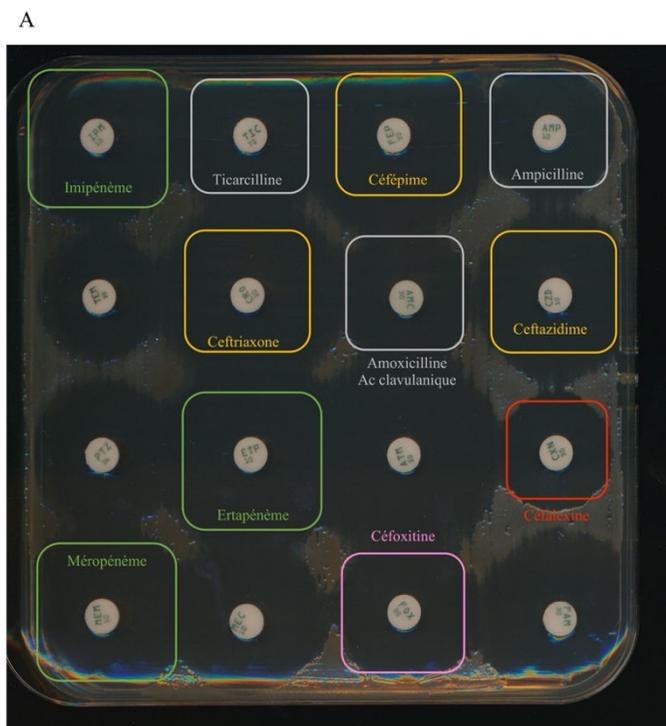
L'émergence de mutants résistants au sein des Entérobactérales productrices de AmpC parmi les patients traités par C3G est un problème crucial. Une étude réalisée sur 477 patients d'*Enterobacter* spp. initialement sensibles aux C3G retrouvait que chez 19% des patients qui avaient été traités par ces molécules, les souches étaient devenues résistantes. Encore plus préoccupant, les phénotypes de *ampC* dé-réprimée étaient d'autant plus fréquents que l'infection était une bactériémie en comparaison avec d'autres sites comme les urines et les plaies (29% contre 7% respectivement) (Kaye et al. 2001). Dans cette même publication, le traitement par C3G était un facteur prédictif indépendant de l'émergence de résistances parmi les souches de *Enterobacter* avec un risque relatif de 2,3 [IC<sub>95%</sub> 1,2 – 4,3 ] (Kaye et al. 2001). Une autre étude réalisée en Corée retrouvait quant à elle que 8% de souches de *Enterobacter* spp. avaient acquis une résistance phénotypique sous traitement par C3G (Choi et al. 2008). Par ailleurs, lorsque le phénotype de AmpC hyper produite est constitué, ce dernier est stable et de transmission verticale. Aussi de 30 à 40% des patients au Royaume Uni et de 15 à 25% des patients aux USA présentaient des souches de *Enterobacter* spp. ayant un phénotype de AmpC hyper produite (Jacoby 2009).

#### 1.2.4.2 Céphalosporinases plasmidiques

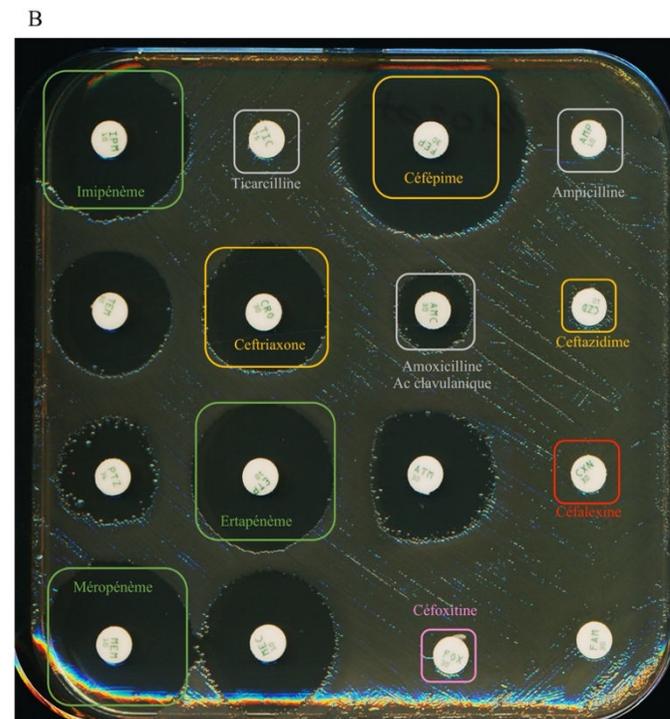
Un autre mécanisme de résistance aux C3G retrouvé chez les Entérobactérales impliquant les céphalosporinases est la présence des gènes codant pour les céphalosporinases sur des plasmides. La synthèse de AmpC, confère à la bactérie un phénotype de résistance vis-à-vis de toutes les pénicillines : ampicilline, ticarcilline, piperarcilline, des céphalosporines de première,

deuxième et troisième génération ainsi que la céfoxitine, appartenant à la classe des céphamycines et l'aztréonam inconstamment (Philippon, Arlet, et Jacoby 2002; Jacoby 2009). Comme les AmpC de support chromosomique, les enzymes ne sont pas inhibées par les IBL de classe A. En revanche, elles sont inhibées par la cloxacilline. Le céfépime ainsi que les carbapénèmes restent le plus fréquemment actifs sur les souches. A noter cependant que lorsque ces AmpC sont associées à des diminutions de la perméabilité membranaire par altération de porines et/ou augmentation d'efflux, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des carbapénèmes augmentent pouvant engendrer une résistance clinique (Philippon, Arlet, et Jacoby 2002; Jacoby 2009). Dans ces mêmes situations, l'activité du céfépime sur ces souches est dépendante de l'*inoculum* bactérien (Philippon, Arlet, et Jacoby 2002).

La première description du gène *ampC* ayant un support plasmidique date de 1989. Une souche de *K. pneumoniae* multirésistante aux antibiotiques présentait un phénotype de résistance atypique avec notamment atteinte des céphalosporines de toutes les générations ainsi que les céphamycines. L'étude retrouvait la présence sur un plasmide conjugatif d'un gène codant pour une enzyme différente des BLSE connues. Cette céphalosporinase fut nommée CMY-1 au regard de son activité de céphamycinase (Philippon, Arlet, et Jacoby 2002; Bauernfeind, Schweighart, et Chong 1989). Depuis, de nombreuses enzymes ont été décrites, avec des nomenclatures pour le moins variables qui rendent difficile le suivi de ces enzymes. Ainsi co-existent des nominations basées sur l'activité enzymatique : CMY active vis à vis des céphamycines, FOX active vis à vis de la céfoxitine, MOX pour son activité anti moxalactame ou encore LAT pour latamoxef (Philippon, Arlet, et Jacoby 2002). D'autres équipes se sont basées sur les classifications enzymatiques, ACT pour *AmpC Type* ou encore ACC pour *Ambler Class C*. Enfin d'autres sont associées aux lieux : MIR-1 pour Miriam Hospital à Providence dans le Rhode Island USA ou encore DHA Dhahran hospital à Dammam en Arabie saoudite. Plus de cinquante variants de céphalosporinases plasmidiques sont actuellement décrits dans les bases de données (Jacoby 2009). Ces enzymes ont pour origine les *ampC* chromosomiques issues de différentes bactéries dont *Morganella morganii* pour la *bla<sub>DHA-1</sub>*, *Enterobacter cloacae* pour *bla<sub>MIR-1</sub>* (Jacoby 2009). A noter que les gènes de type *bla<sub>CMY</sub>* proviennent d'espèces différentes, *Aeromonas* spp pour les gènes *bla<sub>CMY-1</sub>*, *bla<sub>CMY-8</sub>*, *bla<sub>CMY-9</sub>* et *Citrobacter freundii* pour *bla<sub>CMY-2</sub>* (Jacoby 2009). L'*ampC* chromosomique de *C. freundii* est aussi l'origine de deux autres enzymes, *bla<sub>LAT-1</sub>* et *bla<sub>CFE-1</sub>* (Jacoby 2009). Les *ampC* plasmidiques subissent très peu de modifications génomiques au cours du temps ; ainsi, leurs séquences sont très proches des enzymes chromosomiques originelles (Philippon, Arlet, et Jacoby 2002; Jacoby 2009).



Phénotype de résistance « classique » d'une souche de *Escherichia coli*



Phénotype de résistance étendue d'une souche de *Escherichia coli* productrice d'une céphalosporinase plasmidique DHA-1

Figure 6 : Phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamases d'une souche de *Escherichia coli* sauvage et une souche de *Escherichia coli* produisant la céphalosporinase plasmidique DHA-1

Abréviations IMP : Imipénème, TIC : Ticarcilline, FEP : Céfépime, AMP : Ampicilline, TEM : Témocilline, CRO : Ceftriaxone, AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique, CZD : Cefazidime,

PTZ : Pipéracilline – Tazobactam, ETP : Ertapénème, ATM : Aztréonam, CXN : Céfalexine, MEM : Méropénème, MEC : Mécillinam, FOX : Céfoxitine, FAM : Céfamandole

Figure 6-A, la souche de *E. coli* sauvage ne présente aucune résistance vis-à-vis des seize antibiotiques testés.

Figure 6-B, la production de la DHA-1 est responsable de la résistance de 50% des molécules testées. A noter l'image d'induction de l'enzyme entre l'ertapénème et l'aztréonam visible par la disparition du caractère circulaire de l'inhibition de la pousse bactérienne. Photographie : laboratoire de microbiologie, CHU de Caen Normandie, Crédits : Gravey François

Toutes les séquences des *ampC* plasmidiques ne sont pas associées au promoteur *ampR* (Philippon, Arlet, et Jacoby 2002; Jacoby 2009). Celles qui le sont : *bla<sub>ACT-1</sub>*, *bla<sub>DHA-1</sub>*, *bla<sub>DHA-2</sub>* et *bla<sub>CMY-13</sub>* sont inductibles, alors que les autres ne le sont pas (Jacoby 2009). Quel que soit le caractère inductible ou non de la céphalosporinase, ces enzymes sont en très haute concentration dans les cellules. L'expression des gènes est de 33- à 95-fois supérieure à l'expression basale de *ampC* chez une souche de *E. cloacae*. Ces données s'expliquent par la présence de plasmides multicopies et/ou l'existence de promoteurs forts (Jacoby 2009).

Les éléments génétiques mobiles impliqués dans la mobilisation des *ampC* plasmidiques sont identiques à ceux impliqués avec les gènes *bla<sub>CTX-M</sub>*. Les séquences de types ISEcp1 sont associées à la mobilisation des gènes *bla<sub>CMY-2</sub>* (Jacoby 2009). Ces séquences permettent (i) la transposition des gènes adjacents, (ii) de mobiliser les séquences du chromosome vers les plasmides, (iii) jouent le rôle de promoteur fort (Jacoby 2009). Les intégrons de classe 1 comportant la transposase ISCR1 sont associés à la mobilisation d'autres séquences de *bla<sub>CMY-1</sub>*, mais aussi de *bla<sub>DHA-1</sub>* et de *bla<sub>MOX-1</sub>* (Jacoby 2009).

Les plasmides porteurs des différentes *ampC* sont de taille très variable : de 7 à 180 kb sur lesquels fréquemment d'autres gènes impliqués dans la résistance sont retrouvés. Notamment ceux codant pour la résistance aux aminosides, au chloramphénicol, à la tétracycline ou encore au cotrimoxazole, mais aussi d'autres  $\beta$ -lactamases (Philippon, Arlet, et Jacoby 2002; Jacoby 2009).

Les souches productrices d'*ampC* plasmidique ont été décrites à travers le monde (Philippon, Arlet, et Jacoby 2002; Jacoby 2009). Il semble que l'enzyme CMY-2 ait le plus diffusé (Jacoby 2009). Ces bactéries ont été isolées à partir de nombreux prélèvements vétérinaires. Des cas de transmissions entre les animaux et l'Homme ont été décrites (Jacoby 2009). Les souches isolées de prélèvements cliniques humains sont volontiers nosocomiales et associées à des patients aux lourds antécédents issus des services de réanimation et de soins intensifs et ayant reçu de précédents traitements antibiotiques (Philippon, Arlet, et Jacoby 2002; Jacoby 2009). Des épidémies de souches productrices d'AmpC plasmidiques ont été décrites (Philippon, Arlet, et Jacoby 2002). La réelle fréquence est sous-estimée car la détection enzymatique est difficile parmi les Entérobactérales produisant naturellement une céphalosporinase et/ou ayant acquis une BLSE (De Angelis et al. 2020; Jacoby 2009).

### 1.2.4.3 Céphalosporinases à spectre étendu

Des modifications génomiques de types insertions/délétions au sein des séquences de *ampC* ont augmenté leurs affinités notamment pour la ceftazidime et le céfépime (De Angelis et al. 2020; Jacoby 2009). En revanche, les CMI des carbapénèmes sont peu modifiées (Jacoby 2009). Ces *ampC* à spectre étendu ont été décrites sur des supports chromosomiques et plasmidiques (Jacoby 2009).

Enfin, il est à noter que les données de la littérature sont rares voir absentes en ce qui concerne les devenir cliniques spécifiques des patients infectés par les Entérobactérales hyperproduisant AmpC quelle que soit la mécanistique impliquée.

### 1.2.5 Carbapénèmases

L'augmentation de la résistance aux C3G parmi les souches d'Entérobactérales a engendré des prescriptions de carbapénèmes de plus en plus fréquentes ; faisant le lit du développement de leur résistance (Wilson et Török 2018). Les premières carbapénèmases ont été isolées au sein de souches d'Entérobactérales au début des années 1980, chez *Serratia marcescens* et *Enterobacter cloacae* (Rasmussen et al. 1996; Yang, Wu, et Livermore 1990).

Différentes classes de  $\beta$ -lactamases sont responsables de l'hydrolyse des carbapénèmes. Parmi les classes A, le groupe 2f dont l'enzyme la plus fréquente est *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase* (KPC), les metallo- $\beta$ -enzymes de la classe B (groupe 3a, 3b) représentées par la *New Delhi metallo- $\beta$ -lactamases* (NDM) et la *Verona IMipenemase* (VIM) ainsi que certaines Oxacillinases, classe D, groupe 2df, représentées par l'OXA-48 et ses variants (De Angelis et al. 2020; Bush et Jacoby 2010; Nordmann, Dortet, et Poirel 2012).

Les supports génomiques des gènes codant pour ces enzymes sont le plus fréquemment portés par des plasmides et associés à divers éléments génétiques mobiles permettant une diffusion rapide, au sein des souches hospitalières mais aussi communautaires (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012).

### 1.2.5.1 Carbapénèmases de classe A

Ces enzymes hydrolysent les pénicillines, les céphalosporines, l'aztréonam et les carbapénèmes (Figure 7-A). Elles sont inhibées *in vitro* selon des efficacités variables par les IBL dont l'avibactam (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012; Zasowski, Rybak, et Rybak 2015).

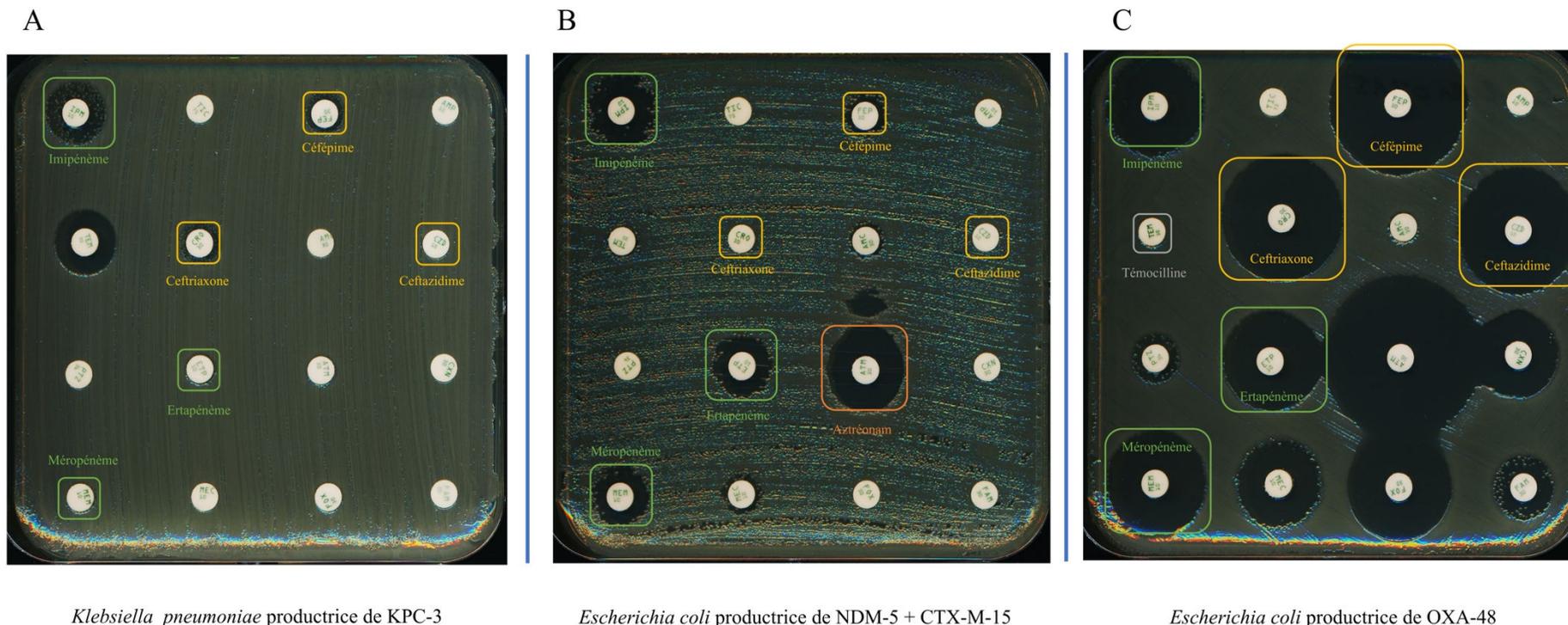


Figure 7 : Phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines de trois Entérobactérales productrices de carbapénémases de type KPC, NDM et OXA

Abréviations IMP : Imipénème, TIC : Ticarcilline, FEP : Céfépime, AMP : Ampicilline, TEM : Témocilline, CRO : Ceftriaxone, AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique, CZD : Ceftazidime, PTZ : Pipéracilline – Tazobactam, ETP : Ertapénème, ATM : Aztréonam, CXN : Céfalexine, MEM : Méropénème, MEC : Mécillinam, FOX : Céfoxitine, FAM : Céfamandole

Figure 7-A, souche de *Klebsiella pneumoniae* proche de la toto-résistance par production d'une carbapénémase de classe A de type KPC-3.

Figure 7-B, souche de *Escherichia coli* productrice de metallo- $\beta$ -lactamase de type NDM-5 associée à une BLSE CTX-M-15. La présence de la BLSE explique le diamètre de petite taille autour de l'aztréonam.

Figure 7-C, souche de *Escherichia coli* productrice de la  $\beta$ -lactamase de classe D OXA-48. L'hydrolyse de la témocilline est constante.

Photographie : laboratoire de microbiologie, CHU de Caen Normandie, Crédits : Gravey François

Quatre principaux groupes d'enzymes de classe A ont été décrits. Les enzymes *Serratia Marcescens Enzyme* (SME) dont il existe trois variants tous décrits au sein de la bactérie du même nom, les IMIpenemases (IMI) retrouvées, pour IMI-1, dans le chromosome de souches de *Enterobacter* sp. et pour IMI-2, sur des plasmides portés par des souches de *Enterobacter asburiae* et *E. cloacae*. Il existe également de nombreux variants de la BLSE *bla<sub>GES</sub>* retrouvés au sein des souches d'Entérobactérales mais aussi de *Pseudomonas* spp et *Acinetobacter* spp dont certains ont une activité de type carbapénémase. Enfin, les KPC sont les enzymes ayant le plus diffusé au sein des carbapénémases de classe A. (De Angelis et al. 2020; Nordmann, Dortet, et Poirel 2012).

L'enzyme KPC a été initialement décrite en 1996 aux USA isolée d'une souche de *K. pneumoniae* (Yigit et al. 2001). Depuis, l'enzyme a diffusé à travers le monde où de nombreux variants (n=53) ont été décrits (De Angelis et al. 2020; Nordmann, Cuzon, et Naas 2009). Les enzymes de type KPC, principalement KPC-2 et KPC-3, sont responsables de la diffusion endémique à l'échelle de la planète (De Angelis et al. 2020; Wilson et Török 2018).

Les enzymes de types KPC ont été retrouvées chez de nombreuses espèces d'Entérobactérales, mais la diffusion est principalement associée à un complexe clonal (CC) de *K. pneumoniae* le CC258 qui inclut les Séquence-Types (ST) ST258 et ST11, associés à KPC-2 (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012; Wilson et Török 2018). Les gènes *bla<sub>KPC</sub>* sont localisés au sein des transposons Tn4401 et Tn4401-like qui appartiennent à la famille des transposons Tn3 (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012; Wilson et Török 2018; Nordmann, Cuzon, et Naas 2009). Ces transposons ont été retrouvés au sein de nombreux plasmides dont IncFIIK, IncI, IncN, IncL/M et IncX (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012; Wilson et Török 2018).

Phénotypiquement, les CMI des carbapénèmes sont d'autant plus importantes que KPC est associée à une diminution de la perméabilité membranaire par altération des porines et/ou hyper-expression des pompes d'efflux (Nordmann, Cuzon, et Naas 2009). L'expression enzymatique est variable ; lorsque l'enzyme est seule, elle peut parfois être prise à tort pour une BLSE hydrolysant les C3G avec atteinte subtile des carbapénèmes (Nordmann, Cuzon, et Naas 2009).

Les conséquences cliniques des infections secondaires à entérobactérales productrices de KPC (E-KPC) sont dramatiques, les taux de mortalité sont supérieurs à 50% ; expliqués par un échec des premières lignes de traitement augmentant le délai d'obtention d'une thérapeutique efficace, facteur crucial dans la prise en charge des infections graves (Nordmann, Cuzon, et Naas 2009; Kumar et al. 2006; Bratu et al. 2005). Les E-KPC sont préférentiellement à l'origine d'infections systémiques chez des patients immunodéprimés ayant une forte charge en soins,

porteurs de différents dispositifs médicaux dont les cathéters et sondes urinaires (Nordmann, Cuzon, et Naas 2009). Les antécédents de traitements antibiotiques sont un facteur de risque majeur chez ces patients, une étude a révélé que sur 58 patients infectés par *K. pneumoniae* KPC, seuls douze avaient précédemment reçu des carbapénèmes, en revanche tous avaient été traités par  $\beta$ -lactamines ou fluoroquinolones (Bratu et al. 2005).

Un fait inquiétant est la description récente de variants de la BLSE CTX-M-15, la CTX-M-33, qui possèdent une faible activité de carbapénémase. Au regard de la diffusion mondiale de cette enzyme, l'existence de tels variants est une réelle menace pour l'avenir des carbapénèmes (Poirel et al. 2019).

### 1.2.5.2 Carbapénémases de classe B – Metallo- $\beta$ -lactamases (MLB)

Les carbapénémases de classe B, appartiennent au groupe 3 selon la classification de Bush et Jabobi (Ambler 1980; Bush et Jacoby 2010). L'hydrolyse enzymatique des  $\beta$ -lactamines nécessite une interaction avec les ions  $Zn^{2+}$  d'où la nomination de métalloenzyme (De Angelis et al. 2020; Nordmann, Dortet, et Poirel 2012). Par conséquent, l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) qui est un chélateur d'ions inhibe le fonctionnement de l'enzyme. En dehors de cette molécule, il n'existe pas actuellement d'inhibiteur des MLB (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012). Cette classe hydrolyse toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'aztreonam (Figure 7-B) (De Angelis et al. 2020; Nordmann, Dortet, et Poirel 2012).

Initialement, les MLB ont été décrites au sein des chromosomes de souches environnementales telles que *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp. et *Stenotrophomonas maltophilia* (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012). C'est au cours des années 1990 qu'elles sont retrouvées parmi des souches de *Pseudomonas* spp. et d'Entérobactérales (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012).

Il existe une grande variété d'enzymes au sein des MBL. Les trois MBL les plus fréquemment isolées parmi les Entérobactérales sont les enzymes de type NDM, VIM et *IMipenem-resistant Pseudomonas* (IMP) (De Angelis et al. 2020; Nordmann, Dortet, et Poirel 2012; Wilson et Török 2018). Les IMP ont été les premières décrites parmi les Entérobactérales. IMP-1 a été mis en évidence au sein d'une souche de *S. marcescens* au Japon en 1991 (Ito et al. 1995). Depuis, les IMP ont été retrouvées à travers le monde et 85 variants ont été décrits. Les premières descriptions des enzymes de type VIM au sein des Entérobactérales sont plus récentes, 2002 au sein de souches de *S. marcescens*, *C. freundii* et *E. cloacae* en Chine (Scoulica et al. 2004; Yum et al. 2002). VIM-1 sera décrite pour la première fois en Europe en 2003, retrouvée au sein de souches de *E. coli* en Grèce (Scoulica et al. 2004). Depuis, 69 variants sont

disponibles dans les bases de données. Les enzymes de types NDM sont les dernières à avoir été isolées en 2008 portées par une souche de *K. pneumoniae* issue d'un prélèvement d'urines chez un patient suédois qui avait été hospitalisé à New-Dehli (Yong et al. 2009). Depuis, elle a été décrite à travers le monde, mais c'est essentiellement sur le sous-continent Indien qu'elle représente un problème de santé publique majeur (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012). En effet, diverses espèces d'Entérobactérales productrices de NDM-1 ont été retrouvées au sein de prélèvements environnementaux : eaux et robinets à New-Dehli, suggérant une diffusion environnementale. Ces données sont confortées par des enquêtes de prévalence provenant d'autres pays du continent ; au Pakistan, les taux de colonisation par des souches productrices de NDM sont 18% en population générale. Il existe de nombreux échanges entre les pays du continent Indien et les pays des Balkans et du Moyen Orient ; ceux-ci se traduisent microbiologiquement par une augmentation de la prévalence des souches NDM dans ces régions qui constituent actuellement le second réservoir mondial (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012). En plus de cette diversité géographique, il existe une diversité génomique, 29 variants du gène *bla<sub>NDM</sub>* ont été décrits (De Angelis et al. 2020).

Les enzymes de type IMP et VIM sont associées aux intégrons de classe 1 dont les cassettes portent différents gènes de résistance aux antibiotiques conférant aux souches des phénotypes *eXtensively Drug Resistant* (XDR).

L'environnement génétique des gènes *bla<sub>NDM</sub>* se constitue en 5' d'une séquence d'insertion ISAb125 (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012). Deux copies de cette séquence d'insertion constituent les extrémités du transposon Tn125 retrouvé chez *A. baumannii*. Aussi, l'arrivée des gènes *bla<sub>NDM</sub>* au sein des Entérobactérales serait un événement en deux temps : (i) passage du gène *bla<sub>NDM</sub>* depuis une espèce bactérienne environnementale inconnue vers les souches de *A. baumannii*, hypothèse supportée par les forts taux de pourcentage CG des gènes constituant le transposon (ii) intégration d'une part du transposon Tn125 au sein de différents plasmides portés par des Entérobactérales (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012).

A l'extrémité 3' du gène *bla<sub>NDM</sub>* est retrouvé le gène *ble<sub>MLB</sub>* codant pour une protéine responsable de la résistance à la bléomycine (PRB). Les deux gènes forment un opéron dont le promoteur se situe au sein de la séquence d'insertion ISAb125. La production de la PRB a deux conséquences. Tout d'abord, la bléomycine est synthétisée par des souches environnementales telles que les *Streptomyces* spp. ainsi, résister à cette molécule confère à la bactérie un avantage pour survivre dans l'environnement. Enfin, la PRB a une action sur la protéine RecA, impliquée dans les phénomènes de recombinaison homologues de l'ADN (Bell 2005). Cette relation PRB-RecA a pour effet de diminuer le nombre de mutations dans le

génomique, stabilisant ainsi les souches productrices de la PRB et de NDM-1 (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012).

A l'inverse des autres carbapénèmes, les gènes *bla<sub>NDM</sub>* ne sont ni associés à une espèce bactérienne particulière, ni à un groupe d'incompatibilité plasmidique donné. Par conséquent, ils ont été retrouvés au sein de très nombreuses espèces d'Entérobactérales et de très nombreux plasmides de famille et de taille variées tels que IncA/C, IncF, IncH, IncL/M, IncN et IncX (Nordmann, Dortet, et Poirel 2012; Wilson et Török 2018).

Les taux de mortalité des infections causées par des Entérobactérales productrices de MBL sont variables. Des études réalisées chez des souches de *K. pneumoniae* productrices de VIM-1 responsables de bactériémies retrouvaient des taux de mortalité de 23% contre 43% pour diverses infections causées par des souches de *Enterobacter cloacae* complexe (Daikos et al. 2009; Falcone et al. 2009). D'autres études enregistraient des taux de mortalité allant de 13 à 55% pour les infections secondaires Entérobactérales productrices de NDM.

### **1.2.5.3 Carbapénèmes de classe D – paragraphe issu du texte « La saga de l'OXA-48 : voyage express chez les entérobactérales » newsletter SFM Juin 2022**

L'enzyme oxacillinase 48 (OXA-48) et ses variants sont les carbapénèmes les plus fréquemment retrouvés en France (Dortet et al. 2017). L'OXA-48 a pour origine l'OXA-54 présente dans le chromosome de *Shewanella oneidensis* (Poirel, Héritier, et Nordmann 2004). Elle a été décrite pour la première fois en 2001 sur un plasmide porté par une souche de *Klebsiella pneumoniae* isolée à partir d'un examen cytotobactériologique des urines à Istanbul en Turquie (Poirel et al. 2004). Dans les pays du bassin méditerranéen, la circulation de l'OXA-48 est endémique ; elle est responsable d'épidémies intra-hospitalières en Europe, en Afrique du Sud, en Chine et en Australie (Pitout et al. 2019).

L'OXA-48 a une activité hydrolytique vis-à-vis des pénicillines et des carbapénèmes dont l'imipénème, l'ertapénème et le meropénème mais peu ou pas d'activité vis-à-vis des céphalosporines de troisième génération. L'OXA-48 est faiblement inhibée par les IBL de classe A (Figure 7-C, Figure 8-A) (Dautzenberg et al. 2014).

En l'absence d'autre mécanisme de résistance associé, la détection des souches productrices d'OXA-48 peut être difficile du fait de (i) la faible hydrolyse des carbapénèmes qui peut alors passer inaperçue, et (ii) l'absence de tests phénotypiques simples tels que ceux basés sur les inhibiteurs de bêta-lactamases (Bush et Jacoby 2010; Skalova et al. 2017). Lorsque l'OXA-48 est associée avec d'autres mécanismes de résistances tels que la production de BLSE, une

hyperproduction de la céphalosporinase AmpC, une hyperproduction de pompes d'efflux et/ou la fermeture ou perte de porines, c'est alors que les problématiques thérapeutiques se posent (Figure 8-B, Figure 8-C) (Nordmann, Naas, et Poirel 2011).

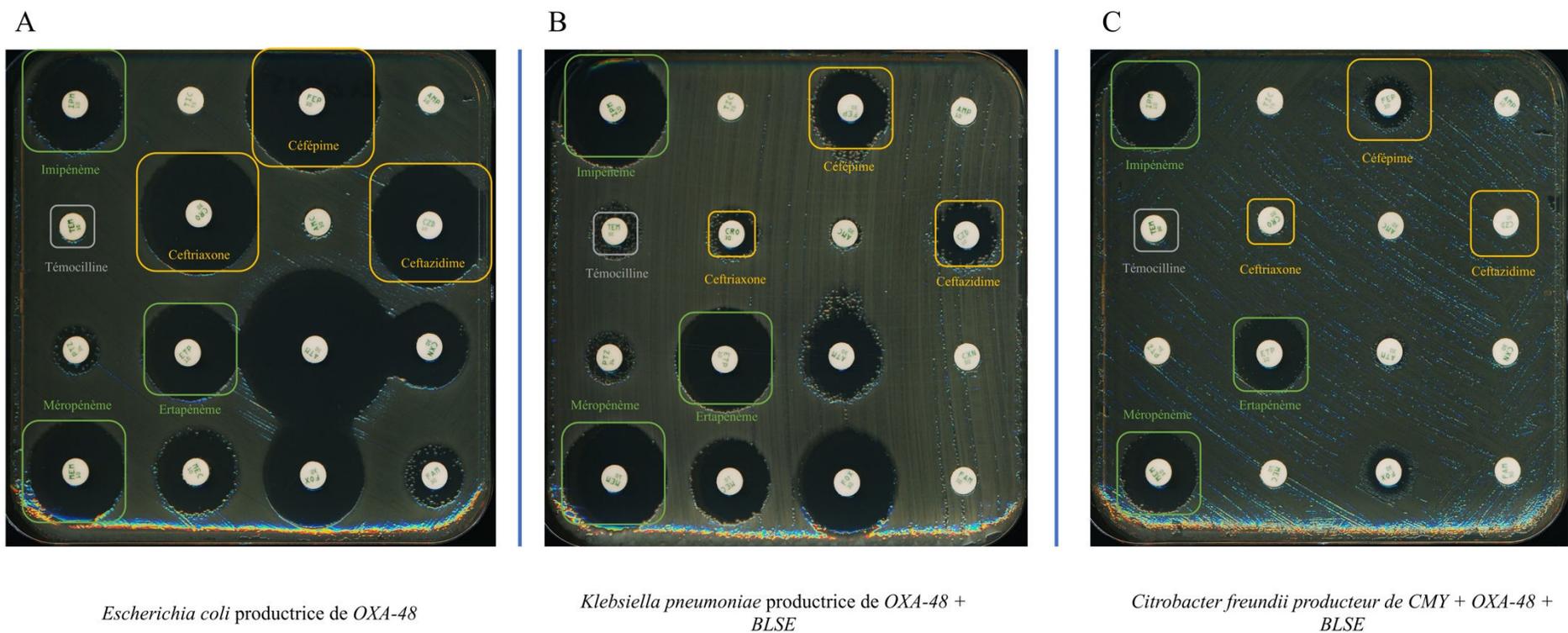


Figure 8 : Phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines de trois espèces d'Entérobactérales productrices de la carbapénémase OXA-48

Abréviations IMP : Imipénème, TIC : Ticarcilline, FEP : Céfépime, AMP : Ampicilline, TEM : Témocilline, CRO : Ceftriaxone, AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique, CZD : Cefazidime, PTZ : Pipéracilline – Tazobactam, ETP : Ertapénème, ATM : Aztréonam, CXN : Céfalexine, MEM : Méropénème, MEC : Mécillinam, FOX : Céfoxitine, FAM : Céfamandole

Figure 8-A, souche de *Escherichia coli* productrice de OXA-48 est résistante aux pénicillines, à la témocilline et présente une hydrolyse faible des carbapénèmes, notamment l'ertapénème.

Figure 8-B souche de *Klebsiella pneumoniae* productrice de OXA-48 et de la BLSE CTX-M-15.

Figure 8-C souche de *Citrobacter freundii*, hyper produisant sa céphalosporinase CMY, et produisant la carbapénémase OXA-48 et la BLSE CTX-M-15.

Les figures 8-B et 8-C illustrent la perte des molécules disponible par l'addition d'autres mécanismes de résistance qu'ils soient chromosomiques et/ou plasmidiques.

Photographie : laboratoire de microbiologie, CHU de Caen Normandie, Crédits : Gravey François

Une étude des souches productrices de l'OXA-48 dans les pays Européens et Nord-Africains retrouvait une co-production de l'OXA-48 avec une BLSE dans 75% des cas, principalement la CTX-M-15 (A Potron et al. 2013). Actuellement, la base de données des beta-lactamases (<http://bldb.eu/>) contient plus de 50 enzymes décrites comme variants de l'OXA-48, qui constituent la famille des OXA-48 like (Dabos et al. 2022) . Ces enzymes possèdent des capacités d'hydrolyse variables. Certaines ne sont plus des carbapénémases mais présentent une affinité uniquement vis-à-vis des C3G, par exemple : OXA-163 et OXA-405 (Dabos et al. 2022; Oueslati et al. 2019). Le gène *bla<sub>OXA-48</sub>* est inséré au sein du transposon Tn1999 dont il existe cinq formes variantes (Figure 9) (Pitout et al. 2019).

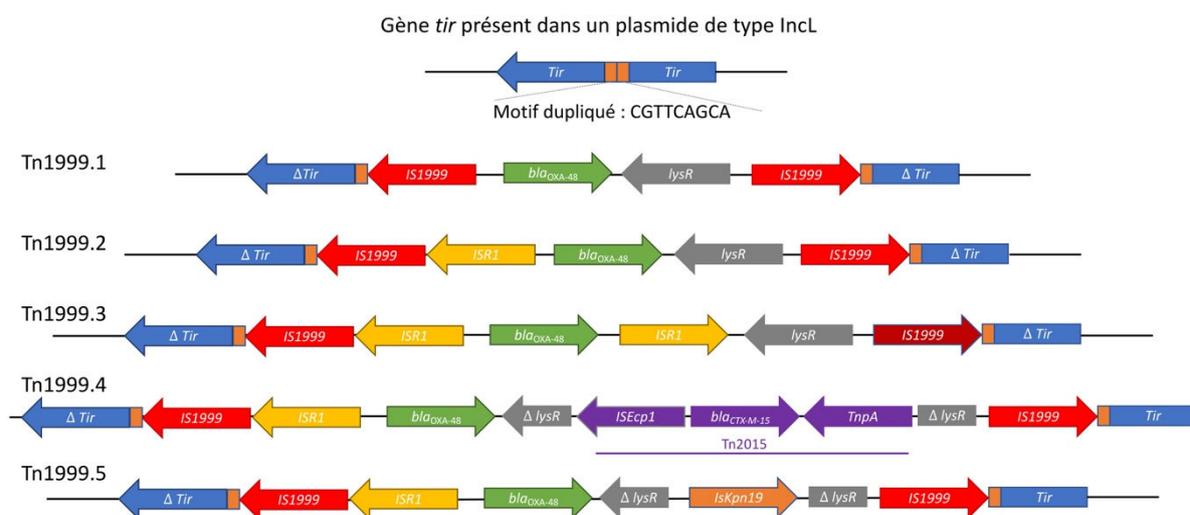


Figure 9 : Organisation des différents transposons Tn1999 porteurs de la carbapénémase OXA-48

Représenté en vert le gène de *bla<sub>OXA-48</sub>* dont l'environnement génomique varie au regard des types de transposons

Dans sa forme la plus simple Tn1999.1, le transposon est composé de deux séquences d'insertion IS1999 en miroir qui entourent le gène *bla<sub>OXA-48</sub>*, et un gène codant pour un régulateur transcriptionnel LysR (Figure 9). Les transposons Tn1999.2 et Tn1999.3 portent en plus, tous les deux, une copie de la séquence d'insertion IS1R en amont du gène *bla<sub>OXA-48</sub>* (Figure 9). Le Tn1999.3 aussi porte une seconde copie de l'IS1R située entre les gènes *bla<sub>OXA-48</sub>* et *lysR* ceci a pour effet de créer un promoteur fort responsable d'une activité enzymatique deux fois plus importante (Pitout et al. 2019). Les transposons Tn1999.4 et Tn1999.5 sont tous les deux des variants du Tn1999.2. Dans chacun d'entre eux, le gène *lysR* est tronqué par l'insertion du transposon Tn2015 porteur du gène de la BLSE *bla<sub>CTX-M-15</sub>* (variant Tn1999.4) et

la séquence d'insertion ISKpn19 (Tn1999.5) (Figure 9). Dans une étude portant sur plus de 100 souches productrices de OXA-48 isolées entre 2001 et 2011 en Europe et en Afrique du Nord, le Transposon Tn1999.2 était le variant le plus fréquemment retrouvé (78%) (A Potron et al. 2013). Le motif génomique d'insertion reconnu par le Tn1999 consiste en une duplication d'un motif cible de neuf paires de bases : CGTTCAGCA présentes dans le gène *tir*, qui code pour protéine d'inhibition de transfert (Poirel, Bonnin, et Nordmann 2012; Anaïs Potron, Poirel, et Nordmann 2014). Des études de conjugaison ont démontré que l'interruption du gène *tir* par l'insertion du transposon Tn1999 engendre la synthèse d'une protéine non fonctionnelle et de ce fait, une augmentation de 50 à 100 fois le taux de transfert conjugatif du plasmide (Anaïs Potron, Poirel, et Nordmann 2014).

Les transposons Tn1999 porteurs de l'OXA-48 sont retrouvés au sein de plasmides de type IncL dans plus de 90% des cas tandis que les autres carbapénémases telles que KPC et NDM sont souvent trouvées sur des plasmides appartenant aux groupes IncF et IncN (A Potron et al. 2013; Kopotsa, Osei Sekyere, et Mbelle 2019). Les plasmides IncL mesurent entre 60 et 70 kb et, classiquement, ils ne contiennent pas d'autres gènes de résistance aux antibiotiques ; ils sont en faible nombre de copies dans la cellule (Skalova et al. 2017; Poirel, Bonnin, et Nordmann 2012; Kopotsa, Osei Sekyere, et Mbelle 2019; Carrër et al. 2010). Ils portent également des opérons de transfert *tra* et *trb* qui codent pour les pili de type IV impliqués dans le mécanisme de conjugaison. Bien que définis comme *broad-host range plasmids*, des travaux ont démontré le possible transfert des plasmides IncL entre espèces d'Entérobactérales mais n'ont pas réussi à transmettre ce plasmide aux souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Ces données peuvent expliquer l'association de l'OXA-48 avec les entérobactérales (Poirel, Bonnin, et Nordmann 2012).

Les gènes *bla<sub>OXA-48</sub>* ont été retrouvés dans d'autres familles de plasmides que IncL, chez lesquelles l'insertion du transposon ne s'est pas effectuée sur le gène *tir*. Par exemple, le transposon Tn1999 a été retrouvé au sein d'un plasmide non groupable de 150 kb isolé d'une souche de *K. pneumoniae*, dans lequel Tn1999 interrompait un gène codant pour une phosphoadenosine phosphosulfate reductase (Nordmann, Naas, et Poirel 2011; Carrër et al. 2010).

Des intégrations chromosomiques du gène *bla<sub>OXA-48</sub>* ont été décrites ; via le transposon Tn6237, notamment au sein du clone ST38 de *Escherichia coli* (Turton et al. 2016).

Selon les travaux, au moment du diagnostic de l'OXA-48, de 22% à 47% des patients portaient plusieurs espèces productrices de l'enzyme allant parfois jusqu'à cinq de façon concomitante (Dautzenberg et al. 2014; Skalova et al. 2017). Ces données peuvent s'expliquer par le haut

pouvoir conjugatif des plasmides IncL ayant le gène *tir* tronqué. A l'inverse des autres types d'enzymes, telles que les KPC et VIM dont la dissémination est fréquemment associée à un clone bactérien épidémique, la diffusion de l'OXA-48 a une dynamique populationnelle différente, avant tout basée sur la diffusion du gène à travers de nombreuses espèces au sein d'un hôte. Cette particularité explique les très nombreuses populations d'entérobactérales au sein desquelles l'OXA-48 a été retrouvée (Mairi et al. 2018).

Fréquemment isolées à partir de prélèvements de dépistage tels que les écouvillonnages rectaux, les souches productrices d'OXA-48 peuvent par la suite être responsables d'infections profondes dans des proportions variables selon les travaux, de 18 à 65% (Dautzenberg et al. 2014; Jolivet et al. 2021). Une étude réalisée aux Pays-Bas retrouvait un taux de mortalité toutes causes confondues de 30% parmi les patients infectés par une souche productrice d'OXA-48. En 2014, une étude portant sur 1000 souches reçues par le CNR, les enzymes de type OXA-48-like représentaient 86% du panel, très loin devant les NDM (8%) et KPC (2%) (Dortet et al. 2017)

Le groupe *European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) classait la situation française au stade quatre, sur une échelle qui en compte cinq, vis-à-vis de la dissémination des OXA-48 c'est-à-dire la présence d'une dissémination interrégionale de l'enzyme à l'échelle du territoire national (Albiger et al. 2015). Enfin, il est à noter que les souches productrices d'OXA-48 n'ont pas été exclusivement isolées de prélèvements humains. Le gène *bla<sub>OXA-48</sub>* a été retrouvé à partir de prélèvements environnementaux réalisés dans les hôpitaux en contexte épidémique : surfaces, matelas, éviers, toilettes ; mais aussi à partir d'eaux usées, ou d'animaux de compagnie (chats, chiens, chevaux) (Mairi et al. 2018). Tous ces réservoirs constituent des routes de transmission possibles jusqu'à l'Homme.

### ***1.2.6 Résistance non enzymatique aux $\beta$ -lactamines : diminution d'accès à la cible***

D'autres mécanismes non enzymatiques contribuent à la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les Entérobactérales (De Angelis et al. 2020; Blair et al. 2015). Les principaux concourent à une réduction de la concentration antibiotique sur son lieu d'action : le périplasme (Blair et al. 2015).

Deux mécanismes sont décrits et peuvent co-exister : (i) atteinte qualitative ou quantitative des porines qui ont pour effet de diminuer la perméabilité membranaire externe et donc la quantité

d'antibiotique qui pénètre dans l'espace périplasmique (Poulou et al. 2013; Lavigne et al. 2013; Szabó et al. 2006) (ii) modification d'expression des pompes d'efflux qui augmente l'export des molécules antibiotiques vers le secteur extracellulaire (Bornet et al. 2003; Gravey et al. 2020). A noter que les modifications d'expression des pompes d'efflux n'ont pas uniquement pour effet de modifier l'efficacité des  $\beta$ -lactamines mais ont des conséquences sur d'autres classes antibiotiques dont les quinolones, la tétracycline ou encore le chloramphénicol (Gravey et al. 2020).

Les modifications fonctionnelles peuvent être la conséquence de mutations affectant directement les éléments constitutifs des porines et/ou des pompes d'efflux (Poulou et al. 2013); mais peuvent aussi être la conséquence d'altérations dans les voies de régulation de leur expression (Bornet et al. 2003). L'expression des pompes Resistance Nodulation Division (RND) qui ont été décrites comme impliquées dans des phénotypes de multi-résistance chez les Entérobactérales répond à différentes voies de régulation impliquant des gènes appartenant à la famille des TetR et AraC–XylS (Weston et al. 2018; Blair et al. 2015).

Ces régulateurs sont organisés sous forme d'opérons au sein desquels des mutations engendrent une hyper-transcription des gènes codant pour différentes pompes RND, se manifestant par des phénotypes de résistantes croisées (Blair et al. 2015). A noter que certains opérons contrôlent à la fois l'expression des pompes RDN et des porines. Ainsi, l'opéron *ramAR* régule l'expression des gènes *acrA*, *acrB* et *tolC*, mais aussi la post-transcription de *ompF* via l'ARN antisens *micF* (Gravey et al. 2020).

A noter que des gènes codants pour des pompes Resistance-Nodulation-cell Division (RND) ont été retrouvés au sein de plasmides de type IncH1 qui portaient également la carbapénémase *bla<sub>NDM-1</sub>* (Dolejska et al. 2013).

Ces mécanismes qui concourent à la diminution des concentrations de  $\beta$ -lactamines au sein de l'espace périplasmique agissent en synergie avec les mécanismes de résistance enzymatiques.

## 1.3 Apport du séquençage à haut débit dans le suivi de la diffusion des BMR

### 1.3.1 Rappels historiques

Depuis la naissance de la microbiologie, il n'y a eu de cesse d'isoler, de cultiver, d'identifier les micro-organismes, notamment ceux responsables d'infections (Uelze et al. 2020). L'identification des espèces bactériennes a connu de nombreuses évolutions basées sur les caractéristiques morphologiques macro- et microscopiques, les caractères biochimiques, les résistances naturelles aux antibiotiques, les différentes atmosphères de croissance, jusqu'à l'arrivée des nouvelles technologies basées (i) sur des analyses moléculaires telles l'étude des séquences codantes pour l'ARN 16S et/ou (ii) sur les analyses des contenus protéiques des bactéries telle que la spectrométrie de masse (Bizzini et Greub 2010; Stackebrandt et Goebel 1994). Toutes ces analyses concourent à obtenir d'une bactérie étudiée son indentation d'espèce. Néanmoins, il est parfois nécessaire de discriminer les bactéries appartenant à la même espèce, notamment lors d'exploration d'épidémie, de diffusion de la résistance aux antibiotiques et/ou de facteurs de virulence (Uelze et al. 2020; Sabat et al. 2013). Aussi, des méthodes dites de typage ont été développées ; elles permettent une différenciation bactérienne au sein de la même espèce (Sabat et al. 2013).

Les premières méthodes de typage développées étaient phénotypiques, basées sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre des antigènes bactériens, de paroi et/ou de flagelle le plus fréquemment (F. Kauffman 1947). Lorsque l'anticorps utilisé est spécifique de l'antigène bactérien, une réaction de précipitation s'effectue ; caractérisée par le terme d'agglutination. Dès 1930, des réactions de sérotypage permettaient une identification de la sous espèce bactérienne (Uelze et al. 2020). Par la suite, d'autres méthodes de typage ont été développées. Le changement considérable de paradigme a été causé la capacité d'extraire l'ADN et le développement de biologie moléculaire. Le *plasmid fingerprint* est l'une des premières méthodes proposées au cours des années 1980 (Uelze et al. 2020). Le principe consiste, après extraction de l'ADN bactérien, à faire migrer l'ensemble du contenu sur un gel d'agarose. Il n'y aura pas modification de la migration de l'ADN chromosomique car les souches appartiennent à la même espèce. En revanche, des bandes de migration surnuméraires peuvent apparaître. Celles-ci correspondent au contenu plasmidique des souches. Ainsi, si deux souches de la même espèce sont épidémiologiquement liées alors elles partagent le même contenu

plasmidique (Tenover 1985). Cette hypothèse était confrontée aux résultats de la migration. Cette technique a été utilisée pour le suivi de la diffusion de souches épidémiques communautaires et nosocomiales (Tenover 1985).

Le *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) s'est secondairement imposé comme méthode de référence pour la comparaison de souches bactériennes dès la fin des années 1980. Le principe de cette méthode repose sur la fragmentation de l'ADN bactérien par des enzymes de restriction. Le nombre et la taille des différents fragments obtenus sont révélés à la suite de la migration sur gel. Ces méthodes de PFGE, harmonisées pour certaines espèces, seront très utilisées jusque dans les années 2000 (Uelze et al. 2020; Sabat et al. 2013).

Le développement de la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) a rendu possible l'amplification de séquences d'ADN spécifiques. Les concentrations d'ADN obtenues après amplification permettaient une étude des séquences nucléotidiques via la méthode de séquençage Sanger (Uelze et al. 2020). Le Multi-Locus Séquence Typing (MLST) étudie les séquences nucléotidiques de sept ou huit gènes de ménage. Pour chaque gène, un répertoire d'allèles connus existe dans lequel à chaque allèle de chaque gène est attribué un numéro. Ceci aboutit à l'obtention d'une succession de sept chiffres qui est traduite en un numéro unique : le Séquence Type (ST) (Uelze et al. 2020; Larsen et al. 2012). C'est en 1998 que cette approche a été pour la première fois proposée pour des souches de *Neisseria meningitidis*, afin de pallier la faible reproductibilité des techniques de typage phénotypiques (Larsen et al. 2012; Maiden et al. 1998). Cette technique présentait un bon pouvoir de discrimination au regard des différentes méthodes de typage d'alors. Elle est reproductible mais néanmoins coûteuse et laborieuse lorsqu'elle repose sur l'approche PCR + séquençage Sanger (Uelze et al. 2020).

De très nombreuses méthodes de typage basées sur les technologies de biologie moléculaire et/ou séquençage de première génération ont été proposées : *Repetitive-element polymerase chain reaction* (rep-PCR) ayant permis la création d'un automate à succès : le Diversilab, ou encore utilisation de puces *micro-array* qui permettaient la détection des nombreux éléments génomiques en une seule analyse tels que la recherche concomitante de *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), la présence de variants alléliques pour le MLST, des éléments plasmidiques ou encore des gènes de résistance aux antibiotiques (Sabat et al. 2013).

Au cours de la seconde partie des années 2000, dix ans après le premier séquençage du génome entier d'une souche de *Haemophilus influenzae* par Craig Venter, Hamilton Smith et collaborateurs, les solutions de séquençages capables de générer une très grande quantité de données par cycle apparaissent dans les laboratoires et plateformes spécialisées (Fleischmann et al. 1995; Loman et Pallen 2015). Le déploiement des solutions de séquençage s'est

accompagné (i) d'une diminution des coûts (ii) d'une augmentation exponentielle des génomes séquencés et disponibles au sein des bases de données (iii) du développement des solutions bio-informatiques permettant d'analyser et valoriser ces nouvelles données (Loman et Pallen 2015). L'accessibilité des données génomiques a révolutionné la microbiologie dans tous les aspects et notamment, le domaine du typage bactérien (Uelze et al. 2020; Loman et Pallen 2015).

### ***1.3.2 Typage bactérien à l'ère de la génomique***

La révolution apportée par le séquençage complet des génomes pour le typage des souches bactériennes est de deux ordres. Tout d'abord, ces technologies permettent d'avoir accès à l'ensemble des informations génomiques présentes dans la cellule. Aussi, elles apparaissent comme capables de fournir le plus grand pouvoir de discrimination et la plus fine résolution pour différencier deux isolats appartenant à la même espèce bactérienne (Medini et al. 2008). Le plus haut pouvoir de discrimination car « tout » le contenu génomique est comparé entre deux souches ; la plus fine résolution s'explique par la capacité d'analyse des outils développés qui permettent une comparaison des souches « au nucléotide près » (Medini et al. 2008). La seconde transformation que la génomique apporte dans le domaine du typage bactérien, est qu'elle se substitue à la plupart des anciennes méthodes phénotypiques. Aussi, obtenir un génome bactérien, c'est pouvoir rattacher la souche étudiée aux anciennes méthodes de typages, tout en ayant accès à un monde de comparaisons nouvelles. Enfin, sous réserve d'avoir à disposition de très grandes capacités de calcul bio-informatique, les analyses de génomique comparative ne sont pas limitées par le nombre de souches étudiées.

#### **1.3.2.1 Recherche d'éléments connus au sein d'un génome**

Le séquençage bactérien est principalement réalisé aujourd'hui via la technologie Illumina qui nécessite de scinder les génomes bactériens en millions de séquences d'ADN dont la taille peut varier de 150 à 300 paires de bases (pb). Les informations issues des séquenceurs sont donc des fichiers qui contiennent des millions de séquences nucléotidiques de 150 à 300 pb associées à un indice qualité appelé le Phred score ; ces deux informations associées sont appelées *reads*. (van Dijk et al. 2014; Quail et al. 2008; Ewing et al. 1998). Les fichiers qui contiennent ces millions de *reads* générés sont appelés fastq. Le phred score dénommé (Q) est relié à la probabilité d'erreur du séquenceur (P) selon la formule suivante :  $Q = -10 \log_{10}(P)$ . Ainsi un

phred score d'une valeur de 10 équivaut à une probabilité d'erreur d'une base sur dix, un phred score d'une valeur de 30 équivaut à une probabilité d'erreur d'une base pour mille (Ewing et al. 1998).

La capacité des analyses génomiques à se substituer aux techniques phénotypiques usuelles est basée sur la possibilité d'extraire des informations pertinentes depuis les données séquencées en les comparant aux informations contenues au sein de bases de données. Pour ce faire, deux grandes approches existent : (i) réaliser un alignement entre le génome assemblé et les bases de données ou (ii) réaliser un alignement entre les données brutes du séquençage (les *reads*) et les bases de données (Boolchandani, D'Souza, et Dantas 2019).

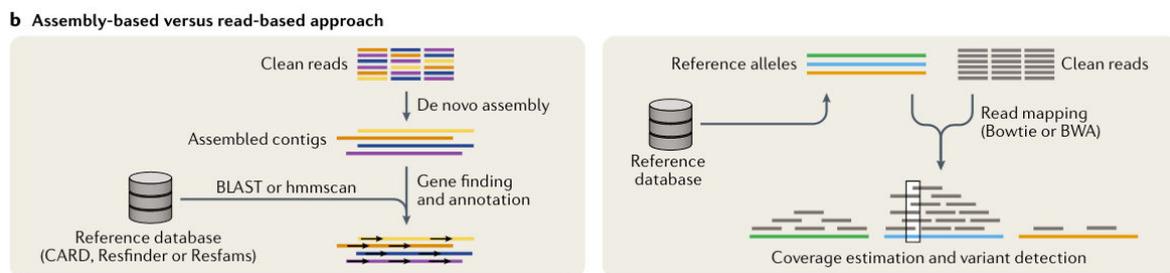


Figure 10 : Présentation des deux approches permettant de rechercher des informations à partir des données de séquençage

A gauche approche basée sur l'assemblage : les *reads* contenus dans les fichiers fastq sont assemblés en séquences nucléotidiques. Ce sont ces séquences qui sont comparées à celles contenues dans les bases de données. A droite, les *reads* des fichiers fastq sont mappés contre des séquences contenues au sein des bases de données.

Image issue de la figure 2 de l'article "*Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance*" publiée en 2019 par Boolchandani *et al* en 2019.

Les approches basées sur la comparaison de séquences nécessitent en premier lieu d'assembler les *reads* contenus dans les fichiers fastq en séquences nucléotidiques de plus grande taille. Cette étape est le plus fréquemment réalisée sans *a priori* c'est-à-dire sans l'appui d'un génome de référence ; il s'agit de l'assemblage *de novo* (Boolchandani, D'Souza, et Dantas 2019). Pour ce faire, les *reads* sont découpés en séquences d'une longueur *k*. Toutes les séquences d'ADN ayant la longueur *k* sont appelées *kmers*. Les séquences sont construites par la succession de *kmers* se chevauchant (Figure 11) (Sohn et Nam 2016). L'organisation de ces *kmers* forment un réseau appelé le graphe de De Bruijn. (Figure 11) (Sohn et Nam 2016). La séquence nucléotidique déduite de ce réseau est basée sur le chemin optimum qui permet de lier les points entre eux appelé le chemin de Euler (Figure 11) (Sohn et Nam 2016).

Il existe de nombreux algorithmes disponibles, dont SPAdes, Velvet et SOAPdenovo (Boolchandani, D'Souza, et Dantas 2019; Bankevich et al. 2012). Les séquences produites forment alors les *contigs* qui peuvent être orientés et ordonnés constituant les *scaffolds* (Sohn et Nam 2016). A noter que les processus d'assemblage *de novo* sont très impactées par les erreurs de séquençage (Boolchandani, D'Souza, et Dantas 2019).

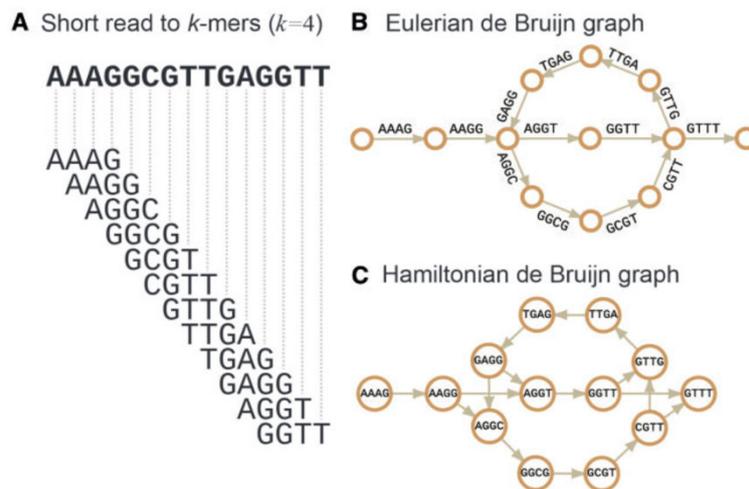


Figure 2. (A) In the de Bruijn graph approach, short reads are split into short  $k$ -mers before the de Bruijn graphs are built. (B) In the Hamiltonian approach, the  $k$ -mers (or sequences) are the nodes, whereas they are the edges in the Eulerian approach. The  $k$ -mers are connected to neighbors by overlapping prefix and suffix  $(k-1)$ -mers.

Figure 11 : Présentation du fonctionnement de l'assemblage *de novo* basé sur le chevauchement des kmers d'une longueur 4 et la formation de graphes de De Bruijn

Figure issue de l'article "The present and future of *de novo* whole-genome assembly" publié en 2018 dans la revue Briefings in Bioinformatics par Sohn *et al.*

Lorsque le génome est assemblé, il est alors possible de rechercher en son sein la présence ou l'absence de gènes ou de protéines d'intérêt. Ces recherches sont basées sur l'homologie de séquences et sont possibles par différents algorithmes dont blast, diamond, ou encore usearch (Altschul et al. 1990; Boolchandani, D'Souza, et Dantas 2019).

La seconde approche consiste à aligner (terme souvent remplacé par l'anglicisme *mapper* ou *mapping*) les *reads* issus du séquençage directement sur des séquences de référence. Pour ce faire, les *reads* peuvent être utilisés « tels quels » via des algorithmes dont les principaux sont Burrows-Wheeler transform et Bowtie2 ; ou alors les *reads* sont classés selon leur composition en kmer et ce sont ces kmers qui seront recherchés au sein des gènes ou protéines d'intérêt (Langmead et Salzberg 2012; Li et Durbin 2009; Clausen, Aarestrup, et Lund 2018). Les approches par kmer sont plus rapides et demandent moins de ressources ; elles sont au cœur du développement de nombreuses approches bio-informatiques (Clausen, Aarestrup, et Lund 2018).

Il n'existe pas actuellement de consensus sur les bonnes pratiques en bio-informatique indiquant quelle approche préférer (Boolchandani, D'Souza, et Dantas 2019). Les choix de méthode peuvent dépendre des données génomiques à disposition. En effet, pour les génomes qui sont séquencés pour un projet, tous les types de fichiers sont à disposition, ce qui n'est pas vrai lorsque les travaux incluent des génomes issus de bases de données pour lesquels fréquemment, seuls les d'assemblages, les fichiers fasta sont disponibles.

### 1.3.2.2 Typage bactérien à l'échelle de la cellule

Les analyses *in silico* ont parfaitement et facilement remplacé la détermination du séquence-type pour les souches séquencées. Alors que cette analyse était réservée aux laboratoires spécialisés, l'accès aux génomes a permis de détecter de plus en plus d'allèles au sein des espèces, permettant un meilleur aperçu de la diversité populationnelle. Ainsi, au sein de la base de données <https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/>, le nombre de séquence types pour le phylogroupe *K pneumoniae* est passé de 40 en avril 2005 à 6239 en octobre 2022 représentant 3244 allèles répartis parmi les sept gènes étudiés.

La détermination du sérotype bactérien est un élément très important de la caractérisation des souches bactériennes car il a été démontré des relations entre le sérotype et l'origine des souches, leur virulence et leur pathogénicité (Uelze et al. 2020). Premier élément de typage décrit, le nombre de sérotypes est très important notamment chez *Salmonella* spp qui compte plus de 2600, tandis que *E. coli* en compte 190 et *Shigella* spp 54 (Uelze et al. 2020).

La détermination des sérotypes est le plus fréquemment basé sur la recherche des antigènes de paroi O et l'antigène flagellaire H tous deux résumés par un chiffre. Cette nomenclature est parfois très connue du grand public comme la souche *E. coli* O157:H7 productrice de shiga-toxine responsable de toxi-infection alimentaire et pour laquelle les infections peuvent se compliquer d'un syndrome hémolytique et urémique mettant en jeu le pronostic vital.

Pour *K. pneumoniae*, l'expression de la capsule est sous le contrôle du locus *cps* dont la structure peut varier en fonction des populations étudiées (Brisse et al. 2013; Chiarelli 2020). Néanmoins, six gènes sont conservés dont *wzi* qui code pour une protéine intervenant dans l'adhésion de la capsule à la membrane externe de la cellule (Brisse et al. 2013). L'étude de la variation des séquences du gène *wzi* permet de déduire le sérotype K des *K. pneumoniae* dans 95% des cas (Brisse et al. 2013).

Chez *Salmonella* spp, l'antigène O répond à l'expression de différents gènes : la flippase *wzx*, la polymérase *wzy* ainsi que des gènes appartenant au cluster *rfb*. Ainsi, il peut être parfois

difficile d'obtenir une prédiction *in silico* fiable. Pour pallier ces contraintes, des approches basées sur l'étude du core génome MLST (voir infra) sont proposées. Le concept de cette approche est d'utiliser des souches de référence dont le sérotype a été déterminé phénotypiquement puis d'attribuer à la souche étudiée le sérotype de la souche de référence dont elle est le plus proche. Cette stratégie permet d'obtenir un sérotype à partir de génomes qui peuvent présenter des assemblages incomplets dans les régions codant pour les antigènes d'intérêt (C. E. Yoshida et al. 2016).

Le contenu du génome en ADN étranger peut aussi être étudié à partir des données de séquençage. En premier lieu, les génomes bactériens sont très riches en séquences de bactériophages : les prophages qui participent à la diversité génomique d'une population (Herridge et al., s. d.). Différents outils permettent la détection de ces séquences virales dont Prophage Hunter, MARVEL, PHAST et PHASTER (Arndt et al. 2016). Ces algorithmes recherchent les différents constituants de phages : protéines de lyse, gènes impliqués dans la répllication ou dans l'assemblage de l'ADN viral puis établissent un score d'identité et d'intégrité du phage au sein du génome recherché (Uelze et al. 2020; Arndt et al. 2016).

Les séquences d'insertions et les transposons sont aussi des éléments responsables de la diversité génomique bactérienne. Différentes approches existent pour leur détection : (i) recherche de séquences homologues, (ii) recherche sans *a priori* de séquences répétées, (iii) recherche hybride entre les deux méthodes précitées basée sur la structure des éléments mobiles. Selon cette dernière approche, les organisations génomiques compatibles avec la présence d'éléments mobiles sont recherchées telles que les « *long terminal repeats* » mais l'homologie entre les séquences connues et les séquences découvertes compte peu ou pas (Bergman et Quesneville 2007; Uelze et al. 2020). Il existe de nombreuses approches disponibles dont RepeatFinder ou SMaRTFinder (Uelze et al. 2020).

Peu d'outils existent pour la recherche des plasmides au sein des données séquencées. L'un des plus populaire est PlasmidFinder qui permet la recherche des *plasmids replicons* et la catégorisation selon les groupes d'incompatibilité pour les plasmides retrouvés parmi les souches d'entérobactérales ou de bactéries à Gram positif (Carattoli et al. 2014; Uelze et al. 2020). D'autres bases de données telles que PLSDB proposent une collection de séquences de plasmides issus d'une sélection de ce qui est disponible sur ncbi mais aussi un algorithme basé sur l'approche kmer Mash pour rechercher les plasmides directement à partir des fichiers fastq (Galata et al. 2019).

Différentes bases de données permettent la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que la détection de certaines mutations chromosomiques. Parmi celles-ci, se distinguent

les bases de données dites généralistes dont les plus connues sont resfinder, pointfinder, deux solutions développées par l'équipe du *center for genomic epidemiology* et the *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD). (Bortolaia et al. 2020; Alcock et al. 2019; Uelze et al. 2020). Ces bases de données contiennent des informations à propos de nombreuses familles de gènes, elles sont pertinentes pour l'étude de nombreux pathogènes (Boolchandani, D'Souza, et Dantas 2019). *A contrario*, certains outils sont dédiés à une espèce bactérienne dont MUBII-TB-DB qui contient les mutations associées à l'antibiorésistance chez *Mycobacterium tuberculosis* et u-CARE qui était spécialisée pour la détection de l'antibiorésistance chez *E. coli* (Flandrois, Lina, et Dumitrescu 2014; Saha, Uttam, et Verma 2015). Malgré l'existence de bases de données de plus en plus exhaustives, les analyses génomiques n'expliquent pas toujours les phénotypes observés. Ces manquements sont surtout retrouvés lorsqu'il existe des variants entre les gènes des bases de données et les génomes étudiés. Sans une concordance parfaite, la prédiction du phénotype est difficile. D'immenses efforts sont faits afin de d'augmenter la qualité et la quantité des informations disponibles dans les bases de données, mais aussi de tendre vers une nomenclature consensuelle des gènes (Boolchandani, D'Souza, et Dantas 2019). Enfin, peu de bases de données ont été pensées pour la recherche des mutations chromosomiques autres que les Quinolones Resistance Determining Region (QRDR). De plus, certains phénotypes s'expliquent par des modifications post-transcriptomiques que les analyses des séquences d'ADN ne mettent pas en évidence (Boolchandani, D'Souza, et Dantas 2019). Ces limitations actuelles freinent le développement dans les laboratoires de l'antibiogramme *in silico* (Ellington et al. 2017). Des approches de *machine learning* sont actuellement développées pour répondre à des couples « antibiotiques – espèces » comme carbapénèmes et *Acinetobacter baumannii*, méticillino-résistance et *Staphylococcus aureus* ou encore cotrimoxazole et *Streptococcus pneumoniae*. Par essence, ces analyses sont extrêmement dépendantes de la qualité et dans une moindre mesure, de la quantité des données disponibles pour entraîner le système (Uelze et al. 2020; Boolchandani, D'Souza, et Dantas 2019).

Comme pour les gènes de résistance aux antibiotiques, différentes bases de données permettant la recherche de gènes de virulence ont été développées. Il existe les bases de données généralistes comme Virulence Finder DataBase (VFDB) qui contient des données issues de 74 genres bactériens, Victors qui est une base manuellement vérifiée qui contient plus de 5000 gènes de virulence issus du monde bactérien, mais aussi viral et fongique (Chen 2004; Sayers et al. 2019). D'autres sources sont orientées vers un ou plusieurs pathogènes telle que Virulencefinder qui propose des données pour *Listeria monocytogenes*, *E. coli* (principalement pour les souches productrices de shiga-toxine) et *S. aureus* (K. G. Joensen et al. 2014). D'autres

bases spécifiques sont disponibles comme celle dédiée à *K. pneumoniae* : <https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/>.

Ainsi, tous les outils présentés peuvent être appliqués aux génomes séquencés. Ils se substituent aux anciennes techniques de typage phénotypiques tout en apportant une quantité d'informations très importantes qui constituent autant d'éléments de comparaison pour l'analyse de souches suspectes d'être impliquées dans des phénomènes épidémiques.

Enfin, il est à noter qu'il existe d'autres méthodes de typage *in silico* qui sont dédiées spécifiquement à une espèce bactérienne. Pour les analyses de *E. coli*, des outils comme le FimTyper permettent la caractérisation du gène *fimH* qui appartient à l'opéron *fim* codant pour les fimbriae de type 1 (Roer et al. 2017). Ces données permettent des caractérisations de souches au sein d'une même séquence type comme le *E. coli* ST131 au sein duquel trois clades sont définis : fimH41, fimH22 et fimH30 (Roer et al. 2017; Wilson et Török 2018). Le dernier étant associé à des phénotypes de multirésistance associant production de BLSE et de résistance aux fluoroquinolones (Wilson et Török 2018). D'autres outils permettent la détection toujours chez *E. coli* des phylogroupes en associant deux approches : la réalisation de PCR *in silico* et la recherche d'homologie de séquences en utilisant l'approche kmer Mash (Beghain et al. 2018). L'ensemble de ces techniques de typage *in silico* permettent de dresser la carte d'identité génomique de la bactérie étudiée. Les analyses génomiques permettent aussi après avoir étudié le génome dans sa singularité, de placer la souche au sein d'une population bactérienne dont différentes échelles sont possibles.

### 1.3.2.3 Analyses populationnelles

Tout comme il existe plusieurs méthodes pour rechercher un gène au sein de données de séquençage, différentes solutions existent pour comparer des génomes entre eux (Uelze et al. 2020). Trois seront décrites : (i) les approches basées sur la comparaison des variations alléliques de gènes, (ii) une comparaison des mutations entre différents génomes et (iii) une approche basée sur la comparaison en contenu nucléotidique utilisant les kmers. Toutes ont en commun d'aboutir à une matrice de distance entre les génomes étudiés. De ces matrices pourront être construits des arbres phylogénétiques via différentes approches de clustering (Uelze et al. 2020).

#### 1.3.2.3.1 Approche gènes par gène : core genome Multi Locus Sequence Type (cgMLST) :

Le core genome MLST est l'application à plus grande échelle du MLST initialement basé sur sept gènes de ménages. C'est une approche dite gène par gène au cours de laquelle, pour chaque gène constituant le schéma, l'allèle présent dans le génome est recherché et attribué sous la forme d'un numéro (Schürch et al. 2018). Ainsi, le core génome MLST d'une souche correspond à une suite de numéros correspondant aux numéros des allèles retrouvés dans le génome étudié dont le nombre dépend de l'espèce et du schéma utilisé. La distance entre deux souches correspond au nombre d'allèles divergents au regard du schéma utilisé. La matrice de distance peut être visualisée sous la forme de clustering hiérarchique, d'arbre de *neighbor-joining* ou *Minimum-spanning tree*. (Schürch et al. 2018; Uelze et al. 2020). L'intérêt du core génome MLST est qu'il ne dépend pas d'un génome de référence (c.f infra) mais d'un schéma public qui permet la comparaison inter-laboratoire des données (Schürch et al. 2018). Cependant, la gestion des données manquantes peut modifier les résultats d'analyses basées sur le même schéma MLST ainsi que l'ajout et/ou le retrait de génomes au sein des analyses (Hennart et al. 2022). Pour les principaux pathogènes dont *L. monocytogenes*, *K. pneumoniae*, *E. coli* des schémas sont disponibles publiquement (Bialek-Davenet et al. 2014; Hennart et al. 2022; Moura et al. 2016; Zhou et al. 2020).

#### 1.3.2.3.2 SNP typing :

Une autre approche possible est la détection au sein des génomes de mutations ponctuelles appelées *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) et leur comparaison entre différentes souches (den Bakker et al. 2011).

Pour chaque bactérie étudiée, les *reads* sont alignés contre un génome de référence via les programmes tels que BWA ou bowtie2 (Langmead et Salzberg 2012; Li et Durbin 2009). A la suite, une étape dite de *variants calling* va dresser la liste de toutes les modifications génomiques retrouvées entre le génome de référence et la souche étudiée.

Ces modifications peuvent être de différentes natures telles que des substitutions nucléotidiques ponctuelles : les SNP, mais aussi des insertions/délétions (Uelze et al. 2020). Pour ce faire, le *variant calling* s'appuie sur différentes métriques dont : la qualité du séquençage de la base, la qualité de l'alignement du read mais aussi le nombre de reads dans lesquels la mutation a été retrouvée ce qui est appelé la profondeur.

Il existe différents algorithmes qui permettent le *variant calling* dont FreeBayes, GATK, SAMtools (DePristo et al. 2011; Li 2011; Garrison et Marth 2012). Ainsi, pour chaque souche étudiée, la position et le nombre des SNP par rapport à la référence sont connus. Il est alors possible de déduire la distance génomique entre les souches en étudiant position par position la présence et la nature des variants retrouvés par rapport à la référence.

Dans cette approche, seules les bases du génome de référence couvertes par toutes les souches étudiées comptent dans la mesure des distances génomiques. Aussi, pour que cette approche soit pertinente, le génome de référence utilisé doit être de bonne qualité et proche des souches étudiées, c'est-à-dire, au moins du même ST. Parallèlement, la qualité des génomes comparés compte aussi pour beaucoup, si l'une des souches présente un alignement de mauvaise qualité, c'est la comparaison de l'ensemble de génomes qui sera altérée (Uelze et al. 2020).

#### 1.3.2.3.3 Kmer comparaisons

Les approches par kmers déjà utilisées pour l'assemblage *de novo* des génomes et pour la recherche de séquences directement à partir des *reads* de séquençage peuvent être utilisées pour comparer des génomes.

Ces approches ne dépendent ni d'un génome de référence, ni d'un schéma existant. Différents algorithmes sont proposés dont kSNP3 (Gardner, Slezak, et Hall 2015, 3). Des approches encore plus novatrices utilisent des techniques, initialement développées par des moteurs de recherche pour comparer un grand nombre de génomes (Argimón et Aanensen 2016). Elles reposent sur la technique du *MinHash* qui permet de réduire une très grande quantité de données en un plus petit nombre dont la gestion demande moins de ressources computationnelles (Argimón et Aanensen 2016). Pour chaque génome, les contenus en kmer sont évalués. Chaque séquence de kmer est résumée, « hashée » en un identifiant unique de plus petite taille. Seule une partie de ces *hashs* seront conservés et rangés dans un contenant appelé *sketch*. Ainsi, la comparaison de génomes via ces techniques correspond à la comparaison du contenu en *hashs* de deux *sketches*. Ce qui pourrait signifier comparer deux éléments par le contenu de résumer de leur résumer. Les performances de ces approches sont bonnes et permettent de différencier les isolats jusqu'à l'échelle de la sous espèce (Argimón et Aanensen 2016). Dans l'article faisant état de son fonctionnement, les développeur de l'algorithme Mash illustre la capacité de cette méthodologie d'appréhender de très grands nombre de génomes (Figure 12) (Ondov et al. 2016).

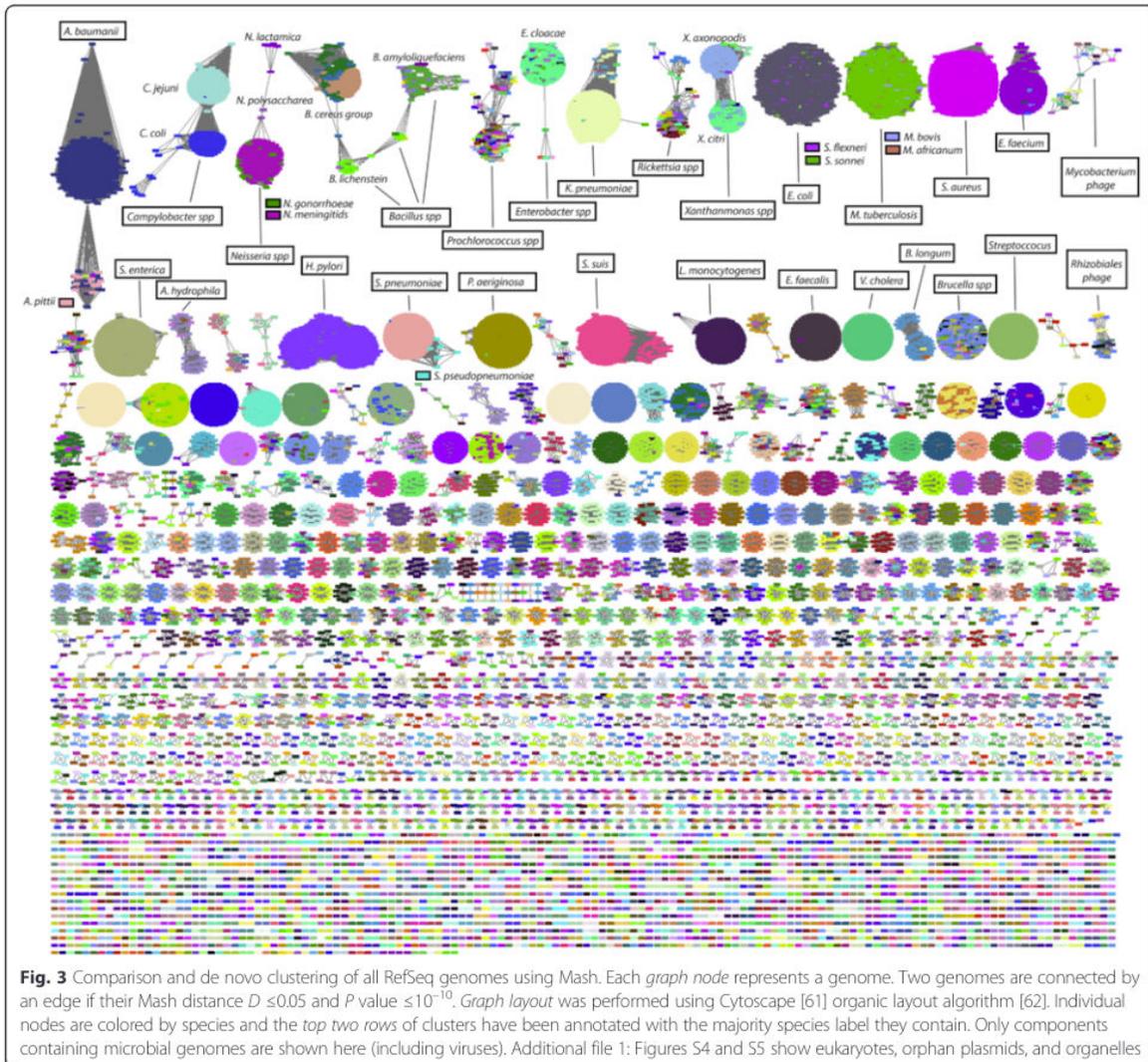


Figure 12 : clustering de 54 118 génomes issus de ncbi RefSeq via l'algorithme Mash

Image extraite de l'article "Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash" de Ondov *et al.* En utilisant l'approche de *Minhash*, les 618 Go de données ont été résumée en sketches de 93Mb soit une réduction de plus de 7000 fois la quantité de données à comparer. Ce qui a permis de calculer les 1,5 milliards distances entre tous les génomes en moins de sept heures.

## 1.4 Objectifs de la thèse de science

La thèse intitulée « Génomique des bactéries multirésistantes aux antibiotiques en Normandie : investigations épidémiques, études populationnelles, mécanismes de résistance aux antibiotiques » avait pour objectif l'établissement d'un système de surveillance de la circulation des entérobactérales résistantes aux céphalosporines de troisième génération isolées dans les services de réanimation du CHU de Caen. Cette veille épidémiologique devait permettre une meilleure caractérisation phénotypique et génomique des souches circulantes afin de connaître l'écologie bactérienne, mettre en évidence/comprendre les voies de dissémination, rechercher la présence de clones bactériens à succès. De ces outils mis en place, une veille génomique régionale représentait un objectif secondaire.

## 2 Résultats

### 2.1 Mise en place d'un système de surveillance des bactéries multirésistantes, présentation de la stratégie et des solutions d'analyses mise en place

#### 2.1.1 Sélection des patients et des souches bactériennes

Initialement, le choix a été fait de ne pas suivre toutes les espèces d'entérobactérales productrices de BLSE mais uniquement les bactéries appartenant au complexe *Enterobacter cloacae*, au complexe *Klebsiella pneumoniae* et à l'espèce *Escherichia coli* (Rodrigues et al. 2018). Cette décision s'est basée sur l'étude rétrospective de la circulation locale des E-BLSE au sein de laquelle, les bactéries suscitées représentaient 98% des espèces isolées. Néanmoins, l'organisation développée devait être capable de répondre à des alertes portant sur toute espèce d'entérobactérale issues des services cliniques, de l'hygiène hospitalière et/ou le service de bactériologie

Les prélèvements de dépistages ont été inclus dans ce système de surveillance. Tout d'abord, il a été démontré que les souches isolées dans les selles ont un intérêt clinique ; elles peuvent être la source d'infection profondes comme il l'a été démontré pour des infections secondaires à *K. pneumoniae*. La colonisation digestive exposait le patient à un surrisque d'infections de 16% vs 3% représentant un odds ratio de 6,9,  $P. < 0,001$  (Gorrie et al. 2017). Secondairement, 70% des souches de E-BLSE isolées dans les services de réanimation sont issues du dépistage systématique de BMR. Ces souches, en plus d'être potentiellement à l'origine d'infections peuvent être la source de la transmission de l'antibiorésistance. Il convenait donc de ne pas méconnaître ces populations de BMR.

Pour un même patient, seule la première souche de chaque espèce était incluse dans la surveillance. Au-delà d'un délai d'un an, l'inclusion d'une espèce déjà étudiée était de nouveau possible. L'inclusion des nouvelles souches était réalisée de façon prospective à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2019 à une fréquence hebdomadaire. Des scripts en langage de programmation R ont été développés afin de permettre une extraction des données contenues au sein du système d'information du laboratoire (SIL) pouvant alimenter une base de données dédiée à la surveillance des E-BLSE.

### 2.1.2 Surveillance basée sur des données phénotypiques

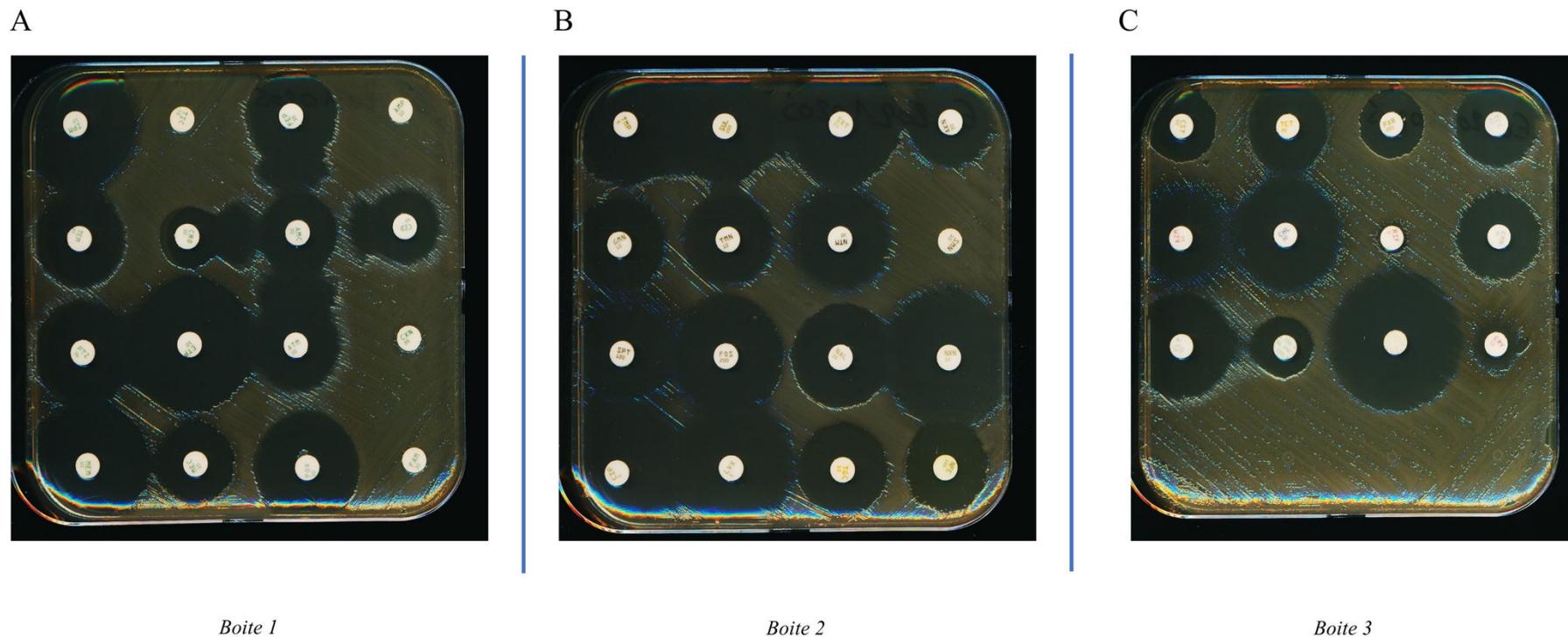
Les analyses de génomes ont représenté une part très importante de la surveillance. Néanmoins, tout séquençage était précédé d'une caractérisation phénotypique des souches basée sur des antibiogrammes contenant 44 molécules représentant 10 familles d'antibiotiques (Figure 13). Les antibiogrammes représentaient un contrôle qualité avant séquençage. Ils assuraient l'absence de contamination manifeste par une autre espèce bactérienne et confirmaient l'expression du phénotype souhaité.

Les données phénotypiques sont un élément de typage à part entière. De plus, elles permettent un suivi écologique de la résistance en utilisant des molécules qui ne sont pas employées dans les antibiogrammes de routine. Selon les projets, des CMI's ont été également réalisées via des méthodes telles que le Sensititre (ThermoFisher scientific) et/ou manuellement.

Les gènes de résistance aux antibiotiques retrouvés dans les génomes étaient comparés aux données d'antibiorésistance, permettant un lien étroit et permanent entre les données génomiques et phénotypiques.

### 2.1.3 Séquençage des génomes

Le séquençage des génomes bactériens n'a pas été réalisé *in situ* devant l'absence de matériel disponible. Après la mise en culture des souches, les culots cellulaires étaient traités par un réactif de lyse (Roche) et de la protéinase K (Roche). Les lysats bactériens étaient envoyés et séquencés sur la plateforme de microbiologie mutualisée (p2m) de l'institut Pasteur de Paris. L'extraction de l'ADN était réalisée via le système MagNA Pure (Roche) puis les bibliothèques étaient préparées en utilisant le kit Nextera (Illumina). Le séquençage était opéré sur l'automate Nextseq 500 (Illumina) générant des reads paired-end de 150 paires de bases. Les données reçues étaient constituées des fichiers fastq et de l'assemblage *de novo* des génomes.



*Figure 13 : AntibioGramme élargi réalisé avant le séquençage de toute souche bactérienne*

Abréviations IMP : Imipénème, TIC : Ticarcilline, FEP : Céfépime, AMP : Ampicilline, TEM : Témocilline, CRO : Ceftriaxone, AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique, CZD : Ceftazidime, PTZ : Pipéracilline – Tazobactam, ETP : Ertapénème, ATM : Aztréonam, CXN : Céfalexine, MEM : Méropénème, MEC : Mécillinam, FOX : Céfoxitine, FAM : Céfamandole, TMP : Triméthoprim, SUL : Sulfonamide, SXT : Cotrimaxole, GMN : Gentamicine, TMN : Tobramycine, NTM : Nétilmicine, SMN : Streptomycine, SPT : Spectinomycine, FOS : Fosfomycine, NAL : Acide Nalidixique, NXN : Norfloxacine, CIP : Ciprofloxacine, LVX : Levofloxacine, TIG : Tigécycline, CST : Colistine, TET : Tétracycline, PXB : Polymyxine B, TCC : Ticarcilline – Acide Clavulanique, AZM : Azithromycine, CHL : Chloramphénicol, RIF : Rifampicine, KMN : Kanamycine, CLT : Ceftolozane- Tazobactam, XNL : Ceftiofur, MAR : Marbofloxacine, ERY : Érythromycine

Figure 13-A boîte n°1 qui ne contient que des molécules appartenant à la classe des  $\beta$ -lactamines

Figure 13-B boîte n°2 contenant différentes classes antibiotiques : Triméthoprim – Sulfamides, Aminosides, Quinolones, Nitrofurantoïne, Tétracyclines

Figure 13-C boîte n°3 contenant différentes classes antibiotiques : Polymyxines, Tétracyclines, Macrolides, Phénicolés, Rifamycines, Aminosides et  $\beta$ -lactamines. Photographie : laboratoire de microbiologie, CHU de Caen Normandie, Crédits : Gravey François

## 2.1.4 Développement des solutions d'analyses

Un système de surveillance génomique efficient, doit s'adapter à l'échelle de la question posée. Il doit être capable de dresser la « carte d'identité génomique » de la bactérie en s'appuyant sur les différentes méthodes de typage disponibles ; mais aussi de travailler sur un nombre important de génomes lorsqu'une approche populationnelle est nécessaire. Il est possible de répondre à la quasi-totalité de ces besoins en utilisant des solutions « clef en main » proposées sur internet, néanmoins, ces outils souffrent d'un certain nombre de limitations ; notamment leur inadéquation avec les analyses d'un grand nombre de génomes, la nécessité de déposer sur des serveurs externes les données génomiques, l'absence de liberté sur les paramètres à utiliser. Jusque-là inexistante, il a été nécessaire de créer de toute part une solution locale d'analyse de génomes en s'appuyant sur des outils libres de droits disponibles. Ce développement a été très important au cours de la première année et demie du projet de thèse et a nécessité l'écriture de plus de 23 000 lignes de code, principalement en langage Python. Toujours perfectibles et encore en développement/amélioration, les solutions développées permettent à ce jour d'analyser les génomes selon différentes dimensions.

### 2.1.4.1 Vérification de la qualité de séquençage et profondeur des génomes

Dans son ouvrage *Bioinformatics Data Skills* (Buffalo 2015), Vince Buffalo insiste à de très nombreuses reprises sur l'importance en bio-informatique de ne jamais faire confiance aux données utilisées. Aussi, avant de réaliser une quelconque analyse de génomique, les données de séquençage sont évaluées via deux algorithmes différents, en plus des différents contrôles réalisés sur la plateforme P2M. Le premier outil fastqc permet de connaître de nombreuses métriques à propos des fichiers fastq, notamment, le nombre de reads présents dans les fichiers, l'importance des reads dupliqués, la qualité du séquençage via le phred score. Le second outil, quast, évalue la qualité des assemblages *de novo* via la taille totale du génome, le nombre de contigs, le nombre de bases sans information nucléotidiques, les 'Ns'.

Ces données sont très importantes pour l'interprétation des résultats obtenus par la suite. Elles peuvent même entraîner la non-analyse d'un génome si les données sont de trop mauvaise qualité.

Enfin, ces données réunies permettent de calculer avec approximation la couverture moyenne du génome selon la formule suivante  $\text{couverture moyenne} = \frac{(\text{Taille moyenne des reads} \times \text{nombre moyen de reads})}{\text{Taille du génome assemblé}}$ . Cette

donnée est précieuse, elle permet la comparaison des profondeurs entre des éléments tels que les gènes de résistance aux antibiotiques et le chromosome. Ces données peuvent orienter sur la présence de gènes sur un support plasmidique ou alors, intégré dans le chromosome bactérien.

#### 2.1.4.2 Dresser la carte d'identité du génome

Une stratégie de typage a été mise en place pour tout génome inclus dans le système de surveillance. Un ensemble d'analyses est réalisé quel que soit l'espèce considérée, il s'agit de :

- La détermination de l'espèce bactérienne par l'étude des variations de 53 gènes codants pour les protéines ribosomales grâce à l'outil rMLST (Jolley et al. 2012). Cette approche a pour avantage de nécessiter moins de ressources de calcul que d'autres plus connues telle que Kraken (Wood et Salzberg 2014).
- L'attribution du séquence type selon les schémas MLST adéquats (Wirth et al. 2006; Diancourt et al. 2005; Miyoshi-Akiyama et al. 2013).
- La recherche des gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que des mutations ponctuelles via l'association de trois outils : Resfinder, PointFinder et Resistance Gene Identifier (Bortolaia et al. 2020; Alcock et al. 2019; Ea Zankari et al. 2017)
- La recherche des gènes de virulence via trois bases de données distinctes : Virulencefinder pour les génomes de *E. coli*, <https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/> pour *K. pneumoniae*, et Virulence Factor DataBase pour les *Ecc* (K. G. Joensen et al. 2014; Lam, Wyres, et al. 2018; Lam, Wick, et al. 2018; Chen 2004).
- La détermination des groupes d'incompatibilité (Inc) des plasmides portés par les souches via l'outil PlasmidFinder (Carattoli et al. 2014).

A ces analyses génériques, sont rajoutées en fonction de l'espèce :

- La détermination du sérotype O:H, du phylogroupe, du *fimH*-type pour les génomes de *E. coli* (Katrine G. Joensen et al. 2015; Beghain et al. 2018; Roer et al. 2017).
- La recherche de l'allèle du gène *wzi* pour les souches appartenant au complexe *Klebsiella pneumoniae* (Brisse et al. 2013).
- L'attribution du complexe selon la séquence partielle du gène *hsp60* décrit par Hoffman et collaborateurs pour les souches de *Ecc* (Hoffmann et Roggenkamp 2003).

Pour une espèce étudiée, l'ensemble des résultats de typage sont associés (i) entre eux, (ii) aux résultats des antibiogrammes (iii) aux données démographiques du prélèvement dont : la date de réalisation, le service demandeur, l'origine (iv) aux informations issues du SIL : numéro de demande, numéro d'hospitalisation du patient, etc. La figure 14 illustre la présentation finale des résultats qui devait être accessibles et compréhensibles par des profils variés : notamment microbiologistes et hygiénistes n'ayant pas tous la même connaissance de la bactériologie et des analyses de génomes.

A

Nom.etude	Numero.patient	Correspondant	Date.de.prel.	Date.entree	N.demande	Numero.sejour	Nature	Taxon	ST	alleles	O:H	FimH	Phylogroup	Beta-lactam
Ec20190511	391282	633	25/01/2019	16/01/2019	9011623830	308543982	SELLES	Escherichia coli	ST401	adk-1,fumC-107,gyrB-7,icd-11,mdh-7,purA-3,recA-7	O7:H35	fimH233	A	blaDHA-7_blaSHV-12_blaTEM-1B
Ec20190512	179553	612	30/01/2019	29/01/2019	9011631213	308570043	SELLES	Escherichia coli	ST58	adk-6,fumC-4,gyrB-4,icd-16,mdh-24,purA-8,recA-14	O8:H25	fimH27	B1	blaCTX-M-15_blaTEM-1B
Ec20190513	374821	1610	05/02/2019	04/02/2019	9021638118	308594201	SELLES	Escherichia coli	ST95	adk-37,fumC-38,gyrB-19,icd-37,mdh-17,purA-11,recA-26	ND:H4	fimH27	B2	blaCTX-M-14_blaTEM-1B
Ec20190514	126612	611	09/02/2019	09/02/2019	9021645960	308608252	SELLES	Escherichia coli	ST59	adk-27,fumC-32,gyrB-24,icd-29,mdh-26,purA-19,recA-22	O1:H7	fimH34	F	blaCTX-M-14
Ec20190515	188534	1610	12/02/2019	11/02/2019	9021650331	308609968	SELLES	Escherichia coli	ST131	adk-53,fumC-40,gyrB-47,icd-13,mdh-36,purA-28,recA-29	ND:H4	fimH30	B2	blaCTX-M-27
Ec20190516	101174964	633	18/02/2019	17/02/2019	9021658793	308605321	SELLES	Escherichia coli	ST58	adk-6,fumC-4,gyrB-4,icd-16,mdh-24,purA-8,recA-14	O9:H25	fimH32	B1	blaOXA-1
Ec20190519	101024560	611	20/02/2019	23/12/2018	9021662352	308495969	SELLES	Escherichia coli	ST88	adk-6,fumC-4,gyrB-12,icd-1,mdh-20,purA-12,recA-7	O8:H17	fimH39	C	blaOXA-1
Ec20190521	101233973	7700	19/03/2019	18/03/2019	9031701874	308698049	URINAIRE	Escherichia coli	ST1618	adk-36,fumC-24,gyrB-9,icd-13,mdh-17,purA-11,recA-159	O4:H1	fimH9	B2	blaCTX-M-14
Ec20190522	101225521	633	27/03/2019	26/03/2019	9031714158	308685604	SELLES	Escherichia coli	ST38	adk-4,fumC-26,gyrB-2,icd-25,mdh-5,purA-5,recA-19	O86:H18	fimH27	D	blaCTX-M-14
Ec20190523	107159	1630	01/04/2019	25/03/2019	9041719364	308712012	SELLES	Escherichia coli	ST131	adk-53,fumC-40,gyrB-47,icd-13,mdh-36,purA-28,recA-29	ND:H5	fimH41	B2	blaCTX-M-15_blaTEM-1B

B

Nom.etude	ST	O:H	Beta-lactam	ampicilline	amoxicilline_ac clavulanique	ticarcilline	ticarcilline_acide clavulanique	piperacilline tazobactam	mecillinam	cefalexine	cefamandole	cefotixime	ceftriaxone	ceftazidime	cefepime	ceftiozane tazobactam	aztreonam	temocilline
Ec20190511	ST401	O7:H35	blaDHA-7_blaSHV-12_blaTEM-1B	6	11	7	22	28	17	13	16	20	31	18	33	32	26	25
Ec20190512	ST58	O8:H25	blaCTX-M-15_blaTEM-1B	6	21	6	19	21	10	6	6	25	9	13	19	26	17	22
Ec20190513	ST95	ND:H4	blaCTX-M-14_blaTEM-1B	6	15	6	14	18	9	8	6	28	15	23	22	23	25	21
Ec20190514	ST59	O1:H7	blaCTX-M-14	6	21	6	21	26	24	10	6	26	18	25	25	28	32	24
Ec20190515	ST131	ND:H4	blaCTX-M-27	6	26	6	27	31	27	11	8	27	21	24	28	28	31	25
Ec20190516	ST58	O9:H25	blaOXA-1	6	10	6	11	8	18	21	20	28	31	28	19	28	36	25
Ec20190519	ST88	O8:H17	blaOXA-1	6	10	6	10	9	22	18	22	28	32	29	19	27	35	24
Ec20190521	ST1618	O4:H1	blaCTX-M-14	6	19	6	18	23	21	6	6	26	11	22	18	25	24	19
Ec20190522	ST38	O86:H18	blaCTX-M-14	6	19	7	22	24	17	6	6	24	12	24	18	26	25	22
Ec20190524	ST131	O25:H4	blaCTX-M-27	6	21	6	22	25	19	6	6	23	15	18	23	25	23	20
Ec20190523	ST131	ND:H5	blaCTX-M-15_blaTEM-1B	6	16	6	16	19	10	6	5	21	8	13	16	21	15	16

C

Nom.etude	Correspondant	ST	Genes_de_Virulence	total
Ec20190511	633	ST401	gad- <i>lpfA</i>	2
Ec20190512	612	ST58	<i>cma-gad-iss-lpfA</i>	4
Ec20190513	1610	ST95	<i>gad-iraN-iss-mchF-vat</i>	6
Ec20190514	611	ST59	<i>air-eiA-gad-iss-lpfA-sat</i>	6
Ec20190515	1610	ST131	<i>gad-iraN-iss-sat-senB</i>	5
Ec20190516	633	ST58	<i>gad-iraN-iss-lpfA-mchF-mcmA</i>	7
Ec20190519	611	ST88	<i>gad-iraN-iss-lpfA-mchF-mcmA</i>	6
Ec20190521	7700	ST1618	<i>gad-iraN-iss-mchB-mchC-mchF-mcmA-pic-vat</i>	9
Ec20190522	633	ST38	<i>eilA-gad-iss</i>	3
Ec20190523	1630	ST131	<i>gad-nfaE-senB</i>	3

Figure 14 : Exemple des résultats du typage génomique pour des souches de *Escherichia coli*

Figure 14 – A : Association des données démographiques du patient, des données propres au prélèvement avec les principaux résultats de typage génomique

Figure 14 – B : Association des données de typage, du résistome avec les données phénotypiques obtenues, exemple de la confrontation des données :  $\beta$ -lactamases identifiées et diamètres des  $\beta$ -lactamines testées.

Figure 14 – C : Résultats de la recherche des gènes de virulence associés et séquence type des souches.

## 2.1.5 Analyses populationnelles

La multiplication des génomes séquencés a permis d'étudier la diversité des souches (i) au sein de leur espèce via les approches de cgMLST (ii) au sein de la même espèce et du même séquence type lors du suivi longitudinal de souches et/ou d'explorations de potentielles diffusions épidémiques.

### 2.1.5.1 Approches core genome MLST :

Pour comprendre la diffusion de la résistance il est important de pouvoir appréhender les populations bactériennes rencontrées dans leur globalité. La détermination des profils de cgMLST était réalisé pour les bactéries appartenant au complexe *Enterobacter cloacae*, au complexe *Klebsiella pneumoniae* et à l'espèce *Escherichia coli* via l'utilisation de la solution chewBBACA (M. Silva et al. 2018).

Pour *E. coli*, le schéma utilisé était celui disponible sur la base de données Enterobase <https://enterobase.warwick.ac.uk/>, pour les souches de *K. pneumoniae* le schéma choisi était celui disponible sur le site <https://www.cgmlst.org/ncs> de la société Ridom bioinformatics (Zhou et al. 2020). En revanche, le schéma cgMLST pour les souches de *Ecc* a été développé pour ce projet de thèse. Plus de 1700 génomes appartenant aux quatorze clusters consistant le complexe *Enterobacter cloacae* ont été annotés via l'algorithme Prokka puis le core genome a été étudié via l'algorithme du Sanger Institute Roary en choisissant comme seuil les gènes retrouvés dans 95% des génomes (Seemann 2014; Page et al. 2015). Pour chaque gène constituant le core génome, les séquences uniques des allèles ont été recherchées via l'outil cd-hit puis extraites pour constituer le schéma cgMLST (Fu et al. 2012).

Après attribution des profils alléliques pour chacun des génomes, une matrice de distance est calculée à partir de laquelle une phylogénie a été reconstruite via des approches de clustering hiérarchiques et l'algorithme MSTreeV2 de l'outil Grapetree (Zhou et al. 2018). Toujours à partir de la matrice de distance un clustering des souches permet d'appréhender numériquement les distances entre les génomes constituant la population d'étude cette approche nommée hierarchical cgMLST clustering (Zhou et al. 2020).

Via les données démographiques, temporelles et/ou géographiques, il était possible de représenter les conséquences d'un événement considéré à l'échelle d'une population bactérienne.

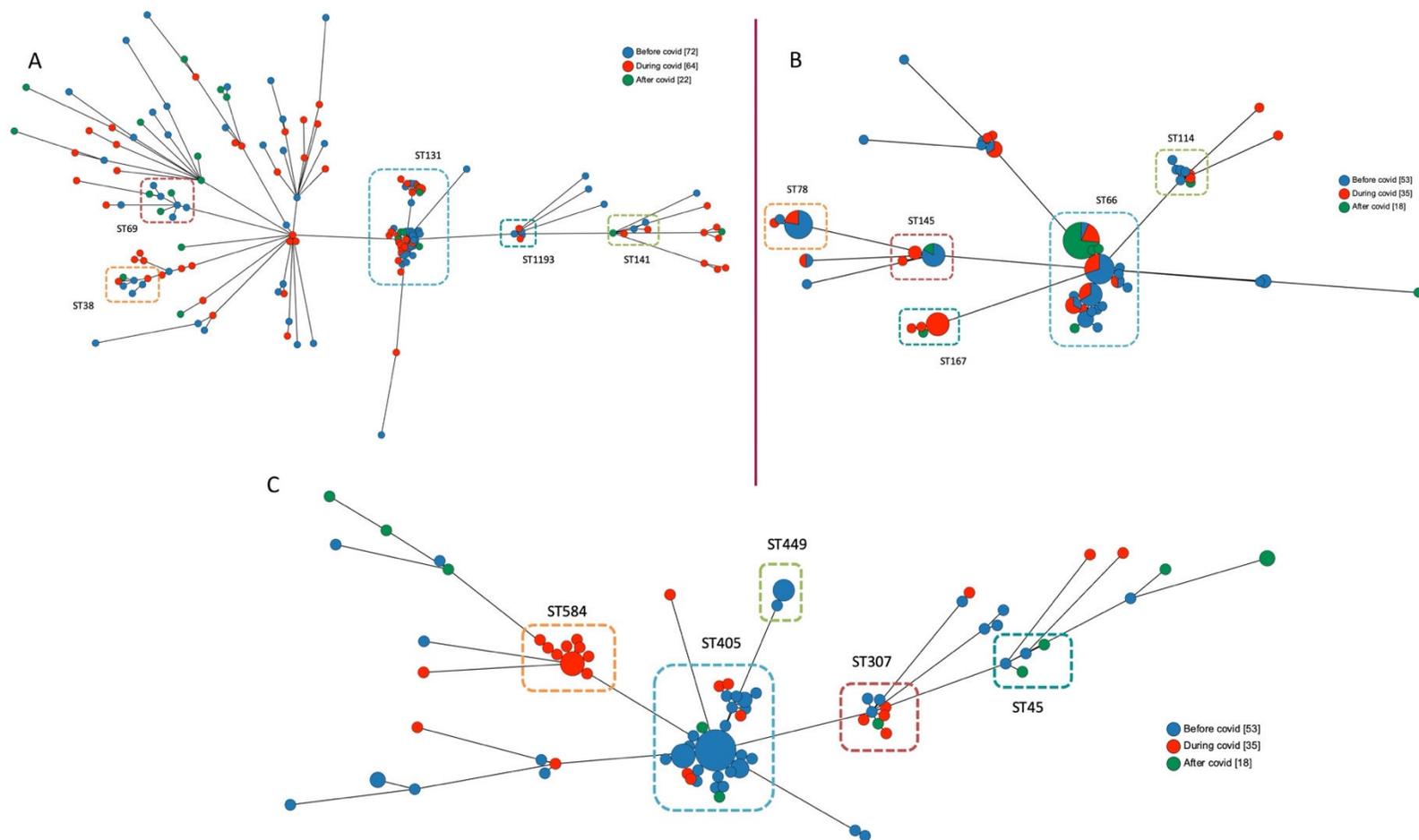


Figure 15 : Analyses cgMLST des populations d'entérobactériales productrices de BLSE isolées dans les services de réanimation du CHU de Caen entre 2019 et 2021, impact de la pandémie de covid-19 sur la diversité de souches circulantes

Figures issues du travail "Impact of Covid-19 pandemic on Extended Spectrum Beta-Lactamases Enterobacteriaceae circulation in three intensive care units of a 1 600-bed university hospital, France" Gravey et al, Eccmid 2022, Lisbonne Portugal. Figure 15-A population de *Escherichia coli*, Figure 15-B populations de *Enterobacter cloacae* complex, Figure 15- C : Population de *Klebsiella pneumoniae*.

### 2.1.5.2 Comparaison des génomes au sein d'un même séquence-type : *variants calling*

L'approche basée sur les *variants calling* a été celle choisie lorsqu'il s'agissait de comparer des génomes appartenant au même séquence type.

La recherche des génomes de référence est une étape cruciale pour la qualité des analyses. Elle s'effectuait au sein des différentes bases de données dont : ncbi RefSeq, Patric database, Enterobase, <https://bigsd.bpasteur.fr/klebsiella/> (O'Leary et al. 2016; Wattam et al. 2017; Zhou et al. 2020). La condition minimale pour considérer un génome comme référence potentielle était que ce dernier partage le même ST que les génomes à analyser. Pour les comparaisons de génomes de *E. coli*, la référence devait également présenter le même sérotype. La qualité de l'assemblage de tous les génomes de référence potentiels était évaluée via quast, ce qui permettait de choisir le meilleur candidat (Gurevich et al. 2013). Les paramètres déterminants étaient, la taille totale de l'assemblage, le nombre de contigs et le nombre de bases inconnues. Le processus de *variants calling* faisait appel à deux algorithmes « classiques » Burrows-Wheeler Aligner et FreeBayes (Li et Durbin 2009).

Un script a été écrit pour réaliser un contrôle qualité de l'étape du mapping. Ce dernier évalue la proportion du génome de référence sur laquelle des *reads* issus des génomes à comparer ont été mappés. En effet, la distance génomique entre deux souches ne tient compte que des SNP présents au sein des régions communes : *core-SNP*. Aussi, la présence d'un génome de mauvaise qualité pour lequel le mapping se serait mal effectué modifierait toutes les comparaisons de deux en deux et les distances génomiques ne seraient pas pertinentes et fausses.

La comparaison deux à deux des génomes permettait l'obtention d'une matrice de distance à partir de laquelle les potentiels liens épidémiologiques entre les génomes étaient étudiés. Une distance maximale de dix SNP entre deux génomes était le seuil retenu pour associer les souches entre elles. Pour certaines sous populations de *Ecc*, le caractère très clonal a nécessité l'abaissement des seuils à moins de cinq SNP. Afin de rendre les données plus accessibles, les matrices de distances étaient « annotées » en associant au numéro d'anonymisation du génome, l'année et le service dans lesquels la souche a été isolée.

Les séquences nucléotidiques des génomes, en prenant en compte les variants mis en évidence, étaient comparées permettant l'établissement d'une phylogénie gubbins (Croucher et al. 2015). Comme pour les données de cgMLST, les données génomiques étaient associées avec les données épidémiologiques et visualisées via l'outil Itol (Letunic et Bork 2016).

## 2.2 Suivi des épidémies intra-hospitalières

### 2.2.1 *Investigation of Serratia marcescens surgical site infection outbreak associated with peroperative ultrasonography probe*

L'article intitulé *Investigation of Serratia marcescens surgical site infection outbreak associated with peroperative ultrasonography probe* a été publié en février 2021 dans la revue *Journal of Hospital Infection* (Impact Factor 3,92) sous la forme d'un *short report*. Cette publication illustre l'apport des analyses génomiques dans les investigations modernes d'hygiène hospitalière.

Au cours de l'année 2018, au Centre Hospitalo-Universitaire de Caen, huit patients ont été opérés pour la réalisation d'une hépatectomie dont les suites ont été marquées par des infections post-opératoires précoces à *Serratia marcescens*. Les interventions n'ont pas été réalisées par les mêmes équipes chirurgicales, mais toutes se sont déroulées dans la même salle et ont nécessité pour le repérage opératoire l'utilisation d'une sonde d'échographie.

Les infections étaient mono-microbiennes ont pris la forme clinique de trois bactériémies et cinq suppurations profondes (quatre abdominales et une localisation pulmonaire). Pour trois patients, une reprise chirurgicale des abcès a été nécessaire. Tous les patients ont été correctement traités et il n'y a eu aucune issue défavorable. Une souche *S marcescens* a été isolée à partir des prélèvements de la sonde d'échographie utilisée dans le bloc opératoire.

Toutes les souches présentaient les mêmes phénotypes de résistance. En plus des résistances naturelles étaient retrouvées des résistances à la ticarcilline, au cotrimoxazole et aux fluoroquinolones. Les bactéries ont été séquencées en génome complet par la technologie Illumina et différentes méthodes de typage ont été utilisées sauf la détermination du Séquence Type car il n'existe pas de schéma défini pour l'espèce.

Les bases de données resfinder (E. Zankari et al. 2012) et CARD (Alcock et al. 2019) ont permis de retrouver que toutes les souches portaient le même resistome : présence chromosomique de la céphalosporinase *bla<sub>SRT-2</sub>* et de l'aminoglycoside acetyltransferase *aac(6')-Ic*, mais aussi acquisition des gènes *bla<sub>TEM-1</sub>* et *dfrA1* codant pour une pénicillinase et une dihydrofolate reductase respectivement. Enfin l'étude des *Quinolones Resistance Determining Region* (QRDR) a mis en évidence les mutations Ser83Ile et Asp87Asn dans GyrA et Ser80Ile dans ParC décrites comme responsables de la résistance de haut niveau aux fluoroquinolones (Khodursky, Zechiedrich, et Cozzarelli 1995; H. Yoshida et al. 1990). Il y avait une adéquation

parfaite entre le phénotype observé et les résistomes retrouvés. Huit gènes de virulence ont été identifiés dans la base de données *Virulence Factor Database* (VFDB) (Chen 2004). Le gène codant pour l'hémolysine *shlA* et son transporteur et activateur *shlB* ont été mis en évidence, ShlA est responsable d'actions cytotoxiques sur les cellules épithéliales et les fibroblastes (Walker, Hertle, et Braun 2004). Les six autres gènes *hasA*, *hasB*, *hasE*, *hasL*, *hasS* et *hasR* forment un système de captation et de métabolisme du Fer (Cwerman-Thibault 2007). L'outil plasmidfinder n'a pas mis en évidence de plasmide (Carattoli et al. 2014).

Enfin, une analyse de génomique comparative basée sur les *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) a retrouvé des distances génomiques entre les neuf génomes comprises entre un et vingt-quatre SNP.

En l'absence de données génomiques, l'apport microbiologique dans cette investigation aurait été limité à une concordance phénotypique entre les souches cliniques et la souche environnementale. Grâce aux analyses de génomes, ce sont le résistome, le virulome, la distance au nucléotide près qui viennent s'ajouter aux données d'antibiorésistance.

Ces informations microbiologiques se sont ajoutées aux explorations de l'équipe d'hygiène hospitalière. L'étude des pratiques opératoires a révélé plusieurs manquements dont deux principaux (i) des fautes dans la procédure de stérilisation de la sonde d'échographie, mais surtout (ii) l'utilisation de la sonde à même le parenchyme hépatique du patient sans utilisation de film stérile pourtant obligatoire. L'ensemble de ces données, concordance chronologique, géographique, physique (même sonde d'échographie), microbiologique, a permis d'apporter une compréhension complète des événements infectieux mais aussi l'adhésion des équipes cliniques. Depuis le changement des pratiques et le respect des règles d'hygiène, il n'y a pas eu de nouvelle épidémie à *S. marcescens* au sein du CHU de Caen.

Pour les raisons évoquées, l'utilisation des analyses génomiques élève la preuve microbiologique apportée par le laboratoire ; ce qui est crucial compte tenu des enjeux soulevés par ces explorations. Une étude dans ncbi a retrouvé 188 articles entre 2000 et 2022 qui associent les données '*Serratia*' et '*Outbreak*' dans le titre ou dans le résumé. Ainsi *S. marcescens* apparaît comme une espèce fréquemment impliquée dans les phénomènes épidémiques, notamment chez les nouveau-nés et les enfants. En effet, une étude des titres des publications retrouve que 34% (64/188) des épidémies présentées avaient eu lieu dans des services de néonatalogie, réanimation ou services conventionnels de pédiatrie. Au regard de l'impact des analyses génomiques et du caractère épidémiogène de *S. marcescens*, il semble urgent de développer un schéma MLST pour cette espèce mais aussi de proposer une base de

données publique permettant de typer et de comparer les génomes séquencés pour une meilleure compréhension de la diffusion de *S. marcescens*.



Short report

## Investigation of *Serratia marcescens* surgical site infection outbreak associated with peroperative ultrasonography probe

A. Géry<sup>a</sup>, A. Mouet<sup>a</sup>, F. Gravey<sup>b</sup>, M. Fines-Guyon<sup>c</sup>, F. Guerin<sup>c</sup>, F. Ethuin<sup>d</sup>,  
F. Borgey<sup>e</sup>, J. Lubrano<sup>f</sup>, S. Le Hello<sup>a, b, c, \*</sup>

<sup>a</sup>Hospital Hygiene and Infection Control Department, CHU Caen, Caen, France

<sup>b</sup>Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (GRAM 2.0) Université Normandie, UNICAEN, UNIROUEN, Caen, France

<sup>c</sup>Microbiology Department, CHU Caen, Caen, France

<sup>d</sup>Surgical Intensive Care Unit, CHU Caen, Caen, France

<sup>e</sup>CPias, CHU Caen, Caen, France

<sup>f</sup>Digestive and Visceral Surgery Ward, CHU Caen, Caen, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 October 2020

Accepted 23 December 2020

Available online 12 February 2021

#### Keywords:

Surgical site infections

*Serratia marcescens*

Whole-genome sequencing



### SUMMARY

Early postoperative infections due to *Serratia marcescens* have been reported by both clinicians and microbiologists in our teaching hospital. Here, we present an interlinked clinical, epidemiological, environmental and genomic investigation of this outbreak due to a T-shaped intraoperative probe contaminated by *S. marcescens* used during peroperative ultrasonography in laparoscopic liver resection.

© 2021 Published by Elsevier Ltd on behalf of The Healthcare Infection Society.

### Introduction

*Serratia marcescens* is an opportunistic pathogen that can cause a wide variety of healthcare-associated infections, such as respiratory and urinary tract infections, meningitis,

bacteraemia and surgical site infections (SSIs), particularly in settings such as intensive care units (ICUs) [1,2]. This Gram-negative bacteria can easily spread in the environment and contaminate medical equipment [1,2], drugs [1,3], antiseptic solutions [4], or the hands of caregivers [1]. Investigations usually find, as a surgical environment reservoir, razors [5,6], detergent-disinfectant solutions [7] or saline solutes [8]. In August 2018, four SSIs due to *S. marcescens* occurred in a digestive surgery ward in a French teaching hospital. This led to extended investigations in order to identify the origin of the outbreak.

\* Corresponding author. Address: Microbiology and Hospital Hygiene and Infection Control Department, CHU Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14000, Caen, France.

E-mail addresses: [lehello-s@chu-caen.fr](mailto:lehello-s@chu-caen.fr), [simon.lehello@unicaen.fr](mailto:simon.lehello@unicaen.fr) (S. Le Hello).

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.12.025>

0195-6701/© 2021 Published by Elsevier Ltd on behalf of The Healthcare Infection Society.

## Methods

This study took place in the teaching hospital of Caen, a 1410-bed hospital located in Normandy, France. On 6<sup>th</sup> August 2018, a fourth spatiotemporal case of *S. marcescens* SSI appeared in the digestive surgery ward. Furthermore, the clinical strains displayed the same antibiotic resistance profile. As a consequence, the hygiene and infection control department of the hospital was alerted on 7<sup>th</sup> August 2018 by surgeons, microbiologists and intensive care seniors; this led to the immediate closure of the operating room. To screen unnoticed cases since the beginning of 2018, retrospective investigations were performed. Information was collected from the acts traceability booklet and medical files, as well as coding data transmitted by the hospital archive department, the microbiology laboratory and the hospital pharmacy. Cases were defined as follows: any patient who had undergone digestive surgery in the incriminated operating room, especially a hepatic tumour resection by radiofrequency or by hepatectomy (with intraoperative ultrasound guidance) and who had a microbiological sample positive for *S. marcescens*. The National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) risk index was calculated for cases [9]. Environmental samples were performed in the operating room, including airlock by taking air samples (impact biocollector) and surface samples (contact agar plates), in order to find the reservoir of *S. marcescens*. Isolated strains were identified using the matrix assisted laser desorption ionization-time of flight MALDI-TOF mass spectrometry method (Bruker®, Germany). Anti-microbial susceptibility was tested against a large panel of antibiotics according to French and European guidelines [10] for all *S. marcescens* strains, clinical and environmental, isolated throughout this investigation, as well as two supplementary not-linked strains. Moreover, these strains were subjected to whole-genome sequencing (WGS) using a NextSeq 500 platform (Illumina, USA), generating 150 bp paired-end reads. Genomes were *de novo* assembled using SPAdes v 3.12 software. Every genome is available on the NCBI BioProject: PRJNA648275. All known acquired antibiotic resistance genes were screened thanks to the Resfinder database ([www.cge.dk](http://www.cge.dk)). Furthermore, point mutations were searched in order to detect alterations in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs). Reads were mapped against the reference genome *S. marcescens* subsp. *marcescens* Db11 (Nucleotide accession number: NZ\_HG326223) using the Burrows–Wheeler Aligner, and single nucleotide polymorphisms (SNPs) were determined in order to evaluate the distance between all the sequenced strains using mpileup, as previously described [10].

## Results

A total of eight patients suffered from SSIs caused by *S. marcescens* between 5<sup>th</sup> April and 7<sup>th</sup> August 2018 in the same digestive surgery ward. These patients underwent hepatectomy with intraoperative ultrasound guidance, with four of them undergoing tumour resection by radiofrequency. All eight cases had an early deep SSI (between 0 and 11 days after surgery), and all but one case received adapted antibiotic treatment for 11–42 days. Three cases required surgical revision to control the infection (see patient characteristics in Table 1). In all cases, the drug used for preoperative surgical antibiotic

prophylaxis and method of administration were in accordance with *in situ* and French Society of Anaesthesia and Intensive Care Medicine guidelines, which consists of 2 g cefazolin injection (<https://sfar.org/>). The NNIS score was variable among patients: 0 ( $N = 3$ ), 1 ( $N = 4$ ) and 2 ( $N = 1$ ). The highest score corresponded to the index case who suffered from deterioration in his general status and potentially contaminated surgery. His biliary tract infection (caused by *S. marcescens*) was responsible for immediate postoperative septic shock, which was treated with a combination of cefepime and gentamicin for 25 days.

The investigation of the eight cases revealed two common points: (1) the operating room and (2) the use of a unique T-shaped intraoperative probe 8816 (BK Ultrasound, Peabody, MA, USA). The operating room was closed, and radiofrequency material was retired on 7<sup>th</sup> August 2018, whereas the ultrasound probe was sequestered three days after the alert. In fact, time was needed to analyse 67 environmental samples, including surgical material samples (radiofrequency material and T-shaped probes), medicine fridges, scopes, room surfaces (floors, walls, materials, trolleys, operation tables, cables, scalytic lamps, and cans), detergent-disinfectant and antiseptic solutions, syringe drivers, ultrasound scanners, and computer keyboards. Surgical interventions were performed by several surgical teams; hence, no *S. marcescens* carriage testing was performed on caregivers. First, none of the 67 samples were positive for *S. marcescens*. A new inspection was performed on the ultrasound probe by the hygiene microbiologist. It turned out that the sleeve that allowed for the seal between the cable and body of the probe was unstuck, facilitating the probable formation of a reservoir. In addition, an analysis of the local practices highlighted two major non-compliances. First, the probe was used intraoperatively without a single-use sterile protective sheath, and second, the maintenance carried out after its use was not in conformity (absence of terminal disinfection after cleaning). Thanks to these observations, new samples were taken by modifying the sampling technique in pre-adding a step of sterile water immersion/injection of/in the probe, in particular in the sleeve. In doing so, a *S. marcescens* strain was isolated and displayed the same pattern of antibiotic resistance as those isolated from the eight patients. All these epidemic strains harboured the chromosomal *AmpC bla-SRT-2* and *aac(6)-Ic* genes, conferring resistance to most penicillins, including cefazolin and amikacin, respectively. Epidemic strains also carried the *bla-TEM* gene, coding a penicillinase; aminoglycoside *aadA1* gene, conferring resistance to streptomycin and spectinomycin; and *dfrA1* gene, leading to resistance to trimethoprim and co-trimoxazole. QRDRs were chromosomally substituted in GyrA (Ser83Ile and Asp87Asn) and ParC (Ser80Ile), conferring high-level resistance to fluoroquinolones through three amino acid changes. Epidemic strains remained susceptible to key antibiotics for *S. marcescens* treatment (i.e., third-generation cephalosporins or carbapenem). *In silico* analyses confirmed that all eight clinical strains were closely related to the probe strain, with an average of distance of 9 SNPs (min: 1, max: 24) inside the cluster, while a distance 87,000 SNPs split the epidemic strains with two not-linked strains (see Supplementary Figure S1).

In total, the incriminated T-shaped probe was used in nine interventions between the index case and its withdrawal. Among them, eight patients presented with SSIs caused by

**Table 1**  
Operating history and patient characteristics of *Serratia marcescens* surgical site infections, 2018, in a teaching hospital in Caen, Normandy, France

Epidemic patients	Age (years), sex	Medical history	Ultrasonography operation	Operation duration in hours	NNIS index <sup>a</sup>	Operation date	Day delay (D), prelevement type <sup>b</sup>	Antibiotic treatment Surgical revision	Outcome
EP1	59, male	Intrahepatic cholangiocarcinoma	Hepatectomy	4	2	5 <sup>th</sup> April 2018	D0, biliary prosthesis	Cefepime Gentamicin	Recovered
EP2	59, male	Intrahepatic adenocarcinoma	Hepatectomy	3	0	16 <sup>th</sup> May 2018	D4, blood	Cefepime	Recovered
EP3	33, female	Hepatic hydatid cysts	Hepatectomy	6	1	28 <sup>th</sup> June 2018	D11, Redon drain	Cefepime	Recovered
EP4	66, male	Intrahepatic cholangiocarcinoma	Hepatectomy	6	1	29 <sup>th</sup> June 2018	D8, pleural fluid	Ceftazidime Surgical revision	Recovered
EP5	83, female	Intrahepatic adenocarcinoma	Hepatic resection radiofrequency	3	0	1 <sup>st</sup> August 2018	D5, blood	Cefepime Gentamicin	Recovered
EP6	60, male	Intrahepatic adenocarcinoma	Hepatic resection radiofrequency	5	1	2 <sup>nd</sup> August 2018	D2, blood	Ceftazidime-avibactam Gentamicin Surgical revision	Recovered
EP7	64, male	Intrahepatic adenocarcinoma	Hepatic resection radiofrequency	2	0	2 <sup>nd</sup> August 2018	D3, hepatic abscess	Surgical revision	Recovered
EP8	77, male	Intrahepatic adenocarcinoma	Hepatic resection radiofrequency	5	1	3 <sup>rd</sup> August 2018	D4, Redon drain	Cefepime Imipenem	Recovered

EP, Epidemic patient.

<sup>a</sup> National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) index was calculated for each patient according to guidelines [9].

<sup>b</sup> First *S. marcescens* isolation.

*S. marcescens*. In the only patient who did not contract an SSI, the contaminated probe was used with a very short contact time. Regarding surgical procedures, numerous non-compliances were uncovered, such as the absence of bio-cleaning and upkeep traceability for radiofrequency material, T-shaped probes and fridges, as well as the absence of the single-use sheath of the probe during ultrasonography.

Not one case of *S. marcescens* SSI has been reported since the end of this investigation and corrective measures have been taken, such as medical device vigilance, staff information and procedure adjustments in bio-cleaning and traceability and the use of the probe sheath during deep surgical operations.

## Discussion

This *S. marcescens* outbreak investigation revealed eight postoperative infections due to the use of a contaminated T-shaped intraoperative probe. During ultrasonography, the probe was used in direct and long contact with tissues without a single-use sheath. These defaults could explain a brief five-day mean elapsed time between the operation and the first signs of infection. This delay is shorter than that described in other publications [11,12]. Interestingly, our investigation disentangled this epidemic episode by detecting all patients (including the index case), by identifying the cause of the SSI and the mechanism related to the formation of the reservoir. No similar example was found in the literature. Indeed, in most of studies referring to *S. marcescens* SSI outbreaks, a strain reservoir was epidemiologically suspected, rarely confirmed, or the number of contaminated patients was estimated [1–12]. This investigation also highlighted that the sole use of contact agar plates was not sufficient to find *S. marcescens* on the probe. If a specific device is suspected to be infected, we recommend the use of the technique presented in this report, namely immersion of the device in sterile water and/or injection of sterile water into unreachable nooks. Furthermore, WGS is a highly discriminative tool widely used in large-scale epidemiologic investigations [6,10], and we showed through our work that it is valuable to ascertain our hypothesis of contamination.

Our investigation raised several questions concerning care practices [13]. It must be emphasized that high surgical activity leaves little time for the caregivers: (1) to allow a good check-up of the equipment and a realization of an adapted upkeep and (2) to get practical training courses and to master the procedure. In addition, the use of the ultrasound probe without a sheath is a common practice by surgeons to obtain a better surgical view, but it is not without risks in terms of health-associated infections. Patient contamination by the T-shaped probe could depend on both bacteria inoculum and duration of exposure and could not be avoided by the recommended antibiotic prophylaxis (cefazolin 2 g), as it is ineffective against *S. marcescens*.

We would like to underline that these results were obtained through close cooperation between the hospital hygiene department, the digestive surgery ward, the hospital archive department, and the microbiology laboratory. This led to the issuing of a medical device alert and to the withdrawal of the T-shaped probe and showed that the use of a single-use sterile sheath placed on the tip of the probe during ultrasonography in laparoscopic liver resection is essential in order to avoid such peroperative infections. Infection prevention and control

measures, including reminder courses on adequate cleaning and decontamination of the probe were set up. Since then, no other case was observed.

In conclusion, we reported an outbreak of *S. marcescens* SSIs associated with peroperative ultrasonography. These results led to the withdrawal of the probe, to a reinforcement of the training course on the pre-cleaning step, in particular disinfection procedures vigilance, and to a correction of the practices, especially by the systematic use of a single-use cover during peroperative ultrasonography in laparoscopic liver resection.

## Acknowledgements

We thank Annie Lemarié, Nelly Devère, Valerie Moreno and Florence Souplet for their excellent technical assistance work, and the administration and infection control staff, as well as the pharmacy hospital, for their support during the investigation.

### Conflict of interest statement

All authors: no reported conflicts.

### Funding sources

None.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.12.025>.

## References

- [1] Mahlen SD. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:755–91.
- [2] Cristina ML, Sartini M, Spagnolo AM. *Serratia marcescens* infections in Neonatal Intensive Care Units (NICUs). *Int J Environ Res Public Health* 2019;16:610.
- [3] Cilli F, Nazli-Zeka A, Arda B, et al. *Serratia marcescens* sepsis outbreak caused by contaminated propofol. *Am J Infect Control* 2019;47:582–4.
- [4] Merino JL, Bouarich H, Pita MJ, et al. *Serratia marcescens* bacteraemia outbreak in haemodialysis patients with tunnelled catheters due to colonisation of antiseptic solution. Experience at 4 hospitals. *Nefrologia* 2016;36:667–73.
- [5] Leng P, Huang WL, He T, Wang YZ, Zhang HN. Outbreak of *Serratia marcescens* postoperative infection traced to barbers and razors. *J Hosp Infect* 2015;89:46–50.
- [6] Kim EJ, Park WB, Yoon JK, et al. Outbreak investigation of *Serratia marcescens* neurosurgical site infections associated with a contaminated shaving razors. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020;9:64.
- [7] Ehrenkranz NJ, Bolyard EA, Wiener M, Cleary TJ. Antibiotic-sensitive *Serratia marcescens* infections complicating cardiopulmonary operations: contaminated disinfectant as a reservoir. *Lancet* 1980;2:1289–92.
- [8] Pegues DA, Shireley LA, Riddle CF, et al. *Serratia marcescens* surgical wound infection following breast reconstruction. *Am J Med* 1991;91:5173–8.
- [9] Emori TG, Culver DH, Horan TC, et al. National nosocomial infections surveillance system (NNIS): description of surveillance methods. *Am J Infect Control* 1991;19:19–35.
- [10] Gravey F, Cattoir V, Ethuin F, et al. RamR deletion in *Enterobacter cloacae* complex as a consequence of therapeutic failure

- during a long-term hospitalized patient. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64(10). e00962-20.
- [11] Fernández AL, Adrio B, Martínez Cerejio JM, Martínez Monzonis MA, El-Diasty MM, Alvarez Escudero J. Clinical study of an outbreak of postoperative mediastinitis caused by *Serratia marcescens* in adult cardiac surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2020;30:523–7.
- [12] Ulu-Kilic A, Parkan O, Ersoy S, et al. Outbreak of postoperative empyema caused by *Serratia marcescens* in a thoracic surgery unit. *J Hosp Infect* 2013;85:226–9.
- [13] Carrico RM, Furmanek S, English C. Ultrasound probe use and reprocessing: Results from a national survey among U.S. infection preventionists. *Am J Infect Control* 2018;46:913–20.

## 2.2.2 *Highlighting extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae outbreak by routine genomic typing*

L'article intitulé *Highlighting extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae outbreak by routine genomic typing* a été soumis dans le journal *International Journal of Hygiene and Environmental Health* sous la forme d'un short report. Cette publication est la première description d'une épidémie engendrée par la population de *Klebsiella pneumoniae* ST584. Elle illustre aussi le fonctionnement d'un système de surveillance de la circulation des E-BLSE basé sur la génomique.

La société Française d'Hygiène hospitalière (SF2H), recommande de « mettre en place une surveillance épidémiologique des agents infectieux « à haut potentiel de transmission croisée » dont les BMR » (Société Française d'Hygiène Hospitalière 2009). Au CHU de Caen, ce système est basé sur la détection du portage des E-BLSE chez tous les patients hospitalisés dans les services de réanimation : à l'admission puis de façon hebdomadaire. Depuis janvier 2019, toutes les espèces de E-BLSE isolées chez un patient sont systématiquement séquencées et typées via des analyses *in silico*.

En novembre 2020, une alerte est donnée au sein de deux unités de réanimation chirurgicale, physiquement contiguës, devant l'augmentation de l'incidence des taux de portage et d'infections à *K. pneumoniae* productrice de BLSE (Kp-BLSE). En effet, entre septembre et novembre trois patients ont présenté une bactériémie et cinq étaient porteurs de Kp-BLSE. Au cours du mois de décembre un nouveau patient va présenter une infection urinaire (dont la souche ne sera pas retrouvée) et trois patients seront dépistés porteurs soit douze cas en quatre mois.

Le typage *in silico* retrouvait neuf souches de Kp-BLSE ST584 et deux souches appartenant aux ST46 et ST405. Ces premiers éléments permettaient à la fois de restreindre mais aussi concentrer les investigations sur les cas suspects. Les souches de Kp-BLSE ST584 présentaient le même phénotype de résistance expliqué par un même résistome : *bla<sub>CTX-M-15</sub>* and *bla<sub>TEM-1B</sub>*, *aph(3'')-Ib* and *aph(6)-Id*, *sul2* and *dfrA14*, *tet(A)*, *qnrB1*. Les analyses de génomique comparatives basées sur la recherche des SNP ont retrouvé une distance génomique maximale entre les génomes de neuf SNP allant dans le sens de l'hypothèse d'une diffusion clonale au sein de ces deux unités de réanimation.

Simultanément, les équipes d'hygiène ont procédé à (i) des audits de pratiques auprès des soignants qui n'ont pas révélé de manquement (ii) 69 prélèvements environnementaux incluant

les matériels médicaux, les surfaces et autres points d'eau ; aucun prélèvement n'a retrouvé la présence de Kp-BLSE. A noter la présence d'un lave bassin défectueux qui n'a pas été prélevé car remplacé avant le début des investigations.

Après les interventions des équipes d'hygiène dans les unités, le séquençage des souches de E-BLSE a continué de façon prospective sans plus mettre en évidence la présence de Kp-BLSE ST584 parmi les patients du CHU.

Les soignants font tout leur possible pour traiter au mieux les patients. Aussi, lorsque ces soignants sont informés d'une potentielle épidémie au sein des unités, cela peut être interprété comme une accusation de faute professionnelle, de manquements, avec parfois des réactions de rejet de la situation. De plus, les mesures de précaution contact mises en place sont contraignantes et peuvent amplifier un sentiment de lassitude. Les analyses de génomes apportent des informations objectives nécessaires à la pédagogie et à la compréhension de l'épisode. De plus, elles permettent de rationaliser les explorations en éliminant les cas qui ne peuvent pas, scientifiquement, être reliés à l'épidémie en cours. Elles permettent aussi, comme c'était le cas dans ce travail, un suivi géographique des souches mettant en évidence la diffusion du clone épidémique à deux unités de réanimation.

Lors de cette exploration, les premières comparaisons de souches ont été réalisées dès l'alerte connue car les données étaient déjà existantes permettant une très grande réactivité. Le séquençage prospectif permet de suivre l'évolution d'une situation épidémique : aggravation - régression. Un système de surveillance basé sur la génomique s'enrichit de chaque séquençage réalisé. Les analyses de génomiques comparatives ne sont pas limitées par le nombre de souches à comparer. Elles peuvent à tout moment s'enrichir de nouveaux génomes qui peuvent modifier l'analyse d'une situation.

La mécanique de l'épidémie de *K. pneumoniae* ST584 n'a pas été totalement résolue. En effet, au regard des éléments disponibles, il semble que cette épidémie ait été causée par des transmissions de personnes à personnes sans diffusion dans l'environnement. Restera cependant le lave bassin non prélevé qui empêchera d'éliminer formellement une origine environnementale à cet épisode épidémique.

# Highlighting extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak by routine genomic typing

Wilson S<sup>1§</sup>, Gravey F<sup>2,3§</sup>, Denisenko A<sup>4</sup>, Lehoussel C<sup>1</sup>, Fines-Guyon Marguerite<sup>2</sup>, Le Hello S<sup>1,2,3</sup> and Jeanne-Leroy C<sup>1</sup>.

§ contributed equally to the work

<sup>1</sup> Hospital Hygiene and Infection Control Department, CHU Caen, 14000 Caen, France

<sup>2</sup> Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, Inserm UMR 1311 DYNAMICURE, 14000 Caen, France

<sup>3</sup> Microbiology Department, CHU Caen, 14000 Caen, France

<sup>4</sup> Surgical Intensive Care Unit, CHU Caen, 14000 Caen, France

Corresponding author: Simon Le Hello, Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, CHU Caen Normandie, Department of Hospital Hygiene and Infection Control and Microbiology, Inserm UMR 1311 DYNAMICURE, 14000 Caen, France - Electronic address: [lehello-s@chu-caen.fr](mailto:lehello-s@chu-caen.fr). Phone number: + 33 02 31 06 45 94

**Abstract:** 50 words

**Body text:** 1209 words

**References:** 10

**Key words:** Outbreak, Whole genome sequencing, *Klebsiella pneumoniae*, ST584, ESBL

## Abstract

Whole genome sequencing has become the gold standard for any microbiological investigations. Doing it routine enabled outbreak detections. We investigated an epidemic extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain on two intensive care units over a 4-month period. Even later, intervention by the infection control team brought an end to the outbreak.

## **Introduction**

*Klebsiella pneumoniae* (*Kp*) is a Gram-negative opportunistic pathogen and a natural inhabitant of the human intestinal tract. This species can also be found on mucosal surfaces in mammals, as well as in water, sewage, soil, and plants.<sup>1-3</sup>

Amongst various mechanisms of antibiotic resistance, *Kp* can acquire enzymes such as extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) which reduce the number of therapeutic options available leading to the prescription of last line antibiotics: carbapenems.<sup>4</sup> Consequently, carbapenem resistant strains have emerged which can cause severe infections among immunocompetent patients.<sup>5</sup> Recent antibiotic use, catheter carriage, mechanical ventilation and prolonged hospitalization are risk factors for antibiotic resistant *Kp* infections.<sup>6</sup>

*Kp* is responsible for nosocomial infections and hospital outbreaks due to cross transmission from patient to patient, from environmental reservoirs to patients or both intricate mechanisms.<sup>7-8</sup> Surveillance of ESBL-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) is recommended in epidemic circumstances in intensive care units (ICUs) in France.<sup>9</sup> Here we describe the investigation and corrective measures for the first reported hospital outbreak due to an ESBL-*Kp* ST584 strain.

## Materials and Methods

### *Setting*

The outbreak occurred in a regional cardio-thoracic (CT) ICU (22 beds) and conventional CT ward (22 beds) at Caen University Hospital, a 1410-beds teaching hospital in Normandy, France. During their medical care, patients follow the same pathway: they are initially hospitalized on the CT conventional ward before surgery, following which they are transferred to the CT-ICU. They return to the CT conventional ward once they are stabilized. The same team of health care workers (HCWs) are dispatched in the two units. All patients hospitalized in the hospital's ICUs have a weekly ESBL-Enterobacteriaceae (ESBL-E) carriage screening using rectal swabs. For each patient, the first ESBL-E is tested for antimicrobial susceptibility testing (AST) and DNA extracted to whole genome sequencing (WGS) to monitor the circulation of ESBL-E populations and to confirm human to human transmission.

On the 2<sup>nd</sup> of November 2020 the infection control team (ICT) was notified of a high rate of carriage and infections of ESBL-*Kp* in the CT intensive care ward which lead to the initiation of an investigation.

### *Interventions*

For each patient with an ESBL-*Kp* carriage or infection the ICT checked the correct application of contact precautions and analyzed their medical files to study the spatiotemporal link between cases. The ICT questioned HCWs from these wards on their hygiene practices and cleaning procedures for shared medical material. Simultaneously, environmental samples were taken from surfaces and medical material to identify potential indirect cross transmission as well as from sink drain traps and liquids on the wards to look for a potential environmental reservoir.

### *Microbiology*

WGS has been in place in routine in Caen University Hospital since 2019. All the first isolated ESBL-E strains isolated in ICUs of our hospital were tested for AST by disk diffusion according the EUCAST-CASFM guidelines (<https://www.sfm-microbiologie.org/>) and sequenced after conventional DNA extraction using the Nextseq 500 Illumina technology. Libraries were prepared using the Illumina Nextera Kit generating 150 bp paired-end reads. Quality assessment was performed using fastqc software. Genome were *de novo* assembled using Spades version 3.12. Quality of the assembly was checked using quast software. Several typing methods were applied on the genomes. Multi-Locus Sequence Type (ST) determination based on bigsdb Pasteur database (<https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Presence of acquired

antibiotics genes was assessed using resfinder tool (<http://genomicepidemiology.org>). A variant calling was performed, on the genomes of the strains which shared the same ST in our database containing nine ESBL-*Kp* genomes that have been sequenced since the 1st January 2019, using both Burrows-Wheeler Aligner and FreeBayes and the following reference genome ASM393747v1. A Single Nucleotide Polymorphism (SNP) distance matrix was computed. Outbreak cases were defined as a patient hospitalized either on the CT surgery ward or in the CT ICU with a positive sample for ESBL-*Kp* which belonged to the same ST and displayed less than 10 SNP of divergence. All the sequenced genomes are available on the following Bioproject (PRJNA811107).

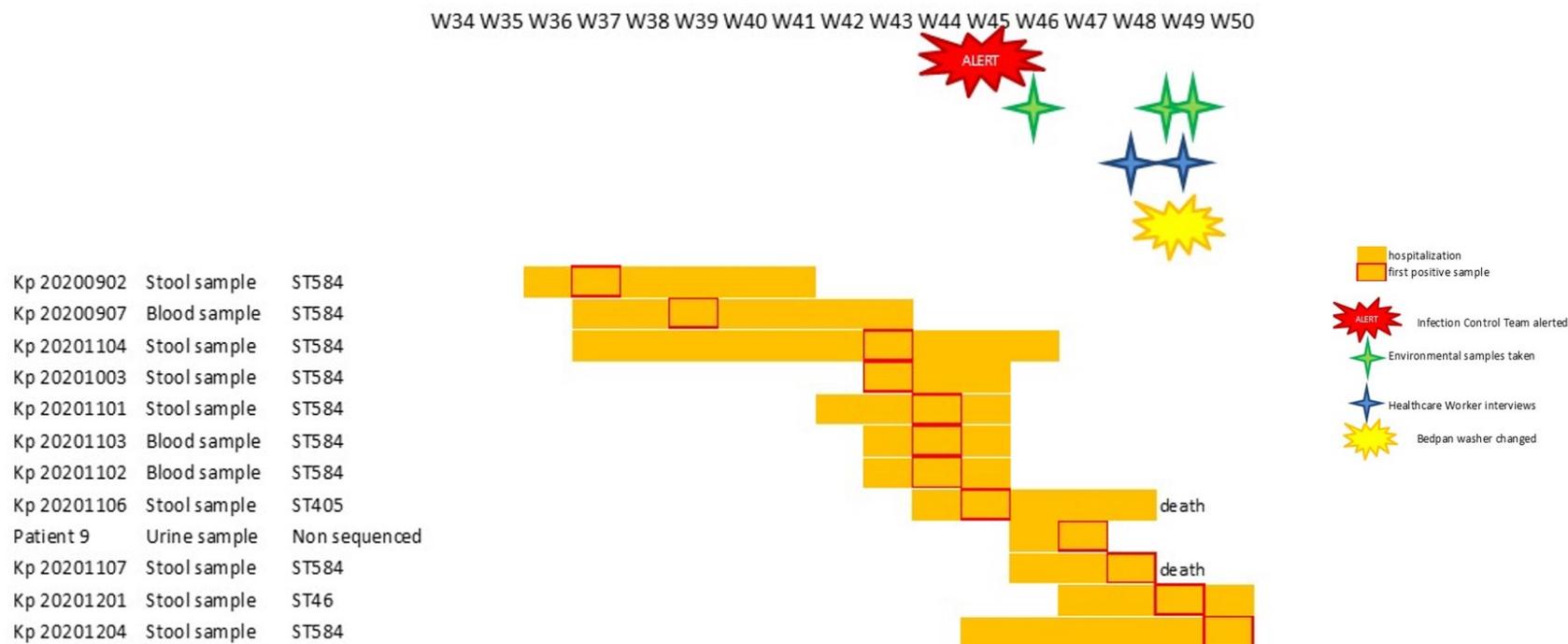
## Results

### *Description of outbreak*

Between 1<sup>st</sup> September 2020 and 2<sup>nd</sup> November 2020, eight cases of ESBL-producing *Kp* were recorded on the two wards, leading to the initial alert on the 2<sup>nd</sup> of November 2020. Four more patients were tested positive between the 3<sup>rd</sup> of November 2020 and the 6<sup>th</sup> of December 2020. A total of 12 patients either carried (n=8) or were infected (n=4) by an ESBL-*Kp* (Figure 1). Nine of the eleven strains sequenced belonged to the same ST584 while the two remaining ones belonged to other *Kp* populations, ST46 and ST405 respectively (Figure I). The ST584 strains harbored the same resistome: *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *aph*(3'')-Ib and *aph*(6)-Id, *sul2* and *dfrA14*, *tet*(A), *qnrB1*, conferring resistance to penicillins, third-generation cephalosporins, aminoglycosides, co-trimoxazole, tetracycline and decreased susceptibility to quinolones, respectively. This resistance was confirmed by disk-diffusion method according to the guidelines. Variant calling analyses revealed that the maximum genomic distance between the strains was 9 SNP, suggesting the dissemination of a unique epidemic strain during a four-month period in two unique but linked wards. Furthermore, no other ESBL-producing ST584 *Kp* have been isolated from ICU patients in our hospital since 2019.

Alongside patient sample analysis, 35 environmental samples were taken from medical devices (patient armchairs, patient lifts, ultrasound probes, ECG machines), 10 from surfaces such as computer keyboards, 8 from liquids (hand soap, ultrasound gel etc.), as well as 16 samples from sink drain traps on the wards. All samples were analyzed for microbiology using conventional culture procedures. Of these 69 samples, none were positive for Enterobacteriaceae. Moreover, interviews of personnel did not identify any errors in hygiene practice such as hand hygiene, hygiene and maintenance of shared medical equipment and correct use of PPE. A dysfunctional bedpan washer was present on the CT ICU and was highly suspected as a reservoir as no further strain of ESBL-*Kp* ST584 appeared after it was it was changed at the end of November 2020; however, no samples were taken from it before its removal. As genomic typing routine did not reveal any additional ESBL-E belonging to this epidemic strain in all of the ICUs in the establishment since December 2020, this led to two conclusions: (i) the bedpan washer was probably the source of the outbreak, (ii) the *Kp* ST584 outbreak could be considered resolved.

**Figure 1:** Chronological description of the ESBL-Kp epidemic in 2020 in Caen University teaching hospital, France



*Chronological description of the ESBL-Kp outbreak in 2020 on two ICU in Caen University Hospital, Caen, France. Twelve outbreak-related cases of ESBL-Kp were identified from September 1<sup>st</sup> 2020 and December 6<sup>th</sup> 2020. The provenance of the first positive ESBL-Kp sample is described (stool, blood or urine), as well as the Sequence Type (ST) for each case. The urine sample for Patient 9 was no longer cultivable and was not analysed. Two of the twelve affected patients (Kp 20201106 and Kp 20201107) died in the hospital of non-infectious causes. The length of hospitalization for each case is represented (orange shading), with the week of their first positive ESBL-Kp sample outlined in red. Information on the dates of interventions by the Infection Control Team are presented on the figure, with the initial alert given on the 2<sup>nd</sup> November 2020, environmental samples performed on week 46, 48 and 49, HCW interviews on week 48 and 49 and change of the defective bedpan washer week 49.*

## **Discussion and conclusion**

To our knowledge, this outbreak is the first nosocomial transmission of the ESBL-*Kp* ST584 strain described. This rare bacterial population has been found in wild boars in Algeria, which also produced the CTX-M-15 enzyme, but no reports of infection or colonization in humans have been published so far.<sup>10</sup> None of the environmental samples were positive for Enterobacteriaceae. However, the implication of the bedpan washer in the episode is clearly suspected. The dynamic of the outbreak is still unknown, it could be direct transmission from the potential environmental reservoirs to patients, or cross-transmission from HCWs to patients or lastly an association of these mechanisms.

Thanks to the systematic prospective genomic program in place since 2019, the ICT were able to confirm the authenticity of the outbreak as well as the end of the episode in December 2020 with no additional *Kp* ST584 strains found. WGS provides the ability to rapidly identify cases, control outbreaks and identify new strains of MDR Enterobacteriaceae. This active surveillance system appears to be essential in the battle against antibiotic resistance and human cross transmissions.

## **Consent**

All patients were treated according to clinical judgement and infection control practices to treat them and control the outbreak according to local guidelines. Patients did not undergo randomization or intervention for the purpose of this report. Data has been analyzed and presented anonymously.

## **Conflict of interest statement**

All authors: no reported conflicts.

## **Funding sources**

None.

## **Acknowledgements**

We thank Annie Lemarié, Céline Bazin, Valérie Moreno and Florence Souplet for their excellent technical assistance work, and all the administration and infection control staff, as well as all the ICU staff members for their support during the investigation.

## References

1. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(4):589–603.
2. Podschun R, Pietsch S, Höller C, Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(7):3325–7.
3. Struve C, Krogfelt KA. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environ Microbiol* 2004;6(6):584–90.
4. Chong Y, Shimoda S, Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol* 2018 Jul;61:185–8.
5. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8:4.
6. Peña C, Pujol M, Ricart A, Ardanuy C, Ayats J, Liñares J, et al. Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. *J Hosp Infect*;35(1):9–16.
7. Tofteland S, Naseer U, Lislevand JH, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. A Long-Term Low-Frequency Hospital Outbreak of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Involving Intergenous Plasmid Diffusion and a Persisting Environmental Reservoir. *PLoS One* 2013;8(3):e59015.
8. Kaiser T, Finstermeier K, Häntzsch M, Fauchaux S, Kaase M, Eckmanns T, et al. Stalking a lethal superbug by whole-genome sequencing and phylogenetics: Influence on unraveling a major hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Am J Infect Control* 2018;46(1):54–
9. Société Française d'Hygiène Hospitalière. Prévention de la transmission croisée : Précautions complémentaires contact Available from: <https://www.sf2h.net/publications/prevention-de-transmission-croisee-precautions-complementaires-contact>
10. Bachiri T, Bakour S, Ladjouzi R, Thongpan L, Rolain JM, Touati A. High rates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in wild boars and Barbary macaques in Algeria. *J Glob Antimicrob Resist* 2017;8:35–40.

## 2.3 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

### 2.3.1 *ramR* Deletion in an *Enterobacter hormaechei* Isolate as a Consequence of Therapeutic Failure of Key Antibiotics in a Long-Term Hospitalized Patient

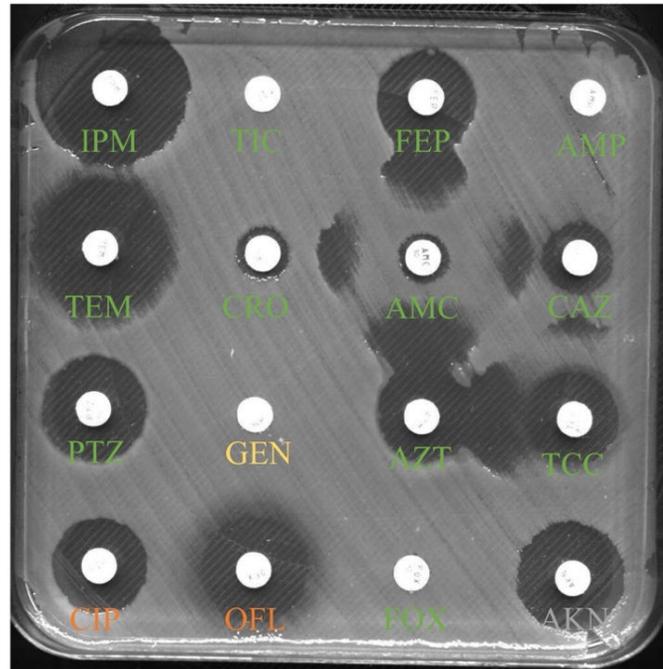
L'article *ramR* Deletion in an *Enterobacter hormaechei* Isolate as a Consequence of Therapeutic Failure of Key Antibiotics in a Long-Term Hospitalized Patient a été publié en octobre 2020 dans la revue *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Impact Factor 5.9).

En janvier 2018, un patient a été admis dans le service de réanimation chirurgicale du CHU de Caen dans les suites d'une chirurgie vasculaire. Il va malheureusement rapidement présenter différentes complications septiques dont il va décéder après quatre mois de prise en charge. Son histoire infectieuse est marquée par la succession d'infections profondes causées alternativement par *Enterobacter hormaechei* et *Staphylococcus epidermidis*, pour lesquelles douze molécules antibiotiques auront été administrées. Après deux mois et demi d'hospitalisation, les souches de *E. hormaechei* sont devenues plus résistantes aux antibiotiques ; initialement productrices de BLSE, les derniers antibiogrammes étaient proches de la pan-résistance. Ce travail avait pour objet d'expliquer les modifications phénotypiques observées : switch populationnel ? évolution *in vivo* d'une même souche qui se serait adaptée sous une très importante pression de sélection antibiotique ?

La réalisation de CMI vis-à-vis d'un large panel d'antibiotiques représentant différentes familles, a retrouvé des résistances plus marquées pour les  $\beta$ -lactamines (temocilline, céfépime, ertapénème), les fluoroquinolones, la tigécycline, le chloramphénicol ainsi que la chlorhexidine. A noter cependant que les augmentations de CMI étaient variables, les plus fortes variations étaient retrouvées pour la ciprofloxacine (fold change 8), la tigécycline (fold change 4) et le chloramphénicol (fold change 4). L'ajout de 40 mg/L de Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide (PABN) dans le milieu engendrait une diminution des CMI suggérant une implication des pompes Resistance-Nodulation-cell Division (RND) dans les phénomènes observés.

Les premières analyses de typage *in silico* ont révélé que les six souches de *Enterobacter* appartenaient à l'espèce *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* au cluster 6 selon Hoffman et au ST66. La distance génomique maximale entre les six génomes était de neuf SNP.

A



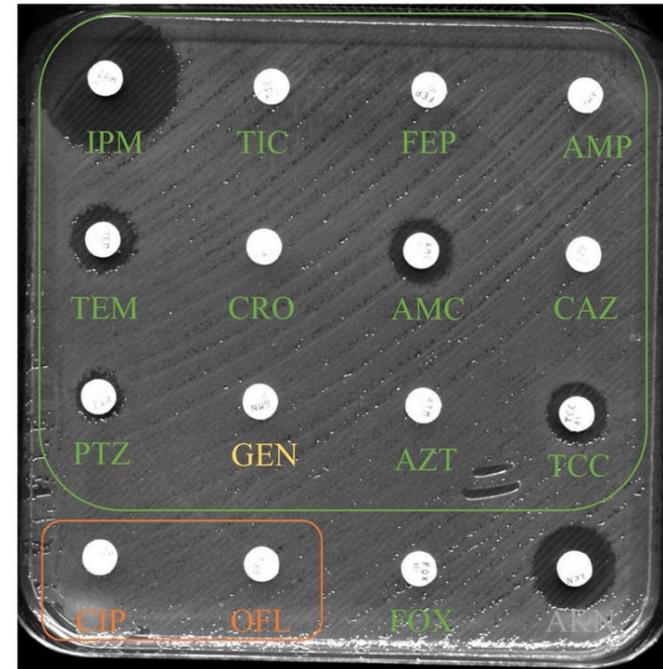
Diminution de  
l'efficacité des  
B-lactamines

Perte d'activité des  
fluoroquinolones

IPM: Imipénème, TIC: Ticarcilline, FEP: Céfépime, AMP: Ampicilline, TEM: Témocilline, CRO: Ceftriaxone, AMC: Amoxicilline + acide clavulanique, CAZ: Ceftazidime, PTZ: Pipéracilline + tazobactam, ERT: Ertapénème, AZT: Aztréonam, TCC: Ticarcilline + acide clavulanique, CIP: Ciprofloxacine, OFL: Ofloxacine, AKN: Amikacine, SXT: Cotrimoxazole, FOS: Fosfomycine, CXN: Cefalexine, FIX: Cefixime, FUR: Nitrofurantoïnes, GEN: Gentamicine

Février 2018 – Selles

B



Mars 2018 – Hémoculture

Figure 16 : Antibiogrammes en diffusion illustrant l'évolution phénotypique de d'une souche clinique de *Enterobacter hormaechei*

Figure 16 – A : phénotype initiale de la souche isolée d'un prélèvement de selles. Souche productrice de BLSE, diminution du diamètre des fluoroquinolones par la production du QnrB1

Figure 16 – B : phénotype proche de la toto-résistance, seuls l'imipénème et l'amikacine conservent une activité.

Toutes ces informations concouraient à l'hypothèse d'une adaptation longitudinale d'une souche unique.

Le résistome retrouvé chez ces six souches était (i) identique : *bla*<sub>CTX-M15</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *aac*(3)-IIa, *aac*(6')-Ib-cr, *aph*(3'')-Ib, *aph*(6)-Id, *sul2*, *dfrA14*, and *qnrB1*, et (ii) n'a pas évolué au cours du temps. Aucune information d'intérêt n'a été retrouvée après recherche de mutations au sein d'une collection de gènes décrits comme impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez les *E. hormaechei*. En revanche, l'étude de la localisation des variants entre les souches initiales et celles hyper-résistantes a mis en évidence une délétion des seize premiers nucléotides de l'extrémité 3' du gène *ramR*, entraînant un décalage du cadre de lecture et la perte des 69 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de la protéine. RamR est un inhibiteur transcriptionnel appartenant à la famille des Tet(R). Son rôle est de contrôler l'expression du gène *ramA* qui appartient à la famille des *AraC/XylS transcriptional activator*. Fonctionnellement, RamR est divisé en deux domaines ; l'extrémité N-terminale constitue le domaine de liaison à l'ADN, tandis que l'extrémité C-terminale permet la liaison aux substrats et la dimérisation de la protéine. RamR ne pouvant plus se lier à l'ADN, ne contrôle plus l'expression de *ramA* qui devient hyper transcrit. RamA est un régulateur pléiotrope ; il régule notamment l'expression des gènes codant pour la pompe d'efflux RND AcrAB-TolC et la porine OmpF (via l'ARN antisens micF). Le phénotype de résistance croisée observé chez les souches pan-résistantes peut donc trouver son explication mécanistique dans l'altération de *ramR*.

Une approche transcriptomique basée sur la *quantitative reverse transcription* PCR (qRT-PCR) a démontré que les gènes *ramR* et *ramA* étaient hyper exprimés, ce qui avait pour conséquence une augmentation de la transcription de *acrA*, *acrB*, *tolC*, *micF* ainsi qu'une sous expression de *ompF*. Par ailleurs, il n'y avait pas de modification d'expression de l'opéron *marAR*, également connu pour contrôler sur les pompes RND ; ni de modification d'expression des gènes de résistance acquis tels que *bla*<sub>CTX-M-15</sub> et *aac*(6')-Ib-cr ou encore de l'*ampC* chromosomique.

Par la suite, une délétion complète du gène *ramR* a été réalisée au sein de la souche de référence *E. cloacae* ATCC 13047. Les CMI's obtenues chez la souche mutante étaient comparables à celles observées pour les souches pan-résistantes. Enfin, un gène *ramR* fonctionnel a été inséré avec son promoteur dans le plasmide pBAD202. Ce plasmide a été utilisé pour compléter une souche clinique pan-résistante et le mutant  $\Delta ramR$  ATCC 13047. L'ajout du gène *ramR* fonctionnel au

sein de ces deux souches s'est associé à la disparition du phénotype de résistance croisée et à l'obtention des CMI's identiques aux souches initiales.

Cette publication est la première description des conséquences de l'altération de l'opéron *ramAR* au sein d'une souche d'*E. hormaechei*. De plus, ce travail s'inscrit dans le suivi longitudinal d'un patient issu d'un service à très forte charge en soins ; il s'agit donc de la mise en évidence de la sélection *in vivo* d'un mutant résistant. Grace aux analyses génomiques, il a été possible (i) de mettre en évidence la persistance de la même souche tout au cours de l'hospitalisation (ii) de démontrer la non-évolution temporelle du résistome et des principaux gènes connus chez *E. cloacae* complexe comme impliqués dans la résistance aux antibiotiques (iii) de réaliser une analyse sans *a priori* basée sur les résultats des *variants calling* à partir de laquelle la mutation de *ramR* a été détectée (iv) de démontrer l'absence d'autres mutations d'intérêt entre les souches initiales et les souches pan-résistantes. Par la suite, les données phénotypiques, de transcriptomiques et de mutagenèse ont donné tout leur sens biologique aux informations issues du séquençage.

Il existe de nombreuses descriptions bibliographiques du rôle de l'opéron *ramAR* dans l'antibiorésistance chez les Entérobactérales. Les mutations décrites sont nombreuses et variées, pouvant toucher *ramR* mais aussi la région intergénique entre *ramR* et *ramA*. Les antécédents de traitements antibiotiques, dont les fluoroquinolones, sont un facteur de risque de mutations au sein de l'opéron *ramAR*. Aussi, au regard de la multiplicité des mutations retrouvées, de l'association avec les antécédents de traitements antibiotiques et des conséquences phénotypiques observées, l'opéron *ramAR* apparaît comme un facteur important de l'adaptation bactérienne.

Pour donner suite à ce travail, différents travaux de recherche sont menés au sein de notre unité de recherche :

- Une étude basée sur le suivi longitudinal des *K. pneumoniae* isolées parmi les patients hospitalisés au sein des services de réanimation du CHU de Caen (M2 recherche poursuivi en thèse de science).
- Étude transcriptomique du régulon *ramR* au sein de souches de *Enterobacter cloacae* complexe (Master 2 recherche).
- Étude de la prévalence des mutations de l'opéron *ramAR* associées au phénotype de résistance croisée parmi des souches d'Entérobactérales productrices de BLSE (sujet de ce doctorat)



## *ramR* Deletion in an *Enterobacter hormaechei* Isolate as a Consequence of Therapeutic Failure of Key Antibiotics in a Long-Term Hospitalized Patient

François Gravey,<sup>a</sup> Vincent Cattoir,<sup>b,c</sup> Frédéric Ethuin,<sup>d</sup> Laetitia Fabre,<sup>e</sup> Racha Beyrouthy,<sup>f</sup> Richard Bonnet,<sup>f</sup> Simon Le Hello,<sup>a,g</sup> François Guérin<sup>a,h</sup>

<sup>a</sup>Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (GRAM 2.0), Normandie Université, UNICAEN, UNIROUEN, Caen, France

<sup>b</sup>Department of Clinical Microbiology, Rennes University Hospital, Rennes, France

<sup>c</sup>Inserm U1230, University of Rennes 1, Rennes, France

<sup>d</sup>Caen University Hospital, Surgical Intensive Care Unit, Caen, France

<sup>e</sup>Institut Pasteur, Bacterial Pathogen Enteric Unit, Paris, France

<sup>f</sup>Department of Clinical Microbiology, Clermont-Ferrand University Hospital, Clermont-Ferrand, France

<sup>g</sup>Department of Hospital Hygiene, Caen University Hospital, Caen, France

<sup>h</sup>Department of Clinical Microbiology, Caen University Hospital, Caen, France

Simon Le Hello and François Guérin contributed equally to the coordinating work.

**ABSTRACT** Genome changes are central to the adaptation of bacteria, especially under antibiotic pressure. The aim of this study was to report phenotypic and genomic adaptations undergone by an *Enterobacter hormaechei* clinical strain that became highly resistant to key antimicrobials during a 4-month period in a patient hospitalized in an intensive care unit (ICU). All six clinical *E. hormaechei* strains isolated in one ICU-hospitalized patient have been studied. MICs regarding 17 antimicrobial molecules have been measured. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were determined on the sequenced genomes. The expression of genes involved in antibiotic resistance among *Enterobacter cloacae* complex strains were determined by reverse transcription-quantitative PCR (qRT-PCR). All the strains belonged to sequence type 66 and were distant by a maximum of nine SNPs. After 3 months of hospitalization, three strains presented a significant increase in MICs for ceftazidime, cefepime, temocillin, ertapenem, tigecycline, ciprofloxacin, and chloramphenicol. Those resistant strains did not acquire additional antibiotic resistance genes but harbored a 16-bp deletion in the *ramR* gene. This deletion led to upregulated expression of RamA, AcrA, AcrB, and TolC and downregulated expression of OmpF. The  $\Delta ramR$  mutant harbored the same phenotype as the resistant clinical strains regarding tigecycline, chloramphenicol, and ciprofloxacin. The increased expression of RamA due to partial deletion in the *ramR* gene led to a cross-resistance phenotype by an increase of antibiotic efflux through the AcrAB-TolC pump and a decrease of antibiotic permeability by porin OmpF. *ramR* appears to be an important adaptative trait for *E. hormaechei* strains.

**KEYWORDS** *Enterobacter cloacae* complex, *ramR*, tigecycline, fluoroquinolone, chloramphenicol, whole-genome sequencing, RND efflux pumps, OmpF

Members of the *Enterobacter cloacae* complex (ECC) are major opportunistic pathogens, especially in patients hospitalized in intensive care units (ICUs). Within this complex, three clusters (C3, C6, and C8) that all correspond to *Enterobacter hormaechei* species are mainly recovered from clinical samples and are responsible for infections and hospital outbreaks (1). Furthermore, many ECC strains have become resistant

Citation Gravey F, Cattoir V, Ethuin F, Fabre L, Beyrouthy R, Bonnet R, Le Hello S, Guérin F. 2020. *ramR* deletion in an *Enterobacter hormaechei* isolate as a consequence of therapeutic failure of key antibiotics in a long-term hospitalized patient. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e00962-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00962-20>.

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to François Guérin, [francois.guerin@chu-rennes.fr](mailto:francois.guerin@chu-rennes.fr).

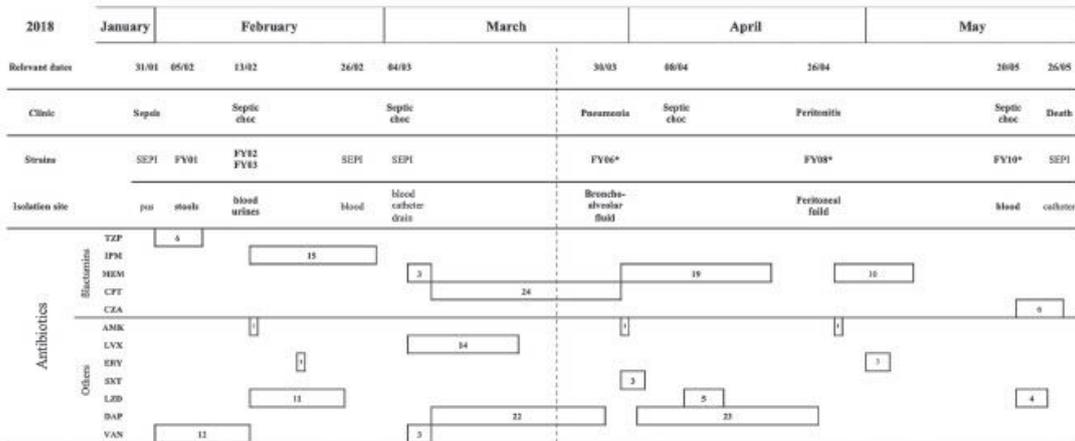
Received 12 May 2020

Returned for modification 2 June 2020

Accepted 22 July 2020

Accepted manuscript posted online 10 August 2020

Published 21 September 2020



**FIG 1** Timeline of patient's hospitalization. Infectious clinical history, bacterial strains isolated, and antibiotic treatments are presented. For each antibiotic treatment, the duration (in days) is indicated. The dotted line represents the apparition of the 16-bp deletion in *ramR* among the *E. hormaechei* clinical strains. SEPI, *Staphylococcus epidermidis*; FV, *E. hormaechei* clinical strains; TZP, piperacillin-tazobactam; IPM, imipenem; MEM, meropenem; CPT, ceftaroline; CZA, ceftazidime-avibactam; AMK, amikacin; LVX, levofloxacin; ERY, erythromycin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; LZD, linezolid; DAP, daptomycin; VAN, vancomycin. \*, *E. hormaechei* clinical strains with a cross-resistance phenotype.

to broad-spectrum cephalosporins by the overproduction of chromosomal cephalosporinase (AmpC) and/or by acquisition of genes coding for extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). Even more alarming is the emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE), which has increased the focus on ECC strains. In addition, multidrug efflux pumps (especially those belonging to the resistance-nodulation-cell division [RND] family) and decreased membrane permeability (due to modifications in porin concentration) play a major role in the resistance of Gram-negative bacteria to a wide range of antibiotics (2–6). Moreover, genes involved in the regulation of efflux pumps and porin expression can also contribute to the adaptation of strains to their environment and their avoidance of the host immune system (7, 8). Among these regulator genes, the *ramAR* locus belongs to the AraC/XylS transcriptional activator family (9). RamA adjusts the membrane permeability by modulating the concentrations of the efflux pump AcrAB-TolC as well as the porin OmpF (10). The expression of RamA is negatively controlled by RamR. Among several *Enterobacteriaceae* species, it has been described that mutations in *ramR* drive an overexpression of RamA, which leads to a cross-resistance phenotype with an increase of MICs for  $\beta$ -lactams, fluoroquinolones, tigecycline, and chloramphenicol (11–13). Here, we present how an *E. hormaechei* strain evolved rapidly *in vivo* under multiple-antibiotic treatment administered in one patient.

In January 2018, a 75-year-old man was admitted to a surgical ICU after vascular surgery. The patient quickly developed several septic complications, such as bacteremia, nosocomial pneumonia, and peritonitis caused alternatively by *E. hormaechei* and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains, for which he received an escalation of 12 different antimicrobial agents (piperacillin-tazobactam, imipenem, meropenem, ceftazidime-avibactam, amikacin, co-trimoxazole, vancomycin, linezolid, daptomycin, erythromycin, ceftaroline, and levofloxacin) until he died of septic shock 4 months after his admission (Fig. 1). During his hospitalization, six *E. hormaechei* strains were isolated from stool, blood culture, and urine samples and bronchoalveolar and peritoneal fluids. Initially, the strains exhibited an ESBL phenotype and then became resistant to almost all antibiotics tested. The aim of this study was to decipher the phenotypic and genomic evolution of these strains, which acquired a multidrug resistance (MDR) phenotype *in vivo*.

TABLE 1 MICs of the studied strains

Strain	MIC (mg/liter) [FC] <sup>a</sup>																
	PTZ	TEM	CAZ	CTX	FEP	AZT	ETP	MER	IMP	AMK	GEN	CIP	CHL	TIG	CS	CHX	CTAB
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	8	4	1	1	0.06	0.5	0.25	0.125	0.25	1	0.5	0.016	4	0.25	>256	2	32
13047 ΔECL_RS15545 (ramR)	16	8	1	2	0.125	1	0.5	0.125	0.5	1	0.5	<b>0.06 (4)</b>	<b>16 (4)</b>	<b>2 (8)</b>	>256	4	32
13047_pBAD202	8	4	1	1	0.06	1	0.25	0.125	0.25	1	0.5	0.016	4	0.25	>256	2	32
13047_pBAD202ΔECL_RS15545	8	4	1	1	0.06	1	0.25	0.125	0.25	1	0.5	0.016	2	0.25	>256	2	32
13047 ΔECL_RS15545_pBAD202	16	8	1	2	0.125	1	0.5	0.125	0.5	1	0.5	<b>0.06 (4)</b>	<b>16 (4)</b>	<b>2 (8)</b>	>256	4	32
13047 ΔECL_RS15545_pBAD202 ΔFY08_ramR <sup>b</sup>	16	8	1	2	0.125	1	0.5	0.125	0.5	1	0.5	<b>0.06 (4)</b>	<b>16 (4)</b>	<b>2 (8)</b>	>256	4	32
FY01	64	4	32	256	16	32	0.25	0.125	0.5	2	32	2	8	0.5	0.125	16	32
FY02	64	8	32	256	32	64	0.25	0.125	0.5	2	32	2	4	0.25	0.125	16	32
FY03	64	4	64	128	32	64	0.25	0.125	0.5	2	32	2	4	0.25	0.25	16	32
FY06 <sup>c</sup>	64	<b>16 (4)</b>	128	256	<b>64 (4)</b>	64	0.5	0.125	0.5	2	<b>32</b>	<b>32 (16)</b>	<b>32 (8)</b>	<b>2 (8)</b>	0.125	32	32
FY08 <sup>c</sup>	64	<b>16 (4)</b>	64	256	<b>64 (4)</b>	64	0.5	0.125	0.5	4	<b>64</b>	<b>32 (16)</b>	<b>32 (8)</b>	<b>2 (8)</b>	0.125	32	32
FY10 <sup>c</sup>	128	<b>16 (4)</b>	64	256	<b>64 (4)</b>	64	0.5	0.125	0.5	4	<b>64</b>	<b>32 (16)</b>	<b>32 (8)</b>	<b>2 (8)</b>	0.125	32	32
FY01_pBAD202	32	4	32	128	16	64	0.25	0.125	0.5	2	32	2	4	0.5	0.125	16	32
FY01_pBAD202ΔECL_RS15545	32	4	16	128	16	32	0.25	0.125	0.5	2	32	2	4	0.5	0.125	16	32
FY10_pBAD202	128	16	64	256	64	64	0.5	0.125	1	2	64	32	16	2	0.125	32	32
FY10_pBAD202ΔECL_RS15545	32	4 (-4)	32	128	16 (-4)	32	0.25	0.125	0.5	2	32	2 (-16)	4 (-4)	0.5 (-4)	0.125	16	32
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047+PaβN <sup>d</sup>	4				0.06							0.016	2	0.25			
13047 ΔECL_RS15545 (ramR)+PaβN <sup>d</sup>	8				0.125							0.03	2 (-8)	0.25 (-8)			
FY01+PaβN <sup>d</sup>	16				64							2	2	0.25			
FY10+PaβN <sup>d</sup>	16				64							4 (-8)	2 (-16)	0.5 (-4)			

<sup>a</sup> PTZ, piperacillin-tazobactam; TEM, temocillin; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; FEP, cefepime; AZT, aztreonam; ETP, ertapenem; MER, meropenem; IMP, imipenem; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; CIP, ciprofloxacin; CHL, chloramphenicol; TIG, tigecycline; CS, colistin; CHX, chlorhexidine; CTAB, cetyl trimethyl ammonium chloride. Numbers in boldface are MICs which significantly evolved: fold changes  $\geq 4$  or  $\leq -4$ .

<sup>b</sup> Truncated ramR.

<sup>c</sup> Strain with ECL\_RS15545 truncated gene.

<sup>d</sup> PaβN (Phe-Arg-β-naphthylamide) used at a concentration of 40 mg/liter.

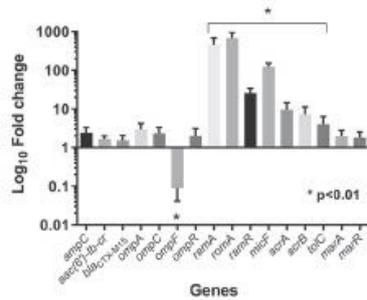
## RESULTS

**Antibiotic and antiseptic susceptibilities.** Comparison of antibiotic susceptibility profiles showed two distinct groups: strains FY01 to FY03 (group I) were susceptible to chloramphenicol (CHL) and tigecycline (TIG) (MICs of 4 and 0.25 mg/liter, respectively), whereas FY06 to FY10 (group II) were resistant (MICs of 32 and 2 mg/liter, respectively) (Table 1). In addition, significant differences in MICs between the two groups of isolates were observed for ciprofloxacin (CIP; MICs increased from 2 to 32 mg/liter [16-fold]) (Table 1). Lower changes were noted for some β-lactams, such as temocillin (TEM; 4-fold), piperacillin-tazobactam (PTZ; 2-fold), cefepime (FEP; 2-fold), and ertapenem (ETP; 2-fold) (Table 1). Regarding antiseptic testing, reduced susceptibility to chlorhexidine (CHX; MIC, 16 mg/liter) was observed for all the clinical strains in comparison to the reference strain (ATCC 13047; MIC, 2 mg/liter). Group II strains showed a 2-fold increase in MIC to CHX (32 mg/liter) compared to that for group I strains (Table 1).

**In silico typing.** The six strains were identified *in silico* as *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis*; they all belonged to sequence type (ST) 66 and the C6 Hoffman cluster. Whole-genome sequencing (WGS) analyses confirmed that these six strains (isolated from a unique clinical specimen from the same patient) were isogenic, with a maximum of nine-SNP difference between all the strains, and only one SNP was observed between the two groups.

**Antibiotic resistance genetic determinants.** The six strains shared the same resistome: *bla*<sub>CTX-M15</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib-cr*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *sul2*, *dfiA14*, and *qnrB1*. Regarding known point mutation targets, a unique nonsynonymous mutation in GyrB (Phe746Ser) was found among the strains of group II. This mutation was outside the quinolone resistance-determining region (QRDR) of *gyrB* and could not explain the CIP MIC modifications. Moreover, no mutations or insertions/deletions were observed in genes involved in antibiotic resistance (see Table S2 in the supplemental material).

However, by comparing the whole genomes of group I to those of group II, a 16-bp deletion in the LI63\_RS07965 gene coding for a TetR-like transcriptional regulator was observed in group II. This gene is a homologue of the *ramR* gene of *Klebsiella pneumoniae* Ecl8 (59% identical) and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Ken-



**FIG 2** Differences of gene expression between strains FY06 to FY10 (group II) and FY01 to FY03 (group I) represented by a bar chart. Fold changes were calculated using the  $\Delta\Delta C_T$  method using *spoB* as a housekeeping gene. Error bars represent one standard deviation. Statistical analyses have been performed using the Student's *t* test on GraphPad Prism version 8. Significant *P* value was considered lower than 0.05. This figure highlights that partial deletion of *ramR* led to the overexpression of seven genes, *ramR*, *romA*, *romA*, *micF*, *acrA*, *acrB*, and *tolC*, whereas *ompF* was downregulated.

tucky CDC19 (63% identical) and is called *ramR* in this study. This deletion was responsible for a shift in the nucleotide sequence reading frame, leading to a loss of the first 69 N-terminal amino acids (aa) of RamR. Immediately downstream from the *ramR* gene, there is a 1,104-bp gene, *romA*, which encodes a 367-aa metallohydrolase. This gene is similar to the *romA* genes of *K. pneumoniae* (70% identical) and *Citrobacter freundii* (21% identical). Downstream of *romA*, there is *ramA*, a 342-bp gene which encodes a 113-aa protein, RamA, that belongs to the AraC/XylS transcriptional activator family.

**Transcriptional consequences of *ramR* deletions.** The reverse transcription-quantitative PCR (qRT-PCR) experiments evaluated the regulatory consequences of *ramR* alteration by comparing gene expression between group I and group II strains. These experiments highlighted that the loss of the N-terminal portion of RamR among the strains FY06 to FY10 led to the overexpression of *ramR* itself (fold change [FC], 26), *romA* (FC, 680), *ramA* (FC, 453), *micF* (FC, 124), *acrA* (FC, 9), *acrB* (FC, 7), and *tolC* (FC, 4) and reduced expression of *ompF* (FC, 0.08) (Fig. 2). No difference in gene expression has been observed regarding chromosomal *ampC*, *ompA*, or *ompC* as well as another AraC/XylS transcriptional activator, *marA* (Fig. 2). These results suggested that dysregulation of the *ramRA* locus could explain the emergence of a cross-resistance phenotype by modifying membrane permeability by increasing efflux pump expression and decreasing OmpF concentrations.

***Enterobacter cloacae* ATCC 13047 mutant analyses.** To decipher the resistance mechanism in the *E. hormaechei* strains, one mutant of *E. cloacae* ATCC 13047 deleted for the gene ECL\_RS15545 was constructed. Thus, MICs of CHL, TIG, and CIP were determined for the  $\Delta ramR$  (ATCC 13047  $\Delta ECL\_RS15545$ ) strain. *E. cloacae* ATCC 13047 cells in which *ramR* was deleted became significantly more resistant (FC  $\geq 4$ ) to CHL, TIG, and CIP similarly to the clinical strains (FY06 to FY10) harboring a 16-bp deletion in *ramR* (Table 1). Furthermore, the transformation of the ATCC 13047  $\Delta ECL\_RS15545$  with the pBAD202 plasmid containing the *ramR* sequence of FY08 did not allow any restoration of the MICs (Table 1). To further analyze the role of the RamR regulator, two clinical isolates (FY01 and FY10) were transformed with the pBAD202 vector containing *ramR* cloned with its promoter region (Table 1). The MICs of CHL, TIG, and CIP for FY10 complemented strains decreased, reaching the same values as for the FY01 strain (Table 1). Finally, in the presence of Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide (PABN), there was a significant decrease in the MICs of CHL (FC, 8), TIG (FC, 8), and CIP (FC, 4) for the ATCC 13047  $\Delta ECL\_RS15545$  and FY10 strains, suggesting the involvement of RND efflux pumps such as AcrAB-TolC (Table 1).

These results allowed us to hypothesize that the prescription of antibiotics during February and March 2018, such as  $\beta$ -lactams and levofloxacin (Fig. 1), led to the

selection of clinical strains with the *ramR* mutation and overexpression of the RamA-controlled cascade, i.e., the expression of different genes involved in efflux pumps and decreased porin expression (Fig. 2).

## DISCUSSION

This article provides a description of an *in vivo* evolution of a unique *E. hormaechei* clinical strain under important antibiotic pressure by the partial deletion of the 3' end of the *ramR* gene leading to a cross-resistance phenotype. Dysregulation among the *ramRA* locus and the consequences have already been described among several species such as *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *C. freundii*, *Klebsiella aerogenes*, and ECC (9, 11, 12, 14). RamA belongs to the AraC-XylS transcriptional activator family and, like MarA, controls the membrane permeability by regulating both the OmpF porin expression via the antisense RNA *micF* and the efflux pump AcrAB-TolC (10). RamA could be overexpressed by two main mechanisms. First, deletions in a region located upstream of this gene, near by the marbox, could alter RamA self-regulation (11), but there was no alteration in this region among the clinical strains (data not shown). Second, RamA could be overexpressed by the nonfunctionality of RamR (12, 14). RamR is composed of two functional regions: the N-terminal one corresponding to the helix-turn-helix (HTH) domain, which is the DNA binding site, and a second region that is required for substrate recognition and binding (11, 15). In our study, RamR lost its first 69 N-terminal amino acids. As a consequence, RamR could not bind the DNA and could not inhibit RamA expression. To the best of our knowledge, *ramR* mutations conferring antibiotic resistance have not yet been described among *E. hormaechei* strains. However, these events have already been described among *K. pneumoniae*, *S. enterica* serovar Typhimurium, and *K. aerogenes* (11–13) with a variety of mutations, which could allow bacteria to quickly adapt to antibiotic pressure (11). The *E. hormaechei* multiresistant clinical strains may have been selected by  $\beta$ -lactam and fluoroquinolones treatments which were given during February and March (Fig. 1).

Results of the qRT-PCR confirmed that a nonfunctional RamR lead to overexpression RamA, AcrA, AcrB, and TolC and reduced expression of OmpF, as was previously described (15). However, our results suggest that RamA overexpression did not lead to increased MarA expression, contrarily to what has been published for *K. aerogenes* (10). Moreover, it seems the N-terminal deletion of RamR leads to its own overexpression, which has been inconstantly described among *K. aerogenes* clinical and mutant strains (11). Taken together, these results suggest that RamR could contribute to the regulation of its own expression.

The role played by the pump AcrAB-TolC in the increase of the MICs of CHL, TIG, and CIP has been demonstrated by using Pa $\beta$ N (Table 1). Concerning the OmpF downregulation, the MIC of the  $\beta$ -lactam in the ATCC 13047  $\Delta$ ECL\_RS15545 strain did not change as it did among the clinical strains. Indeed, the increase in the MIC of  $\beta$ -lactam is only significant if the reduced expression of OmpF is associated with another mechanism, such as the acquisition of an ESBL enzyme and/or *ampC* derepression, which was not the case in this mutant (16). Nevertheless, the *ramR*-complemented clinical strain FY10 recovered initial MICs, including for  $\beta$ -lactams (Table 1).

Usually, bacterial adaptation is associated with horizontal gene transfer between bacteria in the same microbiota. This work highlighted how a chromosomal mutation in *ramR* could be a response to antibiotic selection pressure. Moreover, it has been described in *K. pneumoniae* that RamA overexpression allows the bacteria to hide from the mouse immune system. Modifications in *ramR* could provide multiple advantages to bacteria and need to be analyzed more among clinical *Enterobacteriaceae*, as it appears to be an important adaptative trait.

**Conclusion.** Host adaptation through gene acquisition, genome degradation (gene inactivation or deletion), or both is central to pathogen evolution. In the present study, we highlighted that (i) the transcriptional regulator RamR of *E. hormaechei* is a repressor of the expression of *ramA* and (ii) the *ramRA* locus appears to be the most potent regulator of the cross-resistance phenotype for *E. hormaechei*.

TABLE 2 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Characteristic(s)	Reference, biosample, or source
<b>Strains</b>		
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	Reference strain	17
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047 ΔECL_RS15545 ( <i>ramR</i> )	Deleted ECL_RS15545	This study
13047_pBAD202	13047 strain carrying pBAD202	This study
13047_pBAD202ΔECL_RS15545	13047 carrying pBAD202/D-TOPOΔECL_RS15545, hyperexpresses <i>ramR</i> with its own promoter	This study
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047 ΔECL_RS15545_pBAD202	Deleted ECL_RS15545 strain carrying pBAD202	This study
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047 ΔECL_RS15545_pBAD202 ΔFY08_ <i>ramR</i> <sup>a</sup>	Deleted ECL_RS15545 strain carrying pBAD202, hyperexpresses <i>ramR</i> with its own promoter	This study
FY01	Clinical isolate (stool) (date 02/05/2018) <sup>b</sup>	SAMN14547852
FY02	Clinical isolate (blood culture) (02/13/2018)	SAMN14548158
FY03	Clinical isolate (urine) (02/13/2018)	SAMN14548159
FY06	Clinical isolate (bronchoalveolar fluid) (03/30/2018)	SAMN14548185
FY08	Clinical isolate (peritoneal liquid) (04/06/2018)	SAMN14548186
FY10	Clinical isolate (blood culture) (05/20/2018)	SAMN14548187
FY01 pBAD202	ECLJO_031 strain carrying pBAD202	This study
FY01 pBAD202ΔECL_RS15545	ECLJO_031 strain carrying pBAD202/D-TOPOΔECL_RS15545, hyperexpresses <i>ramR</i> with its own promoter	This study
FY10 pBAD202	ECLJO_031 strain carrying pBAD202	This study
FY10 pBAD202ΔECL_RS15545	ECLJO_031 strain carrying pBAD202/D-TOPOΔECL_RS15545, hyperexpresses <i>ramR</i> with its own promoter	This study
<b>Plasmids</b>		
pBAD202	General expression vector with arabinose-inducible promoter, Kan <sup>r</sup>	Life Technologies
pKD4	Plasmid containing an FRT-flanked kanamycin cassette, Kan <sup>r</sup>	31
pCP20-Gm	FLP-mediated recombination vector, Gen <sup>r</sup>	32
pKOBEG	Recombination vector, phage λ <i>recYβα</i> operon under the control of the pBAD promoter, Cm <sup>r</sup>	33

<sup>a</sup>*ramR* sequence from FY08.<sup>b</sup>Dates are given as month/day/year.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** During a 4-month period, six *E. hormaechei* strains were recovered from the same patient: one from a rectal swab and five from clinical samples. Details about the chronology of strains isolations and the antibiotic prescriptions are available in Fig. 1. Identification at the species level was performed by using a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry method (Bruker, Germany). The reference strain *E. cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047 (nucleotide accession number NC\_014121.1) was used to create mutants (17). The bacterial strains used in this study are listed in Table 2.

**Antimicrobial agent susceptibility test.** Antimicrobial susceptibility was examined using the microdilution method according to the guidelines recommended by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility (EUCAST; <http://www.eucast.org/>). The antimicrobial agents or combinations tested included piperacillin-tazobactam (PTZ), temocillin (TEM), ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), cefepime (FEP), aztreonam (AZT), ertapenem (ETP), meropenem (MER), imipenem (IMP), amikacin (AMK), gentamicin (GEN), ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol (CHL), tigecycline (TIG), colistin (CS), cetyl trimethyl ammonium chloride (CTAB), and chlorhexidine (CHX). All tests were performed in triplicates. The MICs of CHL, TIG, and CIP were also determined by the broth microdilution method in the presence and absence of Phe-Arg-β-naphthylamide (PAβN) at a concentration of 40 mg/liter.

**DNA sequencing and bioinformatics.** High-throughput whole-genome sequencing (WGS) was carried out on all *E. hormaechei* strains at the Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) from the Pasteur International Bioresources network (PIBNet; Institut Pasteur, Paris, France). DNA extraction was performed using the MagNAPure 96 system (Roche, Germany). Libraries were prepared using the Nextera XT kit (Illumina, USA), and sequencing was performed with the NextSeq 500 system (Illumina, USA), generating 150-bp paired-end reads. Alien Trimmer was used for read trimming and clipping (18). The quality of the filtered fastq files was evaluated using fastqc software (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Finally, genomes were *de novo* assembled using SPAdes v 3.12 software using the recommended kmer sizes for Illumina 150-bp paired reads (-k 21, 33, 55, and 77) (19). The quality of the genome assembly was assessed using Quast software (20). Species of the sequenced bacteria were checked using the NCBI prokaryotic genome annotation pipeline (21). Sequence type (ST) was determined using the multilocus sequence typing (MLST) scheme based on seven housekeeping genes: *dnaA* (chromosomal replication initiator protein DnaA), *fusA* (elongation factor G), *gyrB* (DNA gyrase subunit beta), *leuS* (leucine-tRNA ligase), *pyrG* (CTP synthase), *rplB* (50S ribosomal protein L2), and *rpoB* (DNA-directed RNA polymerase

subunit beta) (22). Clustering, based on the partial sequence of the *hsp60* gene, was determined using the blastn algorithm with the following parameters: identity, 97%; coverage, 100% (23, 24). Acquired antibiotic resistance genes and point mutations were searched in the Center for the Genomic Epidemiology (CGE) using Resfinder and PointFinder databases, respectively (25). The genes described as involved in antibiotic resistance among ECC strains are summarized Text S1 in the supplemental material. All genes were screened for using blastn with the following parameters: identity, 80%; coverage, 80%.

For the read mapping process, the reference genome used was *E. hommaechei* subsp. *oharae* strain 34978 (nucleotide accession number CP012165.1). The reads were aligned using Burrows-Wheeler Aligner (26) version 0.7.17, and variant calling was performed using mpileup (27).

**Construction of the knockout mutants and a multicopy plasmid library containing putative regulator ORFs.** Deletion of the putative TetR regulator (ECL\_RS15545) was performed using the method previously described which employs the Red helper plasmid pKOBEG (28–30). The primers used in the study are reported in Table S1. The TetR regulator (ECL\_RS15545), including its own promoter, was amplified by PCR using the primers listed in Table S1. The amplicon was then TA-cloned into the overexpression plasmid pBAD202 (low-copy-number plasmid: ~20 copies/cell) Directional TOPO (Invitrogen, France). *Escherichia coli* TOP10 cells (Invitrogen, France) carrying pBAD202 recombinants containing correctly oriented inserts were selected on LB plates with 40 mg/liter kanamycin. After purification, a plasmid carrying the *ramR* regulator gene with its own promoter was used to transform the ECC ATCC 13047 strain and clinical isolates (Tables 1 and 2).

**Gene expression by RNA quantification.** Total RNA was extracted from bacterial cells grown to the late exponential phase by using the Direct-Zol RNA miniprep kit (Zymo Research, USA). Residual chromosomal DNA was removed by treating samples using the TURBO DNA-free kit (Life Technologies, France). Samples were quantified using a NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, France). cDNA was synthesized from total RNA (~1 µg) using a QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. Transcript levels of the following genes were determined using primers described in Table S1: *ramR*, *romA*, *ramA*, *micF*, *aaaA*, *acrB*, *tolC*, *marA*, *marR*, *ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompR*, *ampC*, *bla<sub>CTX-M15</sub>*, and *aac(6)-Ib-σ*. Note that the DNA binding sites of the primers used for *ramR* were not affected by the 16-bp deletion. Fold changes were calculated using the comparative cycle threshold ( $\Delta\Delta C_t$ ) method using *rpoB* as a housekeeping gene. Experiments were performed at least three times. Differences of gene expression between strains FY06 to FY10 (group II) and FY01 to FY03 (group I) were evaluated using Student's *t* tests on GraphPad Prism version 8. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant.

**Ethics.** This study has been conducted in compliance with the Helsinki Declaration (ethical principles for medical research involving human subjects) and was conducted in accordance with the guidelines of research board of our teaching hospital. The patient's data were anonymously reported. Because specimens used in this study were part of the routine patient management without any additional sampling, and because the patient's family provided no objection for his samples to be used, this study did not need to be examined by an ethical committee, and patient's informed consent was not required.

**Data availability.** Genomes of this study and information about the strains are described in BioProject PRJNA623478. Genomes used for *ramR*, *romA*, and *ramA* comparison were *Enterobacter hommaechei* subsp. *oharae* strain 34978 (NZ\_CP012165.1), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* strain Ecl8 (HF536482.1), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Kentucky strain CDC191 (ABE101000007.1), and *Citrobacter freundii* strain FDAARGOS\_61 (CP026045.1). Nucleotide sequences of genes described as involved in antibiotic resistance in ECC strains are available in Text S1. The bioinformatics analyses did not depend on homemade algorithms but on publicly available software, which has been described above.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 0.4 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Michel Auzou, Sébastien Galopin, and Mamadou Godet for their excellent technical assistance.

Part of this work was performed on computing resources provided by CRIANN (Normandy, France). The 3-year doctoral contract of François Gravey was funded by a grant from the Normandy Region.

We have no conflicts of interest to declare.

## REFERENCES

- Morand PC, Billoet A, Rottman M, Sivadon-Tardy V, Eyrolle L, Jeanne L, Tazi A, Anract P, Courpied J-P, Poyart C, Dumaine V. 2009. Specific distribution within the *Enterobacter cloacae* complex of strains isolated from infected orthopedic implants. *J Clin Microbiol* 47:2489–2495. <https://doi.org/10.1128/JCM.00290-09>.
- Poole K, Krebses K, McNally C, Neshat S. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* 175:7363–7372. <https://doi.org/10.1128/jb.175.22.7363-7372.1993>.
- Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 28:337–418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>.

4. Guérin F, Lallement C, Isnard C, Dhalluin A, Cattoir V, Giard J-C. 2016. Landscape of resistance-nodulation-cell division (RND)-type efflux pumps in *Enterobacter cloacae* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 60:2373–2382. <https://doi.org/10.1128/AAC.02840-15>.
5. 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. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>.
6. Nikaido H, Rosenberg EY, Foulds J. 1983. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells. *J Bacteriol* 153:232–240. <https://doi.org/10.1128/JB.153.1.232-240.1983>.
7. Zheng J, Tian F, Cui S, Song J, Zhao S, Brown EW, Meng J. 2011. Differential gene expression by RamA in ciprofloxacin-resistant *Salmonella* Typhimurium. *PLoS One* 6:e22161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022161>.
8. Buckley AM, Webber MA, Cooles S, Randall LP, La Ragione RM, Woodward MJ, Piddock LJV. 2006. The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol* 8:847–856. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00671.x>.
9. Majewski P, Gutowska A, Sacha P, Schneiders T, Talalaj M, Majewska P, Zebrowska A, Ojdana D, Wiczorek P, Hauschild T, Kowalczyk O, Niklinski J, Radziwon P, Tryniszewska E. 2020. Expression of AraC/XylS stress response regulators in two distinct carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* ST89 biotypes. *J Antimicrob Chemother* 75:1146–1150. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz569>.
10. Chollet R, Chevalier J, Bollet C, Pages J-M, Davin-Regli A. 2004. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2518–2523. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2518-2523.2004>.
11. Molitor A, James CE, Fanning S, Pagès J-M, Davin-Regli A. 2018. Ram locus is a key regulator to trigger multidrug resistance in *Enterobacter aerogenes*. *J Med Microbiol* 67:148–159. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000667>.
12. Hentschke M, Wolters M, Sobottka I, Rohde H, Aepfelbacher M. 2010. *ramR* mutations in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2720–2723. <https://doi.org/10.1128/AAC.00085-10>.
13. Abouzeed YM, Baucheron S, Cloeckaert A. 2008. *ramR* mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2428–2434. <https://doi.org/10.1128/AAC.00084-08>.
14. Fàbrega A, Ballesté-Delpierre C, Vila J. 2016. Differential impact of *ramRA* mutations on both *ramA* transcription and decreased antimicrobial susceptibility in *Salmonella* Typhimurium. *J Antimicrob Chemother* 71:617–624. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv410>.
15. Yamasaki S, Nikaido E, Nakashima R, Sakurai K, Fujiwara D, Fujii I, Nishino K. 2013. The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with multiple drugs. *Nat Commun* 4:2078. <https://doi.org/10.1038/ncomms3078>.
16. Yang D, Guo Y, Zhang Z. 2009. Combined porin loss and extended spectrum  $\beta$ -lactamase production is associated with an increasing imipenem minimal inhibitory concentration in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains. *Curr Microbiol* 58:366–370. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9364-4>.
17. Ren Y, Ren Y, Zhou Z, Guo X, Li Y, Feng L, Wang L. 2010. Complete genome sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* type strain ATCC 13047. *J Bacteriol* 192:2463–2464. <https://doi.org/10.1128/JB.00067-10>.
18. Criscuolo A, Brisse S. 2013. AlienTrimmer: a tool to quickly and accurately trim off multiple short contaminant sequences from high-throughput sequencing reads. *Genomics* 102:500–506. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2013.07.011>.
19. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
20. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
21. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvermin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. 2016. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res* 44:6614–6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>.
22. Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. 2013. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One* 8:e66358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066358>.
23. Hoffmann H, Roggenkamp A. 2003. Population genetics of the nomenclature *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol* 69:5306–5318. <https://doi.org/10.1128/aem.69.9.5306-5318.2003>.
24. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.
25. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67:2640–2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.
26. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
27. Li H. 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 27:2987–2993. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr509>.
28. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
29. Derbise A, Lesic B, Dacheux D, Ghigo JM, Carniel E. 2003. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38:113–116. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00181-0](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00181-0).
30. Guérin F, Isnard C, Cattoir V, Giard JC. 2015. Complex regulation pathways of AmpC-mediated  $\beta$ -lactam resistance in *Enterobacter cloacae* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7753–7761. <https://doi.org/10.1128/AAC.01729-15>.
31. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
32. Doublet B, Douard G, Targant H, Meunier D, Madec JY, Cloeckaert A. 2008. Antibiotic marker modifications of lambda red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *J Microbiol Methods* 75:359–361. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.06.010>.
33. Chaverche MK, Ghigo JM, d'Enfert C. 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 28:E97. <https://doi.org/10.1093/nar/28.22.e97>.

### ***2.3.2 Mutations within the ramAR Operon are Correlated with Additional Antibiotic Resistance in ESBL Enterobacterales Isolated in Intensive Care Units***

L'article intitulé "*Mutations within the ramAR Operon are Correlated with Additional Antibiotic Resistance in ESBL Enterobacterales Isolated in Intensive Care Units*" est actuellement soumis dans la journal Microbiology Spectrum (Impact Factor 7.1).

La pression antibiotique est un facteur de risque reconnu de sélection de mutations au sein de l'opéron *ramAR* chez les Entérobactérales (Ricci et Piddock 2009). Ces mutations engendrent une surexpression de la pompe RND AcrAB-TolC et sous expression de la porine OmpF ; se traduisant par des résistance vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines, de la tigécycline, de la ciprofloxacine et du chloramphenicol (Ricci et Piddock 2009; Abouzeed, Baucheron, et Cloeckert 2008; Gravey et al. 2020). Les patients hospitalisés dans les services de réanimation sont soumis à de fortes pressions médicamenteuses dont anti-infectieuses. Ce travail s'est intéressé à la prévalence des mutations au sein de l'opéron *ramAR* associées à des phénotypes de résistance au sein d'une population d'Entérobactérales productrices de BLSE isolées au sein de trois services de réanimation pendant trois ans.

Deux approches ont été réalisées. Des études génomiques ont permis de déterminer la diversité des populations bactériennes, leur résistome, mais aussi de travailler sur la diversité génomique et protéique des différents éléments constituant l'opéron *ramAR* ainsi que les autres régulateurs impliqués dans l'expression des pompes RND chez les Entérobactérales. Simultanément, une caractérisation phénotypique des souches a été réalisée avec la détermination des CMI vis-à-vis de douze molécules dont la témocilline, la ciprofloxacine et la tigécycline via la technologie du Sensititre (ThermoFisher scientifique). Pour les souches présentant une résistance vis-à-vis des trois molécules, les CMI au chloramphénicol étaient mesurées. Pour soutenir l'hypothèse de l'implication d'une pompe RND dans les phénotypes observés, les CMI étaient déterminées en présence Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide.

De 2019 à 2021, 476 souches de E-BLSE ont été isolées dont 443 (93%) appartenaient aux espèces *E. coli* (n = 194, 44%), *K. pneumoniae* (n = 122, 28%) et *Ecc* (n = 127, 28%). Trente et une souches étaient résistantes à la fois vis-à-vis de la témocilline, de la tigécycline, de la ciprofloxacine et du

chloramphenicol. Aucune souche de *E. coli* ne présentait le phénotype recherché. Les élévations de CMI observés étaient réversibles par utilisation du PABN.

Les analyses de génomique comparative ont mis en évidence une grande diversité populationnelle (ST) au sein des souches résistantes. Les résistomes ne permettaient pas d'expliquer les phénotypes observés. En revanche, toutes les souches résistantes aux quatre molécules présentaient des mutations au sein de la protéine RamR (*Ecc*, n = 11 et *K. pneumoniae*, n = 10), de la région intergénique *ramAR* (*Ecc*, n = 4 et *K. pneumoniae*, n = 5) et au sein de AcrR (une souche de *K. pneumoniae*). Quelle que soit l'espèce considérée, les mutations dans RamR touchaient trois domaines de la protéine : (i) le domaine Helix-Turn-Helix qui constitue le site de liaison de RamR à l'ADN, (ii) des substitutions d'acides aminés au sein des sites clés de liaison de la protéine avec ses substrats et (iii), des altérations de l'extrémité C-terminale impliquée dans la dimérisation de RamR. Les mutations nucléotidiques observées au sein de la région intergénique *ramAR* modifiaient les motifs reconnus par RamR pour sa liaison avec l'ADN. Ainsi, à l'exception d'une souche, toutes les bactéries résistantes aux quatre antibiotiques présentaient des mutations au sein de l'opéron *ramAR*. Par ailleurs, l'étude des autres régulateurs des pompes RDN tels que *marAR*, *soxSR* a mis en évidence que l'opéron *ramAR* présentait la plus grande diversité génomique faisant de ce dernier un facteur d'adaptation bactérienne.

Différents processus cellulaires sont sous le contrôle de l'opéron *ramAR*. Notamment, *ramAR* intervient dans la synthèse du lipide A. En cas de surexpression de RamA, les propriétés de la membrane bactérienne sont modifiées entraînant une résistance accrue à la phagocytose macrophagique et une plus grande capacité à coloniser les organes comme le poumon et la rate dans des modèles murins (De Majumdar et al. 2015). Par ailleurs, il a été démontré que les souches sur-exprimant la pompe AcrAB-TolC, sous exprimaient le système de réparation de l'ADN MutS, leur conférant un phénotype hyper mutateur (El Meouche et Dunlop 2018). Ainsi, les mutations au sein de l'opéron *ramAR* semblent parfaitement répondre aux besoins de souches évoluant dans un environnement à forte pression de sélection comme les services de réanimation. En effet, les souches sont (i) plus résistantes aux antibiotiques, (ii), plus résistantes à la réponse immunitaire innée, (iii) capables d'invasion d'organes, (iv) peuvent acquérir différentes mutations chromosomiques permettant à la population de s'adapter à différents stress. Au sein de ce travail, plus de 10% des souches de *K. pneumoniae* et de *Ecc* productrices de BLSE présentaient des mutations au sein de l'opéron *ramAR*.

Mutations within the *ramAR* Operon are Correlated with Additional Antibiotic Resistance in ESBL  
*Enterobacteriales* Isolated in Intensive Care Units

François Gravey,<sup>a,b,#</sup> Alice Michel,<sup>b</sup> Bénédicte Langlois,<sup>b</sup> , Gakuba Clément,<sup>c</sup> Damien Du  
Cheyron,<sup>d</sup> Fazilleau Laura,<sup>e</sup> Brossier David,<sup>f</sup> François Guérin,<sup>g</sup> Jean Christophe Giard,<sup>b</sup> Simon Le  
Hello<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Service de Microbiologie, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14033 Caen Cedex, France

<sup>b</sup> Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, Inserm UMR 1311 DYNAMICURE, 14000, Caen, France

<sup>c</sup> Service de Réanimation Chirurgicale, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14033 Caen Cedex, France

<sup>d</sup> Service de Réanimation Médicale, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14033 Caen Cedex, France

<sup>e</sup> Service de Réanimation néonatale, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14033 Caen Cedex, France

<sup>f</sup> Service de Réanimation pédiatrique, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14033 Caen Cedex, France

<sup>g</sup> Service de Bactériologie, CHU de Rennes Pontchaillou, Rennes, Bretagne, France

Running Head: AMR caused by *ramAR* Mutations in EBSL-*Enterobacteriales*

François Gravey and Alice Michel contributed equally to this work.

#Address correspondence to François Gravey [gravey-f@chu-caen.fr](mailto:gravey-f@chu-caen.fr)

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the proportion of additional resistance to temocillin, ciprofloxacin, tigecycline and chloramphenicol that resulted from mutations within the *ramAR* operon in extended-spectrum  $\beta$ -lactamases *Enterobacterales* (ESBL-E) isolated in three ICUs for three years in a French university hospital. Two parallel approaches were performed: (i) the genomes of all the ESBL-E were sequenced, and sequence type, resistome and sequences of the *ramAR* operon and other TetR-associated genes were studied, and (ii) the Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) for temocillin, ciprofloxacin, tigecycline and chloramphenicol were determined. A total of 443 ESBL-E strains were included, including *Escherichia coli* (n=194), *Klebsiella pneumoniae* (n=122) and *Enterobacter cloacae complex* (*Ecc*) (n=127). Thirty-one strains, 16 *K. pneumoniae* and 15 *Ecc*, showed an overresistance phenotype (ORP) defined as being resistant to the four molecules tested in addition to having the ESBL-E phenotype. ORP was reversible by the addition of Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide, suggesting a role for RND pumps in these observations. Mutations associated with ORP were restricted to RamR, the *ramAR* intergenic region (IR) and AcrR. Mutations in RamR consisted of C- or N-terminal deletions, amino acid substitutions inside its DNA-binding domain or within key sites of protein–substrate interactions. The *ramAR* IR showed substitutions in nucleotides involved in the RamR DNA-binding domain. More than 10% of the ESBL-*Ecc* and ESBL-*K. pneumoniae* isolated in the ICUs showed an ORP associated with mutations within RamR or the *ramAR* IR. This diversity of sequences suggested that RamR and the *ramAR* IR represent major factors for bacterial adaptation.

## INTRODUCTION

*Enterobacteriales* are Gram-negative bacteria that tend to develop resistance to many antibiotics commonly used in clinical practices, including last-resort molecules such as carbapenems, colistin, and aminoglycosides, leading to a major public health concern (1, 2). Antimicrobial resistance mechanisms through transferable resistance genes are well known, but chromosomal mutations are also involved in several ways: (i) by changing the target of the antibiotics (3) or (ii) by interfering with cellular pathways such as efflux pump regulation and expression (4). Among *Enterobacteriales*, resistance-nodulation-division (RND) pumps have already been associated with antimicrobial resistance phenotypes, strain fitness and virulence, especially AcrAB-TolC (5, 6). Regulation of this tripartite efflux pump is complex and mainly involves three major transcriptional regulator systems. AcrR is the local repressor that controls the transcription of *acrAB*. The expression of *acrR* is itself regulated by two physically distant operons, *marRAB* and *ramAR*, which also control the expression of *tolC* (6). The *ramAR* operon has been described widely among the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (7), *Enterobacter cloacae* complex (*Ecc*) (4) and *Klebsiella pneumoniae* (8), whereas *marRAB* has been well described in *Escherichia coli* (9). AcrR, RamR and MaR belong to the TetR/AcrR family. These proteins are organized into dimers, and their secondary structures are exclusively composed of alpha helices. They are divided into two functional parts: (i) the N-terminus forms a helix turn helix (HTH) pattern, which is a DNA-binding domain (10), and (ii) the C-terminus of the protein constitutes the protein–substrate interaction interface (10). Both RamR and MarR act as constitutive inhibitors of the expression of *ramA* and *marA* (6), which products belong to the AraC/XylS family (11). RamA and MarA behave as positive transcriptional regulators of many genes, including *acrAB* and *tolC*. Moreover, the *acrAB* transcript can be protected by carbon storage regulator A (CsrA), maximizing the expression of efflux pump-encoding genes (12). CsrA is an RNA-binding protein; it interacts with the 5' extremity of the *acrAB* transcript, which conserves the secondary structure of the RNA, which is protected from the formation of a repressive RNA structure, allowing a correct interaction with the ribosome. Moreover, it has been shown that additional regulatory systems, such as SoxS and Rob, can also recognize the same DNA sequence as RamA and play a role in the transcription of *acrAB-tolC* (6). Mutation within the N-terminal part of RamR among a clinical extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producer *Enterobacter hormaechei* strain led to additional resistance to antibiotics, including four classes of antibiotics, temocillin (TEM), ciprofloxacin

(CIP), tigecycline (TIG) and chloramphenicol (CHL) (4). This overresistance phenotype (ORP) was shown to be related to *acrAB-tolC* overexpression and *ompF* downregulation due to RamR mutation (4). The impact of antimicrobial therapy by quinolones and fluoroquinolones, on selecting AcrAB-TolC-overexpressing bacteria has already been described (13). Patients hospitalized in ICUs are under important selective pressure with the intensive use of antimicrobial and nonantimicrobial molecules and several homeostatic modifications. All these factors can lead to the selection of strains that overexpress their RND pumps. The aim of this study was to identify the proportion of clinical extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacterales* (ESBL-E) that showed an ORP in a collection of more than 400 unique strains isolated in three ICUs in a French university hospital for three years that could be explained by mutations within the *ramAR* operon or other TetR-associated genes.

## RESULTS

### *Diversity of strains and $\beta$ -lactamase descriptions*

A total of 476 ESBL-E were isolated in the three ICUs between 2019 and 2021. Ninety-three percent (n=443) belong to *E. coli*, *K. pneumoniae* or *Ecc* species and were included in this study. Strains came from the surgical ICU (n=245, 55%), medical ICU (n=178, 40%) and neonatology unit (n=20, 4%) (Supplementary Table 1). Eighty-two percent of the strains (n=364) came from rectal swab samples, 5% from urine samples (14) and 3% from blood cultures (15) (Supplementary Table 1). The species distribution was *Escherichia coli* (n=194, 44%), *Klebsiella pneumoniae* (n=122, 28%) and *Enterobacter cloacae* complex (n=127, 28%). Among the *Ecc* strains, the predominant species was *Enterobacter hormaechei* (n=113), followed by *Enterobacter cloacae* (n=10) and *Enterobacter kobei* (n=2) (Supplementary Table 1). There was an important diversity within the species studied. Indeed, 69 unique sequence types (STs) were found among the *E. coli* strains. ST131 was the most frequent ST (n=59, 30%), followed by ST38 (n=10, 5%) and ST69 (n=9, 5%). The numbers of unique STs were less important for *K. pneumoniae* (n=27) and *Ecc* (n=16). The main STs found among *K. pneumoniae* strains were ST405 (n=50, 41%), ST548 (n=14, 11%) and ST307 (n=11, 9%), whereas for *Ecc* strains, the predominant STs were ST66 (n=67, 53%), ST78 (n=11, 9%) and ST145 (n=9, 7%) (Supplementary Table 1). Regardless of the species, the major ESBL enzyme found was *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (n=307, 70%), followed by *bla*<sub>CTX-M-27</sub> (n=34, 8%) and *bla*<sub>SHV-12</sub> (n=7%). Some enzymes were significantly more associated with some species, such as *bla*<sub>CTX-M-27</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-55</sub> with *E. coli* ( $P < 0.001$ ), *bla*<sub>SHV-12</sub> with *Ecc* ( $P < 0.001$ ) and *bla*<sub>SHV-2</sub> with *K. pneumoniae* ( $P < 0.001$ ) (Supplementary Table 1). All these data demonstrated an important populational and mechanistic diversity among the strains studied.

### *Minimum inhibitory concentration (MIC) determination and impact of Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide*

A total of 35 strains, *K. pneumoniae* (n=19) and *E. hormaechei* (n=16), showed resistance to CIP, TEM and TIG according to the results obtained with the Sensititre system. The MICs of the 443 strains are available in Supplementary Table 1. Interestingly, no strain of *E. coli* showed an ORP. Determined by the broth microdilution method, the MICs of CHL revealed that 15 out of 16 *E. hormaechei* and 16 out of 19 *K. pneumoniae* strains were also resistant to this antibiotic (Table 1).

**TABLE 1** Origins, sequence types, resistomes and minimum inhibitory concentrations with or without 20 mg/L of pABN for temocillin, ciprofloxacin, tigecycline and chloramphenicol in the 31 resistant strains

Species	Study name	Origin	ST	Acquired beta-lactamase	Temocillin <sup>a</sup>	Fluoroquinolones AG + QRDR mutations	Ciprofloxacin <sup>a</sup> (+pABN)	Tigecycline AG	Tigecycline <sup>a</sup> (+ pABN)	Chloramphenicol AG	Chloramphenicol <sup>a</sup> (+ pABN)
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Ecc20200803	Pus	ST78	<i>blaSHV-12, blaTEM-1B</i>	16	-	1 (<0.25)	-	4 (0.5)	-	32 (2)
	Ecc20190808	BAL	ST66	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	16	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB1</i>	16 (8)	-	2 (1)	-	32 (4)
	Ecc20190903	BAL	ST66	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	16	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB1</i>	16 (8)	-	2 (1)	-	32 (4)
	Ecc20190904	BAL	ST66	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	16	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB1</i>	8 (4)	-	2 (1)	-	32 (4)
	Ecc20210401	Stool	ST66	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	16	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB1</i>	16 (8)	-	2 (1)	-	16 (2)
	Ecc20200502	Stool	ST568	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1</i>	16	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB1</i>	8 (2)	-	2 (0.5)	-	32 (4)
	Ecc20210802	Stool	ST66	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	16	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB1</i>	16 (4)	-	4 (1)	-	16 (2)
	Ecc20190702	Stool	ST114	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	32	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB1, ParC S80I, GyrA S83L</i>	256 (64)	-	4 (1)	<i>catA1</i>	>256 (128)
	Ecc20190501	Stool	ST106	<i>blaSHV-12, blaTEM-1B</i>	32	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	4 (2)	-	4 (2)	-	32 (4)
	Ecc20200601	Pus	ST66	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	64	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB1</i>	16 (8)	-	2 (0.5)	-	16 (2)
	Ecc20190609	Stool	ST66	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	16	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB1</i>	16 (8)	-	4 (1)	-	32 (4)
	Ecc20191003	Stool	ST66	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	16	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB1</i>	16 (8)	-	4 (1)	-	32 (4)
	Ecc20190502	BAL	ST114	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	32	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB1, ParC S80I, GyrA S83L</i>	256 (128)	-	2 (0.5)	<i>catA1</i>	>256 (64)
	Ecc20190701	BC	ST114	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1</i>	64	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB1, ParC S80I, GyrA S83L</i>	128 (64)	-	2 (0.5)	-	32 (2)
Ecc20190706	Stool	ST114	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	32	<i>aac(6)-Ib-cr, qnrB1, ParC S80I, GyrA S83L</i>	256 (128)	-	2 (0.5)	<i>catA1</i>	>256 (64)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kp20190611	Stool	ST405	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	32	<i>aac(6)-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrB1</i>	64 (64)	-	2 (0.5)	-	32 (2)
	Kp20190626	Stool	ST307	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	16	<i>aac(6)-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrB1, GyrA S83I, ParC S80I</i>	128 (128)	-	4 (1)	-	64 (8)
	Kp20190803	Stool	ST405	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	16	<i>aac(6)-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrB1</i>	32 (8)	-	2 (0.5)	-	128 (16)
	Kp20190602	Stool	ST15	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	32	<i>aac(6)-Ib-cr, oqxA, oqxB, ParC S80I</i>	256 (128)	-	4 (2)	-	64 (4)
	Kp20211001	Stool	ST307	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	16	<i>aac(6)-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrB1, GyrA S83I, ParC S80I</i>	256 (64)	-	2 (1)	-	32 (4)
	Kp20211005	BA	ST307	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	16	<i>aac(6)-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrB1, GyrA S83I, ParC S80I</i>	256 (128)	-	2 (1)	-	32 (4)
	Kp20190403	Stool	ST449	<i>blaSHV-2</i>	32	<i>oqxA, oqxB</i>	0,5 (< 0.25)	-	4 (1)	-	128 (8)
	Kp20210510	BA	ST405	<i>blaCTX-M-15, blaTEM-1B</i>	16	<i>oqxA, oqxB, qnrB1</i>	4 (1)	-	2 (1)	-	32 (4)
	Kp20210808	Stool	ST20	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	32	<i>aac(6)-Ib-cr</i>	1 (0.25)	-	2 (1)	-	>256 (256)
	Kp20190607	Stool	ST45	<i>blaCTX-M-15, blaTEM-1B</i>	64	<i>oqxA, oqxB</i>	0.5 (< 0.25)	-	2 (0.5)	<i>catA1</i>	>256 (128)
	Kp20191103	Stool	ST45	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	16	<i>aac(6)-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrB1</i>	16 (8)	-	2 (1)	-	64 (8)
	Kp20200201	Stool	ST392	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaOXA-4, blaTEM-1B, blaTEM-2</i>	64	<i>aac(6)-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrB1, GyrA S83I, ParC S80I</i>	128 (128)	-	2 (0.5)	<i>floR</i>	>256 (128)
	Kp20201107	Stool	ST584	<i>blaCTX-M-15, blaTEM-1B</i>	32	<i>oqxA, oqxB, qnrB1</i>	2 (< 0.25)	-	4 (0.5)	-	64 (8)
	Kp20201204	Stool	ST584	<i>blaCTX-M-15, blaTEM-1B</i>	16	<i>oqxA, oqxB, qnrB1</i>	2 (1)	-	4 (0.5)	-	64 (2)
	Kp202106011	Stool	ST636	<i>blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	32	<i>aac(6)-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrB1</i>	4 (4)	-	2 (1)	-	16 (2)
	Kp20211201	Catheter	ST870	<i>blaSHV-106</i>	128	<i>oqxA, oqxB</i>	256 (128)	-	2 (1)	-	16 (2)

Abbreviations: BAL, broncho-alveolar liquid; BC, blood culture, BA bronchial aspiration; AG, associated genes; QRDR, quinolones resistance determining region; pABN, Phe-Arg-β-naphthylamide

<sup>a</sup> MICs are presented in milligram per liter

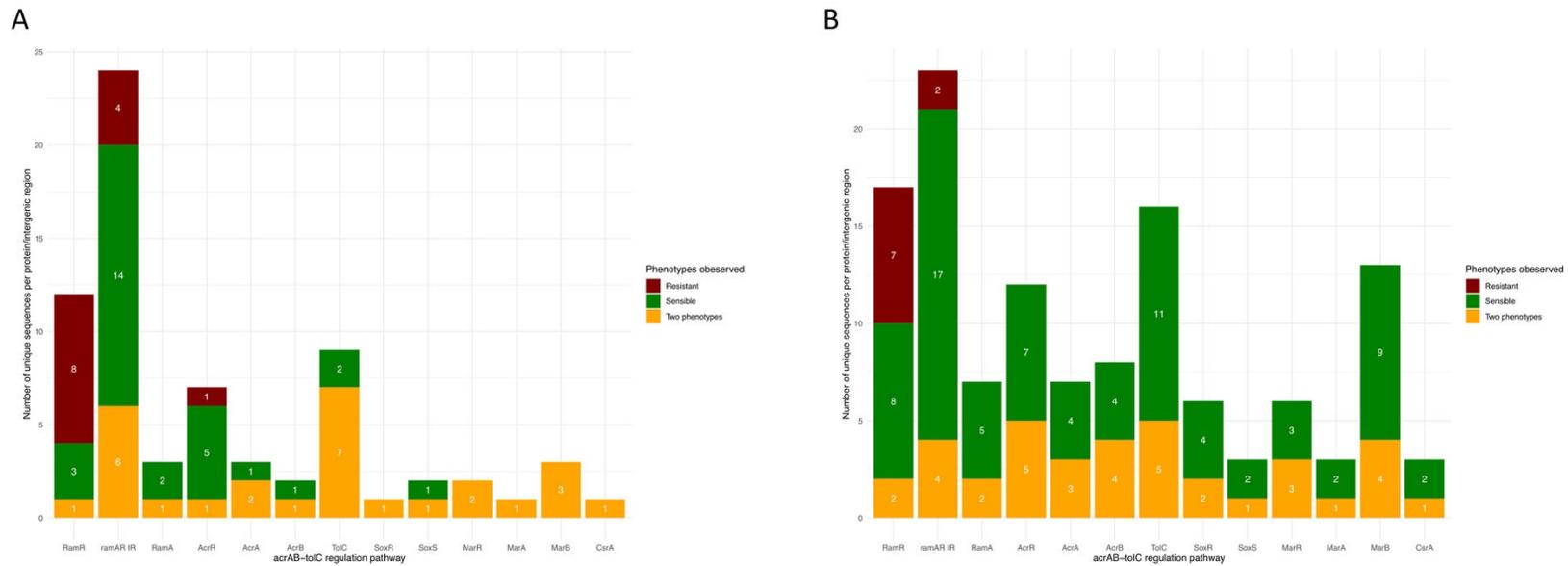
A proportion of *Ecc* strains (15/127 (12%)) and *K. pneumoniae* strains (16/122 (12%)) showed an ORP. Resistant strains were not associated with a specific ICU and/or with a specific sample origin (data not shown).

The MICs of TEM and TIG were less diverse than the MICs of CIP and CHL (Table 1). Indeed, the MICs of TEM varied between 16 mg/L and 64 mg/L (except for one strain), those for TIG varied between 2 mg/L and 4 mg/L, those for CIP varied between 0.5 mg/L and 256 mg/L, and those for CHL varied between 16 mg/L and > 256 mg/L (Table 1). These results could be explained by the acquisition of additional resistance mechanisms, such as *aac(6')-Ib-cr* and *qnr* genes, mutations within the quinolone resistance determining region for CIP and the presence of *cat* and *floR* genes for CHL (Table 1).

The addition of 20 mg/L of Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide (pABN) to the medium significantly decreased the MICs of CHL, CIP and TIG. CHL showed the greatest fold changes, between 8- and 16-fold, followed by TIG (between 2- and 8-fold) and CIP (between 2- and 4-fold) (Table 1). These results suggested the involvement of an RND pump in the phenotypes observed. As mentioned in the Methods section, the MICs of TEM were not determined in the presence of pABN, as the resistance of this molecule is associated with the downregulation of *ompF*, which is not modified by the addition of pABN.

### ***Sequence extraction and diversity of RND associated regulators***

The sequences of twelve genes and the *ramAR* intergenic region (IR) were found among the 122 *K. pneumoniae* and 127 *Ecc* strains. However, the operon *ramAR* was absent from all 194 genomes of *E. coli* studied. The sequences of the proteins RamA, RamR, AcrR, AcrA, AcrB, TolC, SoxR, SoxS, MarA, MarB, MarR, and CsrA and the *ramAR* IR showed tremendous differences in terms of diversity. Considering all the sequences together, the diversity was greater in *Ecc* strains than in *K. pneumoniae* strains: a total of 124 unique sequences versus 70 were found, respectively (Figure 1 and Supplementary Tables 2 and 3). Regardless of the species, sequences of RamR and the *ramAR* IR have always been the most variable elements. Indeed, 24 and 23 unique sequences of the *ramAR* IR and 17 and 12 unique sequences of RamR were found among the *Ecc* and *K. pneumoniae* strains, respectively (Figure 1 and Supplementary Tables 2 and 3). In contrast, sequences of the proteins CsrA, MarA, SoxS, and RamA were the most conserved among the two species (Figure 1 and Supplementary Tables 2 and 3).



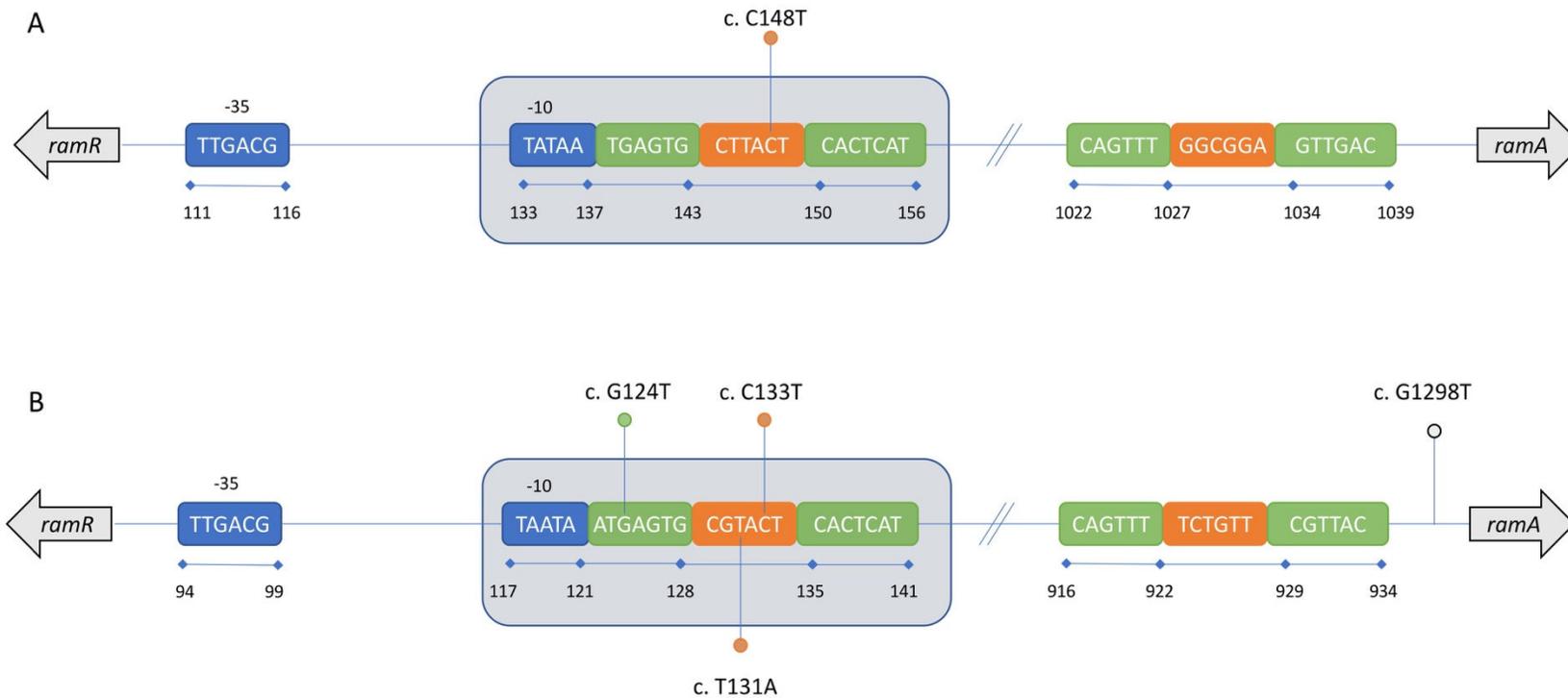
**Figure 1** Diversity of the sequences within the *acrAB-tolC* regulation pathway. The number of unique sequences and the phenotypical association (see methods) found in 12 proteins, RamA, RamR, AcrR, AcrA, AcrB, TolC, SoxR, SoxS, MarA, MarB, MarR, and CsrA, and the *ramAR* intergenic region are represented in bar plots. A represents the sequence diversity from the genomes of 122 ESBL-producing *K. pneumoniae*; B represents the sequence diversity from the genomes of 127 ESBL-producing *E. cloacae* complexes. Sequences only recovered from susceptible strains are represented in green, sequences that were specific to resistant strains are represented in red, and sequences that were found in both susceptible and resistant isolates are coloured yellow. Abbreviation: IR – intergenic region.

These results highlighted that inside a regulatory pathway, some elements may present important sequence diversity, whereas others cannot. These variable elements could be a factor in bacterial adaptation and phenotype modification.

### ***Correlations between sequences and resistance phenotypes***

Strains with ORP had associated mutations only in a few proteins or intergenic regions. Indeed, *K. pneumoniae* strains with ORP showed specific mutations within RamR (n=8), *ramAR* IR (n=4) and AcrR (n=1) (Figure 1A), whereas *Ecc* strains with ORP had specific modifications within RamR (n=7) and *ramAR* IR (n=2) (Figure 1B) (see details below). All the other protein sequences studied were found (i) in both types of phenotypes, i.e., susceptible, and resistant, or (ii) only in sensitive strains (Figure 1), suggesting that they did not participate in the ORP observed.

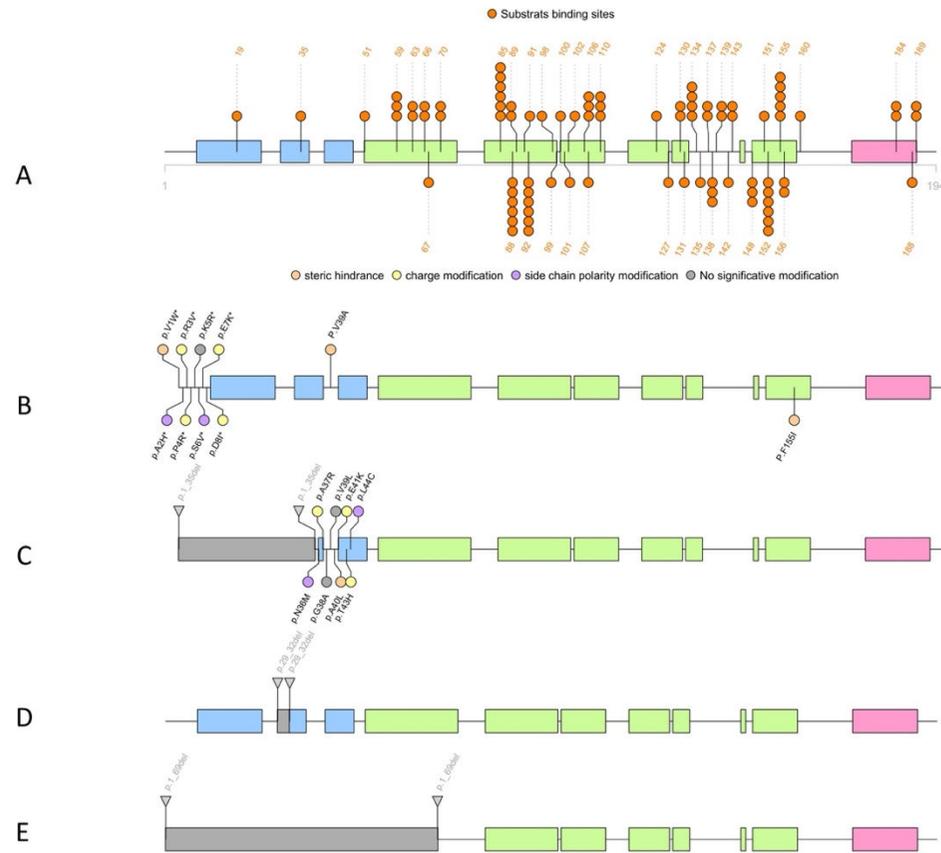
Among the 15 *Ecc* strains with ORP, four, which belonged to two different STs (ST78 and ST66) and two different Hoffman *hsp60* clusters (C3 and C6), had a cDNA mutation: c.C148T (c for coding DNA) in the *ramAR* IR (Figure 2A). This single nucleotide polymorphism (SNP) occurred within the RamR DNA-binding site of *ramAR* IR, which likely affects the ability of RamR to play a repressor role (Figure 2A and Table 2). Six strains showed some amino acid replacements within RamR. Three ST114 strains had a p.V39A (p for protein) substitution, which led to a steric modification inside the DNA-binding region of RamR (Table 2 and Figure 3B). Two ST66 strains had substitutions in the first eight N-terminal amino acids, leading to two steric hindrances, three side chain polarity modifications, and three charge modifications (Figure 3B). These substitutions are likely to change the secondary and tertiary structure of the N-terminal part of RamR, which is the DNA-binding region of the protein. One ST66 strain had a p.F155L substitution (Table 2 and Figure 3B). This 155-position is known to be one of the major sites for protein–substrate interactions. Substitution of a large and aromatic amino acid by a smaller and nonaromatic amino acid could change the conformation of RamR and the behaviour of the protein. Five strains showed a deletion of the N-terminal part of RamR (Table 2 and Figure 3C-E). One ST66 strain had a p.1\_35del mutation in addition to eight amino acid substitutions within the DNA-binding site (Figure 3C). One ST106 strain had a p.29\_32del (Table 2 and Figure 3D), whereas three strains from different STs (ST568, ST66, ST114) had a p.1\_69del (Table 2 and Figure 3E). All these deletions completely or partially destroyed the DNA-binding region of RamR, which most likely led to an inability of the protein to be a transcriptional inhibitor.



**Figure 2.** Organization of the *ramAR* intergenic region among *Enterobacter cloacae* complex (A) and *Klebsiella pneumoniae* (B) strains. RNA polymerase binding sites are represented in blue boxes (-35 and -10). Pseudopalindromic sequences are drawn by green boxes. The six nucleotides between the palindromic sequences are represented in orange boxes. The RamR DNA-binding domain described by Baucheron et al. (16) is surrounded by the grey box.

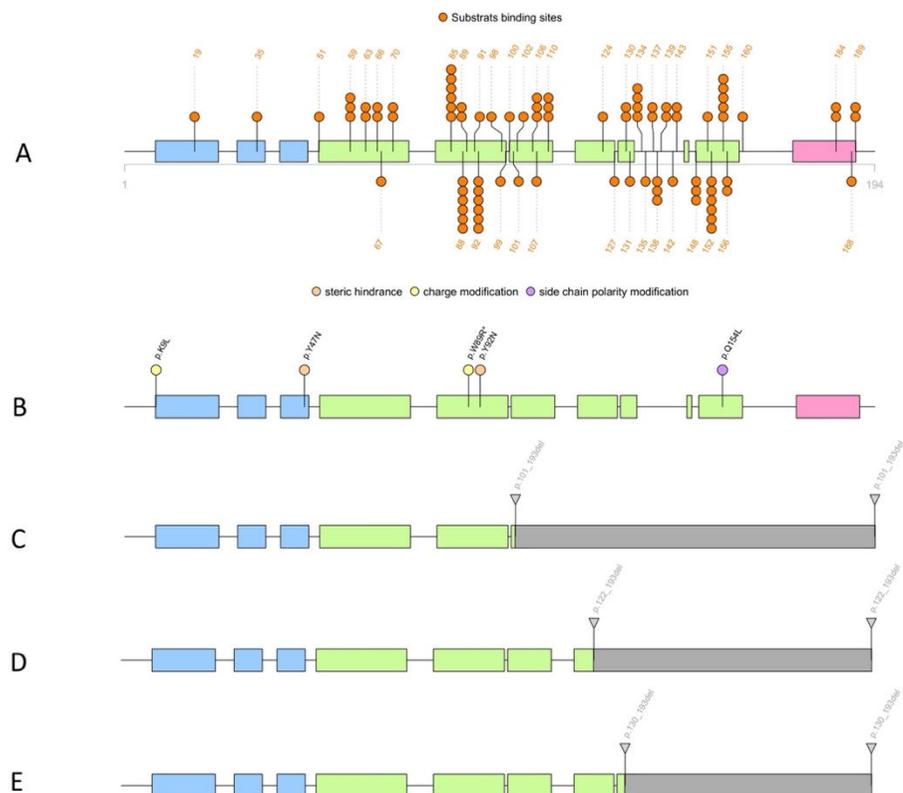
**TABLE 2** Sequence types of the resistant strains, RamR- and *ramAR* intergenic region-associated mutations, and biological significance

Study name	ST	RamR mutations associated with resistant strains	<i>ramAR</i> intergenic region mutations associated with resistant strains	Biological significance of genomic/proteins modifications
Ecc20200803	ST78			
Ecc20190808	ST66	-	c.C148T	Mutations within the RamR DNA-binding region: linker
Ecc20190903	ST66			
Ecc20190904	ST66			
Ecc20210401	ST66	p.I_35del, p.N36M, p.A37R, p.G38A, p.V39L, p.A40L, p.E41K, p.T43H, p.L44C	-	1° - Loss of the DNA-binding domain 2° - Amino acid modifications: steric hindrance, side chain polarity modifications, charge modification
Ecc20200502	ST568			
Ecc20210802	ST66	p.I_69del	-	Loss of the DNA-binding domain
Ecc20190702	ST114			
Ecc20190501	ST106	p.29_32del	-	Loss of the DNA-binding domain
Ecc20200601	ST66	p.F155L	-	Amino acid modifications: steric hindrance inside a key position for protein-substrate interactions
Ecc20190609	ST66	p.V1W, p.A2H, p.R3V, p.P4R, p.K5R, p.S6V, p.E7K, p.D8I	-	Amino acid modifications: steric hindrance, side chain polarity modification, charge modification
Ecc20191003	ST66			
Ecc20190502	ST114			
Ecc20190701	ST114	p.V39A	-	Amino acid modifications: steric hindrance inside the DNA-binding domain
Ecc20190706	ST114			
Kp20190611	ST405	p.Y92N	-	Amino acid modifications: steric hindrance
Kp20190626	ST307	p.Y47N	-	Amino acid modifications: steric hindrance
Kp20190803	ST405	p.W89R	-	Amino acid modifications: steric hindrance, charge modification
Kp20190602	ST15	p.L154Q	-	Amino acid modifications: steric hindrance and polarity modification of the side chain inside a key position for protein-substrate interactions
Kp20211001	ST307			
Kp20211005	ST307	p.K9I	-	Amino acid modifications: steric hindrance, charge modification
Kp20190403	ST449	p.130_193del	-	Loss of C-terminal extremity of RamR, no possibility for dimerization
Kp20210510	ST405	p.122_193del	-	Loss of C-terminal extremity of RamR, no possibility for dimerization
Kp20210808	ST20	p.122_193del	-	Loss of C-terminal extremity of RamR, no possibility for dimerization
Kp20190607	ST45	p.101_193del	-	Loss of C-terminal extremity of RamR, no possibility for dimerization
Kp20191103	ST45	No specific mutation	c.C133T	Mutations within the RamR DNA-binding region: linker
Kp20200201	ST392	No specific mutation	c.T131A	Mutations within the RamR DNA-binding region: linker
Kp20201107	ST584			
Kp20201204	ST584	No specific mutation	c.G124T	Mutation inside the palindromic sequence ATGAGTG within the RamR DNA-binding region
Kp20211201	ST870	No specific mutation	c.G1298T	Unknown significance
Kp202106011	ST636	No specific mutation	No specific mutation	No explanation



**Figure 3.** Structural and functional annotation of RamR and specific mutations/deletions found among resistant *Enterobacter cloacae* complex strains. A – Blue rectangles represent the helix turn helix (HTH) domain of the protein that includes the DNA-binding site. Green rectangles represent regions involved in the protein-substrate interactions. The fourth alpha helix is involved in both HTH domain and protein substrate interactions. The pink rectangle represents the region involved in dimerization with a second RamR protein. Orange dots represent the positions of amino acids implicated in protein–substrate interactions according to the PDB database and Yamasaki *S et al* (10). The number of dots represents the number of substrates that interact with this specific amino acid. B and C – Amino acid substitutions associated with resistant strains are represented in circles. Consequences of the substitution are organized by colours. Amino acid substitutions marked with an asterisk were all found in strains Ecc20190609 and Ecc20191003. C, D, and E represent the N-terminal deletions found in several proteins. The strain Ecc20210401 (C) showed an association of a deletion of the first N-terminal 35 amino acids and numerous amino acid substitutions in the second and third alpha helices.

Among the 16 *K. pneumoniae* strains with ORP, five presented a mutation inside the *ramAR* IR, while ten had mutations within RamR (Table 2 and Figures 2 and 4). One strain, Kp20210808, had, in addition to the mutation in RamR, another specific mutation inside AcrR. The mutation within AcrR was p.A80S, which led to the replacement of a small and nonpolar amino acid by a larger and polar amino acid. For the strain Kp202106011, no explanation could be provided by the genomics explorations despite an ORP with an obvious decrease of MICs by addition of pA $\beta$ N (Tables 1 and 2). Two strains belonging to the STs ST392 and ST45 had c. T131A and c. C133T substitutions, respectively, which both occurred within the RamR DNA-binding region (Table 2 and Figure 2B). Two ST584 strains had a c. G124T substitution, which changed the palindromic sequence 'ATGAGTG' inside the RamR binding site (Table 2 and Figure 2B). Together, these substitutions could modify the DNA-RamR interaction, likely leading to a weaker RamR repressor activity. On the other hand, the strain Kp20211201 had a unique substitution within the *ramAR* IR, c.G1298T, whose biological significance is unknown (Table 2 and Figure 2B). Among the ten strains with specific RamR mutations, three ST114 strains, one ST405, one ST307, and another ST405 showed p.V39A, p.Y92N, p. Y47N, and p.W89R, respectively (Table 2 and Figure 4B). All these alterations led to steric hindrance inside the DNA-binding domain (Figure 4B). It should be noted that the p.W89R was also responsible for the replacement of a neutral amino acid, tryptophan, by a positive amino acid, arginine, which could have consequences for the secondary and tertiary structures of the protein (Table 2 and Figure 4B). The strain Kp20190602 (ST15) had a p.L154Q substitution that caused steric hindrance and polarity modification of the side chain of the amino acid inside a key position for protein-substrate interactions (Table 2 and Figure 4B). Finally, four strains belonging to ST449, ST405, ST20, and ST45 harboured important deletions in the C-terminal part of RamR, p.130\_193del, p.122\_193del, p.122\_193del, and p.101\_193del, respectively (Table 2 and Figure 4C-E). All these deletions have in common the disappearance of the ninth alpha helix, which allows the dimerization of RamR; thus, RamR is likely to not be functional.



**Figure 4.** Structural and functional annotation of RamR and specific mutations/deletions found among resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. A – Blue rectangles represent the helix turn helix (HTH) domain of the protein that includes the DNA-binding site. Green rectangles represent regions implicated in the protein-substrate interactions. The pink rectangle represents regions involved in dimerization with a second RamR protein. The fourth alpha helix is involved in both HTH domain and protein substrate interactions. Orange dots represent the positions of amino acids implicated in protein-substrate interactions according to the PDB database and Yamasaki *S et al* (10). The number of dots represents the number of substrates that interact with this specific amino acid. B – Amino acid substitutions specific to resistant strains are represented in circles. Consequences of the substitution are organized by colours. Amino acid substitutions marked with an asterisk have been previously described in another resistant *Klebsiella pneumoniae* (17). C, D, and E represent the C-terminal deletions found in several proteins. None of them expressed the ninth alpha helix.

## DISCUSSION

Mutations in RamR, AcrR or within the *ramAR* IR associated with AcrAB-TolC dysregulation and antimicrobial resistance have been described in many species (4, 7, 8, 15). In this work, more than ten percent of the ESBL-*Ecc* and ESBL-*K. pneumoniae* strains isolated in ICUs for three years showed an ORP that correlated to mutations inside the *ramAR* operon. This proportion is extremely high and has not been described in previous studies (18). It may be suspected that, such a proportion could be due to clonal dissemination of a specific population that incorrectly increases the number of strains. This hypothesis can be refuted because of (i) the number of unique STs found among the resistant strains (6/16 and 10/27 among *Ecc* and *K. pneumoniae* strains, respectively), and (ii) the diversity of mutations found inside the *ramAR* operon. Regardless of the species and the elements mutated, the overexpression of an RND pump seems to be associated with clinical ESBL-*Ecc* and ESBL-*K. pneumoniae* strains.

According to the guidelines of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, testing of CHL and TIG susceptibility is not mandatory for *Enterobacterales* (19). As a consequence, there is a risk of not detecting the ORP among clinical strains. However, it seems important to know which ESBL-*Enterobacterales* have RND pump dysregulation in order to adopt a pertinent therapeutic approach and reduce the risk of resistant mutant selection. Moreover, TEM, CIP and TIG are in the same Sensititre plate (FARMgGN). However, the MIC of CHL must be determined through another method. This limits the ability of clinical microbiology laboratories to routinely screen this ORP.

Considering the whole proteins and intergenic region studied, the results showed that sequence diversity was limited to limited elements. The total number of unique sequences was higher in *Ecc* than in *K. pneumoniae*, which could be explained by the existence of several species merged in the *Enterobacter cloacae* complex whereas only *K. pneumoniae* strains were studied. In both species/complexes, sequences of CsrA, MarA, SoxS, SoxR, RamA, and MarR were conserved, whereas AcrR, *ramAR* IR and RamR showed the highest proportion of mutations. Consequently, *csrA*, *marA*, *soxS*, *soxR*, *ramA*, and *marR* could be considered as “stable” genes, not only because of their implication in the *acrAB-tolC* expression pathway but also because of their impact on several cellular processes. Indeed, CsrA plays a major role in intracellular carbon metabolism by controlling several essential enzymes involved in glucose metabolism in *E. coli*

(17). *marRAB* and *soxRS* operons are both involved in oxidative stress responses (9, 20). At the same time, it has been described that *ramRA* has pleiotropic effects on the cell, such as modification of lipid A synthesis, antimicrobial susceptibility, and macrophage interactions (21). As a consequence, the fitness cost for the cell of mutations within the *ramRA* operon is probably lower than those within *marRAB*, *soxRS* and *csrA*, leading to a higher sequence diversity in this genomic region. The *ramAR* operon seems to be an important adaptative factor for the *Ecc* and *K. pneumoniae* strains. In this context (6), the *ramRA* operon was not found among *E. coli* strains in this study, and it is tempting to speculate that the lack of this operon explains the absence of ORP found among *E. coli* strains in this work.

It should be noted that all the resistant strains harboured an altered sequence of the *ramAR* IR or RamR but not both. This is in accordance with a study of the *ramAR* operon among *Salmonella* Typhimurium strains, which also concluded that strains had specific mutations in one or other region but not simultaneously (15). Three types of modifications have been found in mutated RamR. First, the DNA-binding site could be altered by (i) massive deletions, as it has been found in *Ecc* strains in other studies (4, 22), and (ii) amino acid substitutions. These amino acid substitutions have been reported in several species, but their localization can differ (7, 15, 23). It should be noted that the tryptophan substitution at position 89 has also been described in a *K. pneumoniae* strain (23). In accordance with previously published studies, most of the mutated RamR had a unique amino acid substitution (7, 23). Deletions and/or amino acid substitutions changed the RamR DNA-binding domain, which could lead to a weaker or a complete abolition of its transcriptional inhibitory function, leading to *ramA* and *acrAB-tolC* overexpression (4). The second type of RamR alteration is, as previously described (7), the deletion of the C-terminal part of the protein, which results in the absence of the ninth alpha helix, which is involved in the dimerization of the protein (10). Third, two proteins harboured amino acid substitutions in p.154 and p.155. This last has been described as a key position for protein–substrate interactions in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (10). Amino acid replacement inside p.155 or near p.154 could change the behaviour of the protein, which will result in a lower functionality. All the RamR modifications found in this study could explain the alteration of protein function.

Mutations associated with resistant strains have also been found inside the *ramAR* IR. In both *Ecc* and *K. pneumoniae*, the RamR DNA-binding region was subjected to nucleotide substitutions (Figure 2). For two *K. pneumoniae* strains, there was a modification in the

ATGAGTG palindromic sequences corresponding to the RamR binding motif (Figure 2). The overexpression of AcrAB-TolC after modification of these palindromic sequences has been described in previous studies (15, 24). Four *Ecc* and two *K. pneumoniae* strains showed nucleotide substitutions between the two palindromic sequences. A study performed with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium highlighted that two RamR homodimers bind the DNA, one per DNA strand. Moreover, the DNA-binding site of RamR is not restricted to palindromic sequences, as it could be for other TetRs (16), but consists of a 28 bp nucleotide sequence (Figure 2). This binding site included the -10 region binding site of the RNA polymerase, the palindromic sequences and the six extra bases, which form the linker between the two palindroms (16). Interestingly, it has been shown in *Salmonella* that a 2 bp deletion, one nucleotide inside the linker and another in the palindromic sequence, alters RamR-DNA interactions, leading to the overexpression of *ramA*, *acrB* and *tolC* by 6.6-, 3.4- and 2.5-fold, respectively (16). These data reinforce our suggestion that the additional antimicrobial resistance for the six strains can be linked to the mutation within the *ramAR* IR region.

It has been demonstrated that RamA controls the expression of not only *acrAB-tolC* but also other pump-encoding genes such as *oqxAB* and *yrbB-F* (21). It also controls the lipid A moiety by modulating the transcription of *lpxO*, *lpxC* and *lpxL-2*. As a consequence, RamA-overexpressing strains are less susceptible to polymyxin, colistin and cationic antimicrobial peptides due to membrane modifications and are more resistant to macrophage phagocytosis, which conferred better systemic diffusion to the lung and spleen in a mouse model (21). All these characteristics are advantageous for clinical bacterial strains.

In this context, it has been demonstrated that *acrAB*-overexpressing cells of *E. coli* and *S. Typhimurium* do not express *mutS* (14). Thus, the lack of DNA mismatch repair leads to hypermutable phenotypes (14). It could then be hypothesized that AcrA-TolC overexpression through RamR or *ramAR* IR mutations allows bacterial strains to acquire chromosomal mutations, leading to a heterogeneous bacterial population among which some cells could better adapt to stress. According to this evolutionary point of view, the operon *ramRA* seems to be a major factor of adaptation for bacteria.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Bacterial strains***

In the Teaching Hospital of Caen, patients from medical, surgical, or neonatology ICUs were screened weekly for ESBL-E carriage using rectal swabs and selective media (Chromid BLSE, Biomérieux, Marcy l'Etoile, Auvergne-Rhône-Alpes, France). Identification at the species level was performed using a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry method (Bruker, Billerica, Massachusetts, United States of America). The presence of an ESBL-encoding enzyme was confirmed using the combination disk test according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines (<https://eucast.org/>). Between 2019 and 2021, the first ESBL-E strains identified as *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Ecc* found in clinical or screening samples from each patient were gathered for whole genome sequencing and further antimicrobial susceptibility characterization.

### ***Antimicrobial susceptibility tests***

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using the FRAMgGN plate of the Sensititre Antimicrobial Susceptibility Testing System (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States of America) according to the manufacturer's instructions. The antimicrobial agents or combinations tested included amikacin (AMK), aztreonam (AZT), cefepime (FEP), ceftazidime (CAZ), ciprofloxacin (CIP), colistin (CS), ertapenem (ETP), ceftolozane-tazobactam (C/T), gentamicin (GEN), imipenem (IMP), meropenem (MER), piperacillin-tazobactam (PTZ), temocillin (TEM), tigecycline (TIG), and sulfamethoxazole (STX). MIC values were determined using the Sensititre Vizion digital MIC Viewing System (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States of America). Clinical interpretation was performed according to the guidelines of the “Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie” CA-SFM EUCAST 2020 (19).

### ***Selection of bacterial strains of interest and MICs determination***

Strains that demonstrated a decreased susceptibility to CIP (> 0,5 mg/L), TIG (> 0,5 mg/L) and TEM (> 8 mg/L) were selected for further investigations. MICs for TIG, TEM, CIP and CHL were determined by the broth microdilution method. MIC determination by the broth microdilution

method was carried out using Mueller-Hinton (MH) broth in biological triplicates, in which the bacteria were incubated in 96-well microplates for 24 hours at a temperature of 37 °C after bacterial inoculation. The bacterial suspensions used to inoculate microplates were made from 0.5 McFarland suspensions that were then diluted to one hundredth in cation-adjusted MH broth. As controls, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was used for CIP, CHL and TIG and the *Enterobacter hormaechei* FY01 strain was used for TEM (4). The impact of the RND efflux pump inhibitor pAβN (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, United States of America) at 20 mg/L on the MIC values was tested for CIP, CHL and TIG (25). MICs for TEM were not tested in the presence of pAβN, as the MICs observed are not linked to RND pump dysregulation but rather to a modification of *ompF* expression, as has already been mentioned (4). Finally, ESBL strains were defined as showing an ORP if they were resistant to the four antibiotics CIP (> 0,5 mg/L), TIG (> 0,5 mg/L), TEM (> 8 mg/L) and CHL (> 8 mg/L).

### ***DNA sequencing and strain typing***

High-throughput whole-genome sequencing (WGS) was carried out at the *Platform de Microbiologie Mutualisée* (P2 M) from the Pasteur International Bioresources network (PIBNet; Institut Pasteur, Paris, Île de France, France). DNA extraction was performed using the MagNAPure 96 system (Roche). Libraries were prepared using the Nextera XT kit (Illumina), and sequencing was performed with the NextSeq 500 system (Illumina, San Diego, California, United States of America), which generated 150-bp paired-end reads. Alien Trimmer software was used for read trimming and clipping. The quality of the filtered fastq files was evaluated using fastqc software. Genomes were *de novo* assembled using SPAdes v. 3.12 software using the recommended kmer sizes for Illumina 150-bp paired reads (-k 21, 33, 55, and 77). The quality of the genome assembly was assessed using the Quast tool (26). Species of the sequenced bacteria were verified using the rMLST program (27). Sequence types (ST) were determined using appropriate multilocus sequence typing (MLST) schemes (28-30). The resistomes of the strains were determined using the Resfinder database with 90% identity and coverage parameters (31).

### ***Gene sequences extraction and sequence clustering***

Nucleic sequences of 13 elements involved within the *acrAB-tolC* regulation pathway were studied. In total, 12 genes, *ramA*, *ramR*, *acrR*, *acrA*, *acrB*, *tolC*, *soxR*, *soxS*, *marA*, *marB*, *marR*,

and *csrA*, and one chromosomal region located between *ramR* and *ramA* were extracted from the genome of each strain using blastn with megablast parameters. Reference sequences used for the blastn database were extracted from NZ\_CP012165.1 *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* strain 34978 chromosome complete genome and CP052181.1 *Klebsiella pneumoniae* strain F16KP0037 chromosome complete genome. Sequences are available in Supplementary Text 1. Both genomes were chosen because of the high-quality sequencing methods using long read sequencing.

Corresponding peptide sequences were obtained from extracted nucleic sequences using the gene prediction algorithm Prodigal (32). The sequences of RamA, RamR, AcrR, AcrA, AcrB, TolC, SoxR, SoxS, MarA, MarB, MarR, and CsrA were compared and clustered using the cd-hit program (33). The nucleotide sequences of the *ramAR* IR were compared and clustered using the cd-hit-est program (33). All cd-hit analyses were performed using 100% identity and length thresholds.

### ***Selection of sequence alterations in the acrAB-tolC regulation pathway***

Protein and nucleotide regions with sequences that were only recovered from resistant strains were further analysed. To consider the protein/nucleotide region, all unique sequences were aligned using muscle (34). Alignments were browsed using AliView (35) to gather the protein/nucleotide modifications that were associated with resistant strains. Then, the biological significance of these differences was tracked using previously published data and protein databases such as UniProt (36), RCSB PDB (37) and InterPro (38). Reference sequences chosen for amino acid or nucleotide substitution studies were those from susceptible strains (Kp20200502 and Ecc20200301 for *Klebsiella pneumoniae* and *Ecc* complex strains, respectively). Nucleotide sequences of the *ramAR* intergenic region are available at the following accession numbers: OP485235 and OP485236.

### ***Ethics***

This study was conducted in compliance with the Helsinki Declaration (ethical principles for medical research involving human subjects) and in accordance with the guidelines of the research board of our teaching hospital in Caen, France. This was a noninterventional study: the specimens used in this study were part of the routine patient management without any additional sampling. No objection was provided by patients or their families.

### ***Data availability***

*In silico* analyses were performed using publicly accessible and published algorithms/software. The parameters used are detailed in the Methods. The genomes of the strains are available at BioProject PRJNA876630.

### **CONCLUSION**

More than seven percent of ESBL-*Enterobacterales* isolated in ICUs showed resistance to TEM, CIP, TIG and CHL. The bacterial species were exclusively *Enterobacter cloacae* complex and *Klebsiella pneumoniae*, and no ORP was found among *E coli*. For 30/31 strains, there was a clear correlation with the alteration of the sequences in the *ramAR* operon. Sequence diversity suggested that RamR and the *ramAR* IR played key roles in the acquisition of antimicrobial resistance and bacterial adaptation among clinical strains. Further explorations are needed to confirm these results in a multicentric and prospective study and the implication of the *ramAR* operon as a key adaptation factor for clinical *Enterobacterales*.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Michel Auzou, Sébastien Galopin, Guillaume Leduc, Isabelle Renouard, and Mamadou Godet for their excellent technical assistance. Part of this work was performed on computing resources provided by CRIANN (Normandy, France).

### **FUNDING**

The three-year PhD program of François Gravey was funded by “Région Normandie”.

## REFERENCES

1. Lutgring JD. 2019. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: an emerging bacterial threat. *Semin Diagn Pathol* 36:182–186.
2. Wilson H, Török ME. 2018. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Microb Genom* 4:e000197.
3. Hooper DC. 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat* 2:38–55.
4. Gravey F, Cattoir V, Ethuin F, Fabre L, Beyrouthy R, Bonnet R, Le Hello S, Guérin F. 2020. *ramR* deletion in an *Enterobacter hormaechei* isolate as a consequence of therapeutic failure of key antibiotics in a long-term hospitalized patient. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e00962–20.
5. Pérez A, Poza M, Fernández A, Fernández MDC, Mallo S, Merino M, Rumbo-Feal S, Cabral MP, Bou G. 2012. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2084–2090.
6. Weston N, Sharma P, Ricci V, Piddock LJV. 2018. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in *Enterobacteriaceae*. *Res Microbiol* 169:425–431.
7. Abouzeed YM, Baucheron S, Cloeckaert A. 2008. *ramR* mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2428–2434.
8. Hentschke M, Wolters M, Sobottka I, Rohde H, Aepfelbacher M. 2010. *ramR* mutations in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2720–2723.
9. Ariza RR, Cohen SP, Bachhawat N, Levy SB, Demple B. 1994. Repressor mutations in the marRAB operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176:143–148.
10. Yamasaki S, Nikaido E, Nakashima R, Sakurai K, Fujiwara D, Fujii I, Nishino K. 2013. The crystal structure of multidrug-resistance regulator *ramR* with multiple drugs. *Nat Commun* 4:2078.
11. Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, Hofmann K, Ramos JL. 1997. Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:393–410.
12. Ricci V, Attah V, Overton T, Grainger DC, Piddock LJV. 2017. CsrA maximizes expression of the AcrAB multidrug resistance transporter. *Nucleic Acids Res* 45:12798–12807.
13. Ricci V, Piddock LJ. 2009. Ciprofloxacin selects for multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediated by at least two different pathways. *J Antimicrob Chemother* 63:909–916.
14. El Meouche I, Dunlop MJ. 2018. Heterogeneity in efflux pump expression predisposes antibiotic-resistant cells to mutation. *Science* 362:686–690.
15. Fàbrega A, Ballesté-Delpierre C, Vila J. 2016. Differential impact of *ramRA* mutations on both *ramA* transcription and decreased antimicrobial susceptibility in *Salmonella typhimurium*. *J Antimicrob Chemother* 71:617–624.
16. Baucheron S, Coste F, Canepa S, Maurel MC, Giraud E, Culard F, Castaing B, Roussel A, Cloeckaert A. 2012. Binding of the *RamR* repressor to wild-type and mutated promoters of the *RamA* gene involved in

- efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:942–948.
17. Sabnis NA, Yang H, Romeo T. 1995. Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J Biol Chem* 270:29096–29104.
  18. Jiménez-Castellanos JC, Wan Nur Ismah WAK, Takebayashi Y, Findlay J, Schneiders T, Heesom KJ, Avison MB. 2018. Envelope proteome changes driven by *RamA* overproduction in *Klebsiella pneumoniae* that enhance acquired  $\beta$ -lactam resistance. *J Antimicrob Chemother* 73:88–94.
  19. Amara M, Aubin G, Caron F, Dortet L, Goutelle S, Jeannot K, Lepeule R, Lina G, Marchandin H, Mérens A, Ploy MC, Schramm F, Varon E, Cattoir V. 2020. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: recommandations 2022 V.1.0 Mai. SFM, Paris, France.
  20. Demple B. 1996. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* *soxRS* oxidative stress regulon--a review. *Gene* 179:53–57.
  21. De Majumdar S, Yu J, Fookes M, McAteer SP, Llobet E, Finn S, Spence S, Monahan A, Monaghan A, Kissenpfennig A, Ingram RJ, Bengoechea J, Gally DL, Fanning S, Elborn JS, Schneiders T. 2015. Elucidation of the *RamA* regulon in *Klebsiella pneumoniae* reveals a role in LPS regulation. *PLoS Pathog* 11:e1004627.
  22. Molitor A, James CE, Fanning S, Pagès JM, Davin-Regli A. 2018. Ram locus is a key regulator to trigger multidrug resistance in *Enterobacter aerogenes*. *J Med Microbiol* 67:148–159.
  23. Fang L, Chen Q, Shi K, Li X, Shi Q, He F, Zhou J, Yu Y, Hua X. 2016. Step-wise increase in tigecycline resistance in *Klebsiella pneumoniae* associated with mutations in *ramR*, *lon* and *rpsJ*. *PLoS One* 11:e0165019.
  24. Fàbrega A, Soto SM, Ballesté-Delpierre C, Fernández-Orth D, De Anta MTJ, Vila J. 2014. Impact of quinolone-resistance acquisition on biofilm production and fitness in *Salmonella enterica*. *J Antimicrob Chemother* 69:1815–1824.
  25. Sáenz Y, Ruiz J, Zarazaga M, Teixidó M, Torres C, Vila J. 2004. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg-beta-naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. *J Antimicrob Chemother* 53:544–545.
  26. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075.
  27. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* 3:124.
  28. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60:1136–1151.
  29. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 43:4178–4182.
  30. Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. 2013. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One* 8:e66358.

31. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A, Allesoe RL, Rebelo AR, Florensa AF, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender JK, Stingl K, Nguyen M, Coppens J, Xavier BB, Malhotra-Kumar S, Westh H, Pinholt M, Anjum MF, Duggett NA, Kempf I, Nykäsenoja S, Olkkola S, Wiczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S, Ragimbeau C, Lund O, Aarestrup FM. 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* 75:3491–3500.
32. Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11:119.
33. Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 28:3150–3152.
34. Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797.
35. Larsson A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30:3276–3278.
36. The UniProt Consortium. 2021. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res* 49:D480–D489.
37. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 28:235–242.
38. Blum M, Chang HY, Chuguransky S, Grego T, Kandasamy S, Mitchell A, Nuka G, Paysan-Lafosse T, Qureshi M, Raj S, Richardson L, Salazar GA, Williams L, Bork P, Bridge A, Gough J, Haft DH, Letunic I, Marchler-Bauer A, Mi H, Natale DA, Necci M, Orengo CA, Pandurangan AP, Rivoire C, Sigrist CJA, Sillitoe I, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Bateman A, Finn RD. 2021. The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Res* 49:D344–D354

## **2.4 Étude des populations bactériennes**

L'étude intitulée « *Extended Spectrum Beta-Lactamases Enterobacterales in intensive care units: circulating bacterial populations changes during COVID-19 era* » n'a pas encore été proposée à publication.

En revanche, ce travail a été présenté à l'Eccmid 2022 de Lisbonne où il a été sélectionné pour un workshop intitulé « Lessons learned: will COVID-19 change IPC's daily work? ». Le résumé proposé est disponible en annexes.

Cette étude fait état d'un système de surveillance de la circulation des E-EBLSE au sein de trois services de réanimation basé sur une approche combinée phénotypique et génomique au cours de trois ans : de 2019 à 2021.

Au sein des services de réanimation, des prélèvements rectaux à la recherche du portage de E-BLSE, étaient réalisés à l'admission des patients puis de façon hebdomadaire. Ces dépistages étaient effectués en parallèle des prélèvements cliniques au sein desquels la recherche de BLSE était systématiquement réalisée pour toute entérobactériale qui présentait une résistance à une C3G. Aussi, pour tout patient qui présentait une E-BLSE appartenant aux espèces *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et/ou *Enterobacter cloacae* complexe, la première souche était conservée pour la réalisation d'un séquençage en génome complet et l'étude élargie de la sensibilité aux antibiotiques.

Quatre cent quarante-trois E-EBLSE ont été incluses dont *E. coli* (n = 193), *Ecc* (n = 126) et *K. pneumoniae* (n = 124). A elles trois, ces espèces représentaient 95% de l'ensemble des E-BLSE isolées au sein des services de réanimation sur la période de trois ans. L'incidence des E-BLSE incluant tous type de prélèvements était de 3,7 pour 100 admissions et 5,5 pour 1000 journées d'hospitalisation (JH).

La durée médiane de détection des E-BLSE était de sept jours, mais il existait de profondes disparités en fonction des espèces. En effet, le délai médian de mise en évidence de la présence de *E. coli*-BLSE était d'un jour ; 62% des souches avaient une origine communautaire alors que pour *Ecc*-BLSE et *Kpn*-BLSE les délais médians étaient de 12 et 11 jours respectivement. Ainsi, plus de 80% des *Ecc*-BLSE et *Kpn*-BLSE avaient une origine nosocomiale.

Les souches présentaient de nombreuses résistances associées aux antibiotiques : 12 résistances en moyenne. Les molécules les plus efficaces étaient l'association ceftazidime – avibactam (100%), la tigécycline (99%), les carbapénèmes (98%), la colistine (98%) et l'amikacine (97%). En revanche, 30% des souches étaient résistantes à l'association piperacilline – tazobactam, plus de 50% aux fluoroquinolones. Au regard des gènes codant pour les BLSE, le gène *bla<sub>CTX</sub>*.

*M-15* était le plus fréquemment retrouvé (n = 309, 68%) suivi du gène *bla<sub>CTX-M-27</sub>* (n=34, 7%) et *bla<sub>SHV-2</sub>* (n = 29, 6%). Les autres variants *bla<sub>CTX-M</sub>* étaient significativement associés à *E. coli*, tandis que *bla<sub>SHV-12</sub>* l'était avec les souches de *Ecc* et *bla<sub>SHV-2</sub>* avec les souches de *Kpn*.

La plus grande diversité génomique était retrouvée parmi les souches de *E. coli* qui étaient réparties au sein de sept phylogroupes et de 68 *sequence-types* (ST) dont majoritairement le ST131 (n = 59, 30%). Vingt-huit STs ont été retrouvés au sein des souches de *Kpn* dont les sous populations les plus fréquentes étaient le ST405 (n = 51, 41%), le ST584 (n = 14, 11%) et le ST307 (n= 11, 9%). La plus faible diversité génomique était retrouvée parmi les souches de *Ecc*, seulement 18 STs dont ST66 (n = 67, 53%), ST78 (n = 11, 9%) et ST114 (n = 10%, 8%).

Les études de génomique comparative ont mis en évidence que la capacité des espèces à engendrer des épidémies était très différente. En effet, alors que l'incidence des *E. coli*-BLSE était la plus importante au cours de l'étude, 2,42 pour 1000 JH l'incidence des transmissions croisées était la plus faible, 0,23 pour 1000 JH contre 0,8 et 0,94 pour *Ecc* et *Kpn* respectivement.

Les études de l'association entre la charge de la circulation des E-BLSE représentée par l'incidence globale et l'incidence des transmissions croisées a permis de révéler que les dynamiques des souches ne sont pas les mêmes selon les services. En effet, au sein de la réanimation chirurgicale, il existait une relation de proportionnalité entre la circulation des E-BLSE et le nombre de transmissions croisées. Cette relation a été retrouvée pour les souches de *Kpn* au sein de la réanimation médicale, alors que les transmissions croisées à *Ecc* semblaient moins sensibles à la circulation globale des *Ecc*-BLSE dans le service. Pour *E. coli*, et cela quelque soit le service étudié, il n'y avait aucune relation de linéarité entre le nombre de souches BLSE circulantes et le nombre de transmissions croisées enregistrées. Ces données soulèvent l'hypothèse que le type de patients et de pathologies prises en charge dans les services de réanimation ont un impact sur la dissémination des BMR dans les services.

Enfin, la pandémie de covid-19 a frappé les services de réanimation au cours de cette étude dont les conséquences sur la circulation des E-BLSE ont été étudiées.

La circulation des souches de *Kpn*-BLSE a été extrêmement sensible aux changements de pratique dans les services de réanimation. A la suite de la pandémie covid, la population majoritaire pré-covid ST405 avait quasiment disparue et les nouvelles souches de *Kpn*-BLSE isolées appartiennent à des STs jusque-là jamais rencontrés. Ces données permettent l'hypothèse d'un switch populationnel au sein de l'espèce *Kpn* à la suite de la pandémie.

La circulation des souches de *Ecc*-BLSE a été moins affectée par la pandémie covid et les populations majoritaires avant la pandémie, notamment le ST66, sont toujours les vecteurs de la dissémination de l'espèce au sein des services. Ainsi les clones de *Ecc*-BLSE apparaissent comme endémiques.

Enfin, au cours de la pandémie de covid-19, il a été enregistré une augmentation du nombre de transmissions croisées à *E. coli*-BLSE uniquement dans la réanimation dédiée à la prise en charge des patients infectés par le virus du covid-19. Cet état de fait peut possiblement s'expliquer par la charge du personnel soignant qui a rendu parfois plus difficile le respect des précautions contacts.

Cette étude a décrit des E-BLSE ayant de très forts taux de résistance aux autres antibiotiques rendant les alternatives aux carbapénèmes difficiles. Par ailleurs, il semble qu'il n'existe pas une circulation des E-BLSE mais plusieurs. Les facteurs qui interviennent sont avant tout l'espèce bactérienne considérée, le type de service et les pathologies des patients pris en charge, mais aussi, la charge globale de la circulation des E-BLSE dans les services et les mesures d'hygiène mises en place.

Il apparaît donc trois situations distinctes.

Tout d'abord un nombre important de *E. coli* BLSE ayant une origine principalement communautaire source de diversité génomique mais qui ne semble pas présenter un risque de diffusion au sein des services.

Les souches de *Kpn* ont un fort pouvoir de circulation et de transmissions croisées, mais sont sensibles aux mesures d'hygiène renforcées.

Enfin, la circulation des souches de *Ecc*-BLSE est endémique via des clones à succès comme le ST66. Cette situation semble évoluer pour son propre compte, indépendante de la charge globale en bactéries productrices de BLSE et moins sensible aux mesures préventives mises en place.

De nouvelles études sont nécessaires avant de vérifier ces constatations à plus grandes échelles lors de surveillance multicentrique, mais aussi, il est urgent de définir les éléments génomiques et phénotypiques qui permettent à certains clones de *Kpn* et de *Ecc* une telle diffusion dans les établissements de soins.

1            ***Extended Spectrum Beta-Lactamases Enterobacterales in intensive care units:***  
2            ***circulating bacterial populations changes during COVID-19 era***

3 François Gravey,<sup>1,2</sup> Bénédicte Langlois,<sup>2</sup> Paul Dequiré,<sup>1</sup> Jean-Louis Gerard,<sup>3</sup> Damien Du  
4 Cheyron,<sup>4</sup> Mickaël Jokic,<sup>5</sup> Anne-Sophie Trentesaux,<sup>6</sup> Olivier Join-Lambert,<sup>1,2</sup> Simon Le  
5 Hello<sup>1,2,3#</sup>

6 <sup>1</sup>Service de Microbiologie, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14033 Caen Cedex,  
7 France

8 <sup>2</sup>Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, Inserm UMR 1311 DYNAMICURE, 14000,  
9 Caen

10 <sup>3</sup>Service de Réanimation Chirurgicale, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14033  
11 Caen Cedex, France

12 <sup>4</sup>Service de Réanimation Médicale, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14033 Caen  
13 Cedex, France

14 <sup>5</sup>Service de Réanimation pédiatrique, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14033  
15 Caen Cedex, France

16 <sup>6</sup>Service de Réanimation néonatale, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14033 Caen  
17 Cedex, France

18  
19 Running Head: EBSL-Enterobacterales in ICUs

20 #Address correspondence to Simon Le Hello, [lehello-s@chu-caen.fr](mailto:lehello-s@chu-caen.fr)

21 Normandie University, UNICAEN, UNIROUEN, CHU Caen Normandie, Department of  
22 Hospital Hygiene and Infection Control and Microbiology, Inserm UMR 1311  
23 DYNAMICURE, 14000 Caen, France

24 Phone number: + 33 02 31 06 45 94

## 25 INTRODUCTION

26 Antimicrobial resistance is a worldwide threat for public health (Levy et Marshall 2004). In  
27 Human medicine, this phenomenon has three main consequences (i) medical acts such as  
28 chemotherapy cures, surgical procedures, organs transplant are delayed or canceled (ii) the  
29 extended length of stay (LOS) and the prescription of new drugs led to an increase of health  
30 costs (iii) its increased morbi- mortality of the infections (Levy et Marshall 2004; Cassini et al.  
31 2019; Laxminarayan et al. 2013). Indeed, using available data from 207 countries, Murray and  
32 colleagues estimated that during 2019 1.27 million death were caused by antimicrobial  
33 resistance bacteria [IC95% 911 000 – 1 710 000] (Murray et al. 2022). Interestingly, the global  
34 burden of antimicrobial resistance is not equally distributed between species. Considering  
35 several studies, third generation cephalosporins (3GC) resistant *Escherichia coli* (3GCR-*E.*  
36 *coli*), methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and 3GC resistant *Klebsiella*  
37 *pneumoniae* (3GCR-*Kpn*) are three most species responsible of death caused by antimicrobial  
38 resistance (Cassini et al. 2019; Murray et al. 2022). 3GCR among Enterobacterales can be  
39 mediate by several mechanisms such as extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production,  
40 *ampC* hyper expression and/or carbapenemase production (De Angelis et al. 2020). The  
41 production of ESBL represented, by far, the most frequent mechanism encountered; more than  
42 88% of 3GCR-Enterobacterales were ESBL producer in a study performed in six tertiary  
43 hospitals in Germany (Hamprecht et al. 2016). Genes encoding ESBL belong to three major  
44 families: Temoneira  $\beta$ -lactamase (TEM), sulfhydryl reagent variable  $\beta$ -lactamase (SHV) et  
45 cefotaxim-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase (CTX-M) (Bush et Jacoby 2010). Since 2000s, CTX-M are  
46 the predominant ESBL enzymes worldwide. The European Antimicrobial Resistance  
47 Surveillance Network found that in 2019 15.6% and 34.1% of *E. coli* and *K. pneumoniae*  
48 responsible for invasive infections were respectively resistant to 3GC (European Antimicrobial  
49 Resistance Surveillance Network 2020). These data were in accordance with a study performed

50 among 18 French hospitals that found an annual incidence of ESBL-E infection range from  
51 3.8% to 10.5% (Robin et al. 2017). Previous exposure to antibiotic therapy, age and LOS are  
52 risk factor to develop an ESBL-*Kpn* bloodstream infection (Tumbarello et al. 2006). Patients  
53 hospitalized in Intensive Care Units (ICUs) are under an important antibiotic pressure; this led  
54 to an increase of the incidence of ESBL-E infections in these departments (Paterson et Bonomo  
55 2005; World Health Organization 2011). Taking care of the dissemination of ESBL-E is a real  
56 issue to prevent hospital-acquired infections (HAI), reduce the use of antibiotics such as  
57 carbapenems often prescribed in response of these infections and decrease the mortality. Whole  
58 genome sequencing (WGS) is the actual ultimate method to track the dissemination of resistant  
59 bacteria, to estimate the amplitude of outbreaks and to have a better knowledge of the bacteria-  
60 resistant ecology of wards, with an objective to establish the most efficient hospital control of  
61 ESBL-E (Köser et al. 2012).

62 In France, the first imported coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases were identified on 24  
63 January 2020 (Bernard Stoecklin et al. 2020). Rapidly, new cases and clusters appeared, leading  
64 to a national lockdown on 17 March 2020. During the first COVID-19 wave (March-May  
65 2020), intensive care units (ICU) in many areas of Europe were overwhelmed by patients  
66 developing severe hypoxemic pneumonia and acute respiratory distress syndrome (ARDS).  
67 Today, very few COVID-19 contaminated patients have been hospitalized in ICUs thanks to  
68 vaccination and less virulent variants (COVID-ICU Group on behalf of the REVA Network  
69 and the COVID-ICU Investigators 2021).

70 The aim of this study was to monitor the dissemination of ESBL-E in three ICUs in a French  
71 University hospital for three years (2019 to 2021) using WGS to describe the bacteria  
72 population, their antimicrobial resistance phenotypes, and mechanisms as well as the dynamic  
73 of transmissions among these bacteria. Interestingly, the circulating ESBL-E populations have  
74 been highlighted regarding the pre -and post- ICU COVID management era.

## 75 RESULTS

### 76 *Number of strains, sampling origin and delay of isolation:*

77 A total of 11,952 patients were hospitalized in three ICUs for three years representing 79,777  
78 days of hospitalization. Between the first January 2019 and the 31 December of 2021 a total of  
79 476 unique ESBL-E was isolated from fecal swabs and clinical samples. Among these ESBL-  
80 E 95% (n=443) belonged to *Escherichia coli* (n = 193), *Enterobacter cloacae* complex (n =  
81 126) and *Klebsiella pneumoniae* (n = 124) species which represented the studied strains. The  
82 other species were *Citrobacter freundii* (n = 11), *Klebsiella oxytoca* (n = 7), *Morganella*  
83 *morganii* (n = 4), *Klebsiella aerogenes* (n= 3), *Proteus mirabilis* (n = 2), *Serratia marcescens*  
84 (n=2), *Citrobacter koseri* (n=1), *Klebsiella variicola* (n=1), *Mixta calida* (n = 1) and *Raoultella*  
85 *ornithinolytica* (n = 1). Studied strains were isolated from 419 unique patients with a 64 years-  
86 old median age (min: 0 – max 89) and a males' overrepresentation 70% (n = 274). During their  
87 hospitalization, 22 patients will have more than one ESBL-species isolated. For four patients  
88 the two different ESBL-E were found at the same time, whereas for the eighteen others, EBSL-  
89 E were isolated sequentially. The overall incidence of EBSL-*E. coli*, EBSL-*Kpn* and EBSL-  
90 *Ecc* carriage/infections was 3.7% [CI95% 3,37 – 4,07] of admitted patients and 5.5‰ [CI95%  
91 5,04 – 6,1] days of hospitalization (Table I). The ESBL-E incidence was variable regarding the  
92 departments: 8% of the hospitalized patients in medical ICU had an ESBL-E during their stay  
93 followed by 3.5% and 0.7% in the surgical and neonatal ICUs respectively (Table I). The  
94 majority of ESBL-E was found among patients form surgical ICU (n=243, 55%), followed by  
95 medical ICU (n=180, 40%) and neonatology (n=20, 5%).

96 Regardless the species, ESBL-E were isolated after a median LOS of 7 days (min 0 – max 89);  
97 64% of ESBL-E were hospital acquired (Table I). Interestingly, the delay of isolation for ESBL-  
98 *E. coli* was significantly shorter than the two other species, respectively a median LOS of 1  
99 day versus 12 and 11 days for ESBL-*Ecc* and ESBL-*Kpn* respectively ( $P. < 0,001$ ) (Table I,

100 Figure 1). More than 80% of ESBL-*Ecc* and ESBL-*Kpn* were hospital acquired; twice of ESBL-  
101 *E. coli* (38%) (Table I).  
102 Most of the strains were first isolated from stools, consecutively to a screening carriage test  
103 (83%) followed by urinary samples (5%), respiratory samples (5%) and blood cultures (3%)  
104 (Table I). The proportions of ESBL-*Ecc* were (i) significantly lower than the two other species  
105 in the stools (73% versus 81% and 91% for ESBL-*Kpn* and ESBL-*E. coli* respectively) ( $P. <$   
106  $0,001$ ) and (ii) significantly higher in the respiratory samples (10% versus 5% and 1% for  
107 ESBL-*Kpn* and ESBL-*E. coli* respectively) ( $P. = 0,003$ ) (Table I)

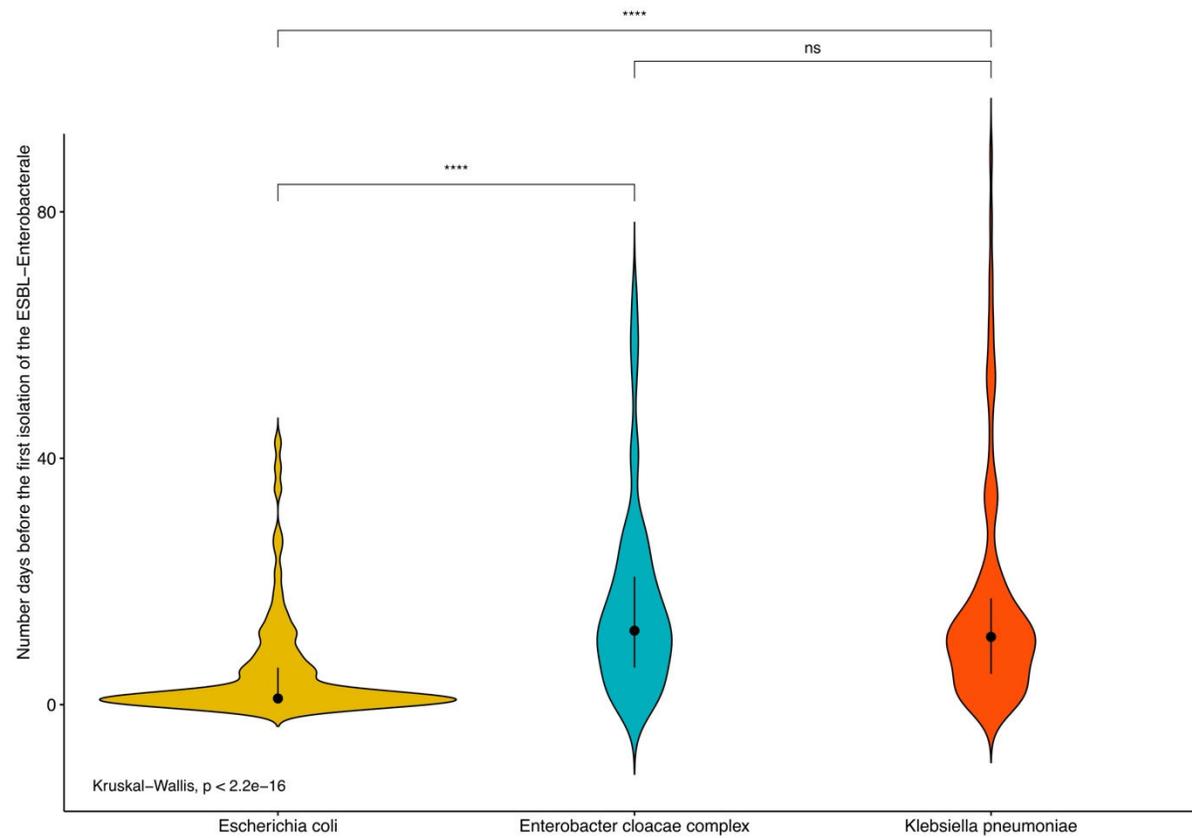
108 Table I: Main Extended Spectrum Beta-Lactamase producers enterobacterales isolated in ICUs, CHU Caen Normandy, France: Incidence,  
 109 community and hospital acquired repartition, samples origin and population diversity regarding the Sequence Type.

	Population overall	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>Incidence</b>				
Overall for 100 Adm - 1000 DoH	3,7 - 5,5	1,6 - 2,4	1 - 1,6	1 - 1,5
Medical ICU 100 Adm - 1000 DoH	8 - 10	3,9 - 4,8	2,5 - 3,1	1,7 - 2,1
Surgical ICU 100 Adm - 1000 DoH	3,5 - 6,5	1,4 - 2,8	0,9 - 1,7	1 - 2
Pediatric ICU 100 Adm - 1000 DoH	0,7 - 0,8	0,1 - 0,1	0,1 - 0,1	0,5 - 0,5
<b>Time of positivity</b>				
delay of EBSL isolation(days) (min -max)	7 (0 - 89)	1 (0 - 43)	12 (0 - 67)	11 (0 - 89)
community acquired	158 (36)	119 (62)	17 (13)	22 (18)
nosocomial acquired	285 (64)	74 (38)	109 (87)	102 (82)
<b>Sample origin<sup>a</sup></b>				
<b>Screening samples:</b>				
Stools	367 (83)	175 (91)	92 (73)	100 (81)
<b>Clinical samples:</b>				
Urines	23 (5)	11 (6)	6 (5)	6 (5)
Respiratory	20 (5)	2 (1)	12 (10)	6 (5)
Blood culture	14 (3)	1 (1)	6 (5)	7 (6)
Pus	11 (2)	4 (2)	5 (4)	2 (2)
Catheter	5 (1)	0	3 (2)	2 (2)
<b>Sequence Types</b>				
Unique ST	112	68	16	28

110 Abbreviations Adm: admission, DoH: Days of Hospitalization, EBSL: Extended Spectrum Beta-Lactamase, ST: Sequence-Type,

111 <sup>a</sup> only sample origins which counted for at least 1% of the samples are described in this table. Number (percentage).

112



113

114 Figure 1: Days of hospitalization before the isolation of the ESBL producing Enterobacterales. Statistical analyses were performed using Kruskal

115 test and Wilcox test respectively

116 ***In silico typing:***

117 *E. coli* strains were split into seven phylogroups: B2 (n=89), A (n=42), D (n=35), B1 (n=14), F  
118 (n=7), E (n=4) and C (n=2) (Supplementary table II). A total of 68 unique STs was found among  
119 *E. coli* strains including 28 ST which were specific to community acquired bacteria that  
120 representing 41% of the diversity of the species. The most frequent ST was ST131 (n=59, 30%),  
121 itself divided into two serotypes O25:H4 (n=46) and O16:H5 (n=13), followed by ST38 (n=10,  
122 5%), ST69 (n=9, 5%), ST1193 (n=7, 4%) and ST4981 (n=6, 3%) (Figure 3-A, supplementary  
123 table III). According to the predominance of the ST131, the most frequent *fimH*-type found was  
124 *fimH31* followed by *fimH27* which is associated with several STs.

125 The *K. pneumoniae* population was spread into 28 ST; ST405 was the predominant  
126 subpopulation (n=51, 41%) followed by ST584 (n=14, 11%) and ST307 (n=11, 9%) (Figure 3-  
127 C, supplementary tables III - IV). The population ST405 harbored the allele *wzi\_143* associated  
128 with the KL\_type KL\_151, but no capsular type was associated with. For 28/51 of these ST405  
129 *in-silico* determination of the O-antigen was O4. The population ST584 had a *wzi\_9* allele  
130 associated with a KL9 phenotype and a K9 capsular phenotype; the O2 antigen *A contrario* was  
131 predicted among 5/14 strains (supplementary table IV).

132 Five species were found among *Ecc* strains: *Enterobacter hormaechei* (n=113, 90%),  
133 *Enterobacter cloacae* (n=10, 8%), *Enterobacter kobei* (n=2, 1%) and *Enterobacter ludwigii*  
134 (n=1, 1%). *E. hormaechei* strains belonged to the Hoffman *hsp60* cluster C6 (n=79, 70%),  
135 followed by C3 (n=22, 19%), C8 (n= 11, 10%) and C14 (n = 1) (supplementary table V). All  
136 the *E. cloacae* belonged to the Hoffman *hsp60* cluster C11, the two *E. kobei* to the C2 cluster  
137 while the only *E. ludwigii* to the C5 cluster. *Ecc* strains had the less diverse population studied  
138 with only 18 unique ST. More than half of the ESBL-*Ecc* population belonged to the ST66  
139 subpopulation (n=67, 53%). The other frequent subpopulations within this species were ST78

140 (n=11, 9%), ST114 (n=10, 8%) and ST167 (n=9, 7%) (Figure 3-B, supplementary tables III -  
141 V).

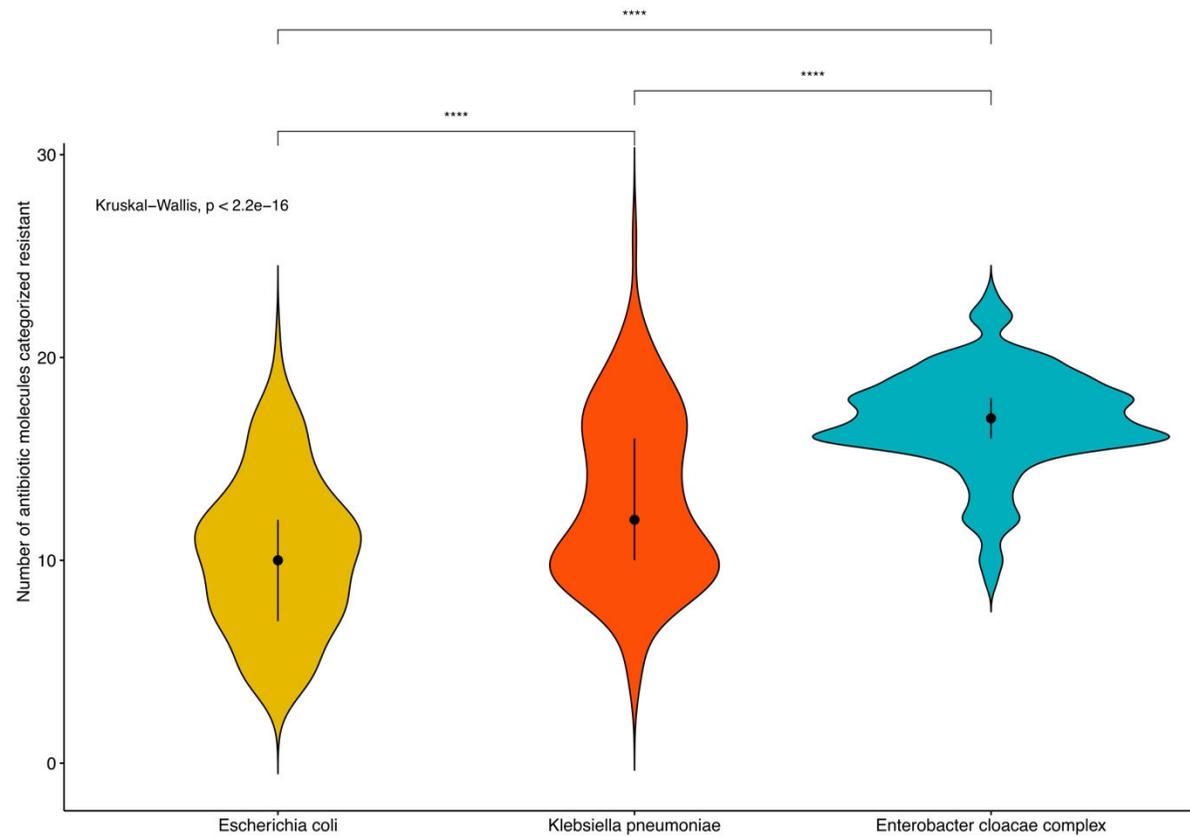
142

### 143 **Antibiotic resistance and resistome**

144 ESBL-E were on average resistant to three antibiotics classes including the  $\beta$ -lactams (min 1 –  
145 max 6), and twelve molecules (min 3 – max 26). The most effective non- $\beta$ -lactams molecules  
146 were tigecycline and colistin with a susceptibility percentage (S%) of 99% and 98%  
147 respectively (Table II).

148 ESBL-*E. coli* were significantly less resistant than the two other species regarding both, the  
149 number of antibiotic classes and molecules lost ( $P. < 0.001$ , both). Indeed, the median number  
150 of resistant classes and molecules among ESBL-*E. coli* were two and ten versus four and  
151 seventeen for ESBL-*Ecc* and three and twelve for ESBL-*Kpn* (Figure 2).

152 Regarding the  $\beta$ -lactamases, ESBL-E carried a median of two genes including these most  
153 frequent associations: *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub> (n=143, 32%) followed by *bla*<sub>CTX-M-15</sub>,  
154 *bla*<sub>TEM-1B</sub> (n=73, 16%) and *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> (n= 24, 5%). *bla*<sub>CTX-M-15</sub> represented the most  
155 frequent ESBL encoding gene found (n=309, 68%), followed by *bla*<sub>CTX-M-27</sub> (n=34, 7%) and  
156 *bla*<sub>SHV-12</sub> (n=29, 6%). The ESBL encoding genes repartition was inhomogeneous within the  
157 three species. Indeed, at the exception of *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, the others *bla*<sub>CTX-M</sub>- variants were nearly  
158 exclusively recovered among *E. coli* strains. The *bla*<sub>SHV-12</sub> and *bla*<sub>SHV-2</sub> were significantly  
159 more frequent among *Ecc* and *Kpn* strains respectively ( $P. < 0,001$ , both) (Supplementary table  
160 VI).



161

162 Figure 2: Distribution of the number of antibiotic molecules categorized as resistant according to the 2021 CASFM EUCAST breakpoints within  
 163 the ESBL producing Enterobacterales studied. Statistical analyses were performed using Kruskal test and Wilcox test respectively

164 Interestingly, five strains, one *E. coli* producing TEM-3 and four *K. pneumoniae* producing  
165 SHV-2 were categorized Susceptible Increased Exposure (SIE) to ceftazidime and were *sticto*  
166 *sensus* nonresistant to 3GC (supplementary table VII). Ceftriaxone was the most frequent  
167 hydrolyzed broad-spectrum cephalosporin (96%), followed by ceftazidime (81%) and cefepime  
168 (62%) (Table II). A third and nine out of ten ESBL-E were resistant to piperacillin-tazobactam  
169 and aztreonam respectively (Table II).

170 Carbapenem remained a very effective class with a susceptible rate of 98%. Ten strains were  
171 resistant to ertapenem: one *E. coli* and one *Kpn* were also carbapenemase producers (*bla*<sub>OXA-244</sub>  
172 and *bla*<sub>OXA-48</sub>), four *Ecc* and two *Kpn* strains presented mutations within the *ramAR* operon  
173 likely responsible to a porin OmpF down regulation (supplementary table VII). Regarding the  
174 new associations  $\beta$ -lactam associated to  $\beta$ -lactamases inhibitor, all the strains were susceptible  
175 to ceftazidime-avibactam but 56 strains (*Ecc* = 30, *Kpn* = 21 and *E. coli* = 5) were resistant to  
176 ceftolozane-tazobactam (Table II, supplementary table VII). A third of the strains were resistant  
177 to mecillinam while temocillin presented a very low rate of resistance: 7% (Table II).

178 The most frequent aminoglycosides resistant encoding genes encountered were *aph(6)-Id*  
179 (n=289, 25%), *aph(3'')-Ib* (n=281, 25%) and *aac(6')-Ib-cr* (n= 175, 15%) (supplementary table  
180 VII). The distribution of genes was quantitatively and qualitatively different regarding the  
181 species. *Kpn* strains only harbored on average one gene per strain with a low diversity: mainly  
182 genes encoding for aminoglycoside phosphotransferases *aph(6)-Id* or *aph(3'')-Ib*. Twenty one  
183 unique genes were found among *E. coli* isolates including four which were specific to this  
184 species: two aminoglycoside nucleotidyltransferases *aadA5* and *aadA22* and two  
185 aminoglycoside phosphotransferases *aph(3')-Ib* and *aph(3')-IIa* , the average number of genes  
186 was three per strain. *Ecc* strains harbored an average number of seven genes per strains. Four  
187 aminoglycoside 6'-N-acetyltransferases were significantly more frequent among this species:  
188 *acc(6')-Ib-cr*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-IIc* and *aac(3)-IIe* (*P.* < 0,001, each). Amikacin was by far

189 the most effective aminoglycoside with S% = 97%, followed by gentamicin (S% = 52%) and  
190 tobramycin (S% = 47%) (Table II)

191 Levofloxacin was the most active fluoroquinolone S% = 66%, followed by norfloxacin S% =  
192 45% and levofloxacin S% = 31% (Table II). The low rate of susceptibility to ciprofloxacin  
193 could be explained by the high prevalence of *acc(6')-Ib-cr* associated to qnrB1 (supplementary  
194 table VI).

195 Table II: Number of strains resistant to antibiotics, percentage of antimicrobial resistance: Overall, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,  
 196 *Enterobacter cloacae* complex  
 197

classes	molecules	number of resistant strains/443)	Overall (%)	<i>Escherichia coli</i> (%)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (%)	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (%)
β-lactams	amoxicillin clavulanic acid	264	60	38	52	100
	ticarcillin clavulanic acid	314	71	51	80	92
	piperacillin tazobactam	132	30	10	40	50
	ceftriaxone	424	96	97	96	94
	ceftazidime	358	81	60	95	98
	cefepime	275	62	50	59	84
	ertapenem	10	2	1	2	5
	imipenem	1	0	0	1	0
	meropenem	2	0	0	2	0
	mecillinam	132	30	17	40	39
	aztreonam	406	92	83	96	100
	temocillin	30	7	6	6	9
	ceftolozane-tazobactam	56	13	3	17	24
	ceftazidime-avibactam	0	0	0	0	0
Aminoglycosides	amikacin	15	3	7	1	0
	gentamicin	215	49	28	37	91
	tobramycin	235	53	31	42	98
Fluoroquinolones	norfloxacin	244	55	48	46	75
	levofloxacin	149	34	44	27	24
	ciprofloxacin	258	69	53	77	88
Others	fosfomicin	27	6	3	10	7
	chloramphenicol	76	17	11	16	27
	cotrimoxazole	314	71	47	85	94
	nitrofurantoin	145	33	2	47	67
	colistin	10	2	1	1	6
	tigecycline	5	1	0	3	1

198

199 **Dissemination of ESBL-E**

200 Crossed transmission processes referred to person to person transmissions and/or  
201 disseminations through environmental reservoirs appended within the three species and inside  
202 the three ICUs. In total, 33 episodes of crossed transmission processes were detected, and 157  
203 strains involved (Table III), meaning that 35% of ESBL-E isolated during the study period were  
204 associated to a crossed transmission process. The number of crossed transmission processes  
205 and the number of strains associated per crossed transmission processes were very different  
206 according to the species.

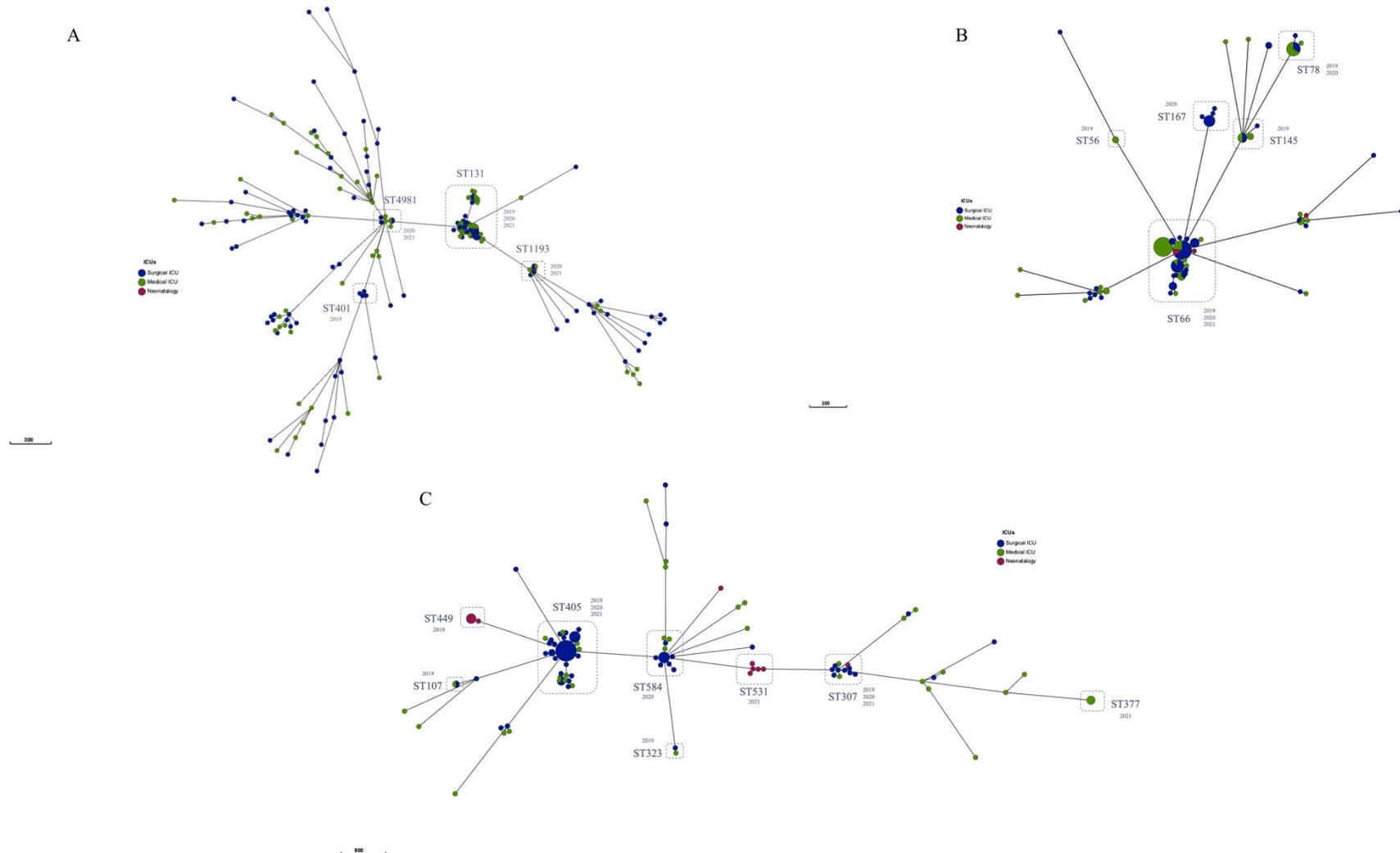
207 For *E. coli*, seven crossed transmission processes were found among four STs, ST131 (n=3),  
208 ST4981 (n=2), ST1193 (n=1), ST401 (n=1), a total of 18 strains were involved (Table III,  
209 Figure 3-A). For *Ecc*, the number of crossed transmission processes was twice higher than *E.*  
210 *coli* (n=15). Crossed transmission processes occurred in a limited number of STs, ST66 (n=9),  
211 ST73 (n=3), ST167, ST145, ST56 (n=1, each) (Table III, Figure 3-B). A total of 64 strains was  
212 associated with crossed transmission processes representing more than half of the total of  
213 ESBL-*Ecc* (51%). For *Kpn*, eleven crossed transmission processes were detected among eight  
214 different STs, ST405 (n=2), ST307 (n=3), ST584, ST449, ST531, ST377, ST107 and ST323  
215 (n=1, each) (Table III, Figure 3-C). A total of 75 strains were associated with crossed  
216 transmission processes represented 60% of the whole ESBL-*Kpn* isolated for three years.

217 The incidence of isolated ESBL strain per 1000 days of hospitalization was highest for *E. coli*,  
218 overall: 2,42 ‰ versus 1,5 ‰ for both ESBL-*Kpn* and ESBL-*Ecc* (Table IV). However, the  
219 incidence of EBSL-E associated to crossed transmission processes per 1000 days of  
220 hospitalization was the highest for *Kpn* (0,94 ‰), followed by *Ecc* (0,8 ‰) and *E. coli* (0,23  
221 ‰) (Table IV). This means that, despite that ESBL-*E. coli* represent the highest pressure of  
222 ESBL strains within the three ICUs studied, this species is rarely associated with crossed  
223 transmission processes.

224 Table III Number of cross transmissions processes observed, number of strains involved, metrics from the SNP calling realized  
 225

Species	ST	Number of strains	Cross Transmission phenomena	Number of strains involved in CRP	SNP average within the ST	Median SNP within the ST	Minimal number of SNP	Maximal number of SNP
<i>Ecc</i>	ST66	67	9	48	61	25	0	340
	ST78	11	3	7	65	12	0	316
	ST167	9	1	5	6	6	0	17
	ST145	7	1	2	282	16	0	1236
	ST56	2	1	2	2	2	0	2
<i>Kpn</i>	ST405	51	2	41	171	8	0	634
	ST584	14	1	13	5	3	0	22
	ST307	11	3	6	96	109	0	150
	ST449	6	1	6	3	2	0	6
	ST531	5	1	2	16	16	3	23
	ST377	3	1	3	1	1	0	1
	ST107	2	1	2	6	6	6	6
	ST323	2	1	2	6	6	6	6
<i>E. coli</i>	ST131	59	3	9	3472	420	0	9110
	ST1193	7	1	2	983	93	0	3297
	ST4981	6	2	5	20	24	0	29
	ST401	4	1	2	28	28	6	50

226  
 227 Abbreviations: *Ecc* *Enterobacter cloacae* complex, *Kpn* *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* *Escherichia coli*



228

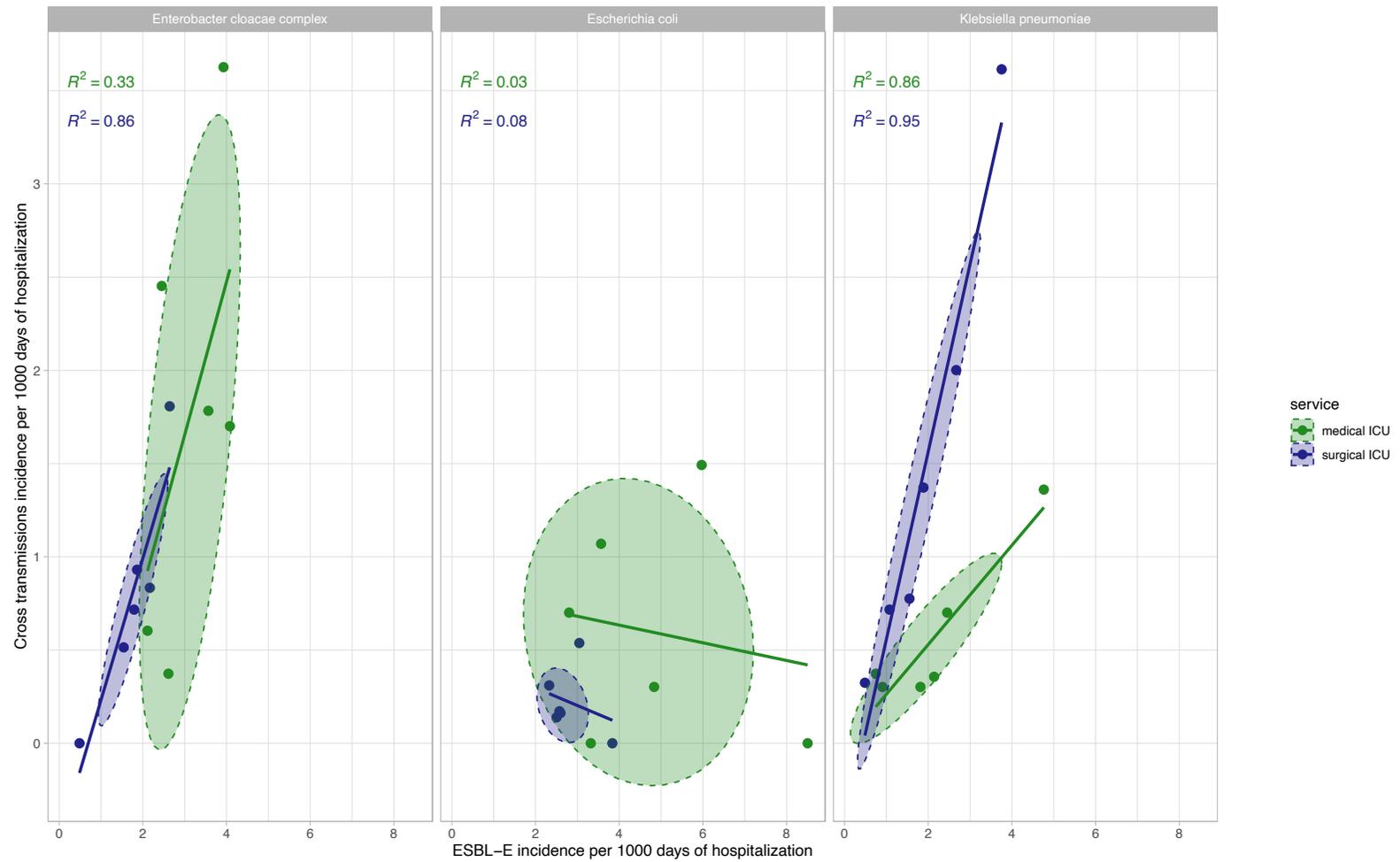
229 Figure 3: core genome MLST analyses of the three species studied. *Escherichia coli* (A), *Enterobacter cloacae* complex (B) and *Klebsiella*  
 230 *pneumoniae* (C). Sequences-types (ST) involved in cross transmission processes were surrounded by dotted lines. Years of cross transmission  
 231 processes was mentioned near to the STs. Circles are colored according to the type of ICU.

232 In neonatology, the incidence of ESBL-E and crossed transmission processes was too low to  
233 draw a conclusion (Table IV). Nevertheless, the spread of the three species was studied in both  
234 adults' ICUs (Table IV). For *Kpn*, the diffusion of ESBL-strains by crossed transmission  
235 processes was correlated with the pressure of this species in both departments ( $R^2 = 0.95$  and  
236  $R^2 = 0.86$  in surgical and medical ICU respectively) (Figure 4). The same correlation  
237 relationship was found for *Ecc* strains in surgical ICU ( $R^2 = 0.86$ ). Regarding the medical ICU  
238 and *Ecc*, things appeared more complicated; it seems that there was, overall, a relationship  
239 between the incidence of ESBL-strains and the rate of crossed transmission processes.  
240 Nevertheless, this association is probably not explained by a linear modeling ( $R^2 = 0,33$ ) (Figure  
241 4). For *E. coli* there was a complete absence of relation between the incidence of the ESBL  
242 producing strains and their diffusion through crossed transmission processes (Figure 4 and  
243 Table IV).

244 Table IV: Incidences and their 95% confidence intervals of Extended Spectrum Beta-Lactamases enterobacterales circulation and those involved  
 245 in cross transmissions processes per 1000 days of hospitalization per species. Data are segmented per years between 2019 and 2021, in the whole  
 246 ICUs and per specific department

Species	<i>Enterobacter cloacae complex</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Escherichia coli</i>		
	CRP -1000 DoH	ESBL - 1000 DoH	CRP -1000 DoH	ESBL - 1000 DoH	CRP -1000 DoH	ESBL - 1000 DoH	
Overall	2019	1 [0,6 - 1,4]	1,9 [1,43 – 2,49]	1,5 [1,1 - 2]	2,23 [ 1,71 – 2,85]	0,1 [0 - 0,3]	2,51 [1,96 – 3,17]
	2020	0,6 [0,3 - 0,9]	1,55 [1,1 – 2,12]	0,9 [0,5 - 1,3]	1,47 [1,04 – 2,03]	0,3 [0,1 - 0,6]	2,62 [2,03 – 3,34]
	2021	0,9 [0,5 - 1,3]	1,27 [0,88 – 1,77]	0,4 [0,2 - 0,7]	0,93 [0,6 – 1,38]	0,3 [0,1 - 0,5]	2,13 [1,61 – 2,76]
	All	0,8 [0,62 - 1,02]	1,58 [1,32 - 1,88]	0,94 [0,74 - 1,18]	1,55 [1,29 - 1,85]	0,23 [0,13 - 0,36]	2,42 [2,09 - 2,79]
Medical ICU	2019	1,1 [0,5 - 2,3]	3,04 [1,83 – 4,75]	0,8 [0,3 - 1,9]	2,72 [1,58 - 4,35]	0 [0 - 0,6]	5,76 [4,03 – 7,97]
	2020	1,1 [0,4 - 2,4]	3,1 [1,81 – 4,96]	0,4 [0 - 1,3]	1,46 [0,63 - 2,87]	1,3 [0,5 - 2,6]	4,74 [3,1 – 6,95]
	2021	3,1 [1,9 - 4,8]	3,25 [1,98 – 5,01]	0,5 [0,1 - 1,4]	2,11 [1,12 - 3,61]	0,5 [0,1 - 1,4]	3,89 [2,5 – 5,79]
	All medical ICU	1,79 [1,22 - 2,52]	3,13 [2,36 - 4,06]	0,56 [0,27 - 1,03]	2,12 [1,5 - 2,91]	0,56 [0,27 - 1,03]	4,8 [3,84 - 5,93]
Surgical ICU	2019	1,4 [0,8 - 2,2]	2,27 [1,54 – 3,23]	2,3 [1,5 - 3,2]	2,71 [1,91 – 3,74]	0,2 [0 - 0,6]	2,24 [1,67 – 3,40]
	2020	0,7 [0,3 - 1,3]	1,86 [1,17 – 2,82]	1,7 [1 - 2,6]	2,28 [1,5 – 3,32]	0,1 [0 - 0,5]	3,21 [2,27 – 4,41]
	2021	0,3 [0,1 - 0,9]	1,11 [0,59 – 1,89]	0,5 [0,2 - 1,1]	0,77 [0,35 – 1,46]	0,3 [0,1 - 0,9]	2,81 [1,93 – 3,95]
	All surgical ICU	0,83 [0,57 - 1,18]	1,77 [1,37 - 2,26]	1,53 [1,16 - 1,98]	1,96 [1,54 - 2,47]	0,22 [0,09 - 0,42]	2,8 [2,28 - 3,39]
Neonatology	2019	0,1 [0 - 0,7]	0,38 [0,08 – 1,10]	0,8 [0,3 - 1,6]	1 [0,43 – 1,98]	0 [0 - 0,5]	0,13 [0 – 0,7]
	2020	0 [0 - 0,5]	0 [0 – 0,47]	0 [0 - 0,5]	0,26 [0,03 – 0,92]	0 [0 - 0,5]	0,26 [0,03 – 0,92]
	2021	0 [0 - 0,4]	0,11 [0 – 0,63]	0,2 [0 - 0,8]	0,34 [0,07 – 0,99]	0 [0 - 0,4]	0 [0 – 0,42]
	All neonatology	0,04 [0 - 0,23]	0,16 [0,04 - 0,42]	0,32 [0,14 - 0,64]	0,53 [0,28 - 0,9]	0 [0 - 0,15]	0,12 [0,03 - 0,36]

247 Abbreviations CRP crossed transmission processes, DoH: Days of Hospitalization, ESBL: Extended Spectrum Beta-Lactamase, ICU intensive care unit



248

249 Figure 4: Relationship between incidence of the circulation of ESBL-E and the incidence of the crossed transmission processes observed. Results  
 250 are presented by species and by type of ICU.

## 251 **ESBL cross-transmissions during the pre/post ICU COVID management era**

252 We have looked at ESBL-E incidence between the three periods: 1<sup>st</sup> January to 31<sup>st</sup> December  
253 of 2019 (considered as pre-era of COVID-19), 1<sup>st</sup> January to 31<sup>st</sup> December of 2020 (COVID-  
254 19 with ARDS era) and 1<sup>st</sup> January to 31<sup>st</sup> December of 2021 (post-era of ARDS COVID-19),  
255 we have notified some significant differences in ESBL-E circulation and crossed transmission  
256 processes frequencies.

257 The circulation of ESBL-E was less important for the three species in the post-covid era  
258 comparing to the pre-covid (Table IV). Differences were no significative for ESBL-*Ecc* and  
259 ESBL-*E. coli*: 1,9‰ to 1,27‰ and 2,51‰ to 2,13‰ respectively (Table IV). Nevertheless, the  
260 circulation of ESBL-*Kpn* dropped significantly between the two periods 2,23‰ to 0,93‰ ( $P.$   
261  $< 0,001$ ) (Table IV). It appeared that the dynamics of ESBL-E were different within the  
262 different ICUs. Indeed, both ESBL-*Ecc* and ESBL-*Kpn* incidences dropped significantly in  
263 the surgical ICU (Table IV) between the pre-covid and post-covid era ( $P. = 0,026$  for ESBL-  
264 *Ecc* and  $P. < 0,001$  for ESBL-*Kpn*). At the same time, the number of days of hospitalization  
265 dropped from 13639 in 2019 to 11732 in 2021 in the surgical ICU. No significative differences  
266 were observed within the two other ICUs.

267 Considering the crossed transmission processes, the diminution of ESBL-*Kpn* incidence,  
268 overall and in surgical ICU specifically, went hand in hand with a significative diminution of  
269 crossed transmission processes observed between pre- and post-covid era ( $P. < 0,001$  in both  
270 situation). There was also a significative reduction of crossed transmission processes for ESBL-  
271 *Ecc* in the surgical ICU ( $P. = 0,005$ ).

272 In the medical ICUs, the covid specific department, things went different. First, there was no  
273 modification of ESBL-E incidences during the three periods for any species. Moreover, there was  
274 a significantly increased of crossed transmission processes for ESBL-*E. coli* 0‰ to 1,3‰ ( $P.$   
275  $= 0,014$ ) during the covid period (Table IV). In this same department, there was a significantly

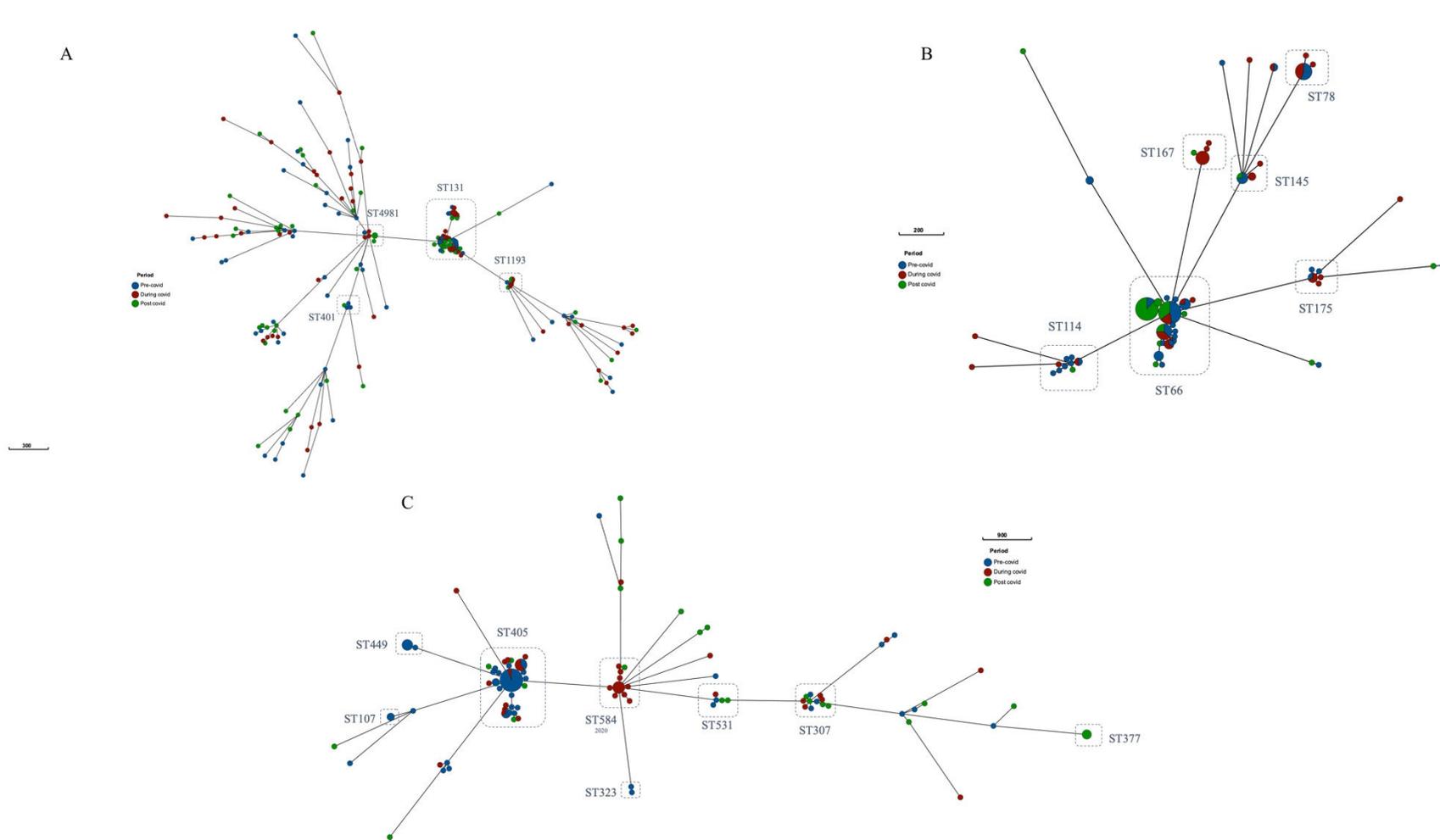
276 increased of ESBL-*Ecc* crossed transmission processes after the covid period: 1,1‰ to 3,1‰  
277 ( $P. = 0,021$ ). In this covid ICUs days of hospitalization changed from 6253 in 2019, 5477 in  
278 2020 and 6160 in 2021.

279 The changes of the ESBL-E circulations and crossed transmission processes were associated to  
280 modifications within the STs isolated among the species.

281 For *ESBL-Kpn*, there was a drastic diminution of the pre-covid endemic clone ST405 ( $n = 35$  pre-  
282 ,  $n = 12$  during,  $n = 4$  post-covid era) (Figure 5). New STs were found such as ST584 (Figure  
283 5). Among the 28 ST unique ST inside the *ESBL-Kpn* population only 7 (25%) were constant  
284 regardless the study period. Thirteen (46%) STs were isolated among *ESBL-Kpn* since the covid  
285 period suggesting an important switch of population in *K. pneumoniae* (Figure 5).

286 Regarding *ESBL-Ecc*, things are different; the ST66 clone remained the main source of *ESBL-*  
287 *Ecc* dissemination regardless the period; 52% of the whole population in the pre-covid era, 28%  
288 during the pandemic and 81% in the post-covid era (Figure 5). In addition, ST114 and ST145  
289 were also isolated in the three studied periods (Figure 5).

290 For *ESBL-E. coli*, ST131 was the main population isolated during the whole study. Among the  
291 70 unique ST found in the *ESBL-E. coli*, only six (9%) were isolated in the three periods. The  
292 diversity of *ESBL-E. coli* was nearly constant through the study: 19 STs were specific to the  
293 pre-covid era, 10 specific to the covid era and 14 specific to post covid era. Meaning in each  
294 period count for 27%, 14% and 20% of the whole species respectively (Figure 5).



295

296 Figure 5: core genome MLST analyses of the three species studied. *Escherichia coli* (A), *Enterobacter cloacae* complex (B) and *Klebsiella*  
 297 *pneumoniae* (C). Main frequent Sequence-types (ST) isolated among the species were surrounded by dotted lines. Circles are colored according to  
 298 the period of isolation: pre-, during-, and post-covid.

## DISCUSSION

In this study, which was conducted over a 3-years period, between 2019 and 202 in three ICUs, *E. coli* was the most frequent ESBL-E encountered as previously described (Robin et al. 2017). The spread of ESBL-*E. coli* in the community was highlighted by the fact that less than 40% of these strains were considered as hospital acquired while the other species were represented by hospital associated ESBL-clones. Stools was the most frequent sample origin of the ESBL strains but around 20% of ESBL-*Kpn* and 25% of ESBL-*Ecc* were first isolated among clinical samples.

Regarding the whole resistance to antibiotics tested of all the 443 ESBL-E selected, the most effective molecules were the new association ceftazidime-avibactam (100% of strains were still susceptible), carbapenems (98%) and amikacin (97%). Piperacillin-tazobactam could not be used if the patient has any ESBL-E risk factor due to a third of the strains were resistant; its resistant rate was much higher than a study performed in Spain on ESBL-E (Morosini et al. 2006). Amikacin appeared as the only available aminoglycoside to use during the probabilistic antibiotic therapy while fluoroquinolones are not an option anymore; this is in accordance with previously published studies (Glupczynski et al. 2007; Morosini et al. 2006). Note the low rate of resistance to temocillin which could be an alternative to carbapenems for the treatment of urinary tract infections caused by ESBL-E (Glupczynski et al. 2007; Delory et al. 2021).

This study highlighted that, the different abilities of the three ESBL-E to spread into a hospital environment and more precisely in intensive care units was inhomogeneous. Even if *E. coli* was the most frequent ESBL-E encountered, very few cross transmission processes have been found. The low transmissibility rate of *E. coli* was in accordance with two previous studies (Cholley et al. 2013; Harris et al. 2007; Gurieva et al. 2018). At the opposite, the high transmissibility of *Kpn* was also pointed out (Gurieva et al. 2018; Cholley et al. 2013). However, there was a lack of data regarding ESBL-*Ecc* which is, overall, the second most

frequent species associated with crossed transmission processes with an incidence of 0,8 crossed transmission processes for 1000 days of hospitalization.

ESBL-*Ecc* was more likely to spread within the medical ICU, while ESBL-*Kpn* was more associated with crossed transmission processes into the surgical ICU. The most successful populations within ESBL-*Ecc* were ST66, ST78, ST145 which were previously recognized as high epidemic potential clones (Izdebski et al. 2015). Among ESBL-*Kpn* strains, the most circulating clones were ST405, ST584 and ST307. Except for ST584 that is very rare, the two other clonal populations have been described elsewhere: ST405 appeared to be associated with the spread of the carbapenemase *bla*<sub>OXA-48</sub> and is also responsible for outbreaks in Spain (Gijón et al. 2020; Machuca et al. 2016); while ST307 was associated with the ESBL CTX-M-15 and with numerous carbapenemases such as *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, and *bla*<sub>VIM</sub> (Peirano et al. 2020).

Regarding a potential correlation between ESBL-E incidence and high-level cross-transmissions between patients, there was none for *E. coli*, but more clearly existed for ESBL-*Kpn* in both medical and surgical ICUs. The same observations were performed for ESBL-*Ecc* in surgical ICU and to a lesser content in the medical ICU.

Finally, the covid pandemic had a huge impact on the ESBL-E circulations in our ICUs. First, the incidence of the two hospital-acquired species *Kpn* and *Ecc* dropped during the pandemic: 35% for *Kpn* and 19% for *Ecc*. This suggested that the reinforcement of infection control procedures had an impact on both, the circulation of ESBL-E and the crossed transmission processes which were incident before the pandemic. Moreover, it's appeared that the diminution of incidences was more important for (i) ESBL-*Kpn*, (ii) into the surgical ICU. This suggested that ESBL-*Kpn* could be more sensitive to infection control procedures than ESBL-*Ecc*. New STs were found among ESBL-*Kpn*, suggesting a subpopulation switch in this species, while ESBL-*Ecc* still spread through the same former STs making them endemic.

Into the surgical ICU, the diminution of both ESBL-*Kpn* and ESBL-*Ecc* was associated with a drop in the number of admissions and the number of days of hospitalization. It could be hypothesized that, below a threshold of patients and turnover into an ICU, the dissemination of ESBL-*Kpn* and ESBL-*Ecc* is deeply slowed. Finally, the pandemic period was the only one for which, the incidence of crossed transmission processes for ESBL-*E. coli* was the highest of the three species into the dedicated covid ICU (medical ICU). These data could be explained by the pressure inside this department which overwhelmed the medical staff and caused some limited but unusual for *E. coli*.

## CONCLUSION

ESBL-E are a burden for public health, especially among patients hospitalized in ICUs for which the incidences of both, circulation and crossed transmission processes were high. Regardless the species, there were many associated antimicrobial resistances; as the consequence there was few alternatives to carbapenems.

The diversity within the ESBL-*E.coli* was high which could be explained by its community origin. At the opposite, numbers of STs were three time lower for ESBL-*Kpn* and ESBL-*Ecc*; moreover, they were mainly hospital associated.

Circulation of ESBL-E was not homogenous but dependent of the species and the type of ICUs considered. ESBL-*E. coli* was the most frequent encountered species but it was almost never associated with crossed transmissions processes. The dissemination occurred within international highly successful clones such as ST405 and ST307 for ESBL-*Kpn* and ST66 and ST78 for ESBL-*Ecc*. The covid-19 pandemic and the increased of infection control procedures had the most consequences for the dissemination of ESBL-*Kpn* which drastically decreased, while ESBL-*Ecc* circulation stayed endemic regardless the study period.

Further studies are needed to understand the genomics and phenotypic traits of the successful clones. Moreover, the difference *E. coli* and other species regarding their ability to spread need to be investigated. Finally, the genomic surveillance system will continue to monitor the dissemination of the EBSL-E to evaluate if the short post pandemic consequences will be stable in the long term.

## **METHODS**

### ***ESBL producing Enterobacterales detection:***

The teaching hospital of Caen is a 1412 beds and counts three ICUs with 20 beds for each. Every patient hospitalized in medical, surgical, or neonatology/pediatric ICU is, at his admission and then weekly screened, for ESBL-E carriage using rectal swabs which is plate on selective agar (CHROMOID ESBL, Biomerieux, Marcy l'étoile, Auvergne-Rhône-Alpes, France). The species of any colony that growth on the media is determined using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Fly mass spectrometry method (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA). If the bacteria belonged to the *Enterobacterales*, the presence of an ESBL encoding enzyme is confirm using the Combination Disk Test (CDT) according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines (<https://eucast.org/>). At the same time, the detection of an ESBL encoding enzyme is performed using the CDT on any clinical *Enterobacterale* which is non-susceptible to at least one third generation cephalosporin tested.

### ***Patient and strains inclusions:***

From the first January 2019 to the 31<sup>st</sup> of December 2021, the first isolation of an ESBL producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* or *Enterobacter cloacae* complex among patients from the three ICUs was collected for further phenotypic and genomic characterizations. Patient was included in the study and epidemiology data were gathered: sex, date of birth, date of hospitalization, collection date, department, nature of sampling.

### ***Antibiograms:***

Antimicrobial susceptibility testing was performed on each strain using both disk diffusion and broth dilution methods. Inhibition diameters were determined regarding fifteen molecules:

ampicillin, ampicillin – clavulanic acid, ticarcillin, ticarcillin - clavulanic acid, mecillinam, cefalexin, cefoxitin, ceftriaxone, norfloxacin, levofloxacin, tobramycin, trimethoprim, fosfomycin, nitrofurantoin, chloramphenicol. At the same time Minimum Inhibitory concentrations (MICs) of sixteen molecules have been tested using the Sensititre FRAMgGN plates (ThermoFisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's instructions: piperacillin – tazobactam, ceftazidime, cefepime, ceftolozane – tazobactam, ceftazidime – avibactam, aztreonam, temocillin, ertapenem, imipenem, meropenem, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, colistin, cotrimoxazole and tigecycline. Diameters and MICs were interpreted according the “*Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*” CA-SFM EUCAST 2021 recommandations.

***Community and hospital acquired bacteria:***

Bacteria have been considered as hospital acquired if they were isolated after 48 hours of hospitalization. Otherwise, there were considered as community acquired bacteria.

***Whole genome sequencing:***

Whole genome sequencing was carried out in the “*Plateforme de microbiologie mutualisée*” (p2m) from the Pasteur International Bioresources network (PIBNet; Institut Pasteur, Paris, France). DNA extraction was performed using the Magna pure 96 instrument (Roche Diagnostic). Then the libraries were prepared using the Nextera XT kit (Illumina) and the DNA sequencing was performed using the Nextseq 500 system generating 150 pb paired end reads.

***In silico assembly and typing:***

Adapters sequences as well as reads for which the average Phred score was below than 28 and/or shorter than 70 nucleotides were removed from the fastq files using Alientrimmer

(Criscuolo et Brisse 2013). The quality of the cleaned fastq files was checked using the fastqc software (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Genomes were *de novo* assembled using SPAdes v3.12 with the recommended kmer sizes for 150 pb Illumina reads (Bankevich et al. 2012). Assemblies were evaluated using Quast (Gurevich et al. 2013). Species of the sequenced genomes were determined using the rMLST method (Jolley et al. 2012). Sequence Type (ST) was attributed using appropriate Multi-Locus Sequence Type (MLST) schemes (Diancourt et al. 2005; Miyoshi-Akiyama et al. 2013; Wirth et al. 2006). Acquired resistance genes and point mutations were looked for using ResFinder and RGI databases respectively (Alcock et al. 2019; Zankari et al. 2012). Carried plasmids were determined using PlasmidFinder database (Carattoli et al. 2014). For *E. coli* genomes, the serotype was determined using SerotypeFinder 2.0 at the default parameters (Joensen et al. 2015) whereas the phylogroup was determined using ClermonTyping method (Beghain et al. 2018). The cluster appurtenance for the ECC strains was *in silico* attributed regarding the partial sequence of *hsp60* (Hoffmann et Roggenkamp 2003). For *K. pneumoniae*, the capsular phenotype was *in silico* predicted studying the *wzi* gene as previously described (Brisse et al. 2013). While the O antigen locus was analyzed using Kaptive(Wick et al. 2018).

### **Core genome MLST (cgMLST) approaches:**

To have an overview of the bacterial distribution among the population studied, a cgMLST approached has been done for the three species. Two publicly available cgMLST schema were used. One provided by cgMLST.org for *K. pneumoniae* (<https://www.cgmlst.org/ncs/schema/>); the second came from Enterobase (Zhou et al. 2020) for *E. coli* ([https://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/download\\_data](https://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/download_data)). A homemade cgMLST was created for *Enterobacter cloacae* strains that comprised 659 genes and 298190 unique alleles (see additional methods). Regardless the species, allele calling was performed using

chewBBACA version 2.8.4 (Silva et al. 2018) on computing resources provided by CRIANN (Normandy, France). cgMLST analyses have been done using exclusively loci that had no missing alleles called. Distance matrix have been computed using personal scripts. Minimal spanning trees were created from the allele calling results using the MSTree V2 algorithm implemented in graptree software (Zhou et al. 2018). Visualization and annotation of data was also performed using grapetree.

### ***Cross transmission processes:***

Genomes of the strains which belonged to the same species and same ST were further analyzed to detect person to person and/or environmental transmissions. For each ST, a reference genome which belonged to the same ST was downloaded from ncbi RefSeq. If several reference genomes were available, the sequencing technology (short/long reads), the assembly quality (Number of contigs, L50, Number of N per 100 kbs) were studied to make a chose. When no appropriate ST was found other databases have been used Enterobase (*E.coli*), bigsdb Pasteur *Klebsiella pneumoniae* (<https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/>) and PATRIC database (*ECC*) (O’Leary et al. 2016; Wattam et al. 2017). All the reference genomes used are summarized in (supplementary Table). The snippy pipeline (<https://github.com/tseemann/snippy>) was used to study variants between the strains. Person to Person transmission was considered as attested for any strains which were not distant from each other for more than ten Single Nucleotide Polymorphism (SNP) for *E. coli* and *K. pneumoniae*, a threshold of five SNP was used for *Ecc* strains.

### ***Statistical analyses:***

Statistical analyses were performed using pandas version 0.24.1(<https://pandas.pydata.org/>) and scipy version 1.2.1. For each variable, descriptive statistics were calculated (percentages,

median, minimum, maximum). Categorical variables were compared with the Chi2 test or the Fisher exact test depending on calculated values. Numerical variables were compared with the non-parametric Mann-Whitney test. To compare the rate ratio between incidences, the R package epiR was used. A *P. value* inferior to 0.05 was considered as significant.

## BIBLIOGRAPHY

- Alcock, Brian P, Amogelang R Raphenya, Tammy T Y Lau, Kara K Tsang, Mégane Bouchard, Arman Edalatmand, William Huynh, et al. 2019. « CARD 2020: Antibiotic Resistance Surveillance with the Comprehensive Antibiotic Resistance Database ». *Nucleic Acids Research*, octobre, gkz935. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>.
- Bankevich, Anton, Sergey Nurk, Dmitry Antipov, Alexey A. Gurevich, Mikhail Dvorkin, Alexander S. Kulikov, Valery M. Lesin, et al. 2012. « SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing ». *Journal of Computational Biology* 19 (5): 455-77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Beghain, Johann, Antoine Bridier-Nahmias, Hervé Le Nagard, Erick Denamur, et Olivier Clermont. 2018. « ClermonTyping: An Easy-to-Use and Accurate *in Silico* Method for *Escherichia* Genus Strain Phylotyping ». *Microbial Genomics* 4 (7). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000192>.
- Bernard Stoecklin, Sibylle, Patrick Rolland, Yassoung Silue, Alexandra Mailles, Christine Campese, Anne Simondon, Matthieu Mechain, et al. 2020. « First Cases of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in France: Surveillance, Investigations and Control Measures, January 2020 ». *Eurosurveillance* 25 (6). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000094>.
- Brisse, S., V. Passet, A. B. Haugaard, A. Babosan, N. Kassis-Chikhani, C. Struve, et D. Decré. 2013. « Wzi Gene Sequencing, a Rapid Method for Determination of Capsular Type for Klebsiella Strains ». *Journal of Clinical Microbiology* 51 (12): 4073-78. <https://doi.org/10.1128/JCM.01924-13>.
- Bush, Karen, et George A. Jacoby. 2010. « Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (3): 969-76. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.
- Carattoli, Alessandra, Ea Zankari, Aurora García-Fernández, Mette Voldby Larsen, Ole Lund, Laura Villa, Frank Møller Aarestrup, et Henrik Hasman. 2014. « *In Silico* Detection and Typing of Plasmids Using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (7): 3895-3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>.
- Cassini, Alessandro, Liselotte Diaz Högberg, Diamantis Plachouras, Annalisa Quattrocchi, Ana Hoxha, Gunnar Skov Simonsen, Mélanie Colomb-Cotinat, et al. 2019. « Attributable Deaths and Disability-Adjusted Life-Years Caused by Infections with Antibiotic-Resistant Bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A Population-Level Modelling Analysis ». *The Lancet Infectious Diseases* 19 (1): 56-66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4).
- Cholley, P., M. Thouverez, H. Gbaguidi-Haore, M. Sauget, C. Slekovec, X. Bertrand, D. Talon, et D. Hocquet. 2013. « Hospital Cross-Transmission of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 43 (8): 331-36. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.06.001>.
- COVID-ICU Group on behalf of the REVA Network and the COVID-ICU Investigators. 2021. « Clinical Characteristics and Day-90 Outcomes of 4244 Critically Ill Adults with COVID-19: A Prospective Cohort Study ». *Intensive Care Medicine* 47 (1): 60-73. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06294-x>.

- Criscuolo, Alexis, et Sylvain Brisse. 2013. « AlienTrimmer: A Tool to Quickly and Accurately Trim off Multiple Short Contaminant Sequences from High-Throughput Sequencing Reads ». *Genomics* 102 (5-6): 500-506. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2013.07.011>.
- De Angelis, Giulia, Paola Del Giacomo, Brunella Posteraro, Maurizio Sanguinetti, et Mario Tumbarello. 2020. « Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of  $\beta$ -Lactam Resistance in Enterobacteriaceae ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (14): 5090. <https://doi.org/10.3390/ijms21145090>.
- Delory, Tristan, Simon Gravier, Diane Le Pluart, Géraldine Gaube, Soline Simeon, Benjamin Davido, Emilie Piet, Raphaël Lepeule, Philippe Lesprit, et Matthieu Lafaurie. 2021. « Temocillin versus Carbapenems for Urinary Tract Infection Due to ESBL-Producing Enterobacteriaceae: A Multicenter Matched Case-Control Study ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 58 (1): 106361. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106361>.
- Diancourt, L., V. Passet, J. Verhoef, P. A. D. Grimont, et S. Brisse. 2005. « Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella Pneumoniae* Nosocomial Isolates ». *Journal of Clinical Microbiology* 43 (8): 4178-82. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005>.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. 2020. « Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net) Annual Epidemiological Report for 2020 », 34.
- Gijón, Desirée, Ana P. Tedim, Aránzazu Valverde, Irene Rodríguez, María-Isabel Morosini, Teresa M. Coque, Marina Manrique, et al. 2020. « Early OXA-48-Producing *Enterobacteriales* Isolates Recovered in a Spanish Hospital Reveal a Complex Introduction Dominated by Sequence Type 11 (ST11) and ST405 *Klebsiella Pneumoniae* Clones ». Édité par Patricia A. Bradford. *MSphere* 5 (2): e00080-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00080-20>.
- Glupczynski, Y., T.-D. Huang, C. Berhin, G. Claeys, M. Delmée, L. Ide, G. Ieven, et al. 2007. « In Vitro Activity of Temocillin against Prevalent Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing Enterobacteriaceae from Belgian Intensive Care Units ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 26 (11): 777-83. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0370-9>.
- Gurevich, Alexey, Vladislav Saveliev, Nikolay Vyahhi, et Glenn Tesler. 2013. « QUAST: Quality Assessment Tool for Genome Assemblies ». *Bioinformatics* 29 (8): 1072-75. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
- Gurieva, Tanya, Mirjam J D Dautzenberg, Marek Gniadkowski, Lennie P G Derde, Marc J M Bonten, et Martin C J Bootsma. 2018. « The Transmissibility of Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Intensive Care Units ». *Clinical Infectious Diseases* 66 (4): 489-93. <https://doi.org/10.1093/cid/cix825>.
- Hamprecht, A., A. M. Rohde, M. Behnke, S. Feihl, P. Gastmeier, F. Gebhardt, W. V. Kern, et al. 2016. « Colonization with Third-Generation Cephalosporin-Resistant Enterobacteriaceae on Hospital Admission: Prevalence and Risk Factors ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71 (10): 2957-63. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw216>.
- Harris, Anthony D., Mamuka Kotetishvili, Simone Shurland, Judy A. Johnson, J. Glenn Morris, Lucia L. Nemoy, et J. Kristie Johnson. 2007. « How Important Is Patient-to-Patient Transmission in Extended-Spectrum  $\beta$ -

- Lactamase Escherichia Coli Acquisition ». *American Journal of Infection Control* 35 (2): 97-101. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.09.011>.
- Hoffmann, H., et A. Roggenkamp. 2003. « Population Genetics of the Nomenclature Species Enterobacter Cloacae ». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (9): 5306-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5306-5318.2003>.
- Izdebski, R., A. Baraniak, M. Herda, J. Fiett, M. J. M. Bonten, Y. Carmeli, H. Goossens, et al. 2015. « MLST Reveals Potentially High-Risk International Clones of Enterobacter Cloacae\* ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (1): 48-56. <https://doi.org/10.1093/jac/dku359>.
- Joensen, Katrine G., Anna M. M. Tetzschner, Atsushi Iguchi, Frank M. Aarestrup, et Flemming Scheutz. 2015. « Rapid and Easy *In Silico* Serotyping of Escherichia Coli Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data ». Édité par K. C. Carroll. *Journal of Clinical Microbiology* 53 (8): 2410-26. <https://doi.org/10.1128/JCM.00008-15>.
- Jolley, Keith A., Carly M. Bliss, Julia S. Bennett, Holly B. Bratcher, Carina Brehony, Frances M. Colles, Helen Wimalaratna, et al. 2012. « Ribosomal Multilocus Sequence Typing: Universal Characterization of Bacteria from Domain to Strain ». *Microbiology* 158 (4): 1005-15. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055459-0>.
- Köser, Claudio U, Edward J P Cartwright, Amanda L Ogilvy-Stuart, Claire Chewapreecha, Simon R Harris, Gordon Dougan, Louise J Fraser, et Geoffrey P Smith. 2012. « Rapid Whole-Genome Sequencing for Investigation of a Neonatal MRSA Outbreak ». *The New England Journal of Medicine*, 9.
- Laxminarayan, Ramanan, Adriano Duse, Chand Wattal, Anita K M Zaidi, Heiman F L Wertheim, Nithima Sumpradit, Erika Vlieghe, et al. 2013. « Antibiotic Resistance—the Need for Global Solutions ». *The Lancet Infectious Diseases* 13 (12): 1057-98. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9).
- Levy, Stuart B, et Bonnie Marshall. 2004. « Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses ». *Nature Medicine* 10 (12s): S122-29. <https://doi.org/10.1038/nm1145>.
- Machuca, Jesús, Lorena López-Cerero, Felipe Fernández-Cuenca, Irene Gracia-Ahufinger, Guillermo Ruiz-Carrascoso, Fernando Rodríguez-López, et Álvaro Pascual. 2016. « Characterization of an Outbreak Due to CTX-M-15-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Lacking the *Bla*<sub>OXA-48</sub> Gene Belonging to Clone ST405 in a Neonatal Unit in Southern Spain ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71 (8): 2353-55. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw137>.
- Miyoshi-Akiyama, Tohru, Kayoko Hayakawa, Norio Ohmagari, Masahiro Shimojima, et Teruo Kirikae. 2013. « Multilocus Sequence Typing (MLST) for Characterization of Enterobacter Cloacae ». Édité par Patrick C. Y. Woo. *PLoS ONE* 8 (6): e66358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066358>.
- Morosini, María-Isabel, María García-Castillo, Teresa M. Coque, Aránzazu Valverde, Ângela Novais, Elena Loza, Fernando Baquero, et Rafael Cantón. 2006. « Antibiotic Coresistance in Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and *In Vitro* Activity of Tigecycline ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (8): 2695-99. <https://doi.org/10.1128/AAC.00155-06>.
- Murray, Christopher JL, Kevin Shunji Ikuta, Fablina Sharara, Lucien Swetschinski, Gisela Robles Aguilar, Authia Gray, Chieh Han, et al. 2022. « Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis ». *The Lancet* 399 (10325): 629-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).

- O'Leary, Nuala A., Mathew W. Wright, J. Rodney Brister, Stacy Ciuffo, Diana Haddad, Rich McVeigh, Bhanu Rajput, et al. 2016. « Reference Sequence (RefSeq) Database at NCBI: Current Status, Taxonomic Expansion, and Functional Annotation ». *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D733-45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>.
- Paterson, David L., et Robert A. Bonomo. 2005. « Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: A Clinical Update ». *Clinical Microbiology Reviews* 18 (4): 657-86. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>.
- Peirano, Gisele, Liang Chen, Barry N. Kreiswirth, et Johann D. D. Pitout. 2020. « Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk *Klebsiella Pneumoniae* Clones ST307 and ST147 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64 (10): e01148-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01148-20>.
- Robin, F., R. Beyrouthy, S. Bonacorsi, N. Aissa, L. Bret, N. Brieu, V. Cattoir, et al. 2017. « Inventory of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in France as Assessed by a Multicenter Study ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (3): e01911-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01911-16>.
- Silva, Mickael, Miguel P. Machado, Diogo N. Silva, Mirko Rossi, Jacob Moran-Gilad, Sergio Santos, Mario Ramirez, et João André Carriço. 2018. « ChewBBACA: A Complete Suite for Gene-by-Gene Schema Creation and Strain Identification ». *Microbial Genomics* 4 (3). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000166>.
- Tumbarello, Mario, Teresa Spanu, Maurizio Sanguinetti, Rita Citton, Eva Montuori, Fiammetta Leone, Giovanni Fadda, et Roberto Cauda. 2006. « Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* : Risk Factors, Molecular Epidemiology, and Clinical Outcome ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (2): 498-504. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.2.498-504.2006>.
- Wattam, Alice R., James J. Davis, Rida Assaf, Sébastien Boisvert, Thomas Brettin, Christopher Bun, Neal Conrad, et al. 2017. « Improvements to PATRIC, the All-Bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center ». *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D535-42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1017>.
- Wick, Ryan R., Eva Heinz, Kathryn E. Holt, et Kelly L. Wyres. 2018. « Kaptive Web: User-Friendly Capsule and Lipopolysaccharide Serotype Prediction for *Klebsiella* Genomes ». Édité par Daniel J. Diekema. *Journal of Clinical Microbiology* 56 (6): e00197-18, /jcm/56/6/e00197-18.atom. <https://doi.org/10.1128/JCM.00197-18>.
- Wirth, Thierry, Daniel Falush, Ruiting Lan, Frances Colles, Patience Mensa, Lothar H. Wieler, Helge Karch, et al. 2006. « Sex and Virulence in *Escherichia Coli*: An Evolutionary Perspective ». *Molecular Microbiology* 60 (5): 1136-51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>.
- World Health Organization. 2011. « European strategic action plan on antibiotic resistance ». [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0008/147734/wd14E\\_AntibioticResistance\\_111380.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/147734/wd14E_AntibioticResistance_111380.pdf).
- Zankari, E., H. Hasman, S. Cosentino, M. Vestergaard, S. Rasmussen, O. Lund, F. M. Aarestrup, et M. V. Larsen. 2012. « Identification of Acquired Antimicrobial Resistance Genes ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (11): 2640-44. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.
- Zhou, Zhemin, Nabil-Fareed Alikhan, Khaled Mohamed, Yulei Fan, the Agama Study Group, et Mark Achtman. 2020. « The Enterobase User's Guide, with Case Studies on *Salmonella* Transmissions, *Yersinia Pestis* Phylogeny, and *Escherichia* Core Genomic Diversity ». *Genome Research* 30 (1): 138-52. <https://doi.org/10.1101/gr.251678.119>.

Zhou, Zhemín, Nabil-Fareed Alikhan, Martin J. Sergeant, Nina Luhmann, Cátia Vaz, Alexandre P. Francisco, João André Carriço, et Mark Achtman. 2018. « GrapeTree: Visualization of Core Genomic Relationships among 100,000 Bacterial Pathogens ». *Genome Research* 28 (9): 1395-1404. <https://doi.org/10.1101/gr.232397.117>.

## 2.5 Valorisations scientifiques collaboratives en lien avec le développement du séquençage

Tout au long de ce travail de thèse, des échanges scientifiques ont eu lieu avec différentes équipes de recherche qui ont aboutis à la valorisation scientifique de différents travaux :

### 2.5.1 Articles publiés :

1. Gardette M, Le Hello S, Mariani-Kurkdjian P, Fabre L, **Gravey F**, Garrivier A, Loukiadis E, Jubelin G. Identification and prevalence of in vivo-induced genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Virulence*. 2019 Dec;10(1):180-193.
2. Cottalorda A, Leoz M, Dahyot S, **Gravey F**, Grand M, Froidure T, Aujoulat F, Le Hello S, Jumas-Bilak E, Pestel-Caron M. Within-Host Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* Urinary Isolates: A Seven-Patient Longitudinal Genomic and Phenotypic Study. *Front Microbiol*. 2021 Jan 14;11:611246.
3. Aubourg M, Dhalluin A, **Gravey F**, Pottier M, Thomy N, Bernay B, Goux D, Martineau M, Giard JC. Phenotypic and proteomic approaches of the response to iron-limited condition in *Staphylococcus lugdunensis*. *BMC Microbiol*. 2020 Oct 28;20(1):328.
4. Pot M, Reynaud Y, Couvin D, Ducat C, Ferdinand S, **Gravey F**, Gruel G, Guérin F, Malpote E, Breurec S, Talarmin A, Guyomard-Rabenirina S. Wide Distribution and Specific Resistance Pattern to Third-Generation Cephalosporins of *Enterobacter cloacae* Complex Members in Humans and in the Environment in Guadeloupe (French West Indies). *Front Microbiol*. 2021 Jun 25;12:628058.
5. Aubourg M, Pottier M, Léon A, Bernay B, Dhalluin A, Cacaci M, Torelli R, Ledormand P, Martini C, Sanguinetti M, Auzou M, **Gravey F**, Giard JC. Inactivation of the Response Regulator AgrA Has a Pleiotropic Effect on Biofilm Formation, Pathogenesis and Stress Response in *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiol Spectr*. 2022 Feb 23;10(1):e0159821.

6. Lucile Pantel, François Guérin,, Marine Serri, **François Gravey**, Jessica Houard, Kelly Maurent, Marie Attwood, Alan Noel, Alasdair MacGowan, Emilie Racine, Vincent Cattoir, Maxime Gualtierim. Exploring Cluster-Dependent Antibacterial Activities and Resistance Pathways of NOSO-502 and Colistin against *Enterobacter cloacae* Complex Species Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2022): e00776-22.
7. Maya L. Nadimpalli, Marc Stegger, Roberto Viau, Vuthy Yith, Agathe de Lauzanne, Nita Sem, Laurence Borand, Bich-tram Huynh, Sylvain Brisse, Virginie Passet, Søren Overballe-Petersen, Maliha Aziz, Malika Gouali, Jan Jacobs, Thong Phe, Bruce A. Hungate, Victor O. Leshyk, Amy J. Pickering, **François Gravey**, Cindy M. Liu, Timothy J. Johnson, Simon Le Hello, Lance B. We need to plug the leaks: antibiotic resistance at human-animal interfaces in low-resource settings. *Frontiers in Ecology and the Environment* *In press*

### 2.5.2 *Articles soumis*

1. Marta Lourenço, Lisa Osbelt, Virginie Passet, **François Gravey**, Till Strowig, Carla Rodrigues, Sylvain Brisse, Phages against non-capsulated *Klebsiella pneumoniae*: broader host range, slower resistance bioRxiv 2022.08.04.502604

### 2.5.3 *Articles en preparation*

1. **Francois Gravey**, Corinne Sévin, Sophie Castagnet, Nathalie Foucher, Karine Maillard, Jackie Tapprest, Albertine Léon, Simon Le Hello, Sandrine Petry. Identification, antimicrobial resistance, and virulence factors of 119 *Klebsiella pneumoniae* from a necropsy-associated bacterial collection and clinical isolates in Horse
2. Marine Pottier, **François Gravey**, Sophie Castagnet, Michel Auzou, Langlois Bénédicte, Jean-Christophe Giard, Albertine Léon, Simon Le Hello. A ten-year microbiological study of *Pseudomonas aeruginosa* strains in a French University hospital revealed the diffusion of carbapenems and quaternary ammonium resistant populations
3. Charles Maurille and **François Gravey**, Quentin Jehanne, François Guérin, Jean-Christophe Giard, Alexandra Audemard-Verger, Christophe Isnard, Renaud Verdon,

Philippe Lehours, Simon Le Hello. Occurrence of *in vivo* carbapenem-resistant *Campylobacter coli* mediated by porA point mutation under meropenem treatment.

4. Marine Pottier, Sophie Castagnet, **François Gravey**, Sandrine Petry, Jean-Christophe Giard, Simon Le Hello and Albertine Léon. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animals, especially from Equidae

#### ***2.5.4 Communications orales dans des congrès nationaux ou internationaux***

1. **F. Gravey**, L. Fabre, C. Isnard, M. Fines-Guyon, F. Guerin, O. Join-Lambert, A. Mouet, C. Lesteven, F-X Weill, S. Le Hello, Où se place Caen dans le monde de l'*E. coli* ST131 ? Journées Normandes de Recherche Biomédicale, Rouen, septembre 2018
2. M. Fines, **F. Gravey** Investigation des épidémies bactériennes : quelles méthodes de typage en 2019 ? 1<sup>ère</sup> journée Normande de Microbiologie Clinique, Deauville, juin 2019
3. **F. Gravey**, S. Le Hello, M. Le Scouarnec, V. Cattoir, F. Guérin. Système à deux composants *BaeSR* et résistance à la témocilline chez le complexe *Enterobacter cloacae* RICAI, Paris, décembre 2020
4. **F. Gravey**, M. Cordovana, M. Fines-Guyon<sup>1</sup>, C. Jeanne-Leroy, D. du Cheyron, F. Ethuin, L. Fazilleau, M. Auzou, S. Hecht, L. Gebauer, M. Kostrzewa, S. Le Hello and O. Join-Lambert. Performance of the Fourier-transform infrared spectroscopy for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli*, *K. pneumoniae* and *E. cloacae* complex typing. ECCMID July 2021. Online congress
5. **F. Gravey**, M. Cordovana, M. Fines-Guyon, C. JeanneLeroy, D. du Cheyron, F. Ethuin, L. Fazilleau, M. Auzou, S. Hecht, L. Gebauer, M. Kostrzewa, S. Le Hello and O. Join-Lambert. Performance of the Fourier-transform infrared spectroscopy for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli*, *K. pneumoniae* and *E. cloacae* complex typing, 73rd Annual Conference of German Society for Hygiene and Microbiology September 2021, Online congress

6. **François Gravey**, Isabelle Herluison-petit, Paul Dequiré, Michel Auzou, Guillaume Leduc, Marguerite Fines, Christophe Isnard, O. Join-Lambert, Pascal Thibon, France Borgey, Simon Le Hello. Dissémination d'entérobactéries productrices carbapénèmases OXA-48-like au sein d'un CH, RICAI, Paris 13 et 14 décembre 2021
7. **Gravey F**, Cordovana M, Auzou M, Fines-Guyon M, Du Cheyron D, Ethuin F, Fazilleau L, Jeanne-Leroyer C, Hecht S, Gebauer L, Kostrzewa M, Le Hello S and Join-Lambert O. Fourier-transform infrared spectroscopy for rapid extended-spectrum betalactamase-producing *Enterobacteriaceae* typing in intensive care units: a monocentric retrospective two years study on 284 collected clinical isolates, Journées Normandes de Recherche Biomédicale, Rouen, 10 juin 2022. Prix de la communication orale.

### 2.5.5 Communication affichées

1. **F. Gravey**, L. Fabre, C. Isnard, M. Fines-Guyon, F. Guerin, O. Join-Lambert, A. Mouet, S. Le Hello. Épidémiologie génomique des *E. coli* multi-résistantes aux antibiotiques au CHU de Caen, RICAI, Paris 17 et 18 décembre 2018
2. **F. Gravey**, L. Fabre, C. Isnard, M. Fines-Guyon, F. Guerin O. Join-Lambert, A. Mouet, C. Lesteven, F-X Weill, S. Le Hello. Où se place Caen dans le monde de l'*E. coli* ST131 ? RICAI, Paris 17 et 18 décembre 2018
3. Lagniel Elsa, **Gravey François**, Auzou Michel, Guerin François, Nadine Lemaitre, Le Hello Simon, Join-Lambert Olivier, Isnard Christophe. Phenotypic and genomic analysis of antimicrobial resistance in 70 clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis*. Eccmid, Amsterdam, 13 – 16 avril 2019
4. **François Gravey**, Vincent Cattoir, Racha Beyrouthy, Richard Bonnet, Simon Le Hello, François Guérin, Improvement of fast *in silico* cluster determination methods for evaluating the diversity of *Enterobacter cloacae* complex. Eccmid, Amsterdam, 13 – 16 avril 2019
5. **François Gravey**, Frédéric Ethuin, Vincent Cattoir, Racha Beyrouthy, Richard Bonnet, Simon Le Hello, François Guérin. *In vivo* selection of multidrug resistance in *Enterobacter cloacae* complex by a unique *romR* deletion. Eccmid, Amsterdam, 13 – 16 avril 2019

6. Marine Pottier, **François Gravey**, François Guérin, Sophie Castagnet, Antoine Géry, Patrick Plésiat, Albertine Léon et Simon Le Hello. Résistance aux biocides chez des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées chez l'homme et l'animal. Journées Normandes de la Recherche Biomédicale, Caen, 19 novembre 2019
7. Marine Pottier, **François Gravey**, Sophie Castagnet, François Guérin, Antoine Géry, Patrick Plésiat, Albertine Léon et Simon Le Hello. Étude de la production de biofilm, de la résistance aux antibiotiques et aux biocides chez des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées chez l'homme et l'animal. Microbe, Paris, 30 septembre, 2 octobre 2019
8. Hugo Langris, **François Gravey**, Vincent Cattoir, François Guérin. Activité du céfépime sur les souches d'hémocultures du complexe *Enterobacter cloacae* et risque d'échec thérapeutique. RICAI, Paris, 16 et 17 décembre 2019
9. **François Gravey**, Vincent Cattoir, Racha Beyrouthy, Richard Bonnet, Simon Le Hello, François Guérin. Ecr, une protéine potentiellement impliquée dans la résistance hétérogène à la colistine des clusters I et IV du complexe *Enterobacter cloacae*. RICAI, Paris, 16 et 17 décembre 2019
10. **François Gravey**, Vincent Cattoir, Racha Beyrouthy, Richard Bonnet, Simon Le Hello, François Guérin. Structure du complexe *Enterobacter cloacae* à l'ère de la génomique. RICAI, Paris, 16 et 17 décembre 2019
11. **F. Gravey**, N Devere, AS. Trenteseaux, C. Isnard, M. Fines-Guyon, O. Join-Lambert, F. Borgey, A. Mouet, C. Lesteven, B. Guillois, S. Le Hello. Séquençage complet du génome des bactéries résistantes aux antibiotiques, vers un nouvel éclairage des investigations épidémiques. SF2H Strasbourg 5, 6 et 7 juin 2019
12. Marine Pottier, **François Gravey**, Sophie Castagnet, Michel Auzou, Guillaume Leduc, Marion Demuynck, Albertine Léon, Simon Le Hello. Decreased susceptibility to didecyldimethylammonium chloride among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, a ten years retrospective study, in a University Hospital of Caen, France, Eccmid 2020 Online congress
13. Marion Aubourg, **François Gravey**, Anne Dhalluin, Jean-Christophe Giard. Identification of the iron-limitation stimulon in *Staphylococcus lugdunensis*. Eccmid 2020 Online congress

14. Paul Dequiré, **François Gravey**, Michel Auzou, Marguerite Fines, France Borgey, Simon Le Hello. Exploration génomique d'une épidémie à *Klebsiella pneumoniae* BLSE en réanimation. RICAI, Paris 13 et 14 décembre 2021
15. **F Gravey**, L Lemée, S Dahyot, C Chefson, A Cottalorda, S Marret, M Pestel-Caron, S Le Hello et S Boyer. Investigation génomique d'épidémies à *Klebsiella pneumoniae* BLSE en Réanimation néonatale. RICAI, Paris 13 et 14 décembre 2021
16. **François Gravey**, Marguerite Fines-Guyon, Camille Jeanne-Leroyer, Christophe Isnard, Paul Dequiré, Bénédicte Langlois, Frédéric Ethuin, Désiré Samba, Damien Du Cheyron, Cédric Daubin, Claire Lesteven, Olivier Join-Lambert, Michel Auzou, Guillaume Leduc, Simon Le Hello. Impact of Covid-19 pandemic in Extended Spectrum Beta-Lactamses Enterobacteriaceae circulation in three intensive care units of a 1 600-bed university hospital, France. Eccmid, Lisbonne, 23-26 avril 2022, travail sélectionné pour un Virtual Walkthrough sessions: Lessons learned: will COVID-19 change IPC's daily work?
17. **François Gravey**, Paul Dequiré, Ludovic Lemée, Sandrine Dahyot, Christine Chefson, Agnès Cottalorda, Martine Pestel- Caron, Simon Le Hello, Sophie Boyer. A prolonged nosocomial outbreak of ESBL *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit identified by whole genome sequencing. Eccmid, Lisbonne, 23-26 avril 2022
18. Alice Michel, Benedicte Langlois, Simon Le Hello, **Francois Gravey**. Prevalence of mutations within RamAR operon associated with cross resistance phenotype among ESBL Enterobacteriaceae isolated in intensive care units. Eccmid, Lisbonne, 23-26 avril 2022
19. Bouillon Mélanie, Malandain Damasie, Daurel Claire, Le Hello Simon, Dargère Sylvie, **Gravey François**. Délai de positivité des hémocultures, facteur prédisant l'espèce bactérienne ? RICAI, Paris, 12 et 13 décembre 2022
20. Langlois Bénédicte, **Gravey François**, Isnard Christophe, Capitaine Agathe, Guérin François, Auzou Michel, Ethuin Frédéric, Join-Lambert Olivier, Brisse Sylvain et Le Hello Simon. PCR-ZKIR : dépistage moléculaire de colonisation digestive à *Klebsiella pneumoniae*. RICAI, Paris, 12 et 13 décembre 2022

## 3 Conclusion et perspectives

### 3.1 Mise en place d'un système de surveillance institutionnel et régional

Les premiers travaux présentés illustrent l'apport des analyses de génomiques comparatives au cours de l'exploration des épidémies hospitalières. Ces données apportent la preuve microbiologique d'une transmission croisée, de la présence d'un réservoir environnemental, relient des souches bactériennes entre elles ou, au contraire, éliminent des souches alors que les éléments phénotypiques, chronologiques et géographiques pourraient laisser penser à leur implication. La génomique concoure également à la meilleure compréhension de la dissémination des E-BLSE au sein des services de réanimation.

#### 3.1.1 Développement institutionnel du système de surveillance

Ce système de surveillance n'est actuellement plus un projet de recherche, mais est devenu une activité quotidienne du laboratoire de bactériologie du CHU de Caen au sein duquel une unité fonctionnelle (UF) a été créée. Trois techniciens travaillent au sein de cette UF qui est sous la responsabilité du Dr François Gravey. Les missions de cette UF sont multiples (i) continuer la surveillance de E-BLSE, (ii) étendre la surveillance à d'autres types de BMR (iii) développer le séquençage bactérien *in situ* (iv) faire de la génomique bactérienne le cœur de la surveillance des BMR au sein de l'établissement.

Déjà, le suivi des entérobactérales s'est élargi à l'ensemble des souches résistantes aux C3G isolées au sein des services de réanimation sans limitation d'espèce. Ce suivi s'est révélé particulièrement instructif au sein du service de néonatalogie. En effet, la prévalence des entérobactérales du groupe 3 résistante au C3G y est très élevée ; représentées majoritairement par deux espèces : *Citrobacter freundii* et *Enterobacter hormaechei*. La génomique a permis de faire la part de ce qui relève des transmissions croisées et de la sélection sporadique de souches au sein d'un environnement à très forte pression de sélection antibiotiques. Une partie de ces travaux ont été présentés par deux communications orales à la RICAI 2022 dont les résumés sont disponibles en annexes.

Enfin, forts des constatations faites sur l'inhomogénéité de la circulation des E-BLSE au regard de l'espèce, des travaux sont menés avec le Dr Camille Jeanne-Leroy afin de créer un système

algorithmique qui permettrait déceler pour chaque patient porteur d'une E-BLSE la probabilité que ce cette dernière soit associée à un phénomène de transmission croisée. Ces données sont d'importance car elles conditionnent les actions menées par le service d'hygiène dans les services cliniques. Les résultats préliminaires ont fait l'objet de deux communications orales par le Dr Jeanne-Leroy lors de la RICAI 2021 et de la SF2H 2022. Le résumé de la communication orale du Dr Jeanne-Leroy la RICAI 2021 est disponible en annexes.

### *3.1.2 Une surveillance génomique à l'échelle de la région Normandie*

Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2019, la Cellule Régionale d'Epidémiologie génomique (CREM) de Normandie a été créée sous l'impulsion du service de microbiologie et hygiène du CHU de Caen en partenariat avec le Centre d'appui pour la prévention des infections associées aux soins (CPias) de la Région Normandie et l'Agence Régionale (ARS) de Normandie.

Cette structure a pour but de proposer gratuitement à tous les établissements de santé du territoire une expertise génomique pour venir en soutien d'explorations d'épidémies. Au total, plus de dix établissements de santé ont sollicité la structure, représentant 133 isolats. Ces demandes portent à la fois sur des explorations de la diffusion de souches productrices de BLSE (n = 64) et/ou de carbapénèmases (n = 69).

Pour chaque génome analysé un compte rendu est généré et lorsque l'ensemble des analyses sont réalisées, un rapport est rendu à l'établissement demandeur. Ces activités présentent de nombreux intérêts. Tout d'abord, comme pour les équipes du CHU de Caen, elles aident à la compréhension des phénomènes épidémiques et participent à la mise en place d'actions correctives. Ensuite, réaliser des séquençages pour tout un territoire permet de réaliser une veille épidémiologique à l'échelle de la région. Cette surveillance se révèle être très intéressante pour les souches productrices de l'OXA-48 dont la diffusion plasmidique rend difficile le suivi de la diffusion.

L'activité de la CREM et son apport dans la surveillance de la diffusion des carbapénèmases de type OXA-48 ont fait office de deux communications orales lors de la RICAI 2021 dont les résumés sont disponibles en annexes.



Av de la Côte de Nacre – CS 30 001  
14 033 Caen Cedex 09  
Tel : 02.31.06.31.06 [www.chu-caen.fr](http://www.chu-caen.fr)

#### POLE DE BIOLOGIE ET D'HYGIENE

Laboratoire Biologie Médical  
3ème étage tour Côte de nacre

**Responsable de pôle** : Pr S. Le Hello

Secrétariat : 02 31 06 58 40

Fax : 02 31 06 51 72

#### TEST Test

Nom de naissance :

Né(e) le : Age:

Sexe:

N° Patient : Prélevé le : 31/10/22 à 14h42m

N° Séjour : Enregistré le : 31/10/22 à 14h42m

N° Dossier: **2103806320** Edité le : 02/02/23 à 17h52m

0358

GENOMIQUE MICROBIENNE

CHRU COTE DE NACRE

14000 CAEN

### Typage moléculaire d'une souche bactérienne par séquençage du génome complet

Nature de prélèvement : Selles

Numéro d'identification WGS : Ec20221001

N° dossier extérieur : These de science

Identification par séquençage ( Technique rMLST ) :

*Escherichia coli*

INDICATION DU SEQUENCAGE : Souche productrice de BLSE

CARACTERISTIQUES GENOMIQUES DE LA SOUCHE :

Type MLST : ST131

Sérotype : O25:H4

RESISTOME DE LA SOUCHE :

Type de BLSE : CTX-M-15

Autre(s) Bêta-lactamase(s) présente(s) : TEM-1B

Carbapénémase(s) présente(s) : OXA-48

## 3.2 Naissance de nombreux projets de recherche

Les travaux de recherche ont démontré (i) l'importance de la preuve microbiologique dans les investigations de phénomènes épidémiques, (ii) qu'il n'existe pas une dissémination des E-BLSE, mais des disséminations dont les caractéristiques sont propres à l'espèce bactérienne, (iii) que l'opéron *ramAR* semble être un vecteur important de l'adaptation des entérobactérales au sein des services à forte pression antibiotique. Ces informations font naître de nombreuses autres questions.

### 3.2.1 Place de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier dans le système de surveillance des E-BLSE ?

La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (SIR-TF) est une méthode de typage bactérien développée au cours des années 1990. Cette approche étudie le spectre d'absorption d'une bactérie lorsqu'elle est soumise à différentes longueurs d'ondes appartenant au spectre des infrarouges (Novais et al. 2019). La région du spectre appelée W4 illustre la composition en polysaccharides de la paroi bactérienne. Cette zone est extrêmement variable et apporte à la méthode un très haut pouvoir de discrimination (Novais et al. 2019).

Cette méthode a été délaissée au profit des méthodes génomiques au cours des années 2000 – 2010. Néanmoins, le haut pouvoir de classification et la capacité à délivrer des résultats en 3 à 4 heures à partir de colonies isolées expliquent qu'il existe un regain d'intérêt pour cette méthodologie. Notamment, des données de la littérature suggèrent que la SIR-TFS pourrait s'implémenter en première ligne dans la stratégie de diagnostic et de contrôle des épidémies causées par les entérobactérales, les *Pseudomonas aeruginosa* ou encore les *Acinetobacter baumannii* (L. Silva et al. 2020; Martak et al. 2019).

Fort du système de surveillance génomique mis en place, une étude rétrospective a été réalisée en partenariat avec l'industriel Bruker, visant à étudier la capacité de la SIR-TF à discriminer les souches au regard de leur séquence type. Pour les souches de *K. pneumoniae* et de *Ecc* les concordances étaient bonnes. Une limitation existe pour les souches de *K. pneumoniae* qui ne sont plus typables par cette approche lorsqu'elles ne synthétisent plus leur capsule. Enfin, les performances étaient plus limitées dans la classification des souches de *E. coli*. Ce travail a fait l'objet de trois communications orales dont deux internationales lors de l'Eccmid 2021 et lors

du 73<sup>ème</sup> congrès de la société de microbiologie et d'hygiène Allemande. Le résumé proposé à l'Eccmid est disponible en annexes.

Pour faire suite à ces premiers travaux, un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) régional porté par le Pr Join-Lambert va étudier l'impact d'une stratégie de surveillance continue par typage infrarouge systématique et en temps réel des E-BLSE isolées en réanimation sur la fréquence des transmissions croisées estimée par le séquençage du génome entier qui constituera la méthode de typage de référence. Trois CHU Français participent à ce projet : CHU de Amiens, de Rouen et de Caen. Caen sera le centre référent de ce projet de recherche où l'ensemble des analyses de génomique seront réalisées.

### ***3.2.2 Mieux comprendre la dissémination des E-BLSE***

Le système de surveillance de la circulation des E-BLSE a mis en évidence que les espèces bactériennes ne diffusent pas de façon uniforme au sein des services de réanimation. Néanmoins, ces données sont descriptives.

Afin de comprendre ces phénomènes, un programme de recherche nommé PARTHAGE - Predicting Antibiotic Resistance Transmission within and between Humans by combining mathematical modelling, Genomics and Epidemiology est coordonné par le Pr Lulla Opatowski.

Différents chercheurs s'associent pour ce projet qui réunit de nombreuses expertises dont des épidémiologistes, des modélisateurs de la transmission des maladies infectieuses, bactériologistes, phylogénéticiens, bio-informaticiens.

Au sein de ce projet, la circulation des E-BLSE sera suivie d'un point de vue génomique dans différents hôpitaux français. Des données démographiques, épidémiologiques, thérapeutiques, métagénomiques, mais aussi le déplacement des soignants dans les unités de soins seront recueillis. L'un des objectifs de ce projet est de pouvoir modéliser mathématiquement la circulation des E-BLSE dans différents services de réanimation et de détecter les axes fondamentaux de cette diffusion. PARTHAGE a reçu le soutien de l'Agence Nationale de la Recherche débutera au cours de l'année 2023.

### ***3.2.3 Caractériser l'opéron ramAR chez Enterobacter cloacae et Klebsiella variicola***

Une mutation au sein du gène *ramR* a également été mise en évidence lors du suivi longitudinal d'une souche de *Klebsiella variicola* isolée au long terme chez un patient de réanimation. Des qRT-PCR ont révélé que la mutation s'accompagnait d'une dérégulation de l'expression de RamR et de RamA entraînant une augmentation de la résistance vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines, du chloramphénicol, de la ciprofloxacine et de la tigécycline. Des analyses phénotypiques sont actuellement menées afin de caractériser les conséquences non antibiotiques de ces mutations dont la résistance au stress et les modifications de virulence en modèle *Galleria mellonella*.

Ce travail est une nouvelle illustration de l'apparition de mutations au sein de l'opéron *ramAR* chez un patient soumis à une forte pression de sélection antibiotique. Les résultats ont été présentés lors d'une communication orale lors de la RICAI 2022 dont le résumé est disponible en annexes.

Des travaux de caractérisation des conséquences transcriptomiques des mutations de l'opéron *ramAR* retrouvées chez *Enterobacter hormaechei* seront menés au cours d'un master 2 de recherche au cours de l'année 2023.

### ***3.2.4 Une approche « one Health » du système de surveillance de la diffusion des BMR***

La dissémination des E-BLSE ne s'arrête pas aux murs des établissements de soins. La présence communautaire des *E. coli*-BLSE est un vrai problème de santé publique dont la prévalence en population générale a été estimée lors d'une méta-analyse à 16,5% [IC<sub>95%</sub> 14,3% - 18,7%] (Bezabih et al. 2021). A noter cependant de grandes disparités selon les origines géographiques : 27% en Asie [IC<sub>95%</sub> 2,9% - 51,3%] contre 6% en Europe [IC<sub>95%</sub> 4,6% - 7,5%] (Bezabih et al. 2021).

De plus, les Hommes ne sont pas les seuls vecteurs de la diffusion des E-BLSE ; ces dernières ont été retrouvées parmi des animaux de compagnies, chiens chats avec des prévalences variables allant jusqu'à plus de 20% des animaux (Rubin et Pitout 2014). Les bêtes d'élevages sont elles aussi porteuses d'entérobactériales productrices de BLSE et de carbapénèmes de type VIM-1, IMP-4, NDM-5 ou encore OXA-48 (Madec et al. 2017).

Les études environnementales retrouvent elles aussi des prévalences élevées des E-BLSE dans des cours d'eau, même ceux qui ne sont pas reliés avec le circuit des hôpitaux (Zaatout, Bouras, et Slimani 2021).

Aussi, afin d'appréhender la diffusion globale de l'antibiorésistance c'est une surveillance à multiples dimensions qu'il convient de développer faisant intervenir les microbiologistes de tous horizons.

A l'échelle de la région Normandie, des partenariats de recherche se développent entre les CHU de Caen, l'équipe Inserm UM1311 Dynamycure, le laboratoire Labéo et le site de l'Anses de Dozulé. Un projet pilote est en cours qui associe tous les acteurs suscités autour du typage des souches de *K. pneumoniae* isolées dans des prélèvements équin, leur caractérisation phénotypique, génomique et la comparaison de ces données avec les bactéries retrouvées en médecine humaine. Cette première approche « One Health » n'est que le début de nombreuses collaborations.

## 4 Bibliographie

- Abouzeed, Yousef M., Sylvie Baucheron, et Axel Cloeckaert. 2008. « RamR Mutations Involved in Efflux-Mediated Multidrug Resistance in *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (7): 2428-34. <https://doi.org/10.1128/AAC.00084-08>.
- Abraham, E. P., et E. Chain. 1940. « An Enzyme from Bacteria Able to Destroy Penicillin ». *Nature* 146 (3713): 837-837. <https://doi.org/10.1038/146837a0>.
- Albiger, Barbara, Corinna Glasner, Marc J. Struelens, Hajo Grundmann, Dominique L. Monnet, et the European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. 2015. « Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015 ». *Eurosurveillance* 20 (45). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.45.30062>.
- Alcock, Brian P, Amogelang R Raphenya, Tammy T Y Lau, Kara K Tsang, Mégane Bouchard, Arman Edalatmand, William Huynh, et al. 2019. « CARD 2020: Antibiotic Resistance Surveillance with the Comprehensive Antibiotic Resistance Database ». *Nucleic Acids Research*, octobre, gkz935. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>.
- Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, et David J. Lipman. 1990. « Basic local alignment search tool ». *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Ambler, R P. 1980. « The structure of beta-lactamases. » *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 289 (1036): 321-31. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>.
- Argimón, Silvia, et David M. Aanensen. 2016. « Species Mash-Up ». *Nature Reviews Microbiology* 14 (12): 730-730. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.175>.
- Arndt, David, Jason R. Grant, Ana Marcu, Tanvir Sajed, Allison Pon, Yongjie Liang, et David S. Wishart. 2016. « PHASTER: A Better, Faster Version of the PHAST Phage Search Tool ». *Nucleic Acids Research* 44 (W1): W16-21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>.
- Bakker, Henk C. den, Andrea I. Moreno Switt, Craig A. Cummings, Karin Hoelzer, Lovorka Degoricija, Lorraine D. Rodriguez-Rivera, Emily M. Wright, et al. 2011. « A Whole-Genome Single Nucleotide Polymorphism-Based Approach To Trace and Identify Outbreaks Linked to a Common *Salmonella Enterica* Subsp. *Enterica* Serovar Montevideo Pulsed-Field Gel Electrophoresis Type ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (24): 8648-55. <https://doi.org/10.1128/AEM.06538-11>.

- Bankevich, Anton, Sergey Nurk, Dmitry Antipov, Alexey A. Gurevich, Mikhail Dvorkin, Alexander S. Kulikov, Valery M. Lesin, et al. 2012. « SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing ». *Journal of Computational Biology* 19 (5): 455-77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Bauernfeind, A., S. Schweighart, et Y. Chong. 1989. « Extended broad spectrum  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins ». *Infection* 17 (5): 316-21. <https://doi.org/10.1007/BF01650718>.
- Beghain, Johann, Antoine Bridier-Nahmias, Hervé Le Nagard, Erick Denamur, et Olivier Clermont. 2018. « ClermonTyping: An Easy-to-Use and Accurate *in Silico* Method for *Escherichia* Genus Strain Phylotyping ». *Microbial Genomics* 4 (7). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000192>.
- Bell, Charles E. 2005. « Structure and Mechanism of *Escherichia Coli* RecA ATPase: RecA Structure and Mechanism ». *Molecular Microbiology* 58 (2): 358-66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04876.x>.
- Bergman, C. M., et H. Quesneville. 2007. « Discovering and Detecting Transposable Elements in Genome Sequences ». *Briefings in Bioinformatics* 8 (6): 382-92. <https://doi.org/10.1093/bib/bbm048>.
- Bezabih, Yihienew M, Wilber Sabiiti, Endalkachew Alamneh, Alamneh Bezabih, Gregory M Peterson, Wolde Sellasie M Bezabhe, et Anna Roujeinikova. 2021. « The Global Prevalence and Trend of Human Intestinal Carriage of ESBL-Producing *Escherichia Coli* in the Community ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 76 (1): 22-29. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa399>.
- Bialek-Davenet, Suzanne, Alexis Criscuolo, Florent Ailloud, Virginie Passet, Louis Jones, Anne-Sophie Delannoy-Vieillard, Benoit Garin, et al. 2014. « Genomic Definition of Hypervirulent and Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Clonal Groups ». *Emerging Infectious Diseases* 20 (11): 1812-20. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140206>.
- Bizzini, A., et G. Greub. 2010. « Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, a Revolution in Clinical Microbial Identification ». *Clinical Microbiology and Infection* 16 (11): 1614-19. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03311.x>.
- Blair, Jessica M. A., Mark A. Webber, Alison J. Baylay, David O. Ogbolu, et Laura J. V. Piddock. 2015. « Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance ». *Nature Reviews Microbiology* 13 (1): 42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
- Boolchandani, Manish, Alaric W. D'Souza, et Gautam Dantas. 2019. « Sequencing-Based Methods and Resources to Study Antimicrobial Resistance ». *Nature Reviews Genetics*, mars. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0108-4>.

Bornet, Charléric, Renaud Chollet, Monique Malléa, Jacqueline Chevalier, Anne Davin-Regli, Jean-Marie Pagès, et Claude Bollet. 2003. « Imipenem and Expression of Multidrug Efflux Pump in *Enterobacter Aerogenes* ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301 (4): 985-90. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00074-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00074-3).

Bortolaia, Valeria, Rolf S Kaas, Etienne Ruppe, Marilyn C Roberts, Stefan Schwarz, Vincent Cattoir, Alain Philippon, et al. 2020. « ResFinder 4.0 for Predictions of Phenotypes from Genotypes ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75 (12): 3491-3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.

Bratu, Simona, David Landman, Robin Haag, Rose Recco, Antonella Eramo, Maqsood Alam, et John Quale. 2005. « Rapid Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* in New York City: A New Threat to Our Antibiotic Armamentarium ». *Archives of Internal Medicine* 165 (12): 1430. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.12.1430>.

Brisse, S., V. Passet, A. B. Haugaard, A. Babosan, N. Kassis-Chikhani, C. Struve, et D. Decr. 2013. « Wzi Gene Sequencing, a Rapid Method for Determination of Capsular Type for *Klebsiella* Strains ». *Journal of Clinical Microbiology* 51 (12): 4073-78. <https://doi.org/10.1128/JCM.01924-13>.

Buffalo, Vince. 2015. *Bioinformatics data skills*. First edition. Sebastopol, CA: O'Reilly.

Bush, Karen. 2013. « Proliferation and Significance of Clinically Relevant  $\beta$ -Lactamases:  $\beta$ -Lactamase Overview ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1277 (1): 84-90. <https://doi.org/10.1111/nyas.12023>.

Bush, Karen, et Patricia A Bradford. s. d. « B-Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview », 22.

Bush, Karen, et George A. Jacoby. 2010. « Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (3): 969-76. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.

Cantón, Rafael, et Teresa M Coque. 2006. « The CTX-M  $\beta$ -Lactamase Pandemic ». *Current Opinion in Microbiology* 9 (5): 466-75. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011>.

Carattoli, Alessandra, Ea Zankari, Aurora García-Fernández, Mette Voldby Larsen, Ole Lund, Laura Villa, Frank Møller Aarestrup, et Henrik Hasman. 2014. « *In Silico* Detection and Typing of Plasmids Using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (7): 3895-3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>.

Carrër, Amélie, Laurent Poirel, Mesut Yilmaz, Özyay Arikani Akan, Cilli Feriha, Gaëlle Cuzon, Ghassan Matar, Patrick Honderlick, et Patrice Nordmann. 2010. « Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (3): 1369-73. <https://doi.org/10.1128/AAC.01312-09>.

Cassini, Alessandro, Liselotte Diaz Högberg, Diamantis Plachouras, Annalisa Quattrocchi, Ana Hoxha, Gunnar Skov Simonsen, Mélanie Colomb-Cotinat, et al. 2019. « Attributable Deaths and Disability-Adjusted Life-Years Caused by Infections with Antibiotic-Resistant Bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A Population-Level Modelling Analysis ». *The Lancet Infectious Diseases* 19 (1): 56-66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4).

Castanheira, Mariana, Patricia J Simner, et Patricia A Bradford. 2021. « Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: An Update on Their Characteristics, Epidemiology and Detection ». *JAC-Antimicrobial Resistance* 3 (3): dlab092. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>.

Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). 2019. « Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019 ». Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>.

Chen, L. 2004. « VFDB: A Reference Database for Bacterial Virulence Factors ». *Nucleic Acids Research* 33 (Database issue): D325-28. <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>.

Chiarelli, Adriana. 2020. « Diversity of Mucoïd to Non-Mucoïd Switch among Carbapenemase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* », 14.

Choi, Sang-Ho, Jung Eun Lee, Su Jin Park, Seong-Ho Choi, Sang-Oh Lee, Jin-Yong Jeong, Mi-Na Kim, Jun Hee Woo, et Yang Soo Kim. 2008. « Emergence of Antibiotic Resistance during Therapy for Infections Caused by *Enterobacteriaceae* Producing AmpC  $\beta$ -Lactamase: Implications for Antibiotic Use ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (3): 995-1000. <https://doi.org/10.1128/AAC.01083-07>.

Clausen, Philip T. L. C., Frank M. Aarestrup, et Ole Lund. 2018. « Rapid and Precise Alignment of Raw Reads against Redundant Databases with KMA ». *BMC Bioinformatics* 19 (1). <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2336-6>.

Croucher, Nicholas J., Andrew J. Page, Thomas R. Connor, Aidan J. Delaney, Jacqueline A. Keane, Stephen D. Bentley, Julian Parkhill, et Simon R. Harris. 2015. « Rapid Phylogenetic Analysis of Large Samples of Recombinant Bacterial Whole Genome Sequences Using Gubbins ». *Nucleic Acids Research* 43 (3): e15-e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1196>.

Cwerman-Thibault, Hélène. 2007. « M ecanisme moléculaire de l'induction de l'expression de l'opéron has de *Serratia marcescens* ».

Dabos, Laura, Saoussen Oueslati, Sandrine Bernabeu, Rémy A. Bonnin, Laurent Dortet, et Thierry Naas. 2022. « To Be or Not to Be an OXA-48 Carbapenemase ». *Microorganisms* 10 (2): 258. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020258>.

Daikos, George L., Panayiotis Petrikkos, Mina Psychogiou, Chris Kosmidis, Evangelos Vryonis, Athanasios Skoutelis, Kleoniki Georgousi, et al. 2009. « Prospective Observational Study of the Impact of VIM-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase on the Outcome of Patients with *Klebsiella*

*Pneumoniae* Bloodstream Infections ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (5): 1868-73. <https://doi.org/10.1128/AAC.00782-08>.

Dautzenberg, M J, J M Ossewaarde, M E de Kraker, A van der Zee, S van Burgh, S C de Greeff, H A Bijlmer, et al. 2014. « Successful Control of a Hospital-Wide Outbreak of OXA-48 Producing *Enterobacteriaceae* in the Netherlands, 2009 to 2011 ». *Eurosurveillance* 19 (9). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20723>.

De Angelis, Giulia, Paola Del Giacomo, Brunella Posteraro, Maurizio Sanguinetti, et Mario Tumbarello. 2020. « Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of  $\beta$ -Lactam Resistance in *Enterobacteriaceae* ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (14): 5090. <https://doi.org/10.3390/ijms21145090>.

De Majumdar, Shyamasree, Jing Yu, Maria Fookes, Sean P. McAteer, Enrique Llobet, Sarah Finn, Shaun Spence, et al. 2015. « Elucidation of the RamA Regulon in *Klebsiella Pneumoniae* Reveals a Role in LPS Regulation ». Édité par Alan Hauser. *PLOS Pathogens* 11 (1): e1004627. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004627>.

DePristo, Mark A, Eric Banks, Ryan Poplin, Kiran V Garimella, Jared R Maguire, Christopher Hartl, Anthony A Philippakis, et al. 2011. « A Framework for Variation Discovery and Genotyping Using Next-Generation DNA Sequencing Data ». *Nature Genetics* 43 (5): 491-98. <https://doi.org/10.1038/ng.806>.

Diancourt, L., V. Passet, J. Verhoef, P. A. D. Grimont, et S. Brisse. 2005. « Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella Pneumoniae* Nosocomial Isolates ». *Journal of Clinical Microbiology* 43 (8): 4178-82. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005>.

Dijk, Erwin L. van, Hélène Auger, Yan Jaszczyszyn, et Claude Thermes. 2014. « Ten Years of Next-Generation Sequencing Technology ». *Trends in Genetics* 30 (9): 418-26. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>.

Dmowski, Micha l, Marcin Go le biewski, et Izabela Kern-Zdanowicz. 2018. « Characteristics of the Conjugative Transfer System of the IncM Plasmid PCTX-M3 and Identification of Its Putative Regulators ». Édité par Thomas J. Silhavy. *Journal of Bacteriology* 200 (18). <https://doi.org/10.1128/JB.00234-18>.

Dolejska, M., L. Villa, L. Poirel, P. Nordmann, et A. Carattoli. 2013. « Complete Sequencing of an IncHI1 Plasmid Encoding the Carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA Methylase and a Resistance-Nodulation-Cell Division/Multidrug Efflux Pump ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (1): 34-39. <https://doi.org/10.1093/jac/dks357>.

Dortet, Laurent, Ga lle Cuzon, Valérie Ponties, et Patrice Nordmann. 2017. « Trends in Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*, France, 2012 to 2014 ». *Eurosurveillance* 22 (6). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.6.30461>.

El Meouche, Imane, et Mary J. Dunlop. 2018. « Heterogeneity in Efflux Pump Expression Predisposes Antibiotic-Resistant Cells to Mutation ». *Science* 362 (6415): 686-90. <https://doi.org/10.1126/science.aar7981>.

Ellington, M.J., O. Ekelund, F.M. Aarestrup, R. Canton, M. Doumith, C. Giske, H. Grundman, et al. 2017. « The Role of Whole Genome Sequencing in Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria: Report from the EUCAST Subcommittee ». *Clinical Microbiology and Infection* 23 (1): 2-22. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.012>.

European commission. 2017. « A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR) ». [https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr\\_2017\\_action-plan\\_0.pdf](https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf).

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. s. d. « EUCAST technical guidance on the use of the combination disk test (CDT) for confirmation of ESBL in Enterobacterales ».

[https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/Miscellaneous/Guidance\\_document\\_Confirmation\\_of\\_ESBL.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Miscellaneous/Guidance_document_Confirmation_of_ESBL.pdf).

Ewing, Brent, LaDeana Hillier, Michael C. Wendl, et Phil Green. 1998. « Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment ». *Genome Research* 8 (3): 175-85. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>.

F. Kauffman. 1947. « The Serology of the *Coli* Group ». *The Journal of Immunology* 57 (1): 71.

Falcone, Marco, Maria Lina Mezzatesta, Mariagrazia Perilli, Chiara Forcella, Alessandra Giordano, Viviana Cafiso, Gianfranco Amicosante, Stefania Stefani, et Mario Venditti. 2009. « Infections with VIM-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacter Cloacae* and Their Correlation with Clinical Outcome ». *Journal of Clinical Microbiology* 47 (11): 3514-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01193-09>.

Fevre, Cindy, Mehdi Jbel, Virginie Passet, François-Xavier Weill, Patrick A. D. Grimont, et Sylvain Brisse. 2005. « Six Groups of the OXY  $\beta$ -Lactamase Evolved over Millions of Years in *Klebsiella Oxytoca* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (8): 3453-62. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3453-3462.2005>.

Flandrois, Jean-Pierre, Gérard Lina, et Oana Dumitrescu. 2014. « MUBII-TB-DB: A Database of Mutations Associated with Antibiotic Resistance in Mycobacterium Tuberculosis ». *BMC Bioinformatics* 15 (1): 107. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-107>.

Fleischmann, Robert D., Mark D. Adams, Owen White, Rebecca A. Clayton, Ewen F. Kirkness, Anthony R. Kerlavage, Carol J. Bult, et al. 1995. « Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus Influenzae* Rd ». *Science* 269 (5223): 496-512. <https://doi.org/10.1126/science.7542800>.

- Fu, Limin, Beifang Niu, Zhengwei Zhu, Sitao Wu, et Weizhong Li. 2012. « CD-HIT: Accelerated for Clustering the next-Generation Sequencing Data ». *Bioinformatics* 28 (23): 3150-52. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>.
- Galata, Valentina, Tobias Fehlmann, Christina Backes, et Andreas Keller. 2019. « PLSDb: A Resource of Complete Bacterial Plasmids ». *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D195-202. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1050>.
- Gardner, Shea N, Tom Slezak, et Barry G. Hall. 2015. « KSNP3.0: SNP Detection and Phylogenetic Analysis of Genomes without Genome Alignment or Reference Genome ». *Bioinformatics* 31 (17): 2877-78. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv271>.
- Garrison, Erik, et Gabor Marth. 2012. « Haplotype-Based Variant Detection from Short-Read Sequencing ». arXiv. <http://arxiv.org/abs/1207.3907>.
- Gorrie, Claire L., Mirjana Mirčeta, Ryan R. Wick, David J. Edwards, Nicholas R. Thomson, Richard A. Strugnell, Nigel F. Pratt, et al. 2017. « Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella Pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients ». *Clinical Infectious Diseases* 65 (2): 208-15. <https://doi.org/10.1093/cid/cix270>.
- Gravey, François, Vincent Cattoir, Frédéric Ethuin, Laetitia Fabre, Racha Beyrouthy, Richard Bonnet, Simon Le Hello, et François Guérin. 2020. « *RamR* Deletion in an *Enterobacter Hormaechei* Isolate as a Consequence of Therapeutic Failure of Key Antibiotics in a Long-Term Hospitalized Patient ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64 (10): e00962-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00962-20>.
- Guérin, François, Christophe Isnard, Vincent Cattoir, et Jean Christophe Giard. 2015. « Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated  $\beta$ -Lactam Resistance in *Enterobacter Cloacae* Complex ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (12): 7753-61. <https://doi.org/10.1128/AAC.01729-15>.
- Gurevich, Alexey, Vladislav Saveliev, Nikolay Vyahhi, et Glenn Tesler. 2013. « QUASt: Quality Assessment Tool for Genome Assemblies ». *Bioinformatics* 29 (8): 1072-75. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
- Harris, Patrick. 2015. « Clinical Management of Infections Caused by Enterobacteriaceae That Express Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase and AmpC Enzymes ». *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 36 (01): 056-073. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1398387>.
- Hennart, Melanie, Julien Guglielmini, Sébastien Bridel, Martin C J Maiden, Keith A. Jolley, Alexis Criscuolo, et Sylvain Brisse. 2022. « A Dual Barcoding Approach to Bacterial Strain Nomenclature: Genomic Taxonomy of *Klebsiella Pneumoniae* Strains ». Édité par Crystal Hepp. *Molecular Biology and Evolution* 39 (7): msac135. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac135>.

Herridge, Warren P, Preetha Shibu, Jessica O'Shea, Thomas C Brook, et Lesley Hoyles. s. d. « Bacteriophages of *Klebsiella* Spp., Their Diversity and Potential Therapeutic Uses ». *Journal of Medical Microbiology*, 19.

Hofer, Ursula. 2019. « The Cost of Antimicrobial Resistance ». *Nature Reviews Microbiology* 17 (1): 3-3. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0125-x>.

Hoffmann, H., et A. Roggenkamp. 2003. « Population Genetics of the Nomenclature Species *Enterobacter Cloacae* ». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (9): 5306-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5306-5318.2003>.

Ito, H, Y Arakawa, S Ohsuka, R Wacharotayankun, N Kato, et M Ohta. 1995. « Plasmid-Mediated Dissemination of the Metallo-Beta-Lactamase Gene BlaIMP among Clinically Isolated Strains of *Serratia Marcescens* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (4): 824-29. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.4.824>.

Jacoby, George A. 2009. « AmpC  $\beta$ -Lactamases ». *Clinical Microbiology Reviews* 22 (1): 161-82. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>.

Joensen, K. G., F. Scheutz, O. Lund, H. Hasman, R. S. Kaas, E. M. Nielsen, et F. M. Aarestrup. 2014. « Real-Time Whole-Genome Sequencing for Routine Typing, Surveillance, and Outbreak Detection of Verotoxigenic *Escherichia Coli* ». *Journal of Clinical Microbiology* 52 (5): 1501-10. <https://doi.org/10.1128/JCM.03617-13>.

Joensen, Katrine G., Anna M. M. Tetzschner, Atsushi Iguchi, Frank M. Aarestrup, et Flemming Scheutz. 2015. « Rapid and Easy *In Silico* Serotyping of *Escherichia Coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data ». Édité par K. C. Carroll. *Journal of Clinical Microbiology* 53 (8): 2410-26. <https://doi.org/10.1128/JCM.00008-15>.

Jolivet, Sarah, Jeanne Couturier, Xavier Vuillemin, Cyril Gouot, Didier Nesa, Marine Adam, Eolia Brissot, et al. 2021. « Outbreak of OXA-48-Producing *Enterobacteriales* in a Haematological Ward Associated with an Uncommon Environmental Reservoir, France, 2016 to 2019 ». *Eurosurveillance* 26 (21). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.21.2000118>.

Jolley, Keith A., Carly M. Bliss, Julia S. Bennett, Holly B. Bratcher, Carina Brehony, Frances M. Colles, Helen Wimalaratna, et al. 2012. « Ribosomal Multilocus Sequence Typing: Universal Characterization of Bacteria from Domain to Strain ». *Microbiology* 158 (4): 1005-15. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055459-0>.

Kayange, Neema, Erasmus Kamugisha, Damas L Mwizamholya, Seni Jeremiah, et Stephen E Mshana. 2010. « Predictors of Positive Blood Culture and Deaths among Neonates with Suspected Neonatal Sepsis in a Tertiary Hospital, Mwanza- Tanzania ». *BMC Pediatr* 10, 39 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2431-10-39>.

- Kaye, Keith S., Sara Cosgrove, Anthony Harris, George M. Eliopoulos, et Yehuda Carmeli. 2001. « Risk Factors for Emergence of Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporins among *Enterobacter Spp* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (9): 2628-30. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.9.2628-2630.2001>.
- Khodursky, A B, E L Zechiedrich, et N R Cozzarelli. 1995. « Topoisomerase IV Is a Target of Quinolones in *Escherichia Coli*. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (25): 11801-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11801>.
- Kopotsa, Katlego, John Osei Sekyere, et Nontombi Marylucy Mbelle. 2019. « Plasmid Evolution in Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: A Review ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1457 (1): 61-91. <https://doi.org/10.1111/nyas.14223>.
- Kumar, Anand, Daniel Roberts, Kenneth E. Wood, Bruce Light, Joseph E. Parrillo, Satendra Sharma, Robert Suppes, et al. 2006. « Duration of Hypotension before Initiation of Effective Antimicrobial Therapy Is the Critical Determinant of Survival in Human Septic Shock\* ». *Critical Care Medicine* 34 (6): 1589-96. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9>.
- Lallement, Claire, Cécile Pasternak, Marie-Cécile Ploy, et Thomas Jové. 2018. « The Role of ISCR1-Borne POUT Promoters in the Expression of Antibiotic Resistance Genes ». *Frontiers in Microbiology* 9 (octobre): 2579. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02579>.
- Lam, Margaret M. C., Ryan R. Wick, Kelly L. Wyres, Claire L. Gorrie, Louise M. Judd, Adam W. J. Jenney, Sylvain Brisse, et Kathryn E. Holt. 2018. « Genetic Diversity, Mobilisation and Spread of the Yersiniabactin-Encoding Mobile Element ICEK<sub>p</sub> in *Klebsiella Pneumoniae* Populations ». *Microbial Genomics* 4 (9). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000196>.
- Lam, Margaret M. C., Kelly L. Wyres, Louise M. Judd, Ryan R. Wick, Adam Jenney, Sylvain Brisse, et Kathryn E. Holt. 2018. « Tracking Key Virulence Loci Encoding Aerobactin and Salmochelin Siderophore Synthesis in *Klebsiella Pneumoniae* ». *Genome Medicine* 10 (1): 77. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0587-5>.
- Langmead, Ben, et Steven L Salzberg. 2012. « Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2 ». *Nature Methods* 9 (4): 357-59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- Larsen, M. V., S. Cosentino, S. Rasmussen, C. Friis, H. Hasman, R. L. Marvig, L. Jelsbak, et al. 2012. « Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria ». *Journal of Clinical Microbiology* 50 (4): 1355-61. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>.
- Lavigne, Jean-Philippe, Albert Sotto, Marie-Hélène Nicolas-Chanoine, Nicole Bouziges, Jean-Marie Pagès, et Anne Davin-Regli. 2013. « An Adaptive Response of *Enterobacter Aerogenes* to Imipenem: Regulation of Porin Balance in Clinical Isolates ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 41 (2): 130-36. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.10.010>.

Laxminarayan, Ramanan, Adriano Duse, Chand Wattal, Anita K M Zaidi, Heiman F L Wertheim, Nithima Sumpradit, Erika Vlieghe, et al. 2013. « Antibiotic Resistance—the Need for Global Solutions ». *The Lancet Infectious Diseases* 13 (12): 1057-98. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9).

Laxminarayan, Ramanan, Anup Malani, David Howard, et David L. Smith. 2010. *Extending the Cure*. 0 éd. Routledge. <https://doi.org/10.4324/9781936331086>.

Letunic, Ivica, et Peer Bork. 2016. « Interactive Tree of Life (ITOL) v3: An Online Tool for the Display and Annotation of Phylogenetic and Other Trees ». *Nucleic Acids Research* 44 (W1): W242-45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>.

Levy, Stuart B, et Bonnie Marshall. 2004. « Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses ». *Nature Medicine* 10 (12s): S122-29. <https://doi.org/10.1038/nm1145>.

Levy, Stuart B. 2001. « Antibiotic Resistance: Consequences of Inaction ». *Clinical Infectious Diseases* 33 (s3): S124-29. <https://doi.org/10.1086/321837>.

Li, H. 2011. « A Statistical Framework for SNP Calling, Mutation Discovery, Association Mapping and Population Genetical Parameter Estimation from Sequencing Data ». *Bioinformatics* 27 (21): 2987-93. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr509>.

Li, H., et R. Durbin. 2009. « Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform ». *Bioinformatics* 25 (14): 1754-60. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.

Loman, Nicholas J., et Mark J. Pallen. 2015. « Twenty Years of Bacterial Genome Sequencing ». *Nature Reviews Microbiology* 13 (12): 787-94. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3565>.

Madec, J.-Y., M. Haenni, P. Nordmann, et L. Poirel. 2017. « Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase/AmpC- and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Animals: A Threat for Humans? ». *Clinical Microbiology and Infection* 23 (11): 826-33. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.01.013>.

Maiden, Martin C. J., Jane A. Bygraves, Edward Feil, Giovanna Morelli, Joanne E. Russell, Rachel Urwin, Qing Zhang, et al. 1998. « Multilocus Sequence Typing: A Portable Approach to the Identification of Clones within Populations of Pathogenic Microorganisms ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (6): 3140-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>.

Mairi, Assia, Alix Pantel, Albert Sotto, Jean-Philippe Lavigne, et Aziz Touati. 2018. « OXA-48-like Carbapenemases Producing *Enterobacteriaceae* in Different Niches ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 37 (4): 587-604. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3112-7>.

Martak, Daniel, Benoît Valot, Marlène Sauget, Pascal Cholley, Michelle Thouverez, Xavier Bertrand, et Didier Hocquet. 2019. « Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy Can Quickly Type Gram-Negative Bacilli Responsible for Hospital Outbreaks ». *Frontiers in Microbiology* 10 (juin): 1440. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01440>.

Medini, Duccio, Davide Serruto, Julian Parkhill, David A. Relman, Claudio Donati, Richard Moxon, Stanley Falkow, et Rino Rappuoli. 2008. « Microbiology in the Post-Genomic Era ». *Nature Reviews Microbiology* 6 (6): 419-30. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1901>.

Miyoshi-Akiyama, Tohru, Kayoko Hayakawa, Norio Ohmagari, Masahiro Shimojima, et Teruo Kirikae. 2013. « Multilocus Sequence Typing (MLST) for Characterization of *Enterobacter Cloacae* ». Édité par Patrick C. Y. Woo. *PLoS ONE* 8 (6): e66358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066358>.

Morgan, Daniel J, Iruka N Okeke, Ramanan Laxminarayan, Eli N Perencevich, et Scott Weisenberg. 2011. « Non-Prescription Antimicrobial Use Worldwide: A Systematic Review ». *The Lancet Infectious Diseases* 11 (9): 692-701. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70054-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70054-8).

Moura, Alexandra, Alexis Criscuolo, Hannes Pouseele, Mylène M. Maury, Alexandre Leclercq, Cheryl Tarr, Jonas T. Björkman, et al. 2016. « Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes* ». *Nature Microbiology* 2 (octobre): 16185. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.185>.

Murray, Christopher JL, Kevin Shunji Ikuta, Fablina Sharara, Lucien Swetschinski, Gisela Robles Aguilar, Authia Gray, Chieh Han, et al. 2022. « Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis ». *The Lancet* 399 (10325): 629-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).

Naas, Thierry, Saoussen Oueslati, Rémy A. Bonnin, Maria Laura Dabos, Agustin Zavala, Laurent Dortet, Pascal Retailleau, et Bogdan I. Iorga. 2017. « Beta-Lactamase Database (BLDB) – Structure and Function ». *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 32 (1): 917-19. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>.

Nordmann, Patrice, Gaele Cuzon, et Thierry Naas. 2009. « The Real Threat of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase-Producing Bacteria ». *The Lancet Infectious Diseases* 9 (4): 228-36. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4).

Nordmann, Patrice, Laurent Dortet, et Laurent Poirel. 2012. « Carbapenem Resistance in *Enterobacteriaceae*: Here Is the Storm! ». *Trends in Molecular Medicine* 18 (5): 263-72. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.003>.

Nordmann, Patrice, Thierry Naas, et Laurent Poirel. 2011. « Global Spread of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* ». *Emerging Infectious Diseases* 17 (10): 1791-98. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>.

Novais, Ângela, Ana R. Freitas, Carla Rodrigues, et Luísa Peixe. 2019. « Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Unlocking Fundamentals and Prospects for Bacterial Strain Typing ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 38 (3): 427-48. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3431-3>.

O'Leary, Nuala A., Mathew W. Wright, J. Rodney Brister, Stacy Ciufu, Diana Haddad, Rich McVeigh, Bhanu Rajput, et al. 2016. « Reference Sequence (RefSeq) Database at NCBI: Current Status, Taxonomic Expansion, and Functional Annotation ». *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D733-45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>.

Ondov, Brian D., Todd J. Treangen, Páll Melsted, Adam B. Mallonee, Nicholas H. Bergman, Sergey Koren, et Adam M. Phillippy. 2016. « Mash: Fast Genome and Metagenome Distance Estimation Using MinHash ». *Genome Biology* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0997-x>.

Oueslati, Saoussen, Pascal Retailleau, Ludovic Marchini, Laurent Dortet, Rémy A. Bonnin, Bogdan I. Iorga, et Thierry Naas. 2019. « Biochemical and Structural Characterization of OXA-405, an OXA-48 Variant with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Activity ». *Microorganisms* 8 (1): 24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010024>.

Page, Andrew J., Carla A. Cummins, Martin Hunt, Vanessa K. Wong, Sandra Reuter, Matthew T.G. Holden, Maria Fookes, Daniel Falush, Jacqueline A. Keane, et Julian Parkhill. 2015. « Roary: Rapid Large-Scale Prokaryote Pan Genome Analysis ». *Bioinformatics* 31 (22): 3691-93. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>.

Philippon, A., G. Arlet, et G. A. Jacoby. 2002. « Plasmid-Determined AmpC-Type -Lactamases ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.1.1-11.2002>.

Pitout, Johann D. D., Gisele Peirano, Marleen M. Kock, Kathy-Anne Strydom, et Yasufumi Matsumura. 2019. « The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases ». *Clinical Microbiology Reviews* 33 (1): e00102-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-19>.

Poirel, Laurent, Rémy A. Bonnin, et Patrice Nordmann. 2012. « Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (1): 559-62. <https://doi.org/10.1128/AAC.05289-11>.

Poirel, Laurent, Claire Héritier, et Patrice Nordmann. 2004. « Chromosome-Encoded Ambler Class D  $\beta$ -Lactamase of *Shewanella Oneidensis* as a Progenitor of Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (1): 348-51. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.348-351.2004>.

Poirel, Laurent, Claire Héritier, Venus Tolün, et Patrice Nordmann. 2004. « Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella Pneumoniae* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (1): 15-22. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004>.

Poirel, Laurent, José-Manuel Ortiz de la Rosa, Anaïs Richard, Marta Aires-de-Sousa, et Patrice Nordmann. 2019. « CTX-M-33 Is a CTX-M-15 Derivative Conferring Reduced Susceptibility to Carbapenems ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63 (12): e01515-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01515-19>.

Potron, A, L Poirel, E Rondinaud, et P Nordmann. 2013. « Intercontinental Spread of OXA-48 Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* over a 11-Year Period, 2001 to 2011 ». *Eurosurveillance* 18 (31). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.31.20549>.

Potron, Anaïs, Laurent Poirel, et Patrice Nordmann. 2014. « Derepressed Transfer Properties Leading to the Efficient Spread of the Plasmid Encoding Carbapenemase OXA-48 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (1): 467-71. <https://doi.org/10.1128/AAC.01344-13>.

Poulou, Aggeliki, Evangelia Voulgari, Georgia Vrioni, Vasiliki Koumaki, Grigorios Xidopoulos, Vasiliki Chatzipantazi, Fani Markou, et Athanassios Tsakris. 2013. « Outbreak Caused by an Ertapenem-Resistant, CTX-M-15-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Sequence Type 101 Clone Carrying an OmpK36 Porin Variant ». *Journal of Clinical Microbiology* 51 (10): 3176-82. <https://doi.org/10.1128/JCM.01244-13>.

Quail, Michael A, Iwanka Kozarewa, Frances Smith, Aylwyn Scally, Philip J Stephens, Richard Durbin, Harold Swerdlow, et Daniel J Turner. 2008. « A Large Genome Center's Improvements to the Illumina Sequencing System ». *Nature Methods* 5 (12): 1005-10. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1270>.

Radkov, Atanas D., Yen-Pang Hsu, Garrett Booher, et Michael S. VanNieuwenhze. 2018. « Imaging Bacterial Cell Wall Biosynthesis ». *Annual Review of Biochemistry* 87 (1): 991-1014. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012921>.

Rasmussen, B A, K Bush, D Keeney, Y Yang, R Hare, C O'Gara, et A A Medeiros. 1996. « Characterization of IMI-1 Beta-Lactamase, a Class A Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme from *Enterobacter Cloacae* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (9): 2080-86. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.9.2080>.

Review on Antimicrobial Resistance et Jim O'Neill. s. d. « AMR Review Paper - Tackling a crisis for the health and wealth of nations ». <https://amr-review.org/>.

Ricci, V., et L. J. V. Piddock. 2009. « Ciprofloxacin Selects for Multidrug Resistance in *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium Mediated by at Least Two Different Pathways ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63 (5): 909-16. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp054>.

Robin, F., R. Beyrouthy, S. Bonacorsi, N. Aissa, L. Bret, N. Brieu, V. Cattoir, et al. 2017. « Inventory of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in France as Assessed by a Multicenter Study ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (3): e01911-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01911-16>.

- Rodrigues, Carla, Virginie Passet, Andrianiaina Rakotondrasoa, et Sylvain Brisse. 2018. « Identification of *Klebsiella Pneumoniae*, *Klebsiella Quasipneumoniae*, *Klebsiella Variicola* and Related Phylogroups by MALDI-TOF Mass Spectrometry ». *Frontiers in Microbiology* 9 (décembre): 3000. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03000>.
- Roer, Louise, Veronika Tchesnokova, Rosa Allesøe, Mariya Muradova, Sujay Chattopadhyay, Johanne Ahrenfeldt, Martin C. F. Thomsen, et al. 2017. « Development of a Web Tool for *Escherichia Coli* Subtyping Based on *FimH* Alleles ». Édité par Daniel J. Diekema. *Journal of Clinical Microbiology* 55 (8): 2538-43. <https://doi.org/10.1128/JCM.00737-17>.
- Rubin, Joseph E., et Johann D.D. Pitout. 2014. « Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase, Carbapenemase and AmpC Producing Enterobacteriaceae in Companion Animals ». *Veterinary Microbiology* 170 (1-2): 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.017>.
- Sabat, A J, A Budimir, D Nashev, R Sá-Leão, J M van Dijl, F Laurent, H Grundmann, A W Friedrich, et on behalf of the ESCMID Study Group. 2013. « Overview of Molecular Typing Methods for Outbreak Detection and Epidemiological Surveillance ». *Eurosurveillance* 18 (4). <https://doi.org/10.2807/ese.18.04.20380-en>.
- Saha, Saurav B, Vishwas Uttam, et Vivek Verma. 2015. « U-CARE: User-Friendly Comprehensive Antibiotic Resistance Repository of *Escherichia Coli* ». *Journal of Clinical Pathology* 68 (8): 648-51. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202927>.
- Sayers, Samantha, Li Li, Edison Ong, Shunzhou Deng, Guanghua Fu, Yu Lin, Brian Yang, et al. 2019. « Victors: A Web-Based Knowledge Base of Virulence Factors in Human and Animal Pathogens ». *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D693-700. <https://doi.org/10.1093/nar/gky999>.
- Schürch, A.C., S. Arredondo-Alonso, R.J.L. Willems, et R.V. Goering. 2018. « Whole Genome Sequencing Options for Bacterial Strain Typing and Epidemiologic Analysis Based on Single Nucleotide Polymorphism versus Gene-by-Gene-Based Approaches ». *Clinical Microbiology and Infection* 24 (4): 350-54. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.016>.
- Schwaber, M. J., et Y. Carmeli. 2007. « Mortality and Delay in Effective Therapy Associated with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Production in *Enterobacteriaceae* Bacteraemia: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60 (5): 913-20. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm318>.
- Scoulica, Efstathia V, Ioannis K Neonakis, Achilleas I Gikas, et Yannis J Tselentis. 2004. « Spread of *BlaVIM-1*-Producing *E. Coli* in a University Hospital in Greece. Genetic Analysis of the Integron Carrying the *BlaVIM-1* Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 48 (3): 167-72. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2003.09.012>.
- Seemann, T. 2014. « Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation ». *Bioinformatics* 30 (14): 2068-69. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.

Silva, Liliana, Carla Rodrigues, Agostinho Lira, Mariana Leão, Margarida Mota, Paulo Lopes, Ângela Novais, et Luísa Peixe. 2020. « Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy Typing: A Real-Time Analysis of an Outbreak by Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 39 (12): 2471-75. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03956-y>.

Silva, Mickael, Miguel P. Machado, Diogo N. Silva, Mirko Rossi, Jacob Moran-Gilad, Sergio Santos, Mario Ramirez, et João André Carriço. 2018. « ChewBBACA: A Complete Suite for Gene-by-Gene Schema Creation and Strain Identification ». *Microbial Genomics* 4 (3). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000166>.

Skalova, Anna, Katerina Chudejova, Veronika Rotova, Matej Medvecký, Vendula Studentova, Eva Chudackova, Pavel Lavicka, et al. 2017. « Molecular Characterization of OXA-48-Like-Producing Enterobacteriaceae in the Czech Republic and Evidence for Horizontal Transfer of POXA-48-Like Plasmids ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (2): e01889-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01889-16>.

Société Française d'Hygiène Hospitalière. 2009. « Recommandations nationales - Prévention de la transmission croisée: précautions complémentaires contact - Consensus formalisé d'experts - 2009 », 60.

Sohn, Jang-il, et Jin-Wu Nam. 2016. « The Present and Future of *de Novo* Whole-Genome Assembly ». *Briefings in Bioinformatics*, octobre, bbw096. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw096>.

Sougakoff, Wladimir, Sylvie Goussard, Guy Gerbaud, et Patrice Courvalin. 1988. « Plasmid-Mediated Resistance to Third-Generation Cephalosporins Caused by Point Mutations in TEM-Type Penicillinase Genes ». *Reviews of Infectious Diseases* 10 (4): 879-84. <https://doi.org/10.1093/clinids/10.4.879>.

Stackebrandt, E., et B. M. Goebel. 1994. « Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44 (4): 846-49. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>.

Szabó, Dóra, Fernanda Silveira, Andrea M. Hujer, Robert A. Bonomo, Kristine M. Hujer, Jane W. Marsh, Christopher R. Bethel, Yohei Doi, Kathleen Deeley, et David L. Paterson. 2006. « Outer Membrane Protein Changes and Efflux Pump Expression Together May Confer Resistance to Ertapenem in *Enterobacter Cloacae* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (8): 2833-35. <https://doi.org/10.1128/AAC.01591-05>.

Tenover, Fred C. 1985. « Plasmid Fingerprinting: A Tool for Bacterial Strain Identification and Surveillance of Nosocomial and Community-Acquired Infections ». *Nucleic Acid Probes and Monoclonal Antibodies in the Diagnosis of Infectious Diseases* 5 (3): 413-36. [https://doi.org/10.1016/S0272-2712\(18\)30850-3](https://doi.org/10.1016/S0272-2712(18)30850-3).

- Tran-Dien, Alicia, Simon Le Hello, Christiane Bouchier, et François-Xavier Weill. 2018. « Early Transmissible Ampicillin Resistance in Zoonotic *Salmonella Enterica* Serotype Typhimurium in the Late 1950s: A Retrospective, Whole-Genome Sequencing Study ». *The Lancet Infectious Diseases* 18 (2): 207-14. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30705-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30705-3).
- Turton, Jane F., Michel Doumith, Katie L. Hopkins, Claire Perry, Daniele Meunier, et Neil Woodford. 2016. « Clonal Expansion of *Escherichia Coli* ST38 Carrying a Chromosomally Integrated OXA-48 Carbapenemase Gene ». *Journal of Medical Microbiology* 65 (6): 538-46. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000248>.
- Uelze, Laura, Josephine Grützke, Maria Borowiak, Jens Andre Hammerl, Katharina Juraschek, Carlus Deneke, Simon H. Tausch, et Burkhard Malorny. 2020. « Typing Methods Based on Whole Genome Sequencing Data ». *One Health Outlook* 2 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/s42522-020-0010-1>.
- Van Boeckel, Thomas P, Sumanth Gandra, Ashvin Ashok, Quentin Caudron, Bryan T Grenfell, Simon A Levin, et Ramanan Laxminarayan. 2014. « Global Antibiotic Consumption 2000 to 2010: An Analysis of National Pharmaceutical Sales Data ». *The Lancet Infectious Diseases* 14 (8): 742-50. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7).
- Walker, Georg, Ralf Hertle, et Volkmar Braun. 2004. « Activation of *Serratia Marcescens* Hemolysin through a Conformational Change ». *Infection and Immunity* 72 (1): 611-14. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.611-614.2004>.
- Wattam, Alice R., James J. Davis, Rida Assaf, Sébastien Boisvert, Thomas Brettin, Christopher Bun, Neal Conrad, et al. 2017. « Improvements to PATRIC, the All-Bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center ». *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D535-42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1017>.
- Weston, Natasha, Prateek Sharma, Vito Ricci, et Laura J.V. Piddock. 2018. « Regulation of the AcrAB-TolC Efflux Pump in *Enterobacteriaceae* ». *Research in Microbiology* 169 (7-8): 425-31. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.10.005>.
- Wilson, Hayley, et M. Estée Török. 2018. « Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* ». *Microbial Genomics* 4 (7). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000197>.
- Wirth, Thierry, Daniel Falush, Ruiting Lan, Frances Colles, Patience Mensa, Lothar H. Wieler, Helge Karch, et al. 2006. « Sex and Virulence in *Escherichia Coli*: An Evolutionary Perspective ». *Molecular Microbiology* 60 (5): 1136-51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>.
- Wise, R. 2002. « Antimicrobial Resistance: Priorities for Action ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49 (4): 585-86. <https://doi.org/10.1093/jac/49.4.585>.

Wood, Derrick E, et Steven L Salzberg. 2014. « Kraken: Ultrafast Metagenomic Sequence Classification Using Exact Alignments ». *Genome Biology* 15 (3): R46. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>.

World Health Organization. 2011. « European strategic action plan on antibiotic resistance ». [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0008/147734/wd14E\\_AntibioticResistance\\_111380.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/147734/wd14E_AntibioticResistance_111380.pdf).

World Health Organization. 2015. « Global action plan on antimicrobial resistance ». World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>.

World Health Organization. 2017. « Prioritization of Pathogens to Guide Discovery, Research and Development of New Antibiotics for Drug-Resistant Bacterial Infections, Including Tuberculosis ». 9789240026438 (electronic version). Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/311820>.

World Health Organization. 2021. *WHO Integrated Global Surveillance on ESBL-Producing E. Coli Using a “One Health” Approach: Implementation and Opportunities*. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340079>.

Yang, Y J, P J Wu, et D M Livermore. 1990. « Biochemical Characterization of a Beta-Lactamase That Hydrolyzes Penems and Carbapenems from Two *Serratia Marcescens* Isolates ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34 (5): 755-58. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.5.755>.

Yigit, Hesna, Anne Marie Queenan, Gregory J Anderson, Antonio Domenech-Sanchez, James W Biddle, Christine D Steward, Sebastian Alberti, Karen Bush, et Fred C Tenover. 2001. « Novel Carbapenem-Hydrolyzing <sup>β</sup>-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella Pneumoniae* ». *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER.* 45: 11.

Yong, Dongeun, Mark A. Toleman, Christian G. Giske, Hyun S. Cho, Kristina Sundman, Kyungwon Lee, et Timothy R. Walsh. 2009. « Characterization of a New Metallo-β-Lactamase Gene, *Bla*<sub>NDM-1</sub>, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella Pneumoniae* Sequence Type 14 from India ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (12): 5046-54. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>.

Yoshida, Catherine E., Peter Kruczkiewicz, Chad R. Laing, Erika J. Lingohr, Victor P. J. Gannon, John H. E. Nash, et Eduardo N. Taboada. 2016. « The *Salmonella In Silico* Typing Resource (SISTR): An Open Web-Accessible Tool for Rapidly Typing and Subtyping Draft *Salmonella* Genome Assemblies ». Édité par Michael Hensel. *PLOS ONE* 11 (1): e0147101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147101>.

Yoshida, H, M Bogaki, M Nakamura, et S Nakamura. 1990. « Quinolone Resistance-Determining Region in the DNA Gyrase *GyrA* Gene of *Escherichia Coli* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34 (6): 1271-72. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.6.1271>.

Yum, Jong Hwa, Dongeun Yong, Kyungwon Lee, Hyon-Suk Kim, et Yunsop Chong. 2002. « A New Integron Carrying VIM-2 Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene Cassette in a *Serratia Marcescens* Isolate ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 3.

Zaatout, Nawel, Samia Bouras, et Nouria Slimani. 2021. « Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-Producing *Enterobacteriaceae* in Wastewater: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of Water and Health* 19 (5): 705-23. <https://doi.org/10.2166/wh.2021.112>.

Zankari, E., H. Hasman, S. Cosentino, M. Vestergaard, S. Rasmussen, O. Lund, F. M. Aarestrup, et M. V. Larsen. 2012. « Identification of Acquired Antimicrobial Resistance Genes ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (11): 2640-44. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.

Zankari, Ea, Rosa Allesøe, Katrine G Joensen, Lina M Cavaco, Ole Lund, et Frank M Aarestrup. 2017. « PointFinder: A Novel Web Tool for WGS-Based Detection of Antimicrobial Resistance Associated with Chromosomal Point Mutations in Bacterial Pathogens ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (10): 2764-68. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx217>.

Zasowski, Evan J., Jeffrey M. Rybak, et Michael J. Rybak. 2015. « The  $\beta$ -Lactams Strike Back: Ceftazidime-Avibactam ». *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 35 (8): 755-70. <https://doi.org/10.1002/phar.1622>.

Zhou, Zhemin, Nabil-Fareed Alikhan, Khaled Mohamed, Yulei Fan, the Agama Study Group, et Mark Achtman. 2020. « The EnteroBase User's Guide, with Case Studies on *Salmonella* Transmissions, *Yersinia Pestis* Phylogeny, and *Escherichia* Core Genomic Diversity ». *Genome Research* 30 (1): 138-52. <https://doi.org/10.1101/gr.251678.119>.

Zhou, Zhemin, Nabil-Fareed Alikhan, Martin J. Sergeant, Nina Luhmann, Cátia Vaz, Alexandre P. Francisco, João André Carriço, et Mark Achtman. 2018. « GrapeTree: Visualization of Core Genomic Relationships among 100,000 Bacterial Pathogens ». *Genome Research* 28 (9): 1395-1404. <https://doi.org/10.1101/gr.232397.117>.

## **5 Annexes**

## Impact of Covid-19 pandemic in Extended Spectrum Beta-Lactamases Enterobacteriaceae circulation in three intensive care units of a 1 600-bed university hospital, France

François Gravey<sup>1,2</sup>, Marguerite Fines-Guyon<sup>2</sup>, Camille Jeanne-Leroy<sup>3</sup>, Christophe Isnard<sup>1,2</sup>, Paul Dequire<sup>2,3</sup>, Bénédicte Langlois<sup>1</sup>, Frédéric Ethuin<sup>4</sup>, Désiré Samba<sup>4</sup>, Damien Du Cheyron<sup>5</sup>, Cédric Daubin<sup>5</sup>, Claire Lesteven<sup>3</sup>, Olivier Join-Lambert<sup>1,2</sup>, Michel Auzou<sup>2</sup>, Guillaume Leduc<sup>2</sup>, Simon Le Hello<sup>1,2,3</sup>

1. Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (GRAM 2.0), Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France

2. CHU de Caen, Service de Microbiologie, Caen, France

3. CHU de Caen, Service d'Hygiène Hospitalière, Caen, France

4. CHU de Caen, Service de réanimation chirurgicale, Caen, France

5. CHU de Caen, Service de réanimation médicale, Caen, France

### Background:

Extended spectrum beta-lactamases Enterobacteriaceae (ESBL-E) are disseminating worldwide leading to an increase of morbi-mortality in intensive care units (ICUs). In Caen University hospital, since 2019, a prospective surveillance program based on whole genome sequencing (WGS) tends to monitor the circulation of ESBL producing *Escherichia coli* (Ecol), *Klebsiella pneumoniae* (Kpn) and *Enterobacter cloacae* complex (Ecc) in three ICUs. This work explored the impact of the covid-19 pandemic on the circulation of ESBL-E.

### Materials/methods:

the first ESBL-E identified as Ecol, Kpn or Ecc among patient hospitalized in medical, surgical or paediatric ICU was sequenced using Illumina NextSeq 500. In silico species confirmation, sequence type (MLST) and antimicrobial resistance genes were searched. A distance matrix based on Single Nucleotide Polymorphism (SNP) was constructed after mapping against a reference genome for all the strains which shared the same species, and the same ST. Cross-transmission (CT) was defined as a minimum of two strains with a maximum divergence of 10 SNP. Three study periods have been defined: pre-covid-19 March 2019 – February 2020, during covid-19 March 2020 – February 2021, post-covid-19 March 2021 to November 2021.

### Results:

In total, 372 strains have been isolated, regardless the study period, Ecol was the most frequently encountered specie followed by Kpn and Ecc (42%, 29% and 28% respectively). Delays of ESBL-E colonization or infection was very species related: respectively 2, 11 and 13 days for Ecol, Kpn and Ecc which highlighted the disparity of ESBL-E origins: community for Ecol and hospital-acquired for Kpn and Ecc. Regardless the period, none Ecol CT has been revealed in our hospital by while Kpn was associated with several outbreaks which have been slowed down during and after the covid-19 pandemic. Regarding Ecc, the proportion of TC as a mechanism of dissemination in the hospital was the less affected by the covid-19 period.

Discussions: ESBL-Ecol appeared to have a predominant community origin and its proportion increased during the pandemic probably due to the rush of news patients in ICUs. ESBL-Kpn was spreading inside the hospital through successful clones which could have been eradicate by the numerous hygiene measures developed during the pandemic. The proportion of Ecc did not change during the pandemic suggesting that it is the most hospital-oriented species capable of colonization of environmental reservoir from which it can disseminate to patients although the high level of infection control measures provided during the covid-19 pandemic.

Table I : Number of strains included in this study, median delay of isolation, number of unique sequence types and number of cross transmissions found using whole genome sequencing

		<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Number of strains (percentages)	Overall	158 (40)	106 (30)	108 (30)
	Before covid-19	72 (40)	53 (30)	68 (40)
	During covid-19	64 (50)	35 (30)	29 (20)
	After covid-19	22 (40)	18 (40)	11 (20)
Median delay of isolation (days)	Overall	2	13	11
	Before covid-19	1,5	12	13
	During covid-19	4,5	12	7
	After covid-19	1,5	19,5	10
Number of distinct ST	Overall	62	15	25
	Before covid-19	37	11	16
	During covid-19	32	9	10
	After covid-19	14	5	8
Number of cross-transmissions (percentage in the strain circulation)	Overall	5 (3)	42 (40)	56 (52)
	Before covid-19	1 (1)	22 (42)	43 (63)
	During covid-19	4 (6)	9 (26)	12 (41)
	After covid-19	0 (0)	11 (61)	1 (9)

## Exploration génomique de la dissémination d'*Enterobacter cloacae* en réanimation néonatale

Dequire Paul<sup>1</sup>, Jeanne-Leroy Camille<sup>1</sup>, Fazilleau Laura<sup>2</sup>, Fevre Margo<sup>1</sup>, Lehoussel Carine<sup>1</sup>, Nectoux Coralie<sup>1</sup>, Leduc Guillaume<sup>1</sup>, Renouard Isabelle<sup>1</sup>, Gravey François<sup>1,3</sup>, Le Hello Simon<sup>1,3</sup>

1. CHU de CAEN, Service de Microbiologie – Hygiène Hospitalière, Caen, France

2. CHU de CAEN, Service de Réanimation Néonatale, Caen, France

3. Dynamique, Inserm UM1311, Caen, France

### Introduction

Entre décembre 2021 et juillet 2022, vingt-six nouveau-nés ont été infectés et/ou colonisés par une souche d'*Enterobacter cloacae complex* hyper-productrice de céphalosporinase (AmpC<sup>HP</sup>) dans les unités de réanimation et de soins intensifs de néonatalogie d'un Centre Hospitalo-Universitaire Français. L'ensemble de ces souches a été séquencé pour réaliser des analyses de génomique comparative.

### Matériel et méthodes

Un antibiogramme en diffusion contenant 43 molécules a été réalisé permettant de faire un premier screening phénotypique. Les génomes ont été séquencés par la technologie Illumina Nextseq 500. Différents typages *in silico* ont été réalisés : détermination de l'espèce bactérienne, du schéma MLST, recherche du résistome. La recherche d'une présence environnementale a également été réalisée par prélèvements des points d'eaux (eau du lavabo, siphons) et des couveuses.

### Résultats

Au total, 30 souches, 26 isolées d'écouvillons et 4 souches provenant de prélèvements cliniques hyper-produisaient leur AmpC engendrant une résistance vis-à-vis de la ceftazidime et de la ceftriaxone. Aucune de ces souches ne produisaient de  $\beta$ -Lactamase à spectre étendu et les carbapénèmes restaient épargnées. Neuf souches appartenaient au ST1439, deux au ST175 et deux au ST138 avec respectivement une distance nucléotidique maximale de 3, 1 et 9 SNP, affirmant la transmission croisée de ces clones. Le reste des typages n'a mis en évidence que des souches sporadiques correspondant à onze ST distincts. Ces souches n'ont pas été identifiées au sein des siphons et/ou dans les couveuses. La souche épidémique ST1439 n'a été identifiée que sur les deux premiers mois marquant un arrêt des transmissions en février concomitant avec l'intervention de l'équipe d'hygiène.

### Conclusion

Trois populations de *Enterobacter cloacae complex* AmpC<sup>HP</sup> ont été la source d'évènements épidémiques chez 50% des patients infectés et/ou colonisés. La détection de ces épidémies fait suite à la mise en place depuis décembre 2021 d'une alerte et d'une mise en isolement des nourrissons porteurs d'entérobactérales AmpC<sup>HP</sup> en réanimation néonatale. Ces mesures ont permis d'endiguer les phénomènes épidémiques comme l'arrêt des transmissions du clone ST1439 après février 2022. L'importance du nombre des souches AmpC<sup>HP</sup> peut être l'illustration de la forte pression de sélection par les C3G au sein de ces unités de soins.

## Surveillance des entérobactéries résistantes aux C3G Réanimation néonatale

Nectoux Coralie<sup>1</sup> et Dequire Paul<sup>1</sup>, Jeanne-Leroy Camille<sup>1</sup>, Fazilleau Laura<sup>1</sup>, Fevre Margo<sup>1</sup>, Lehoussel Carine<sup>1</sup>, Leduc Guillaume<sup>1</sup>, Renouard Isabelle<sup>1</sup>, Gravey François<sup>1,3</sup>, Le Hello Simon<sup>1,3</sup>

1. CHU de CAEN, Service de Microbiologie – Hygiène Hospitalière, Caen, France
2. CHU de CAEN, Service de Réanimation Néonatale, Caen, France
3. Dynamique, Inserm UM1311, Caen, France

### Introduction

Entre décembre 2021 et août 2022, toutes les souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (E-C3GR) isolées au sein des services de réanimation néonatale et de soins intensifs ont été séquencées en génome complet afin de connaître l'épidémiologie bactérienne et les mécanismes de résistance.

### Matériel et méthodes

En plus des prélèvements à visée diagnostic, un écouvillonnage rectal des nourrissons a été réalisé pour toute nouvelle entrée, puis chaque semaine dans le service de réanimation néonatale puis ensemencé sur gélose sélective. Après antibiogramme, toutes les souches confirmées C3GR étaient séquencées par Illumina Nextseq500 afin de déterminer leur séquence type (ST) et leur résistome.

### Résultats

Au total : 54 souches de E-C3GR ont été retrouvées dont 47 souches hyper-productrices d'AmpC (AmpC<sup>HP</sup>) et seulement 7 entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendue représentant 1% des dépistages totaux contre 8% pour les souches AmpC<sup>HP</sup>. Les souches AmpC<sup>HP</sup>, appartenaient à uniquement deux complexes : 30 *Enterobacter cloacae* complexe (*Ecc*) (n=26 dépistages, 4 prélèvements cliniques : hémoculture (n=1), aspirations trachéales (n=2) et catheter (n=1)) et 17 *Citrobacter freundii* complexe (*Cfc*) (n=17 dépistages). Tous les *Ecc* étaient uniformément résistants à la ceftriaxone et à la ceftazidime alors que certains *Cfc* restaient sensibles à la ceftriaxone. Quatorze STs différents ont été identifiés chez les *Ecc* dont trois impliqués au sein de phénomènes épidémiques prouvés (ST 1439, ST175 et ST138) et neuf STs différents ont été identifiés parmi les *Cfc* dont deux phénomènes épidémiques au sein du même ST185. Une étude plus large entre 2016 et 2021 de l'épidémiologie de ces services retrouve la présence de 9% de E-C3GR dans les infections profondes allant jusqu'à 24% et 41% des prélèvements de dépistage pour *Cfc* et *Ecc* respectivement.

### Conclusion

La prise en compte parmi les souches de E-C3GR des souches AmpC<sup>HP</sup>, en plus des BLSE, révèle un phénomène inconnu et inquiétant. Cette prévalence des E-C3GR dans les services de néonatalogie peut s'expliquer par une forte pression de sélection antibiotique par les C3G et/ou des épidémies intra hospitalières (*Ecc* ST1439) et/ou la présence de réservoirs environnementaux (*Cfc*).

## Apport du séquençage dans la surveillance des EBLSE pour l'Equipe opérationnelle d'hygiène hospitalière (EOHH)

C. Leroyer, F. Gravey, D. Du Cheyron, JL Gerard, M Fines-Guyon, O Join-Lambert, A. Mouet, S. Le Hello

### Introduction/Objectif :

Depuis plusieurs années, la surveillance automatisée des BMR permet à l'EOHH de s'assurer de la mise en place des précautions complémentaires contact à chaque nouveau cas et de détecter des épidémies. Depuis 2019, le séquençage du génome complet de toutes les EBLSE identifiées en réanimation est réalisée en routine au sein du CHU. Nous décrivons les résultats de l'analyse quantitative complétée des résultats des données de séquençage afin de définir un algorithme d'alerte pour l'EOHH et confirmer les transmissions croisées.

### Matériel et Méthodes :

Nous avons extrait sur 2019-2020 les *K. pneumoniae*, *E.coli* et *E. cloacae* complex BLSE pour les services de réanimation adulte. Pour chaque espèce, la première souche BLSE par patient est séquencée en génome complet depuis 2019. Nous définissons un algorithme selon : alerte si identification de 2 BLSE de même espèce dans le même service sur une période de 1 mois, puis une transmission croisée possible si délai d'acquisition > 48h pour le 2nd patient, puis une transmission croisée suspectée si même séquence-type (ST) identifié entre les patients, et enfin une transmission croisée confirmée si la divergence en nombre de SNP (Single Nucleotide Polymorphisme) est  $\leq 10$  entre les souches. Nous avons ensuite calculé les performances de notre algorithme pour chacune des 3 espèces rétrospectivement sur 2019/2020.

### Résultats :

Trois cent vingt souches EBLSE identifiées et typées : 138 *E. coli*, 91 *K. pneumoniae* et 91 *E. cloacae* recouvrant les 7 unités de réanimations médicales ou chirurgicales adultes. Les alertes et le statut des transmissions croisées est représentée dans le tableau 1. La valeur prédictive positive de notre algorithme est de 14,3% pour *E. coli*, 51,8% pour *E. cloacae*, et 92,7% pour *K. pneumoniae*.

	<i>E. coli</i> n=138	<i>K. pneumoniae</i> n=91	<i>E. cloacae</i> n=91
<b>Alertes 2 BLSE</b> <i>même espèce &lt; 1 mois même unité</i>	111	63	62
<b>Transmission croisée possible</b> <b>BLSE n°2 &gt; 48h d'acquisition</b>	50	46	56
<b>Transmission croisée suspectée</b> <i>même ST pour les 2 BLSE</i>	14	41	34
<b>Transmission croisée prouvée</b> <i>même ST et &lt; 10 SNP</i>	2	38	30
<b>Performance de l'algorithme</b>			
<b>Valeur prédictive positive</b>	14,3 %	92,7 %	51,8 %
<b>Valeur prédictive négative</b>	100 %	34,7 %	82,9 %
<b>Sensibilité</b>	100 %	84,4 %	82,9 %
<b>Spécificité</b>	91,2 %	91,2 %	82,9 %

Conclusion :

La mise en place d'une alerte via un algorithme testé avec les données du séquençage permet de détecter rapidement les cas de transmissions croisées (TC), en particulier pour *K. pneumoniae* et *E. cloacae*. Nous confirmons l'acquisition principalement communautaire et la faible transmission des *E. coli* BLSE. Cette approche basée sur la preuve microbiologique permet à l'EOHH de confirmer une TC, d'adapter les mesures de prévention et d'orienter vers la réalisation d'une enquête environnementale en cas d'épidémie. En perspective, l'algorithme peut s'adapter selon les dynamiques de diffusion qui semblent être différentes entre espèces.

## Cellule Régionale d'Epidémiologie génoMique, la CREM de Normandie

Gravey F<sup>1</sup>, Borgey F<sup>2</sup>, Fines-Guyon M<sup>3</sup>, Isnard C<sup>3</sup>, Dequire P<sup>3</sup>, Auzou M<sup>3</sup>, Leduc G<sup>3</sup>, Join-Lambert O<sup>3</sup>, Thibon P<sup>2</sup>, Guet L<sup>2</sup>,  
Jeanne-Leroyer C<sup>3</sup>, Le Hello S<sup>1,3</sup>

1. Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (GRAM 2.0) Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, GRAM 2.0, 14000 Caen, France
2. Centre d'appui pour la prévention des infections associées aux soins Région Normandie, Caen, Rouen, France
3. CHU de Caen, Service de Bactériologie - Hygiène Hospitalière, Caen, France

### Introduction

Parmi les missions des CPIas figurent l'aide aux investigations des épisodes infectieux associés aux soins. Nous développons une Cellule Régionale d'Epidémiologie génoMique (CREM) en Normandie qui, grâce à l'essor du séquençage à haut-débit, a pour objectif d'identifier avec certitude les liens de transmission croisée et une aide microbiologique aux investigations d'épidémies.

### Matériels et Méthodes

Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2019, un recours à la CREM est proposé à tout établissement de santé de Normandie par le CPIas en cas d'épidémie (signalement e-sin) ou de suspicion d'acquisition d'une souche bactérienne. De plus, une surveillance génomique continue des entérobactérales productrices de BLSE (EBLSE) et/ou de carbapénémases (EPC) est effectuée dans les services de réanimation du CHU de Caen (1<sup>ère</sup> souche isolée par patient).

A réception des souches, un séquençage complet du génome est effectué par la technologie Illumina Nextseq. Différents typages *in silico* sont réalisés : détermination de l'espèce bactérienne (rMLST), schéma MLST, recherche du résistome (<https://www.genomicepidemiology.org/>). Une recherche de variants après mapping des séquences sur un génome de référence approprié permet de déterminer la distance nucléotidique (SNP) entre les souches étudiées.

### Résultats

Entre le 1<sup>er</sup> janvier 2019 et décembre 2020, 508 souches bactériennes ont été séquencées et étudiées, réparties en 190 souches d'*Escherichia coli* (37%), 177 souches de *Klebsiella pneumoniae* (KP, 35%), 115 souches d'*Enterobacter cloacae* (ECC, 23%) et 26 autres entérobactérales (5%). Parmi celles-ci, 6% des souches ont été envoyées dans le cadre d'une investigation d'une épidémie et 1% correspondent à des souches environnementales.

Deux populations bactériennes dominent, KP ST405 (33% des KP), ECC ST66 (37% des ECC) et représentent une part importante des transmissions croisées. Sur les années 2019 et 2020, c'est 75 souches (15%) impliquées dans des transmissions croisées ou épidémies confirmées (<10 SNP de divergence entre souches).

### Conclusion

La CREM est un service support pour l'ensemble des bactériologistes et hygiénistes de la région Normandie. Elle permet de mieux préciser, les mécanismes de résistances aux antibiotiques émergents, les voies de dissémination de ces BMR/BHRe à l'échelle d'une région, et les mesures de prévention qui doivent en découler lors d'une épidémie.

## Dissémination d'entérobactériales productrices carbapénèmases *OXA-48-like* au sein d'un CH

François Gravey<sup>1</sup>, Isabelle Herluison-petit<sup>2</sup>, Paul Dequière<sup>3</sup>, Michel Auzou<sup>3</sup>, Guillaume Leduc<sup>3</sup>, Marguerite Fines<sup>3</sup>, Christophe Isnard<sup>3</sup>, O. Join-Lambert<sup>3</sup>, Pascal Thibon<sup>4</sup>, France Borgey<sup>4</sup>, Simon Le Hello<sup>1,3</sup>

1. Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (GRAM 2.0) Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, GRAM 2.0, 14000 Caen, France
2. CH FALAISE-CH ARGENTAN, Coordonnateur de gestion des risques associés aux soins, Argentan, France
3. CHU de Caen, Service de Bactériologie - Hygiène Hospitalière, Caen, France
4. Centre d'appui pour la prévention des infections associées aux soins Région Normandie, Caen, France

### Introduction

Entre 2019 et 2021 seize patients ont été infectés et/ou colonisés par différentes espèces d'entérobactériales productrices de carbapénèmases de type *OXA-48-like* au sein du centre hospitalier d'Argentan. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la circulation de ces enzymes : circulation endémique d'un clone ou épidémie de plasmides, les souches ont été adressées à la Cellule Régionale d'Épidémiologie Génomique (CREM) de Normandie, pour des analyses de génomique comparative.

### Matériel et Méthodes

Toutes les souches ont été séquencées en génome complet sur l'automate Illumina NextSeq 500. Les génomes ont été *de novo* assemblés via SPAdes puis différents typages *in silico* ont été réalisés : détermination de l'espèce bactérienne, schéma MLST, recherche du résistome complet. Le contenu en plasmides a été étudié grâce aux outils plasmidfinder et PLSDB. La distance nucléotidique basée sur les SNP a été évaluée par mapping des reads sur des génomes de référence (i) lorsque deux souches de la même espèce appartenaient au même Sequence Type (ST) afin de rechercher des arguments pour une transmission croisée (ii) de comparer les plasmides et (iii) de typer le transposon Tn1999 caractérisant les plasmides portant les OXA-48.

### Résultats

Six espèces bactériennes ont été identifiées : *Escherichia coli* (n= 8), *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* et *Klebsiella oxytoca* (n=2), *Citrobacter amalonaticus* et *Klebsiella variicola* (n=1). Quatorze souches produisaient la carbapénémase OXA-48 et deux l'OXA-181. La présence de transmission croisée a été mise en évidence pour 4 couples de souches n'expliquant pas l'ensemble de la circulation des carbapénèmases. Parmi les 12 souches productrices d' OXA-48, 2 *E. coli* ST127 portaient un plasmide de la famille IncF de 27029 nucléotides. Les 10 autres souches portaient un plasmide de la famille IncL de 63593 nucléotides. Ces 10 plasmides différaient entre eux d'un maximum de 1 SNP et portaient tous un transposon de type Tn1999.3 illustrant une diffusion d'OXA-48 à la faveur d'un plasmide épidémique au sein de différentes espèces.

### Conclusion

La circulation des carbapénèmases OXA-48-like est complexe et de mécaniques diverses. La transmission interespèces de plasmides de type IncL portant le transposon tn1999.3 semble être la dynamique principale de ce phénomène suspectant un réservoir plus large qui reste à explorer à l'échelle régionale et/ou nationale.

Performance of Fourier-transform infrared spectroscopy typing: a monocentric study using a prospective two-year collection of 284 clinical extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli*, *K. pneumoniae* and *E. cloacae* complex isolates from three clinical wards with high risk of outbreaks.

F. Gravey<sup>1,6</sup>, M. Cordovana<sup>2</sup>, M. Fines-Guyon<sup>1</sup>, D. du Cheyron<sup>3</sup>, F. Ethuin<sup>4</sup>, L. Fazilleau<sup>5</sup>, M. Auzou<sup>1</sup>, M. Kostrzewa<sup>2</sup> Simon Le Hello<sup>1,6</sup>, and O. Join-Lambert<sup>1,6</sup>

1 Service de Microbiologie-Hygiène, Caen Normandie Hospital, Caen, France  
2 Bruker Daltonics  
3 Service de Réanimation médicale, Caen Normandie Hospital, Caen, France  
4 Service de Réanimation chirurgicale, Caen Normandie Hospital, Caen, France  
5 Service de Réanimation néonatale, Caen Normandie Hospital, Caen, France  
6 Research Group on Microbial Adaptation, GRAM 2.0, EA2656, Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, Caen, France

## Background

Fourier-Transform InfraRed spectroscopy (FTIR) is a developing rapid, simple typing technology. In this study, we assessed the accuracy of FTIR to identify the most frequently recovered ESBL-producing Enterobacteriaceae (ESBL-E) species in high-risk clinical wards of our hospital at the sequence type (ST) level.

## Methods.

To reach this aim, we used a prospective collection of 284 consecutive ESBL-E clinical isolates, including 120 *E. coli* (ECOL), 83 *K. pneumoniae* (KP), and 81 *E. cloacae* complex isolates (ECC, 72 *E. hormaechei*, 7 *E. cloacae* and 2 *E. kobei*). Isolates were recovered in 2019 and 2020 from patients hospitalized in 2 adult Intensive care units and in neonatology, excluding replicates in a same patient. Multi locus sequence typing (MLST) was performed by in silico analysis after whole genome sequencing (WGS). Clonality within STs was assessed by SNP typing (<20). FTIR was performed using the IR Biotyper System (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) running the IR Biotyper software with default settings, unaware of WGS typing results. A FTIR type was defined by a cluster of isolates or by a single isolate not clustering with others at the threshold clustering level automatically defined. We used the Simpson diversity index, the adjusted Rand's index and the Wallace coefficient to assess the discriminatory power and correspondence level of FTIR typing compared to MLST.

## Results.

FTIR types diversity varied according to species, reflecting significant variations in genomic diversity of isolates at the ST level: 55 STs for *E. coli*, 19 STs for KP and 14 STs for ECC isolates (Figure 1). *E. coli* ST131, KP ST405, and ECC ST66 were the most frequent clonal group (28% of ECOL, 44% of KP and 43% of ECC isolates, respectively). Agreement between the two methods was satisfactory for KP and ECC but not for *E. coli*, probably reflecting a high frequency of KP and ECC nosocomial acquisitions/outbreaks (< 20 SNPs) compared to *E. coli* isolates (none) during the 2-year study period.

## Conclusion.

FTIR typing is a real-time first-step powerful technique for surveillance of MDR KP and ECC outbreaks in high-risk clinical wards. Suspected clonal outbreaks should be confirmed by WGS.

	Method	N° of types	Simpsons (95% CI)	Adjusted Rand	Adjusted Wallace (95%CI)
E. coli	FTIR	52	0.890 (0.849-0.931)	0.420	0.361 (0.286-0.437)
	MLST	55	0.918 (0.876-0.960)		0.502 (0.336-0.668)
K. pneumoniae	FTIR	22	0.768 (0.679-0.856)	0.862	0.853 (0.696-1.000)
	MLST	19	0.772 (0.688-0.855)		0.873 (0.755-0.990)
E. cloacae complex	FTIR	13	0.743 (0.668-0.818)	0.884	0.800 (0.695-0.905)
	MLST	14	0.781 (0.701-0.861)		0.987 (0.971-1.000)

N° of types: FITR types and sequence types. Simpsons: diversity index. Adjusted rand: global correlation index between the two methods. Adjusted Wallace: directionality of the correspondences

## Modification de l'opéron *ramAR*, facteur d'adaptation de *Klebsiella variicola* ?

Langlois Bénédicte<sup>1,2</sup>, Gravey François<sup>1,2</sup>, Isnard Christophe<sup>1,2</sup>, Capitaine Agathe<sup>2</sup>, Guérin François<sup>3</sup>, Auzou Michel<sup>2</sup>, Ethuin Frédéric<sup>4</sup>, Join-Lambert Olivier<sup>1,2</sup>, Brisse Sylvain<sup>5</sup> et Le Hello Simon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Unité UMR 1311, INSERM, DYNAMICURE, Unicaen

<sup>2</sup> Service de microbiologie, CHU de Caen

<sup>3</sup> Service de bactériologie et hygiène hospitalière, CHU de Rennes

<sup>4</sup> Service de réanimation chirurgicale, CHU de Caen

<sup>5</sup> Institut Pasteur, Université Paris Cité, Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes, Paris

### Introduction :

Au cours d'une hospitalisation de huit semaines en réanimation pour hémorragie cérébrale chez une patiente âgée de 61 ans, sept souches de *Klebsiella variicola* (Kv) ont été isolées de prélèvements rectaux hebdomadaires. L'objectif de cette étude était d'étudier les modifications génomiques et phénotypiques éventuelles pouvant favoriser la persistance de cette souche dans un environnement à forte pression de sélection que sont les services de réanimation.

### Matériels et méthodes

Les sept isolats successifs ont été caractérisés phénotypiquement par antibiogrammes par diffusion en gélose, mesure de CMI en microdilution, croissance en présence de sels biliaires et ont été séquencés (Illumina) pour détermination du séquence-type (ST), identification des gènes de résistance, annotation complète des génomes et mesure de l'évolution la distance génomique des isolats au cours du temps.

### Résultats

Les sept isolats appartenaient au ST1563 et ne différaient entre eux de deux nucléotides au maximum, indiquant la persistance d'un même clone tout au long de l'hospitalisation. Deux isolats obtenus après six semaines d'hospitalisation (ESSO7 et ESSO8) présentaient une diminution de sensibilité au chloramphénicol, aux quinolones et aux cyclines ainsi qu'une tolérance accrue aux sels biliaires forte concentration sans acquisition apparente de gènes de résistance (Tableau 1). Ce phénotype a pu être associé à une mutation génomique unique (T454G) située dans le régulateur transcriptionnel *ramR* et se traduisant par une modification de la séquence protéique (D152Y).

Cette substitution d'acide aminé pourrait modifier les propriétés physico-chimiques du site liaison au substrat de RamR entraînant un changement de comportement du régulateur et la surexpression de pompes d'efflux de type RND. Confirmant cette hypothèse, la détermination de CMI aux antibiotiques en présence de PA $\beta$ N, un inhibiteur spécifique des pompes RND, a montré une restauration des sensibilités aux antibiotiques et aux sels biliaires, tout comme la complémentation des souches ESSO7 et ESSO8 par le gène *ramR* non muté (Tableau 1).

### Conclusion

**Cette étude démontre qu'une simple mutation de l'opéron RamAR confère une tolérance accrue à différents stress par surexpression de pompes d'efflux RND. L'impact observé *in vitro* de cet opéron sur l'adaptation de Kv à un environnement riche en biocides n'est-il que la partie immergée de l'iceberg ?**

Tableau 1 : Caractéristiques génomiques et CMI en microdilution des souches de *K. variicola* présentant un gène *ramR* sauvage (ESSO2 à 6), *ramR* muté (ESSO7 et 8) avec et sans PA $\beta$ N et de *K.variicola* complétées avec le gène *ramR* fonctionnel ( $\Omega$  *ramR*).

Souches	ST	Résistome	CMI (mg/L)								
			Chloramphénicol			Ciprofloxacine			Tigécycline		
				+ PA $\beta$ N	$\Omega$ <i>ramR</i>		+ PA $\beta$ N	$\Omega$ <i>ramR</i>		+ PA $\beta$ N	$\Omega$ <i>ramR</i>
ESSO2	ST1563	<i>bla</i> LEN17, <i>bla</i> SHV1	8	-	-	0.03	-	-	0.5	-	-
ESSO3	ST1563	<i>bla</i> LEN17, <i>bla</i> SHV1	8	-	-	0.03	-	-	0.5	-	-
ESSO4	ST1563	<i>bla</i> LEN17, <i>bla</i> SHV1	8	-	-	0.03	-	-	0.5	-	-
ESSO5	ST1563	<i>bla</i> LEN17, <i>bla</i> SHV1	8	-	-	0.03	-	-	0.5	-	-
ESSO6	ST1563	<i>bla</i> LEN17, <i>bla</i> SHV1	8	-	-	0.03	-	-	0.5	-	-
ESSO7	ST1563	<i>bla</i> LEN17, <i>bla</i> SHV1	64	0.5	2	1.125	0.03	0.03	4	0.5	0.25
ESSO8	ST1563	<i>bla</i> LEN17, <i>bla</i> SHV1	64	0.5	2	0.125	0.03	0.015	2	0.25	0.25

Titre : Génomique des bactéries multirésistantes aux antibiotiques en Normandie : investigations épidémiques, études populationnelles, mécanismes de résistance aux antibiotiques

Résumé : La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique responsable du décès de plus d'un million de personnes par an à travers le monde. Ce travail de thèse avait pour but de développer un système de surveillance de la circulation des entérobactérales multi-résistantes basé sur une caractérisation phénotypique et génomique. Différentes épidémies ont été investiguées pour lesquelles l'apport des analyses de génomiques comparatives s'est révélé crucial. Il a été démontré le rôle de l'opéron *ramAR* dans l'adaptation au long cours d'une souche d'*Enterobacter hormaechei*. Cet opéron est très fréquemment muté au sein des souches d'entérobactérales productrices de BLSE (E-BLSE) soumises à une forte pression de sélection. Enfin, les dynamiques de circulation et de transmission des E-BLSE étaient propres à l'espèce considérée mais aussi liées à la nature du service clinique. *Escherichia coli* avait une origine communautaire et était rarement responsable d'épidémies. A l'inverse, plus de 80% des souches de *Klebsiella pneumoniae* et de *Enterobacter cloacae* complexe étaient d'origine nosocomiales et très fréquemment associées à des phénomènes de transmissions croisées. La pandémie de covid-19 a profondément modifié la circulation et les populations de *K. pneumoniae*, tandis que les mêmes clones endémiques de *Ecc* persistaient toujours à l'hôpital. Le séquençage du génome complet a acquis une place centrale dans la surveillance de la circulation des entérobactérales multi-résistantes à l'échelle du CHU de Caen et de la région Normandie. Associées aux approches phénotypiques, ces données permettent de mieux comprendre l'adaptation bactérienne au long cours.

Title: Genomics of multi-resistant bacteria in Normandy: epidemic investigations, population studies, mechanisms of antibiotic resistance

Abstract: Antibiotic resistance is a major public health burden responsible for the death of over one million people per year worldwide. The aim of this thesis was to develop a surveillance system for the circulation of multidrug-resistant enterobacteriales based on phenotypic and genomic characterization. Different epidemics were investigated for which the contribution of comparative genomic analyses was crucial. The role of the *ramAR* operon in the long-term adaptation of an *Enterobacter hormaechei* strain was demonstrated. This operon was very frequently mutated among ESBL-producing enterobacteriales (ESBL-E) subject to strong selection pressure. Finally, the dynamics of ESBL-E circulation and transmission were specific to the species but also related to the nature of the clinical department. *Escherichia coli* had a community origin and were rarely responsible for outbreaks. In contrast, more than 80% of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* complex strains had a nosocomial origin and were frequently associated with cross-transmission. The covid-19 pandemic profoundly altered the circulation and populations of *K. pneumoniae*, while the same endemic clones of *Ecc* still persisted in hospitals. Whole genome sequencing has acquired a central place in the surveillance of the circulation of multidrug-resistant enterobacteriales in the Teaching Hospital of Caen and in Normandy. Combined with phenotypic approaches, these data provide a better understanding of long-term bacterial adaptation.

---

Keywords: Bacterial genomic, outbreaks, antimicrobial resistance, enterobacteriales