



HAL
open science

Caractérisation génomique des bacilles à Gram négatif producteurs de méthyltransférases de l'ARNr 16S et alternatives thérapeutiques

François Caméléna

► **To cite this version:**

François Caméléna. Caractérisation génomique des bacilles à Gram négatif producteurs de méthyltransférases de l'ARNr 16S et alternatives thérapeutiques. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5147 . tel-04616409

HAL Id: tel-04616409

<https://theses.hal.science/tel-04616409>

Submitted on 18 Jun 2024

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.

Université Paris Cité

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC – ED 562)

Unité Infection, Anti-microbien, Modélisation, Évolution (IAME - UMR-S 1137)

Équipe Écologie, évolution et thérapeutique de la virulence et de la résistance chez les
bactéries (EVRest)

Caractérisation génomique des bacilles à Gram négatif producteurs de méthyltransférases de l'ARNr 16S et alternatives thérapeutiques

Par François Caméléna

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par la Professeure Béatrice Berçot

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 9 Décembre 2022

Devant un jury composé de :

- Rapporteurs : **Mme la Professeure Katy Jeannot**
Professeure des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Franche-Comté
- M le Docteur Thierry Naas**
Maitre de Conférences des Universités –Praticien Hospitalier, Université Paris-Saclay
- Examineurs : **Mme la Professeure Véronique Dubois**
Professeure des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Bordeaux
- M le Professeur Stéphane Bonacorsi**
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris Cité
- Directrice : **Mme la Professeure Béatrice Berçot**
Professeure des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris Cité

RESUME

Les méthyltransférases de l'ARNr 16S (RMTase) sont des enzymes qui confèrent une résistance à haut niveau (CMI \geq 256 mg/L) aux aminoglycosides (AG) d'usage clinique. Depuis les années 2000, les RMTases acquises ont émergé chez des bacilles à Gram négatif, particulièrement chez les producteurs de carbapénémase.

Les objectifs de ce travail étaient d'identifier et de caractériser sur le plan phénotypique et génotypique les bactéries productrices de RMTase dans notre collection pour décrire l'épidémiologie de cette résistance en France afin de mieux comprendre leurs émergences.

Nous avons identifié des RMTases dans des isolats de Enterobacterales, de *A. baumannii* et de *P. aeruginosa* ; leurs prévalences respectives sont estimées à 0,12%, 4,4% et 0,26 % dans notre collection. Chez les Enterobacterales, les RMTases ArmA et RmtB sont les plus fréquentes et sont principalement retrouvées chez *E. coli* et *K. pneumoniae* dans de multiples clones incluant des clones à haut risque. Dans les isolats de *E. coli*, le gène *armA* est principalement localisé sur le transposon Tn1548 retrouvé sur des plasmides IncM, alors que le gène *rmtB* est retrouvé flanqué de différentes séquences d'insertion et hébergé sur des plasmides de type IncF. Chez *K. pneumoniae*, la RMTase RmtF est retrouvée uniquement dans des isolats coproduisant des carbapénémases et appartenant aux clones ST147 et ST231. Dans les isolats de *A. baumannii*, seule la RMTase ArmA est identifiée et uniquement chez des isolats producteurs de carbapénémase, principalement OXA-23. Ces isolats appartiennent à trois clones différents, le plus fréquent est le ST2. Dans les isolats de *P. aeruginosa*, les RMTases ne semblent pas être le mécanisme le plus fréquemment associé à la résistance à haut niveau aux AG. Les gènes de RMTase identifiés sont *rmtF2* et *rmtB4* majoritairement décrits dans le chromosome bactérien au sein d'éléments conjugatifs et intégratifs (ICE). Enfin, nous avons évalué l'activité de l'apramycine sur notre collection de bactéries productrices de RMTase et nous avons montré que la résistance à cette AG est rare (<5%) chez ces bactéries suggérant que l'apramycine constituerait une alternative thérapeutique intéressante en cas d'infection.

Ce travail a permis une caractérisation étendue, incluant des analyses phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques, améliorant les connaissances des bacilles à Gram négatif producteurs de RMTases en France. Bien que rare, les bactéries productrices de RMTases semblent émerger en France par expansion clonale et potentiellement grâce à leur association avec des éléments génétiques mobiles et des carbapénémases, soulignant la nécessité de surveiller cette résistance dans le futur.

Mots clés : Aminoglycosides, méthyltransférase de l'ARNr 16S, Enterobacterales, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, plasmide, élément génétique mobile, carbapénémase, apramycine

Genomic characterization of 16S rRNA methyltransferase-producing Gram-negative bacilli and therapeutic alternatives

ABSTRACT

16S rRNA methyltransferases (RMTases) are enzymes that confer high-level resistance (MIC ≥ 256 mg/L) to clinically relevant aminoglycosides (AG). Since the 2000s, acquired RMTases have emerged in Gram-negative bacilli, particularly in carbapenemase producers.

The objectives of this work were to identify and characterize phenotypically and genotypically the RMTase-producing bacteria in our collection to further describe the epidemiology of this resistance in France and to better understand their emergence.

We identified RMTases in Enterobacterales, *A. baumannii* and *P. aeruginosa* isolates; their prevalences are estimated at 0.12%, 4.4% and 0.26%, respectively, in our collection. Among Enterobacterales, the RMTases ArmA and RmtB are the most frequent and are mainly found in *E. coli* and *K. pneumoniae* in multiple clones including high risk clones. In *E. coli* isolates, the *armA* gene is mainly located on the Tn1548 transposon found on IncM plasmids, while the *rmtB* gene is found flanked by different insertion sequences and harbored by IncF plasmids. In *K. pneumoniae* isolates, the RmtF RMTase is found only in carbapenemase co-producing isolates belonging to clones ST147 and ST231. In *A. baumannii* isolates, only the RMTase ArmA is identified and solely in carbapenemase-producing isolates, mainly OXA-23. These isolates belong to three different clones, the most frequent being ST2. In *P. aeruginosa* isolates, RMTases do not represent the most frequent mechanism associated with high-level AG resistance. The most frequent RMTase genes identified are *rmtF2* and *rmtB4* localized in the bacterial chromosome within conjugative and integrative elements (ICE). Finally, we evaluated the activity of apramycin in our collection of RMTase-producing bacteria and showed that resistance to this AG is rare (<5%) suggesting that apramycin could represent an interesting therapeutic option in case of infection.

This work allowed an extensive characterization, including phenotypic, genotypic and phylogenetic analyses, improving the knowledge of Gram-negative bacilli producing RMTases in France. Although rare, RMTase-producing bacteria seem to emerge in France by clonal expansion and potentially through their association with mobile genetic elements and carbapenemases, highlighting the need of a surveillance of this resistance in the future.

Key words: Aminoglycosides, 16S rRNA methyltransferase (RMTase), Enterobacterales, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, plasmid, mobile genetic element, carbapenemase, apramycin

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement chacun des membres du jury de me faire l'honneur d'évaluer ce travail,

à Madame la Professeure Kathy Jeannot et à Monsieur le Docteur Thierry Naas, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, pour le temps consacré à sa lecture et à son analyse critique,

à l'ensemble des autres membres du jury, Madame la Professeure Véronique Dubois, et à Monsieur le Professeur Stéphane Bonacorsi pour avoir examiné et évalué ce travail,

à ma Directrice de Thèse, Madame la Professeure Béatrice Berçot, à qui je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance, pour ta bienveillance, ta confiance et ton soutien accordés tout au long de cette thèse et en tant qu'assistant dans ton service ; merci de m'avoir proposé ce sujet passionnant et de m'avoir laissé l'autonomie nécessaire pour me l'approprier et le mener à bien, à Madame Manel Merimèche, merci pour ton aide, ta disponibilité et ta gentillesse, ainsi que ta capacité à faire que tout fonctionne tout le temps,

à Monsieur le Professeur Erick Denamur, directeur de l'unité IAME, pour la qualité de votre accueil, votre bienveillance et pour votre aide qui ont contribué à la réussite et à l'amélioration de ce travail,

à Mathilde Liberge, pour ta bonne humeur, ta persévérance et ton aide inestimable pour réaliser cette thèse,

à Florence Morel, sans qui ce travail n'aurait jamais commencé,

aux internes qui ont participé à cette thèse, Pauline, Clotilde et Inès, merci d'avoir apporté votre pierre à l'édifice,

à l'ensemble de l'unité IAME, et en particulier à Mélanie pour ton aide et ton expertise,

à l'équipe du CNR, Aymeric et Mary, pour votre disponibilité et le partage de votre savoir-faire,

à tous les membres du laboratoire de Bactériologie de Saint-Louis et de Lariboisière pour votre sympathie au quotidien et de permettre au labo d'exister,

à mes collègues biologistes, en particulier Thibaut, mon éternel co-assistant, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions,

à tous les gens que j'ai croisés tout au long de mon cursus et qui m'ont donné envie de faire de la bactériologie mon métier : Gaëlle, Anaïs, Laurent, Assaf, Benoît, Jean-Claude, Alban, Thierry (Monsieur Méthylase), Patricia, Philippe, Stéphane et André,

à ma famille,

à mes amis,

et à Cécile.

TABLE DES MATIERES

Table des illustrations	14
Index des tableaux.....	15
Liste des abreviations.....	16
1 Introduction	19
1.1 Résistance aux antibiotiques	19
1.1.1 Découverte des antibiotiques	19
1.1.2 Impact de la résistance aux antibiotiques	20
1.1.3 Méthode microbiologique d'étude des bactéries résistantes aux antibiotiques....	20
1.1.3.1 Les antibiogrammes	20
1.1.3.2 Les techniques de typage de bactérie	21
1.1.4 Focus sur les bacilles à Gram négatif.....	23
1.1.4.1 Entérobactéries	23
1.1.4.2 Non-fermentant	23
1.2 Les aminoglycosides	24
1.2.1 Découverte des aminoglycosides	24
1.2.2 Structure des aminoglycosides	25
1.2.3 Utilisation des aminoglycosides.....	26
1.2.4 Toxicité.....	27
1.2.5 Mécanismes d'action.....	28
1.2.5.1 Pénétration intrabactérienne	28
1.2.5.2 Action sur l'ARN 16S ribosomal	28
1.2.5.3 Effet bactéricide	30
1.2.6 Mécanismes de résistance aux aminoglycosides.....	31
1.2.6.1 Résistance par imperméabilité membranaire	31
1.2.6.2 Résistance par efflux de l'antibiotique.....	32
1.2.6.3 Résistance par inactivation enzymatique	33
1.2.6.4 Résistance par mutation de la cible ribosomale	39
1.3 Méthyltransférase de l'ARNr 16S (RMTase)	39
1.3.1 Origine des RMTases	40
1.3.2 Découverte des RMTases acquises chez les bactéries à Gram négatif	41
1.3.3 Distribution mondiale des RMTases	45

1.3.3.1	NpmA	45
1.3.3.2	NpmB	45
1.3.3.3	ArmA.....	46
1.3.3.4	RmtA.....	46
1.3.3.5	RmtB	46
1.3.3.6	RmtC	47
1.3.3.7	RmtD	47
1.3.3.8	RmtE.....	47
1.3.3.9	RmtF.....	48
1.3.3.10	RmtG	48
1.3.3.11	RmtH.....	50
1.3.4	Prévalence de la résistance par production de RMTase	50
1.3.5	Impact des RMTases sur la santé publique	51
1.3.5.1	Association avec d'autres gènes de résistance aux antibiotiques.....	52
1.3.5.2	Association avec des éléments génétiques mobiles	53
1.3.5.3	Identification chez les animaux.....	64
1.3.5.4	Identification dans l'environnement.....	65
1.3.6	Aminoglycosides actifs sur les bactéries productrices de RMTase	65
1.4	Objectifs du travail de thèse	67
2	Travaux expérimentaux.....	70
2.1	CHAPITRE I : Caractérisation génomique des <i>E. coli</i> producteurs de RMTase en région parisienne.	70
2.1.1	Introduction à la publication n°1	70
2.1.2	Publication n°1	73
2.1.3	Commentaires de la publication n°1	93
2.2	CHAPITRE II : Détection d'isolats de <i>K. pneumoniae</i> coproducteurs de carbapénémase et de la RMTase RmtF à Paris	98
2.2.1	Introduction à la publication n°2.....	98
2.2.2	Publication n°2	103
2.2.3	Commentaire de la publication n°2.....	110
2.3	CHAPITRE III : Caractérisation génomique des <i>P. aeruginosa</i> producteurs de RMTase isolés au groupe hospitalier Saint-Louis-Lariboisière-Fernand Widal à Paris. ...	115
2.3.1	Introduction à la publication n°3.....	115

2.3.2	Publication n°3	119
2.3.3	Commentaire de la publication n°3	148
2.4	CHAPITRE IV : Epidémiologie des Enterobacterales et <i>A. baumannii</i> producteurs de RMTase à Paris.	155
2.4.1	Introduction	155
2.4.2	Sélection des souches cliniques, séquençage et analyse bio-informatique	156
2.4.3	Résultats	157
2.4.4	Discussion	174
2.5	CHAPITRE V : Activité de l'apramycine sur une collection de bacilles à Gram négatif producteurs de RMTase.	179
2.5.1	Introduction à la publication n°4.....	179
2.5.2	Publication n°4	184
2.5.3	Commentaire de la publication n°4.....	210
3	Discussion et Perspectives.....	217
4	Références	228
5	Annexes.....	263

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Structures du noyau aminocyclitol et de différents aminoglycosides.....	26
Figure 2. Représentations détaillées de l'ARNr 30S et de son interaction avec un aminoglycoside.....	30
Figure 3. Transport des aminoglycosides à travers la paroi bactérienne incluant l'entrée par des porines et l'efflux par une pompe d'efflux AcrAD-TolC de type RND.	33
Figure 4. Exemple de modifications chimiques des aminoglycosides par les AME.	34
Figure 5. Interaction entre un aminoglycoside du groupe 4,6-2-DOS (Gentamicine) et du groupe 4,5-2-DOS (Néomycine) avec les résidus G1405 et A1408 de l'ARNr 16S..	40
Figure 6. Arbre Phylogénétique des RMTases intrinsèques et acquises.	44
Figure 7. Distribution mondiale des RMTases.....	49
Figure 8. Mécanismes de transfert horizontaux de gènes.....	53
Figure 9. Exemple d'éléments génétiques mobiles (MGE) et processus impliqués dans la mobilité intracellulaire ou le transfert extracellulaire de gènes de résistance aux antibiotiques.	55
Figure 10. Association des séquences d'insertion IS26 avec <i>npmA</i> et <i>rmtD</i> , du transposon Tn2 avec <i>rmtB</i> , de la séquence <i>ISEcp1</i> avec <i>rmtC</i> et des séquences <i>ISCR14</i> avec <i>rmtD</i>	58
Figure 11. Comparaison de Tn1548 associé à <i>armA</i>	60
Figure 12. Représentation schématique du plasmide pRmtH.	62
Figure 13. Antibiogramme de l'isolat KP24.	100
Figure 14. Diagramme de la sélection des Enterobacterales producteurs de RMTase.	158
Figure 15. Diagramme de la sélection des <i>A. baumannii</i> producteurs de RMTase.....	159
Figure 16. Nombre total de gènes de RMTase trouvés dans les isolats de Enterobacterales (n=53).	160

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Année de découverte et origines de différents aminoglycosides.	25
Tableau 2. Profils de résistance aux aminoglycosides et bactéries associées en fonction du types d'AME.....	36
Tableau 3. Principaux gènes codant pour des enzymes modificatrices des aminoglycosides à localisation chromosomique.....	38
Tableau 4. RMTases intrinsèques présentes chez des bactéries naturellement productrices d'aminoglycosides.....	41
Tableau 5. Découverte des gènes codant les RMTases acquises.	43
Tableau 6. Plasmides historiquement décrits comme porteurs de RMTase.....	63
Tableau 7. Gènes de carbapénémase retrouvés chez les isolats producteurs de RMTase (n=106) par NGS.....	161
Tableau 8. Gènes de carbapénémase par bactérie productrice de RMTase (n=106) identifiés par NGS.....	162
Tableau 9. Gènes de BLSE retrouvés chez les isolats de Enterobacterales producteurs de RMTase (n=53) par NGS.	164
Tableau 10. Gènes de BLSE en fonction des gènes de RMTase (n=53) retrouvés par NGS.	164
Tableau 11. Caractéristiques des Enterobacterales résistants à haut niveau aux AG sans production de RMTase.	167
Tableau 12. Caractéristiques des <i>A. baumannii</i> résistants à haut niveau aux AG sans production de RMTase..	167
Tableau 13. Caractéristiques des Enterobacterales producteurs de RMTase.....	171
Tableau 14. Caractéristiques des <i>A. baumannii</i> producteurs de RMTase.....	173
Tableau 15. Distribution des gènes de RMTase par espèce bactérienne.	180

LISTE DES ABREVIATIONS

AAC : Aminoglycoside Acétyltransférase	MALDI-TOF MS : Spectrométrie de masse couplée à une source d'ionisation laser assistée par une matrice
ADN : Acide désoxyribonucléique	MDR : Multirésistant aux antibiotiques
AG : Aminoglycoside	MGE : Eléments génétiques mobiles
AME : Enzyme modifiatrice des aminoglycosides	MLST : Typage des séquences multilocus
ANT : Aminoglycoside Nucléotidyltransférase	MLVA : Analyse des répétitions en tandem à nombre variable
APH : Aminoglycoside Phosphotransférase	NDM : <i>New Delhi metallo-β-lactamase</i>
ARN : Acide ribonucléique	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ARNm : ARN messenger	OXA : <i>Oxacillinase</i>
ARNr : ARN ribosomal	pb : Paire de base
ARNt : ARN de transfert	PCR : <i>Polymerase Chain Reaction</i>
BLSE : β-lactamase à spectre étendue	PFGE : Electrophorèse en champ pulsé
CARD : <i>Comprehensive Antibiotic Resistant Database</i>	PMQR : Résistance aux quinolones médiés par des plasmides
CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie	QRDR : Résistance aux quinolones médiés par des mutations chromosomiques
CMB : Concentration minimale bactéricide	R : Résistant
CMI : Concentration minimale inhibitrice	RMTase : Méthyltransférases de l'ARNr 16S
CTX-M : <i>Cefotaxime Munich</i>	RND : Superfamille de résistance-nodulation-division cellulaire
DOS : Deoxystreptamine	S : Sensible
EDPI : Phase énergie-dépendante I	SNP : Polymorphismes nucléotidique
EDPII : Phase énergie-dépendante II	SPM : <i>Sao Paulo metalo-β-lactamase</i>
EPA : Effet post-antibiotique	ST : <i>Sequence Type</i>
EUCAST : Comité Européen des Tests de Sensibilité aux Antibiotiques	Tn : Transposon
I : Intermédiaire	VIM : <i>Verona integron-encoded metallo-β-lactamases</i>
ICE : Eléments conjugatifs et intégratifs	WGS : Séquençage de génome complet
IMP : <i>Active against imipenem - Imipenemase</i>	XDR : Extrêmement résistant
Inc : Groupe d'incompatibilité de plasmide	
IRL : <i>Inverted repeat left</i>	
IRR : <i>Inverted repeat right</i>	
IS : Séquences d'insertion	
ISCR : Séquence d'insertion avec des régions communes	
KPC : <i>K. pneumoniae carbapenemase</i>	
LPS : Lipopolysaccharides	

Etude Bibliographique

1 Introduction

1.1 Résistance aux antibiotiques

1.1.1 Découverte des antibiotiques

Le mot « antibiotique » tire son étymologie du préfixe anti - « contre » et du grec βιωτικός « qui concerne la vie, qui sert à l'entretien de la vie » ; avec peut-être une influence du grec ἀντιβίος composé du préfixe anti - « contre » et du grec βίος « vie ». Il a été utilisé en premier par Selman Waksman en 1941 pour désigner toute substance chimique produite par des microorganismes, qui présente à l'état de solution diluée, le pouvoir d'inhiber la croissance d'autres microorganismes et même de les détruire. Par la suite il a désigné toute substance d'origine naturelle ou synthétique possédant une action spécifique de blocage et/ou de destruction des bactéries. Pour les autres micro-organismes, on utilisera les termes d'antifongique (actif sur les champignons), et d'antiviral (actif sur les virus).

Alexander Flemming découvrit la pénicilline en 1928, révolutionnant ainsi le traitement de nombreuses maladies infectieuses (1). Néanmoins l'effet antagoniste entre une moisissure et une bactérie avait déjà été observé à de nombreuses reprises dans l'histoire de l'Humanité. Ainsi, en 1897 le médecin français Ernest Duchesne mentionne que les moisissures d'un champignon, le *Penicillium glaucum*, éliminent la bactérie *Escherichia coli* (*bacterium coli*) lorsqu'elles sont mises en contact. La description de la pénicilline est le début d'un âge d'or pour les antibiotiques avec la découverte de multiples composés produits naturellement par des bactéries ou des moisissures (2). Il existe différentes classes d'antibiotiques avec des mécanismes d'action multiples : inhibition de la synthèse d'acides nucléiques ou de protéines, perturbation de la synthèses ou endommagement de la paroi cellulaire ainsi que la modification du métabolisme bactérien.

La découverte des antibiotiques a permis le traitement des infections bactériennes chez l'homme et l'animal, de même que la prophylaxie, diminuant le risque d'infection chez les patients à risque. Néanmoins, le mésusage à l'échelle mondiale de ces médicaments a engendré une augmentation importante de la résistance aux antibiotiques jusqu'à observer des infections avec des bactéries résistantes à l'ensembles des antibiotiques disponibles (3).

1.1.2 Impact de la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est aujourd'hui considérée comme un problème global de santé publique. En 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié son premier rapport sur la résistance aux antimicrobiens (dont les antibiotiques) soulignant que « à moins que les nombreux acteurs concernés agissent d'urgence, de manière coordonnée, le monde s'achemine vers une ère post-antibiotiques, où des infections courantes et des blessures mineures qui ont été soignées depuis des décennies pourraient à nouveau tuer ».

L'utilisation croissante des antibiotiques en thérapeutique humaine mais aussi en supplémentation dans l'alimentation animal a contribué à sélectionner des bactéries de plus en plus résistante. Il a été estimé que près de 50% des prescriptions antibiotiques en médecine n'étaient pas nécessaires (4). Un autre facteur participant à l'augmentation des résistances aux antibiotiques est que de nombreuses classes d'antibiotiques utilisées en agriculture (comme stimulateurs de croissance par exemple) et en médecine vétérinaire sont les mêmes que celles utilisées en médecine clinique, ce qui signifie que la résistance peut se propager entre les animaux de compagnie, les agriculteurs, le bétail, et l'ensemble de la chaîne alimentaire touchant ainsi presque l'ensemble des individus (5, 6). Enfin, des gènes de résistance aux antibiotiques ont également été trouvés dans l'environnement et dans les milieux aquatiques, en particulier dans les pays où l'assainissement est médiocre et où les eaux usées peuvent être rejetées dans l'environnement (7).

1.1.3 Méthode microbiologique d'étude des bactéries résistantes aux antibiotiques

1.1.3.1 Les antibiogrammes

Le terme antibiogramme a été créé au début des années 1950 par analogie avec l'hémoGramme. Les antibiogrammes sont des tests d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries. Ils peuvent être effectués à l'aide de diverses techniques comprenant, la microdilution, la dilution en gélose, la diffusion et des méthodes semi-automatisées. Ils servent à mesurer sur une souche bactérienne, une concentration active d'antibiotique choisie comme la concentration minimale inhibitrice (CMI), afin de la classer en 3 catégories cliniques : sensible (S), intermédiaire (I) et résistante (R) dont la signification repose sur des critères d'efficacité thérapeutique. Cette CMI correspond à la plus petite concentration d'un antibiotique donné qui inhibe la croissance bactérienne. La CMI diffère de la concentration minimale bactéricide (CMB) qui est la plus petite concentration d'antibiotique capable de tuer des bactéries. Des seuils d'interprétation fournis par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)

et par le Comité Européen des Tests de Sensibilité aux Antibiotiques (EUCAST) sont utilisés pour classer si une bactérie est sensible, intermédiaire ou résistante à un antibiotique donné (8, 9).

D'autres techniques existent pour détecter la résistance aux antibiotiques qui n'utilisent pas une méthode phénotypique conventionnelle comme par exemple la PCR, la spectrométrie de masse couplée à une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI-TOF MS) ou le séquençage de génome complet (*Whole genome sequencing*, WGS). La PCR a été utilisée pour identifier des gènes codant des β -lactamases comme des carbapénèmases (10) ; le MALDI-TOF MS a été utilisé pour détecter la production de β -lactamases (11) ; et le WGS permet d'identifier les gènes codant des résistances aux antibiotiques grâce à différents outils comme ResFinder (12), Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation (ARG-ANNOT) (13), Comprehensive Antibiotic Resistant Database (CARD) ou AMRFinder (14). Cependant, ces techniques ne permettent pas de mesurer la CMI qui est nécessaire pour guider la prescription antibiotique.

1.1.3.2 Les techniques de typage de bactérie

Les méthodes de typage bactérien basées sur l'ADN permettent de distinguer avec plus ou moins de précision si plusieurs isolats d'une même espèce bactérienne appartiennent aux mêmes groupes clonaux ou non. Ces méthodes présentent un intérêt majeur pour les microbiologistes confrontés à des épidémies ou effectuant des études épidémiologiques. Les méthodes de typage bactérien basées sur l'ADN telles que l'électrophorèse en champ pulsé (*Pulse-Field gel electrophoresis*, PFGE) (15), l'analyse des répétitions en tandem à nombre variable (*Variable number of tandem repeats*, VNTR) (*Multilocus VNTR analysis*, MLVA), le typage des séquences multilocus (*Multilocus sequence typing*, MLST) ou le WGS sont désormais les plus couramment réalisées pour déterminer si un isolat bactérien est différent, proche ou identique d'un autre isolat bactérien de la même espèce (15, 16). Les clones sont des bactéries génétiquement indiscernables en raison d'un ancêtre commun, mais elles peuvent avoir été isolées indépendamment à partir de sources et de lieux différents. Certains clones sont considérés comme étant à "haut risque" en raison de leur virulence et/ou de leur multirésistance aux antibiotiques (17). Ils peuvent être observés dans le monde entier avec la possibilité de disséminer la résistance aux antibiotiques ou la virulence par le biais d'éléments génétiques mobiles (*Mobile Genetic Element*, MGE) tels que les plasmides.

1.1.3.2.1 MLST

Le MLST a été développé pour *Neisseria meningitidis* en 1998 afin de remédier au manque de reproductibilité entre les laboratoires avec les anciennes techniques de typage (18). Le principe

du MLST consiste à identifier des séquences nucléotidiques internes d'environ 400 à 500 pb dans plusieurs gènes de référence. Les séquences uniques (allèles) se voient attribuer un nombre entier aléatoire formant une combinaison unique d'allèles pour définir un "profil allélique". Ce profil permet d'obtenir le « sequence type » (ST). Après l'introduction du schéma MLST pour *Neisseria*, le MLST a été considérée comme le "gold standard" du typage, et de nouveaux schémas pour d'autres espèces bactériennes ainsi que des champignons ont été développés (19). Le site pubMLST rassemble les données de toutes les bases de données ([<http://pubmlst.org>]). La MLST a été utilisée pour identifier les clones bactériens et les complexes clonaux. Les complexes clonaux sont des groupes de ST qui partagent des allèles identiques à un nombre spécifié de loci (20). Les principaux inconvénients du MLST sont son coût élevé car il faut séquencer plusieurs gènes. Cependant, le MLST est utile pour l'épidémiologie mondiale car il est basé sur un système normalisé au niveau international, avec un faible taux de mutation des gènes conservés et grande reproductibilité des résultats (21).

1.1.3.2.2 WGS

Le séquençage complet de génome (WGS) peut également être utilisé pour identifier le lien génétique entre des isolats bactériens. Les séquences du génome peuvent être utilisées pour obtenir le ST de la technique MLST et l'analyse des génomes complets peut conduire à l'identification de polymorphismes nucléotidiques (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP), qui sont des mutations localisées sur une paire de base du génome d'un isolat par rapport à un isolat de référence. Par conséquent, le WGS fournit le plus haut niveau de discrimination par rapport aux autres méthodes de typage bactérien (22). De plus, le WGS permet d'identifier les gènes de résistance aux antibiotiques et les facteurs de virulence (23, 24). Les limites du WGS comprennent son coût élevé (bien qu'il soit de moins en moins élevé), la nécessité de connaître les techniques bioinformatiques pour une analyse approfondie des données et l'incapacité des technologies de séquençage à lecture courte (*short read*), qui sont actuellement les plus utilisées dans les laboratoires, à séquencer avec succès les régions contenant de longues répétitions en tandem ou des MGE en raison de la longueur réduite des lectures (<1000 pb) (25, 26).

1.1.3.2.3 Utilisation du typage bactérien

Les méthodes de typage bactérien peuvent aider à identifier les épidémies de bactéries dans les établissements de santé ou les collectivités et permettre de mettre en place les mesures de contrôle appropriées pour réduire la propagation des bactéries, comme l'amélioration de l'hygiène ou l'isolement des patients (27). L'avantage du typage bactérien est également qu'il permet la surveillance à large échelle, en particulier le WGS qui permet de comparer des isolats

séquencés dans le monde entier et d'obtenir d'autres données comme le résistome, et qui participent à identifier les tendances générales et émergentes (28). Ceci est particulièrement important pour les bactéries à Gram négatif multirésistantes aux antibiotiques (*Multidrug resistant*, MDR), qui constituent actuellement une menace pour la santé publique (29).

1.1.4 Focus sur les bacilles à Gram négatif

La résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif est une préoccupation majeure en raison de leur capacité à diffuser mondialement et de la rareté des nouveaux antibiotiques développés (30, 31). Selon la liste des pathogènes prioritaires de l'OMS publié en 2017, de nouveaux antibiotiques sont nécessaires de toute urgence pour cibler *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes et/ou productrices de β -lactamases à spectre étendue (BLSE) (32).

1.1.4.1 Entérobactéries

La naissance de la famille des entérobactéries, appartenant initialement à l'ordre des *Enterobacteriales*, se situe en 1937 lorsque Otto Rahn proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper les micro-organismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquelles on trouvait déjà des noms tels que *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* ou *Serratia*. Cet ordre est composé de bacilles à Gram négatif, non sporulés, anaérobies facultatifs appartenant à la classe des Gammaproteobacteria. En 2016, l'ordre des *Enterobacteriales* fut renommé *Enterobacterales* et divisé en 7 familles, dont les *Enterobacteriaceae*, les *Hafniaceae* et les *Morganellaceae*, sur la base d'analyse phylogénétique de protéines conservées et de protéines ribosomales reconstruites à partir de données de séquençage de génomes complets (33). Ces bactéries sont impliquées dans tous les types d'infections, particulièrement gastro-intestinales, urinaires et nosocomiales. Enfin un critère de gravité particulier est représenté par le fait que ces souches d'entérobactéries présentent souvent des résistances multiples aux antibiotiques. L'émergence et l'augmentation exponentielle de souches productrices de BLSE au début des années 2000 (34) et des souches productrices de carbapénémase depuis quelques années (29), constitue un problème de santé publique à l'échelle mondiale.

1.1.4.2 Non-fermentant

Généralement, les bacilles à Gram négatif non fermentaires regroupent plusieurs familles et genres bactériens pouvant être mobiles ou immobiles et ayant pour traits communs de pouvoir pousser sur milieux ordinaires et de posséder un métabolisme de type aérobie strict. Ces bacilles

à métabolisme oxydatif ne fermentent pas les sucres et sont qualifiées de « non fermentants » ou « non fermentaires ». Ce groupe rassemble des bactéries appartenant à des classes phylogénétiques différentes comme les *Burkholderia* appartenant à la classe des Betaproteobacteria et les *P. aeruginosa* appartenant à la classe des Gammaproteobacteria. Les espèces majoritairement isolées en laboratoire de bactériologie médicale sont *P. aeruginosa* et *A. baumannii*. Ces deux espèces sont des bactéries ubiquitaires de l'environnement mais peuvent aussi provoquer des infections, majoritairement en contexte hospitalier (35, 36). Ce sont des pathogènes opportunistes infectant les patients immunodéprimés, hospitalisés en soins intensifs ou des patients ayant des maladies respiratoires chroniques comme la mucoviscidose. Malheureusement, ces bactéries sont difficiles à traiter à cause de multiples mécanismes de résistance intrinsèques affectant notamment les β -lactamines et les aminoglycosides. Ces résistances sont principalement dues à une faible perméabilité membranaire, à l'action d'enzymes qui dégradent ou modifient les antibiotiques (AmpC, OXA-50, APH(3')-IIIb chez *P. aeruginosa* et AmpC et OXA-51 chez *A. baumannii*), ainsi qu'à la présence de systèmes d'efflux (MexAB-OprM et MexXY-OprM chez *P. aeruginosa* et AdeABC chez *A. baumannii*) capables d'expulser un large panel de molécules antibactériennes en dehors de la cellule (35, 36). De plus, ces bactéries peuvent acquérir des mécanismes de résistance par l'intermédiaire de MGE, comme des plasmides ou des transposons, pouvant aller jusqu'à la résistance à l'ensemble des antibiotiques disponibles (31, 37).

1.2 Les aminoglycosides

1.2.1 Découverte des aminoglycosides

Les premiers aminoglycosides (AG) commercialisés sont la streptomycine isolée en 1944 (38) et la néomycine isolée en 1949 (39) par Selman Waksman aux Etats-Unis. Il reçut le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1952 notamment pour sa découverte de la streptomycine, le premier antibiotique actif contre *Mycobacterium tuberculosis*. La streptomycine a été utilisée dès 1947 pour traiter les patients tuberculeux (40) et ce composé reste encore actuellement recommandé en 2021 par l'OMS dans le traitement des tuberculose à bactéries multi-résistantes (MDR). La plupart des AG sont produits de manière naturelle par des bactéries appartenant à la classe des *Actinomycetia* et aux genre *Streptomyces* ou *Micromonospora* (Tableau 1) (41).

Aminoglycosides	Année de découverte	Origine	Utilisation	Référence
Streptomycine	1944	<i>Streptomyces griseus</i>	Clinique	(38)
Néomycine	1949	<i>Streptomyces fradiae</i>	Clinique	(39)
Hygromycine B	1953	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Vétérinaire	(42)
Kanamycine	1957	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Clinique	(43)
Paromomycine	1959	<i>Streptomyces rimosus</i>	Clinique	(44)
Spectinomycine	1961	<i>Streptomyces spectabilis</i>	Clinique	(45)
Gentamicine	1962	<i>Micromonospora purpurea</i>	Clinique	(46)
Tobramycine	1967	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	Clinique	(47)
Apramycine	1968	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	Vétérinaire	(48)
Ribostamycine	1970	<i>Streptomyces ribosidificus</i>	Clinique	(49)
Sisomicine	1970	<i>Micromonospora rosea</i>	Clinique	(50)
Lividomycine	1971	<i>Streptomyces lividus</i>	Clinique	(51)
Amikacine	1972	Synthétique, dérivé de la kanamycine	Clinique	(52)
Arbekacine	1973	Synthétique, dérivé de la kanamycine	Clinique	(53)
Nétilmicine	1973	Synthétique, dérivé de la sisomicine	Clinique	(54)
Dibekacine	1973	Synthétique, dérivé de la kanamycine	Clinique	(55)
Isepamicine	1977	Synthétique, dérivé de la gentamicine	Clinique	(56)
Fortimicine A	1977	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	Clinique	(57)
Plazomicine	2009	Synthétique, dérivé de la sisomicine	Clinique	(58)

Tableau 1. Année de découverte et origines de différents aminoglycosides.

1.2.2 Structure des aminoglycosides

Les AG sont des molécules cationiques, hydrophiles, qui possèdent un spectre antibactérien large. Chimiquement, tous les composants de cette famille ont en commun un noyau aminocyclitol (cyclohexane avec des substituants) relié ou non à un sucre aminé par une liaison glycosidique (41). Les AG peuvent être divisés en quatre groupes en fonction du type de noyau aminocyclitol (i) le cycle streptidine (*e.g.* streptomycine), (ii) le cycle mono-substitué deoxystreptamine (DOS) (*e.g.* apramycine), (iii) le cycle 4,5-di-substitué-deoxystreptamine (4,5-2-DOS) (*e.g.* néomycine) et le plus important (iv) le cycle 4,6-di-substitué-deoxystreptamine (4,6-2-DOS) (*e.g.* gentamicine, amikacine, tobramycine, nétilmicine et plazomicine) (59) (Figure 1). On distingue au sein du groupe 4,6-2-DOS, les molécules dont la structure de base se rapproche de la kanamycine (*e.g.* amikacine, tobramycine et arbékacine) et celles dont la structure de base se rapproche de la gentamicine (*e.g.* isépamicine, nétilmicine et sisomicine). A noter, l'exception de la spectinomycine qui a un noyau aminocyclitol non relié à un sucre aminé, lui donnant une structure chimique éloignée des autres AG. La structure des AG contient plusieurs groupes hydroxyles et au moins 2 groupes aminés libres, qui sont essentiels pour l'interaction avec la sous-unité 30S du ribosome *via* l'ARNr 16S (41). Par convention, le noyau aminocyclitol comporte les carbones numérotés en chiffre arabe simple et les sucres liés au noyau en position C4 et C5-C6 sont respectivement numérotés avec le chiffre de la position modifiée suivit de prime ou double prime.

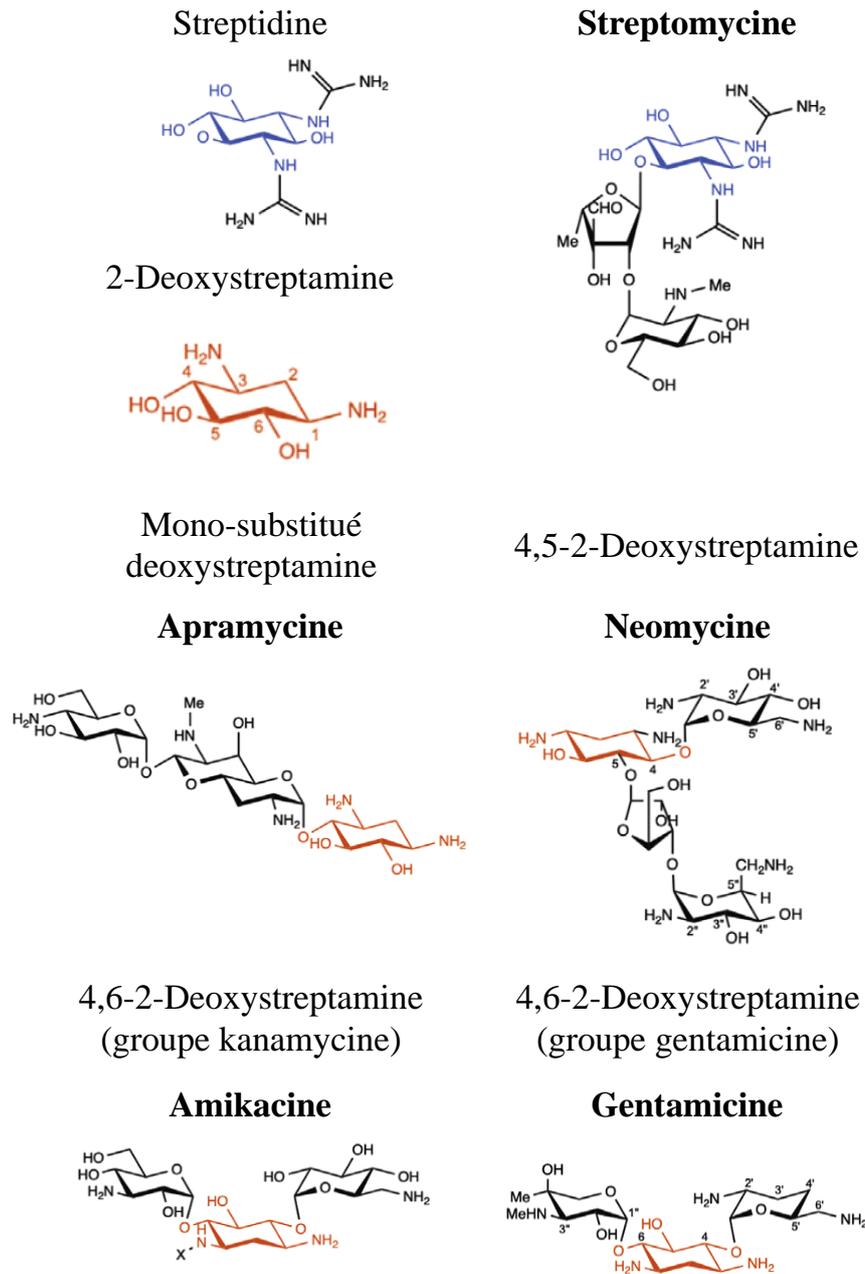


Figure 1. Structures du noyau aminocyclitol et de différents aminoglycosides, adaptées de Wachino *et al.* (60).

1.2.3 Utilisation des aminoglycosides

Les AG sont des antibiotiques à large spectre essentiellement utilisés pour traiter les infections sévères à bactéries à Gram négatif et à Gram positif comme les bactériémies, les pneumonies et les infections urinaires (60, 61). Les AG font partis des molécules anciennes qui ont été classifiées par l’OMS comme des antibiotiques d’importance critique pour la médecine humaine car cette classe d’antibiotique peut encore rester très efficace alors que les autres

familles d'antibiotique sont touchées notamment dans les cas des infections à bacilles à Gram négatif MDR. Ces antibiotiques sont rapidement bactéricides et leur activité peut être significativement accrue lorsqu'ils sont associés aux β -lactamines ou aux fluoroquinolones. Les AG sont exclusivement utilisés par voie parentérale, principalement intra-veineuse, certaines spécialités peuvent être administrées en aérosols, il existe également des AG sous formes locales à usage ophtalmologique et auriculaire.

Leur spectre antibactérien est large et englobe les bactéries à Gram négatif aérobies comme les entérobactéries et le *Pseudomonas aeruginosa*, et des bactéries à Gram positif comme les streptocoques, les entérocoques et les staphylocoques (60). Certaines molécules sont dotées d'une activité spécifique. Ainsi, la streptomycine et l'amikacine sont actives sur les mycobactéries, l'amikacine sur les *Nocardia* spp., la spectinomycine sur *Neisseria gonorrhoeae* et la paromomycine sur les protozoaires et les helminthes (59, 62–65).

1.2.4 Toxicité

L'un des inconvénients à utiliser les AG repose sur leur toxicité et l'apparition d'effets indésirables sous traitement. Les plus fréquents sont l'ototoxicité et la néphrotoxicité (66, 67). Dans les cellules tubulaires proximales du rein, les AG perturbent les processus intracellulaires et provoquent la mort des cellules épithéliales, ce qui entraîne une nécrose tubulaire. La toxicité vestibulaire est due à l'impact sur 2 nerfs crâniens, le nerf vestibulaire responsable de l'équilibre et le nerf cochléaire responsable de l'audition. De plus, les AG ont un impact additionnel sur les cellules ciliées cochléaires entraînant la mort de ces cellules et une perte d'audition généralement irréversible (67). A l'inverse, la néphrotoxicité est réversible (68). Ces toxicités sont dose-dépendantes, et certains patients sont génétiquement plus sensibles aux dommages causés par les AG (69). Cette susceptibilité génétique est associée à une mutation dans le gène *MT-RNR1* qui code l'ARN ribosomal mitochondrial 12S où une guanosine est remplacé par une adénosine en position 827 et/ou 1555 (69). D'autres effets indésirables comme la toxicité neuromusculaire, principalement chez les patients ayant une maladie ou une thérapie qui interfère avec le système neuromusculaire, une réaction d'hypersensibilité, des nausées, des céphalées, des arthralgies et de l'hypotension ont également été rapportés (60). Par conséquent, les doses doivent être calculées pour chaque patient et les niveaux sériques doivent être surveillés pour prévenir ces toxicités (61).

1.2.5 Mécanismes d'action

Les AG sont des molécules chargées positivement ayant une affinité pour les molécules chargées négativement telles que les lipopolysaccharides (LPS), les phospholipides, l'ADN et l'ARN (41, 59, 70). Cela contribue à leur mécanisme d'action, qui consiste principalement à perturber la synthèse des protéines par liaison à l'ARNr 16S du ribosome bactérien (71).

1.2.5.1 Pénétration intrabactérienne

L'accumulation intrabactérienne des AG a lieu en plusieurs étapes dont la première est le passage de la paroi.

1.2.5.1.1 Traversée de la paroi

Chez les bacilles à Gram négatif, la première étape de la pénétration des AG consiste en une interaction électrostatique entre l'AG polycationique et les composés de la membrane chargés négativement (LPS, phospholipides, protéines de la membrane externe). Cette liaison électrostatique est réversible et concentration-dépendante (72). Cette liaison ionique engendre le déplacement des ions magnésiums qui assurent le pontage entre les groupements phosphate. Il en résulte une désorganisation de la membrane externe avec une perméabilité augmentée favorisant l'entrée des AG. L'étape suivante est la traversée de la membrane interne en deux étapes, la phase énergie-dépendante I (*Energy dependante phase I*, EDPI) puis la phase énergie-dépendante II (EDPII). Une fois que l'AG est dans le périplasme, il doit traverser la membrane cytoplasmique pour atteindre sa cible. Cette étape de passage de la membrane interne, appelée EDPI, est un processus oxygène-dépendant utilisant l'énergie de la chaîne de transport d'électrons de la bactérie, ce qui explique pourquoi les bactéries anaérobies strictes sont intrinsèquement résistantes aux AG (73). L'étape EDPII suit l'étape EDPI et correspond à l'accumulation rapide des AG dans le cytoplasme, suite à leur fixation à la sous-unité 30S du ribosome de l'AG, provoquant des erreurs de traduction et augmentant la perméabilité cellulaire (73).

1.2.5.2 Action sur l'ARN 16S ribosomal

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique capable de décoder l'information génétique à partir d'un ARN messager (ARNm). Le ribosome 70S bactérien est composé de deux sous-unités, une petite sous-unité 30S et une grande sous-unité 50S. Si on prend comme référence la bactérie *E. coli*, la sous-unité 30S est composée de 21 protéines ribosomales et d'un ARN ribosomal (ARNr) 16S de 1541 nucléotides, et la sous-unité 50S contient 33 protéines ribosomales et 2 ARNr, le 5S et le 23S, respectivement de 115 et 2909 nucléotides (74, 75). Le

ribosome possède 3 sites majeurs pour la traduction : le site A (pour Aminoacyl-ARN de transfert (ARNt)) qui est occupé par un ARNt porteur d'un acide aminé en attente d'être lié à la chaîne polypeptidique, le site P (pour Peptidyl-ARNt) qui est occupé par un ARNt porteur d'un acide aminé lié à la chaîne polypeptidique en cours de synthèse et enfin, le site E (pour Exit), qui permet la libération de l'ARNt désacétylé qui a cédé son acide aminé (Figure 2) (76). Durant la traduction, l'ARNt portant un acide aminé se fixe au ribosome au niveau du site A qui vérifie que seule l'ARNt complémentaire (celui avec un anticodon capable de s'apparier au codon de l'ARNm) se lie à l'ARNm. Ce site comprend l'hélice 44 de l'ARNr 16S ainsi que deux adénines en position 1492 et 1493 (Figure 2) (75). Une fois vérifié, un lien peptidique est formé entre l'acide aminé lié à l'ARNt au niveau du site A et celui au niveau du site P, suivi d'une translocation du site A vers le site P, le site P et le site E permettant respectivement, l'élongation de la chaîne polypeptidique et la sortie de l'ARNt dépourvu d'acide aminé (76).

L'activité antibactérienne majeure des AG est due à l'inhibition de la synthèse protéique. En effet, les AG impactent toutes les principales étapes du processus de traduction (initiation, élongation, terminaison et recyclage du ribosome) (77–80). Les erreurs de traduction sont dues à la liaison de l'AG au niveau du site A, qui stabilise et favorise la liaison de l'ARNt non complémentaire à l'ARNm. Les études structurales ciblant la petite sous-unité 30S ont démontré que les AG 2-DOS interagissent avec une boucle interne de l'hélice 44 de l'ARNr 16S au niveau du site A du ribosome et stabilisent une conformation où les nucléotides A1492 et A1493 sont basculés vers l'extérieur (Figure 2) (81, 82). Cette conformation permet la fixation d'ARNt non reconnu à l'ARNm favorisant les erreurs de traduction aboutissant à l'accumulation de protéines aberrantes (82). Celles-ci peuvent être insérées dans la membrane cellulaire, modifiant la perméabilité et augmentant même le transport vers le cytoplasme des AG.

Des données récentes montrent également l'existence de sites de liaisons allostériques des AG au sein du ribosome qui affectent la mobilité des sous-unités ribosomales, ce qui entraîne une réduction de la liaison des facteurs de traduction et de l'activité de traduction, ainsi que le recyclage du ribosome (83).

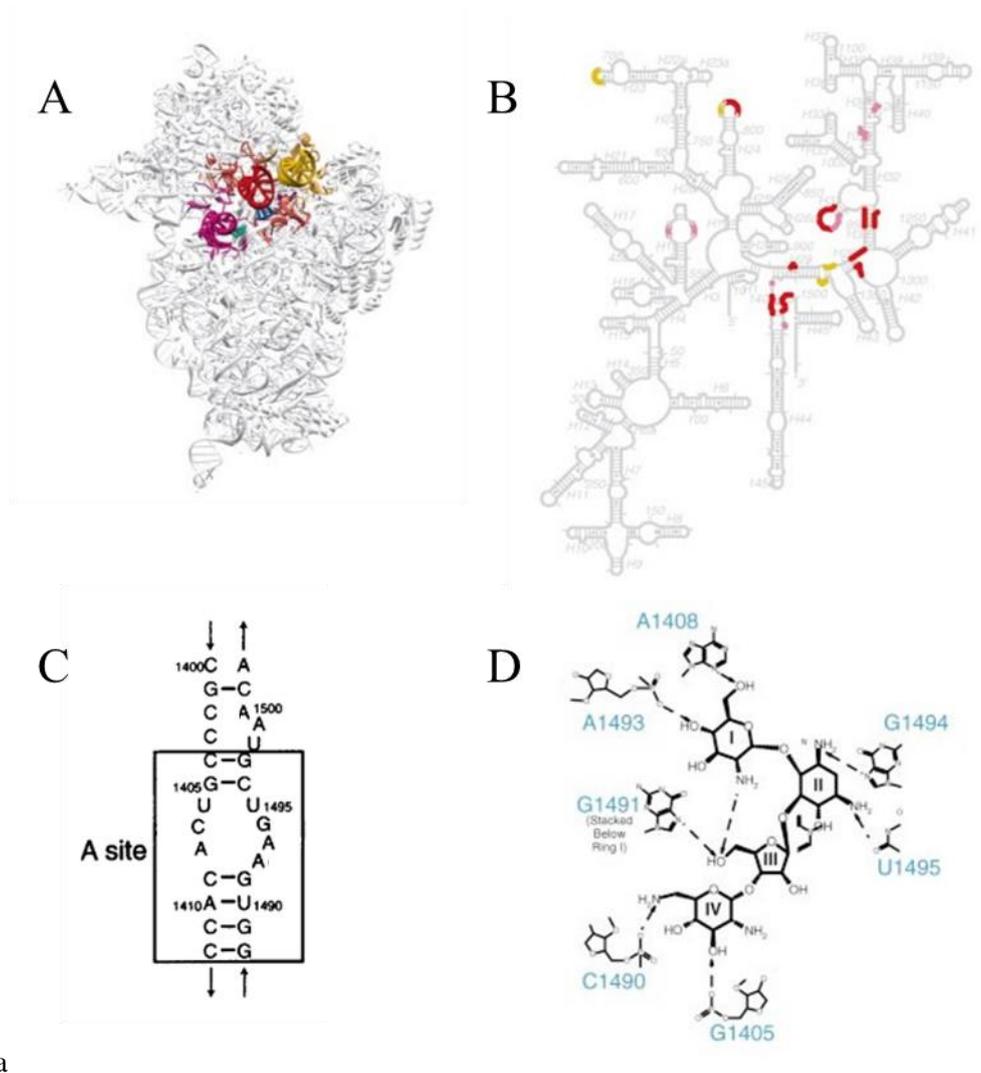


Figure 2. Représentations détaillées de l'ARNr 30S et de son interaction avec un aminoglycoside. (A) Structure du ribosome 30S avec les sites A (magenta), P (rouge) et E (jaune). (B) Structure secondaire de l'ARNr 16S avec les sites A (magenta), P (rouge) et E (jaune). (C) Structure secondaire du site A de l'ARNr 16S de *E. coli*. (D) Diagramme chimique de la paromomycine montrant ses interactions avec les résidus spécifiques de l'ARNr 16S. Figure adaptée de (81, 82).

1.2.5.3 Effet bactéricide

L'altération de la membrane cytoplasmique est vraisemblablement responsable en grande partie de l'effet bactéricide des AG, excepté dans le cas de la spectinomycine qui est seulement bactériostatique. De plus, ces modifications membranaires permettraient un flux massif des AG dans le cytoplasme (84). Il a aussi été proposé que les AG pourraient eux-mêmes diminuer la différence de potentiel électrochimique au niveau de la paroi entraînant ainsi leur propre séquestration intracellulaire irréversible qui serait la base de l'effet bactéricide (85). Enfin, les AG, comme d'autres antibiotiques bactéricides (*e. g.* β -lactamines, fluoroquinolones), semblent stimuler l'oxydation du NADH *via* la chaîne de transport des électrons sous la dépendance du

cycle des acides citriques (cycle de Krebs) (86). L'hyperactivation de la chaîne de transport des électrons stimulent la formation d'ions superoxydes endommageant les agrégats Fer-soufre, rendant le fer ferreux disponible pour l'oxydation par la réaction de Fenton (86). La réaction de Fenton conduit à la formation de radicaux hydroxyles, qui vont engendrer des dommages au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides, ce qui entraîne la mort cellulaire (86, 87).

L'ensemble des effets des AG sur la cellule bactérienne va entraîner une bactéricide rapide, généralement dès la première heure, indépendante de la densité bactérienne (88). Cette bactéricidie est dose dépendante, l'augmentation des concentrations sériques entraînant une augmentation de la bactéricidie à la fois en intensité et en durée (88). Les AG ont de plus un effet post-antibiotique (EPA) très marqué qui est dose dépendant (59). Il a été démontré que l'EPA est directement lié au temps que mettent les bactéries pour récupérer de l'inhibition de la synthèse des protéines (89). On suppose que cela dépend de la dissociation éventuelle de l'AG au ribosome et de sa sortie de la cellule.

1.2.6 Mécanismes de résistance aux aminoglycosides

Il existe plusieurs mécanismes de résistance aux AG qui comprennent (i) une résistance intrinsèque comme le fait d'être anaérobie strict ou par des mutations entraînant un faible niveau de potentiel transmembranaire (88), (ii) une réduction de la concentration cellulaire d'AG par l'intermédiaire de pompes d'efflux ou d'imperméabilité (59, 90), (iii) une modification chimique de l'AG par l'intermédiaire d'enzymes modificatrices des AG (*Aminoglycoside modifying enzyme* ; AME) (70) et (iv) une modification du ribosome par une mutation chromosomique ou par l'action d'une méthyltransférases de l'ARNr 16S (RMTases) (59, 91). Plusieurs de ces mécanismes de résistance peuvent exister en même temps au sein d'une cellule bactérienne.

1.2.6.1 Résistance par imperméabilité membranaire

Ce mécanisme se caractérise par une résistance de bas niveau qui affecte, en général, plusieurs AG.

1.2.6.1.1 Imperméabilité au niveau de la membrane externe

Certains bacilles à Gram négatif présentent une résistance intrinsèque par défaut de fixation électrostatique des AG sur la membrane externe (92). Dans les souches de *P. aeruginosa*, isolées de patients atteints de mucoviscidose, le déficit de certaines chaînes des LPS est fréquente et peut représenter un mécanisme répandu de résistance aux AG (93).

1.2.6.1.2 Imperméabilité au niveau de la membrane cytoplasmique

Les bactéries anaérobies strictes sont naturellement résistantes aux AG du fait de l'existence d'un gradient de potentiel électrochimique insuffisant et de l'absence d'une quinone nécessaire au transport actif intracellulaire de l'AG (94). Le même phénomène est observé chez les streptocoques et les entérocoques qui possèdent une chaîne de transport des électrons incomplètes. Plusieurs déficits en composants de la chaîne respiratoire (cytochrome, quinones, nitrite et nitrate réductase) ou des mutations dans les gènes codant pour l'ATPase ont également été mis en évidence chez les souches résistantes (95). De tels mutants ont été isolés au cours d'infections cliniques ou expérimentales, en particulier des modèles expérimentaux d'endocardites à *P. aeruginosa* (96). Des mutants résistants à la kanamycine, streptomycine et néomycine dus à un déficit en protéine de liaison aux oligopeptides OppA ont été décrits chez *E. coli* (97).

1.2.6.2 Résistance par efflux de l'antibiotique

Il a été démontré que les pompes d'efflux appartenant à la superfamille de résistance-nodulation-division cellulaire (RND) sont à l'origine de la résistance aux AG, notamment AcrD chez *E. coli* (98), AdeABC chez *A. baumannii* (99) et MexXY-OprM chez *P. aeruginosa* (90). Ces pompes d'efflux sont constituées de trois composants : une protéine de transport dans la membrane interne, une protéine de fusion membranaire dans le périplasma et la troisième dans la membrane externe, qui agit comme le composant de la membrane externe de la pompe (Figure 3) (100). Ces composants créent un canal qui exporte les substrats directement hors de la cellule. Ils utilisent la force protonique membranaire comme source d'énergie et rendent les bactéries intrinsèquement résistantes à de faibles concentrations d'AG (59, 101). Cependant, la surexpression des pompes d'efflux par la mutation de gènes régulateurs, tels que *mexZ* pour la pompe d'efflux MexXY-OprM, peut entraîner une résistance élevée aux AG ainsi qu'une résistance à d'autres classes d'antibiotiques, car beaucoup d'entre eux sont également des substrats de cette pompe d'efflux, comme les carbapénèmes, les fluoroquinolones, les macrolides et les tétracyclines (90, 102). Les pompes d'efflux appartenant à la famille RND ont également été impliquées dans l'efflux d'antiseptiques comme les dérivés phénolés (Triclosan) largement utilisés dans des produits domestiques et pesticides (103).

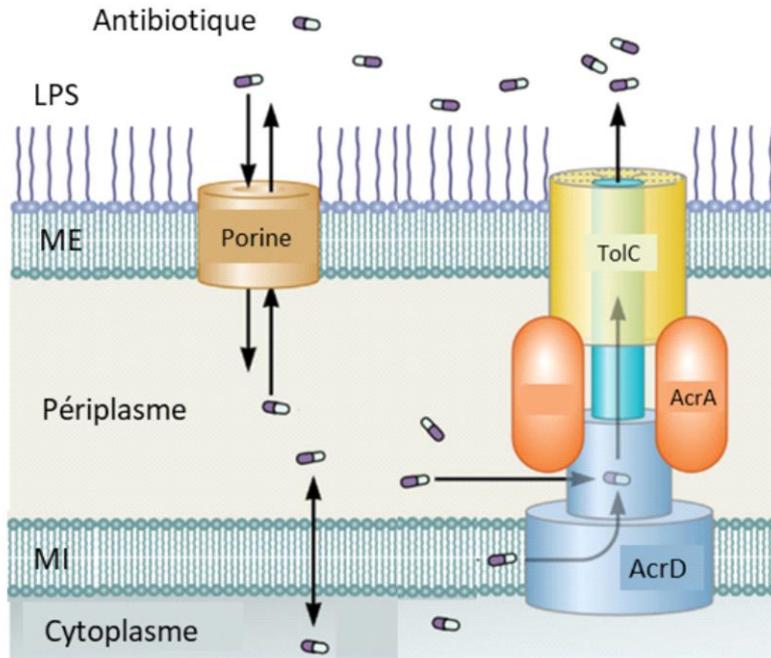


Figure 3. Transport des aminoglycosides à travers la paroi bactérienne incluant l’entrée par des porines et l’efflux par une pompe d’efflux AcrAD-TolC de type RND. Les aminoglycosides sont représentés par des gélules et l’entrée et l’efflux par des flèches. ME : Membrane externe ; MI : Membrane interne (cytoplasmique). Figure adaptée de (100).

1.2.6.3 Résistance par inactivation enzymatique

La modification enzymatique de l’antibiotique est le principal mécanisme de résistance aux AG utilisé par les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (70). Cette inactivation est effectuée par des AME qui catalysent la modification des groupes -NH₂ ou -OH présents sur le cycle DOS ou sur les fragments de sucre, ce qui réduit la capacité des AG à se lier au ribosome et les empêche d’effectuer l’étape EDPII, entraînant la résistance (70). Il existe trois groupes d’AME appelés acétyltransférases (AAC), nucléotidyltransférases (ANT) et phosphotransférases (APH), qui modifient les AG respectivement par acétylation, adénylation et phosphorylation (59, 70) (Figure 4). L’ensemble des profils de résistance aux AG pour chaque AME est listé dans le Tableau 2.

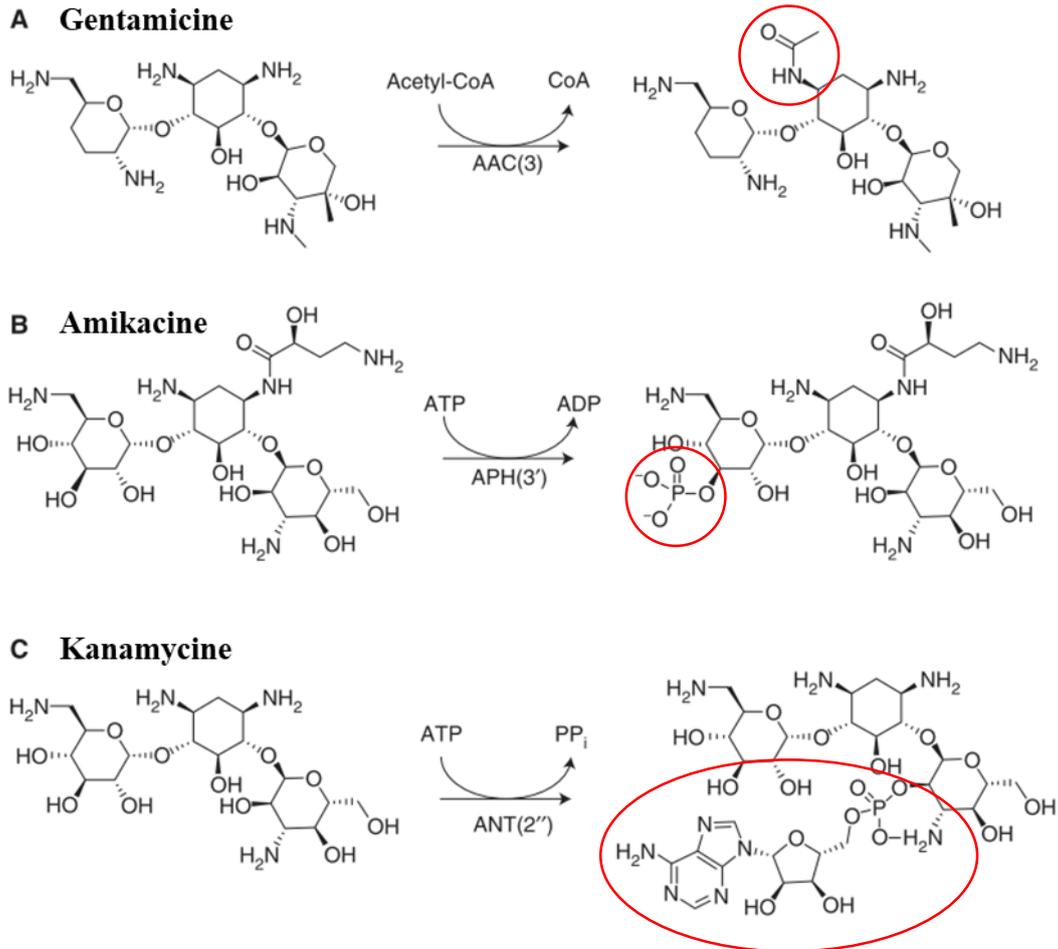


Figure 4. Exemple de modifications chimiques des aminoglycosides par les AME. (A) Modification de la gentamicine catalysée par l'acétyltransférases AAC(3) en présence d'acétyl coenzyme A. (B) Modification de l'amikacine catalysée par la phosphotransférases APH(3') en présence d'ATP. (C) Modification de la kanamycine catalysée par la nucléotidyltransférases ANT(2'') en présence d'ATP. Figure adaptée de (59).

1.2.6.3.1 Classes d'enzymes

Il existe deux schémas différents pour la nomenclature des AME : l'un proposé par Novick *et al.* (104) et l'autre proposé par Shaw *et al.* (105). Selon le schéma proposé par Novick *et al.*, les gènes codant les acétyltransférases, les nucléotidyltransférases et les phosphotransférases sont étiquetées respectivement *aac*, *ant* et *aph*. Cette désignation est suivie d'une lettre indiquant la position de la modification où le gène *aacA* code une 6'-N-acétyltransférase, tandis que les gènes *aacB* et *aacC* codent respectivement une 2'-N-acétyltransférase et une 3'-N-acétyltransférase. Cette désignation peut être suivie d'un numéro pour indiquer une subdivision (106).

Shaw *et al.* (105) ont proposé que les gènes *aac*, *ant* et *aph* soient utilisés pour distinguer le type d'enzyme encodée suivi de la position où l'AG est modifié entre parenthèses, par exemple

(2'), qui modifie la position 2' de AG. Les chiffres romains sont utilisés pour distinguer le profil de résistance et ensuite une lettre minuscule pour distinguer les protéines uniques, par exemple *aac(6')-Ia* et *aac(6')-Ib* sont des gènes uniques codant pour deux protéines ayant le même profil de résistance.

1.2.6.3.2 AAC

Les AAC catalysent l'acétylation des groupes amines (-NH₂) présents sur les AG, en utilisant l'acétyl coenzyme A comme substrat donneur, où les AAC appartenant aux groupes AAC(1), AAC(2'), AAC(3) et AAC(6') catalysent la modification des groupes -NH₂ par l'ajout d'un groupe acétyle aux positions 1, 2', 3 et 6', respectivement (70). L'enzyme AAC la plus répandue est l'AAC(6')-Ib qui confère une résistance à l'amikacine, à la kanamycine et à la tobramycine, mais pas à la gentamicine (Tableau 2) (70). Elle a largement été identifiée chez les bactéries à Gram négatif, notamment les Enterobacterales et les non-fermentant comme *A. baumannii* et *P. aeruginosa* (59, 101). Un trentaine de variants *aac(6')-Ib* numérotés à partir de *-Ib1* dont la nomenclature repose sur la variation de région N-terminale de la protéine ont été décrits principalement dans des structures génétiques de type intégron sous forme de gènes cassettes (autre nomenclature *aacA4*). Dans ces structures, il a été montré que l'expression du variant *aac(6')-Ib₇* était dépendante de la partie 5' conservée de l'intégron (107). De même, le variant *Ib₁₁*, avec des substitutions Leu118 et Ser119 dans la protéine AAC(6')-Ib, a été décrit comme codant la « première acétyltransférase à large spectre » car elle conférait un profil de résistance étendu à tous les AG (108) (Tableau 2). En 2006, l'enzyme bi-fonctionnelle AAC(6')-Ib-cr, qui confère une résistance à la fois aux AG et à certaines fluoroquinolones (norfloxacine et ciprofloxacine) médiée par des substitutions en position 104 et 181 de l'enzyme, était décrite (109). Cette enzyme a été retrouvée en France dans des collections de bacilles à Gram négatif producteurs de l'enzyme CTX-M-15 dès 2005, le gène était localisé dans et hors des intégrons (110–113). On a également découvert que d'autres enzymes AAC(6'), qui font partie d'enzymes bi-fonctionnelles associées à d'autres AME comme l'AAC(6')-APH(2''), génèrent une résistance à une gamme plus large d'AG (114). Cependant, cette enzyme bi-fonctionnelle ne semble être retrouvée que chez les cocci à Gram positif.

Les AAC(6')-II ont des séquences protéiques proches de celles des AAC(6')-Ib (82% d'homologie en acide aminé) mais un spectre qui confère une résistance à la gentamicine, à la kanamycine et à la tobramycine, mais pas à l'amikacine (Tableau 2) (115).

Enzyme	Aminoglycoside																Nomenclature alternative	
	GEN	TOB	NET	AMK	PLZ	KAN	NEO	APR	ISE	SIS	DBK	ABK	PAR	HYG	STR	SPC		
AAC(1)																		
AAC-(2')-I	■	■	■		■	■					■							
AAC-(3)-I	■	■	■															
AAC-(3)-II	■	■	■															
AAC-(3)-III	■	■	■			■	■			■	■				■			
AAC-(3)-IV	■	■	■					■										
AAC-(3)-V	■	■	■															
AAC-(3)-VI	■	■	■							■	■							
AAC-(3)-VII	■	■	■												■			
AAC-(3)-VIII							■	■										
AAC-(3)-IX							■	■										
AAC-(3)-X				■		■					■	■						
AAC-(6')-I						■												
AAC-(6')-Ib ₁₁	■	■	■	■		■												
AAC-(6')-II	■	■	■	■														
ANT-(2'')-I	■	■	■			■	■			■	■							<i>aadB</i>
ANT-(3'')-I	■	■	■			■	■			■	■				■	■	■	<i>aadA1-24</i>
ANT-(4')-I		■		■		■			■		■							<i>aadD, aadD2, ant(4',4'')-I</i>
ANT-(4')-II		■		■		■			■		■							
ANT-(6)-I															■	■	■	<i>ant6, aadE, aadK</i>
ANT-(9)-I																■	■	<i>spc, aad9, ant9</i>
APH-(2'')-I	■																	
APH-(2'')-IV	■				■													
APH-(3')-I						■	■	■					■	■				<i>aphA-1</i>
APH-(3')-II						■	■	■					■	■				<i>aphA-2</i>
APH-(3')-III				■		■	■	■		■								
APH-(3')-IV						■	■	■		■								
APH-(3')-V						■	■	■		■								
APH-(3')-VI				■		■	■	■		■								<i>aphA-6</i>
APH-(3')-VII						■	■	■		■								
APH-(3'')-I															■	■	■	<i>aphE, aphD2, strA</i>
APH-(4)-I														■	■	■	■	<i>hph, hyg</i>
APH-(6)-I														■	■	■	■	<i>aphD, strA, strB, orfI</i>
APH-(7'')-I														■	■	■	■	
APH-(9)-I																■	■	

GEN : gentamicine, TOB : tobramycine, NET : netilmicine, AMK : amikacin, PLZ : plazomicine, KAN : kanamycine, NEO : néomycine, APR : apramycine, ISE : iséпамycine, SIS : sisomycine, DBK : dibékacine, ABK : arbékacine, PAR : paromomycine, HYG : hygromycine, STR : streptomycine, SPC : spectinomycine

Tableau 2. Profils de résistance aux aminoglycosides en fonction du types d'AME. Le carré noir signifie que l'enzyme modifie l'AG, le carré gris signifie que certains variants peuvent modifier l'AG, le carré blanc signifie que l'enzyme ne modifie pas l'AG. Tableau adapté d'après Ramirez *et al.* (70).

Il est intéressant de remarquer que seules les AAC(1) et AAC(3)-IV sont capables de modifier l'apramycine (Tableau 2) (41, 116). Concernant la plazomicine, l'AAC(2')-I et l'APH(2'')-IV peuvent la modifier (Tableau 2) (117).

1.2.6.3.3 ANT

Les ANT catalysent l'adénylation des AG en utilisant un substrat donneur ATP où ils transfèrent un groupe adénosine monophosphate (AMP) aux groupes hydroxyl (-OH) aux positions 6, 9, 4', 2" et 3" de l'AG *via* respectivement les groupes d'enzymes ANT(6), ANT(9), ANT(4'), ANT(2") et ANT(3") (Tableau 2) (70). Tous les groupes d'enzymes sont principalement retrouvés chez des bactéries à Gram positif. L'enzyme ANT(2")-Ia est l'ANT la plus répandue chez les bactéries à Gram négatif (Enterobacterales ainsi que par *A. baumannii* et *P. aeruginosa*) (70, 101, 118). Elle confère une résistance à la dibécacine, à la gentamicine, à la kanamycine, à la sisomicine et à la tobramycine (Tableau 2). Le gène *ant(2)-Ia* est largement présent comme gène cassette dans des intégrons de classe 1 et 2, et a été identifié sur des plasmides et des transposons (70).

1.2.6.3.4 APH

Les APH catalysent la phosphorylation des groupes hydroxyl (-OH) des AG, en utilisant l'ATP comme substrat donneur, aux positions 4, 6, 9, 3', 2", 3" et 7" (Tableau 2) (70). Le plus grand nombre d'APH appartient au groupe APH(3') (70). Les gènes codant les APH(3') ont été trouvés sur des plasmides et des transposons à large spectre d'hôtes (88). Ils confèrent une résistance à plusieurs AG tels que l'amikacine, la kanamycine et la néomycine chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (70).

1.2.6.3.5 Enzymes endogène

Les AME peuvent faire partie du patrimoine chromosomique de la bactérie, qu'elles soient endogènes ou acquises, intégrées dans le chromosome le plus souvent par recombinaison. Elles sont alors la plupart du temps stables dans le génome bactérien spécifiques d'une espèce et leurs transmissions s'effectuent de manière verticale. Ces gènes chromosomiques, codant essentiellement pour des AAC, ont été mis en évidence dans de nombreuses espèces bactériennes (Tableau 3). La plupart d'entre elles, comme par exemples *aac(6')-Ig*, *aac(6')-Ij* et *aac(6')-Ik*, sont exprimées de manière constitutive (119, 120). Cependant, certains gènes chromosomiques peuvent être silencieux ou très faiblement exprimés comme c'est le cas de *aac(6')-Ic* chez *Serratia marcescens* (121). La faible expression de ce gène a été reliée à une séquence promotrice atypique -35, comme celle retrouvée en amont du gène *aac(2')-Ia* chez *Providencia stuartii* (115, 121). L'expression du gène *aac(6')-Ic* peut augmenter

considérablement et cette augmentation a été reliée à des réarrangements au niveau de la région 5' du gène sous forme de modification de la région promotrice (121).

Gène	Phénotype de résistance	Bactérie
<i>aac(2')-Ia</i>	GEN, TOB, DIB, KAN, NET	<i>Providencia stuartii</i>
<i>aac(2')-Ib</i>	GEN, TOB, DIB, KAN, NET	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>aac(2')-Ic</i>	GEN, TOB, DIB, KAN, NET	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>aac(2')-Id</i>	GEN, TOB, DIB, KAN, NET	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>aac(2')-Ie</i>	GEN, TOB, DIB, KAN, NET	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>aac(6')-Ic</i>	AMK, TOB, NET	<i>Serratia marcescens</i>
<i>aac(6')-Ig</i>	AMK, TOB, NET	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
<i>aac(6')-Ii</i>	AMK, TOB, NET	<i>Enterococcus spp.</i>
<i>aac(6')-Ij</i>	AMK, TOB, NET	<i>Acinetobacter sp. 13</i>
<i>aac(6')-Ik</i>	AMK, TOB, NET	<i>Acinetobacter sp. 6</i>
<i>aac(6')-Ir</i>	AMK, TOB, NET	<i>Acinetobacter sp. 14</i>
<i>aac(6')-Iid</i>	AMK, TOB, NET	<i>Enterococcus durans</i>
<i>aac(6')-Iih</i>	AMK, TOB, NET	<i>Enterococcus hirae</i>
<i>aac(6')-Is</i>	AMK, TOB, NET	<i>Acinetobacter sp. 15</i>
<i>aac(6')-It</i>	AMK, TOB, NET	<i>Acinetobacter sp. 16</i>
<i>aac(6')-Iu</i>	AMK, TOB, NET	<i>Acinetobacter sp. 17</i>
<i>aac(6')-Iy</i>	AMK, TOB, NET	<i>Salmonella enterica</i>
<i>aac(6')-Iz</i>	AMK, TOB, NET	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>aac(6')-sk</i>	AMK, TOB, NET	<i>Spreptomycetes kanamyceticus</i>
<i>aac(3)-Xa</i>	AMK, DIB, KAN, ABK	<i>Spreptomycetes griseus</i>
<i>ant(6)</i>	STR	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>aph(6)-Ia</i>	STR	<i>Spreptomycetes griseus</i>
<i>aph(3')-IIb</i>	KAN, NEO	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>aph(3')-Vb</i>	NEO	<i>Streptomycetes ribosidificus</i>
<i>aac(3)-VIIa</i>	AMK, DIB, KAN, ABK	<i>Streptomycetes rimosus</i>
<i>aac(3)-VIIIa</i>	AMK, DIB, KAN, ABK	<i>Streptomycetes fradiae</i>
<i>aac(3)-Ixa</i>	AMK, DIB, KAN, ABK	<i>Micromonospora chalcae</i>

AG : aminoglycoside, GEN : gentamicine, TOB : tobramycine, DIB : dibékacine, KAN : kanamycine, NET: netilmicine, AMK : amikacine, ABK : Arbékacine, STR : Streptomycine, NEO : Néomycine

Tableau 3. Principaux gènes codant pour des enzymes modificateuses des aminoglycosides à localisation chromosomique.

1.2.6.4 Résistance par mutation de la cible ribosomale

1.2.6.4.1 Mutation

La résistance aux AG par mutation de la cible ribosomale concerne essentiellement la streptomycine et la spectinomycine, et a donc une incidence clinique assez faible. Cette résistance reste peu observée car la plupart des procaryotes possèdent dans leurs génomes plusieurs copies des ARNr, excepté des genres comme *Mycobacterium* et *Mycoplasma* qui ne possèdent qu'une copie (122). Ces mutations ont particulièrement été décrites dans la résistance à la streptomycine chez *Mycobacterium* spp.. En effet, une seule mutation dans le gène *rrs* de *Mycobacterium* spp. peut empêcher la liaison de la streptomycine aux ribosomes bactériens. Cette mutation doit se situer dans une de ces deux régions hautement conservées : la boucle 530 ou la région entourant le nucléotide 912 (selon la numérotation de *E. coli*), localisées au niveau du site A de l'ARNr 16S (123). Des mutations dans la protéine S12, responsables de la résistance à la streptomycine, ont également été caractérisées chez plusieurs espèces comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* (124–126). Enfin, une mutation dans la protéine L6 de la grande sous-unité du ribosome conférant un bas niveau de résistance à la gentamicine a été décrite chez *E. coli* (127).

1.2.6.4.2 Méthylation de ARNr 16S

Le second mécanisme de résistance impliquant une modification de la cible, cliniquement beaucoup plus important que le précédent, est la méthylation post-transcriptionnelle du site A de l'ARNr 16S. Ces méthyltransférases (ou méthylases) de l'ARNr 16S (RMTases) sont très courantes chez les *Streptomyces* spp. et *Micromonospora* spp. qui produisent naturellement des AG. Depuis le début des années 2000, leur importance n'a fait qu'augmenter du fait de l'acquisition de ce mécanisme de résistance par des bactéries responsables d'infection, comme *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ou des Enterobacterales, par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles multiples facilitant leur dissémination (128). Les détails concernant la résistance intrinsèque ou acquise par production de RMTase sont l'objet de la section suivante.

1.3 Méthyltransférase de l'ARNr 16S (RMTase)

Ces enzymes confèrent une résistance de haut niveau (CMI \geq 256 mg/L) à tous les AG cliniquement pertinents (amikacine, tobramycine, gentamicine) (128) en ajoutant un groupe méthyle, à la position N-7 du résidu G1405 ou à la position N-1 du résidu A1408, se trouvant au niveau du site A de l'ARNr 16S (Figure 2), en utilisant la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) comme cofacteur (129, 130). La méthylation introduit une charge positive au niveau du résidu,

ce qui empêche la liaison des AG au site A. La modification de A1408 confère une résistance aux AG du groupe 4,5- et 4,6-2-DOS, tels que la gentamicine, l'amikacine et la néomycine, ainsi qu'à l'apramycine, alors que la méthylation du résidu G1405 ne confère une résistance qu'aux AG du groupe 4,6-2-DOS, tels que l'amikacine, la gentamicine et la tobramycine (128, 131). Le profil de résistance conféré par les RMTases est dû à des différences d'interactions entre les résidus G1405 ou A1408 et l'AG. En effet, un AG du groupe 4,6-2-DOS doit former une liaison hydrogène avec la position N7-G1405 pour se fixer à sa cible alors qu'un AG du groupe 4,5-2-DOS ou du groupe monosubstitué-DOS n'en a pas besoin (Figure 5) (128, 129). De plus, l'ensemble des AG possédant un noyau streptamine doivent former une liaison hydrogène avec la position N1-A1408 (Figure 5) (130, 132). Par conséquent, la méthylation des positions N1-A1408 et N7-G1405 empêche la formation de ces liaisons hydrogènes et confère une résistance. Par contre, les RMTases ne confèrent pas de résistance aux AG dépourvus de cycle streptamine, comme la streptomycine (128).

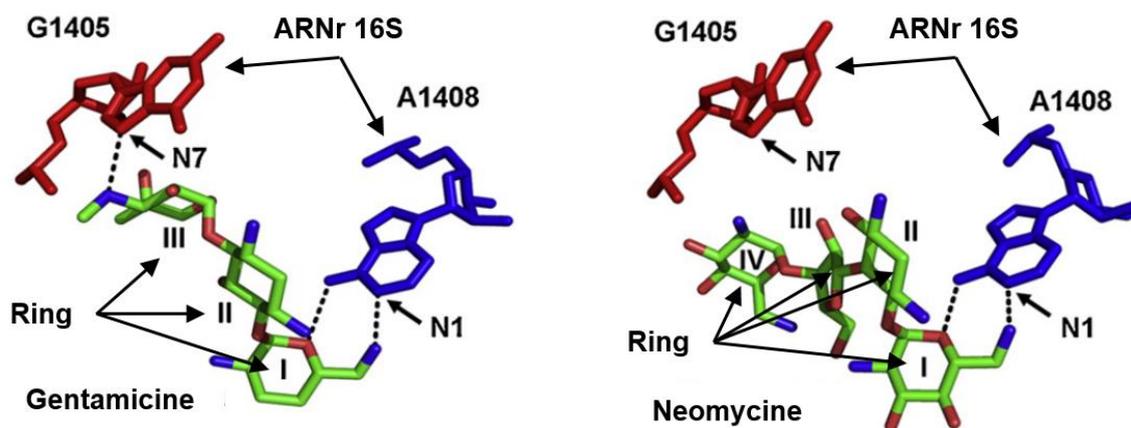


Figure 5. Interaction entre un aminoglycoside du groupe 4,6-2-DOS (Gentamicine) et du groupe 4,5-2-DOS (Néomycine) avec les résidus G1405 et A1408 de l'ARNr 16S. La ligne en pointillée indique une probable liaison hydrogène. Figure adaptée de (128).

1.3.1 Origine des RMTases

Les AG sont produits par les actinomycètes qui sont des bactéries à Gram positif formant des spores (131). Afin de protéger leurs ribosomes des AG qu'elles produisent, elles peuvent utiliser des RMTases pour modifier leur ARNr 16S au niveau du site A, de sorte que les AG ne puissent pas se lier aux ribosomes (131, 133, 134). Ces enzymes ont été découvertes pour la première fois chez des actinomycètes dans les années 1980 où des enzymes modifiant les résidus G1405

et A1408 ont été identifiées comme, respectivement, la RMTase Kmr chez *S. kanamyceticus* ou la RMTase KamA chez *Streptomyces tenjimariensis* (Tableau 4) (135, 136). Ces résistances intrinsèques peuvent être classées en deux catégories : les RMTases agissant en position N7 du résidu G1405 et celles agissant en position N1 du résidu A1408 (Tableau 4) (*cf* section précédente).

Groupe de RMTase	Gènes	Bactéries progénitrices	AG produit	Référence
N7-G1405	<i>fmrO</i>	<i>M. olivasterospora</i>	Fortimicine	(57, 137)
	<i>grmA</i>	<i>M. purpurea</i>	Gentamicine	(46, 134)
	<i>kmr</i>	<i>S. kanamyceticus</i>	Kanamycine	(43, 136)
	<i>grmB</i>	<i>M. rosea</i>	Sisomicine	(50, 138)
N1-A1408	<i>kamA</i>	<i>S. tenjimariensis</i>	Istamycine	(135, 139)
	<i>kamB</i>	<i>S. tenebrarius</i>	Apramycine	(48, 140)
	<i>kamC</i>	<i>Sacharopolyspora hirsuta</i>	Sporiricine	(141, 142)

Tableau 4. RMTases intrinsèques présentes chez des bactéries naturellement productrices d'AG.

1.3.2 Découverte des RMTases acquises chez les bactéries à Gram négatif

En 2000, une *K. pneumoniae* nommée BM4536 et isolée d'une infection des voies urinaires en France présentait des niveaux inhabituellement élevés de résistance à tous les AG du groupe 4,6-2-DOS (143). Le fragment génétique portant le déterminant de résistance a été cloné et séquencé, avant d'être comparé aux séquences disponibles dans Genbank. Ce déterminant inconnu s'est avéré identique à une séquence de la base de données correspondant à une souche de *Citrobacter freundii* portant un plasmide pCTX-M3 (numéro d'accès AF550415) isolée en Pologne en 1997, non décrite en 2003, année où l'équipe de Patrice Courvalin à l'Institut Pasteur a caractérisé et nommé cette protéine ArmA (aminoglycoside résistance methyltransferase A) (143, 144). En 2006, la fonction enzymatique de la RMTase ArmA a été caractérisée comme étant une RMTase méthylant la position N7 du résidu G1405 et que le gène *armA* était retrouvé dans les deux isolats sur un plasmide également porteur de la BLSE *bla*_{CTX-M-3} (129). Il n'a pas fallu longtemps pour réaliser que la RMTase acquise ArmA n'était que la partie émergée de l'iceberg. Seulement 4 mois après la publication décrivant ArmA, l'équipe de Yoshichika Arakawa au Japon a publié un article décrivant une autre RMTase acquise nommée RmtA (ribosomal RNA methyltransferase A), provenant, cette fois, d'une souche de

P. aeruginosa appelée AR-2 et isolée en 1997 (145). Comme *armA*, ce gène conférait une résistance exceptionnellement élevée aux AG du groupe 4,6-2-DOS. Ce gène *rmtA* avait un % de GC de 55 % contre 30 % pour *armA* et les enzymes ArmA et RmtA présentait une très faible identité (30%) en acides aminés (128). Depuis la découverte des RMTases ArmA et RmtA, 11 RMTases distinctes acquises ont été publiées (ArmA, RmtA-H et NpmA-B) en plus de nombreux variants (Tableau 5). Le site de méthylation n'a pas été prouvé au niveau fonctionnel pour l'ensemble des RMTase mais il est admis que l'ensemble des RMTase appartiennent au groupe N7-G1405, à l'exception de NpmA et NpmB, qui appartiennent au groupe N1-A1408. L'analyse du % de GC des gènes de RMTases acquis se situe entre 30% et 68% alors qu'il est proche de 60 % chez les Actinomycètes, suggérant l'existence de progéniteurs de ces gènes acquis différents des producteurs naturels de RMTases connus (*e.g. Micromonospora* spp.) (146). Très récemment, l'équipe de Yohei Doi au Japon, a montré que NpmB1 et NpmB2 avaient des séquences d'acides aminées très proches d'une séquence associée à une bactérie des sols appartenant au phylum *Acidobacteria* du genre *Blastocatellia* et dont l'espèce n'était pas définie (147). De plus, les régions en amont et en aval du gène codant *npmB2* était également similaires à celles retrouvées dans la bactérie du genre *Blastocatellia*. Un arbre phylogénétique des RMTases est présenté Figure 6.

Les gènes codant des RMTases acquises semblaient être présents uniquement chez des bacilles à Gram négatif car, jusqu'à récemment, aucun d'entre eux n'avait été rapporté chez des bactéries à Gram positif (91, 128). Cependant, *npmA*, et son variant *npmA2*, ont été découverts dans des isolats cliniques de *Clostridioides difficile* provenant des États-Unis en 2018 (148). Avant cette découverte, il avait été montré que l'expression du gène *rmtC* chez des bactéries à Gram positif comme *Bacillus subtilis* ou *Staphylococcus aureus* était possible, mais dépendait de l'utilisation de promoteurs optimaux compatibles avec ces bactéries pour l'expression du gène (149). L'expression des gènes codant ces RMTases dans les bactéries à Gram positif en particulier *C. difficile*, connue pour être à l'origine d'épidémies nosocomiales (150) et capable de produire des spores qui peuvent vivre pendant des mois en dehors du corps humain, signifie que ces bactéries ont potentiellement la possibilité de propager ces gènes à d'autres espèces de bactéries. Cette propagation pourrait être facilitée par un transfert horizontal car des recombinases ont été trouvées associées à *npmA* dans la souche CD7814 de *C. difficile* (148).

Gènes	Années de publication	Bactéries	Pays d'isolement	GC (%)	Numéro GenBank	Référence
<i>armA</i>	2003	<i>K. pneumoniae</i>	France	30	AY220558	(143)
<i>armA2</i>	2020	<i>A. baumannii</i>	Myanmar	30	LC433766	(151)
<i>rmtA</i>	2003	<i>P. aeruginosa</i>	Japon	55	AB083212	(145)
<i>rmtB</i>	2003	<i>S. marcescens</i>	Japon	57	AB103506	(152)
<i>rmtB2</i>	2012*	<i>E. cloacae</i>	Etats-Unis	56	JN968578	Non publié
<i>rmtB3</i>	2012*	<i>E. coli</i>	Etats-Unis	56	JN968579	Non publié
<i>rmtB4</i>	2019	<i>P. mirabilis</i>	Etats-Unis	56	KM999534	(153)
<i>rmtC</i>	2006	<i>P. mirabilis</i>	Japon	41	AB194779	(154)
<i>rmtD</i>	2007	<i>P. aeruginosa</i>	Brésil	59	DQ914960	(155)
<i>rmtD2</i>	2011	<i>E. cloacae</i>	Argentine	59	HQ401566	(156)
<i>rmtD3</i>	2018	<i>P. aeruginosa</i>	Myanmar	59	LC229801	(157)
<i>rmtE</i>	2010	<i>E. coli</i>	Etats-Unis	37	GU201947	(158)
<i>rmtE2</i>	2015	<i>E. coli</i>	Chine	37	KT428293	(159)
<i>rmtE3</i>	2022	<i>A. baumannii</i>	Royaume-Uni	37	MH572011	(160)
<i>rmtF</i>	2012	<i>K. pneumoniae</i>	France	67	JQ808129	(161)
<i>rmtF2</i>	2017	<i>P. aeruginosa</i>	Népal	68	LC050387	(162)
<i>rmtG</i>	2013	<i>K. pneumoniae</i>	Brésil	60	JX486113	(163)
<i>rmtH</i>	2013	<i>K. pneumoniae</i>	Iraq	61	KC544262	(164)
<i>npmA</i>	2007	<i>E. coli</i>	Japon	34	AB261016	(165)
<i>npmA2</i>	2018	<i>C. difficile</i>	Etats-Unis	-	-	(148)
<i>npmB1</i>	2021	<i>E. coli</i>	Royaume-Uni	-	EGD5494512**	(147)
<i>npmB2</i>	2021	<i>E. coli</i>	Royaume-Uni	-	EAB8931753**	(147)

*Année de publication dans GenBank.

**Uniquement les séquences d'acides aminés sont publiées dans GenBank.

Tableau 5. Découverte des gènes codant les RMTases acquises.

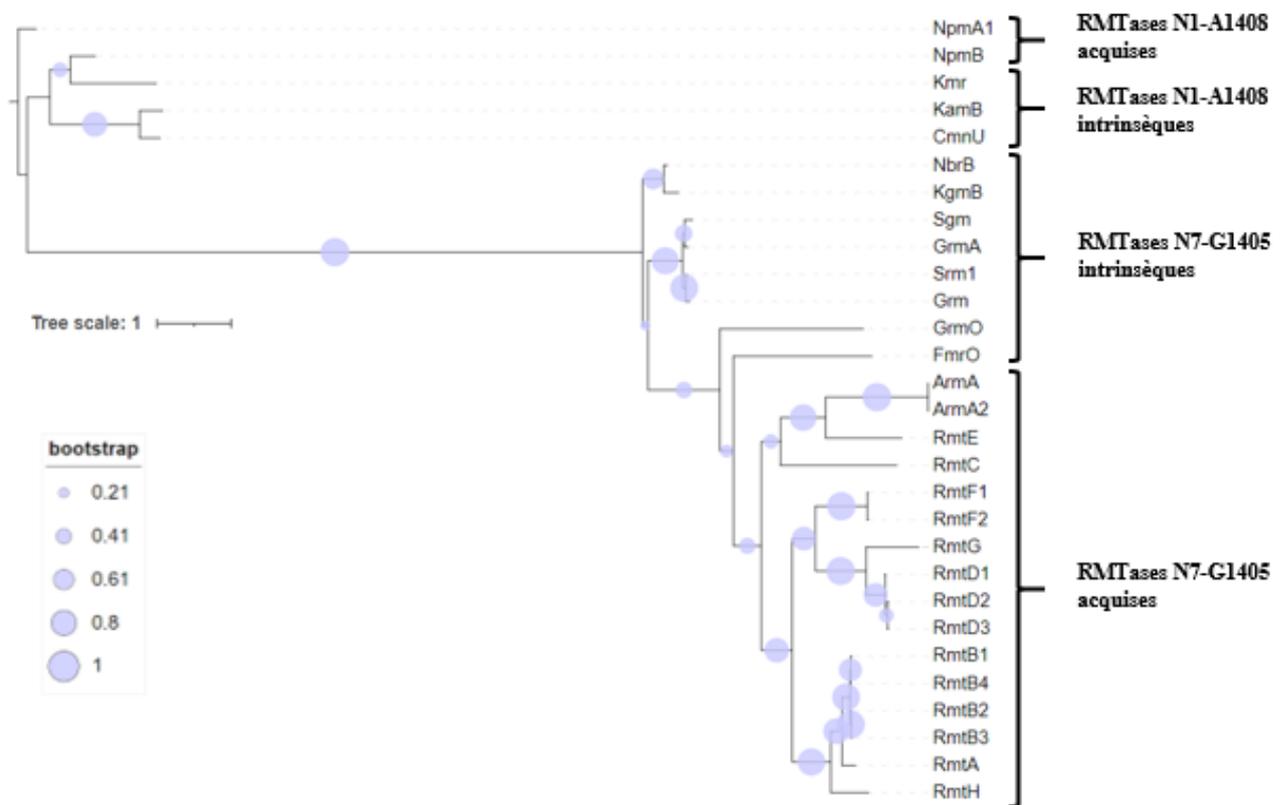


Figure 6. Arbre Phylogénétique des RMTases intrinsèques et acquises. Cet arbre a été construit en utilisant PhyML et iTol (166, 167), à partir des séquences protéiques récupérées de GenBank : Grm0 (numéro d'accension : AY524043), NbrB (numéro d'accension : AF038408), Grm (numéro d'accension : M55521), KgmB (numéro d'accension : S60108), GrmA (numéro d'accension : AY524043), Srm1 (numéro d'accension : AY661430), FmrO (numéro d'accension : D13171.2), Sgm (numéro d'accension 3LCU), KamB (numéro d'accension3MQ2), CmnU (numéro d'accension : EF472579), Kmr (numéro d'accension : EU429565), NpmA1 (numéro d'accension MH249957), NpmB (numéro d'accension : WP_231869585), ArmA (numéro d'accension : AY220558), ArmA2 (numéro d'accension : BBH42896), RmtA (numéro d'accension : AB083212.2), RmtB1 (numéro d'accension : AB103506), RmtB2 (numéro d'accension : JN968578), RmtB3 (numéro d'accension : JN968579), RmtB4 (numéro d'accension : KM999534), RmtC (numéro d'accension : AB194779.2), RmtD1 (numéro d'accension : DQ914960.2), RmtD2 (numéro d'accension : HQ401565), RmtD3 (numéro d'accension : LC229801), RmtE (numéro d'accension : GU201947), RmtF1 (numéro d'accension : JQ808129), RmtF2 (numéro d'accension : LC050387), RmtG (numéro d'accension : JX486113), RmtH (numéro d'accension : KC544262).

1.3.3 Distribution mondiale des RMTases

Une carte indiquant la répartition mondiale des RMTases est présentée en figure 7.

1.3.3.1 NpmA

La RMTase NpmA a été identifiée pour la première fois dans un isolat clinique de *E. coli* appartenant au ST131 provenant du Japon (165). Cet *E. coli* producteur de NpmA a été identifié car il présentait une résistance de haut niveau à l'apramycine, un AG d'utilisation vétérinaire. Après cette première description cette RMTase n'a pas été identifiée souvent. Cette RMTase a été détectée chez des Enterobacterales en Inde (168), en Chine (169), en Arabie Saoudite (170) et dans un isolat de *C. difficile* provenant des Etats-Unis (148). Le gène *npmA2* a été retrouvé uniquement chez *C. difficile* provenant de différentes régions du monde comme les Etats-Unis, l'Australie, le Royaume-Uni et le Canada (148). Ces souches de *C. difficile* présentaient des hauts niveaux de résistances 4-8 fois supérieur aux souches ne produisant pas NpmA2 (148).

1.3.3.2 NpmB

Le gène *npmB*, codant la dernière RMTase décrite, a été découvert par l'équipe de Yohei Doi grâce à une recherche dans la base de données NCBI par homologie de séquence (la séquence en acides aminés de NpmB est similaires à la séquence de NpmA1) (147). Cette équipe identifia deux séquences ayant 40% d'identité avec NpmA1 et annotées comme des « méthyltransférase S-adenosylmethionine (SAM)-dépendant de classe 1 ». Ces deux séquences ont été désignées NpmB1 et NpmB2 avec seulement une mutation (R21C) entre les deux. Elles provenaient de deux souches de *E. coli* isolées au Royaume-Uni. Pour montrer que ces séquences correspondaient bien à des RMTases, les auteurs ont cloné les gènes correspondant dans un plasmide pUC-19 (avec leur promoteur) et transformé ce vecteur dans une souche de *E. coli* sauvage. Le transformant présentait une résistance à l'ensemble des AG des groupes 4,5-2-DOS, 4,6-2-DOS et monosubstitué-DOS avec des CMI proches de celle retrouvées dans les souches produisant NpmA. Les séquences *npmB1* et *npmB2* ont également été identifiées comme proches de séquences décrites dans une bactérie du genre *Blastocatellia* appartenant au phylum Acidobacteria (numéro GenBank : HCA58615). Les séquences en amont et en aval de ces gènes étaient également proches de séquences de bactéries d'espèces d'Acidobacteria, suggérant que *npmB* pourrait provenir de ces bactéries du sol puis aurait intégré dans un second temps le génome de *E. coli* (147). Depuis cette description en 2021 aucune autre souche n'a été décrite avec ces gènes.

1.3.3.3 ArmA

ArmA est la première RMTase acquise décrite (en 2003) dans une souche de *K. pneumoniae* par l'équipe de Patrice Courvalin à l'Institut Pasteur (143). Le gène *armA* est l'un des gènes codant une RMTase acquise les plus répandus dans le monde puisqu'il a été trouvé sur les cinq continents (91, 128, 171). Il a été identifié dans un large éventail de bactéries à Gram négatif, notamment chez *A. baumannii* (172, 173), en particulier dans les isolats appartenant au clone international II (151, 160, 174–176), chez des Enterobacterales (172, 177–181) et beaucoup plus rarement chez *P. aeruginosa* (182–185). Cette RMTase a également été identifiée chez des espèces telles que *Salmonella* spp. (186–191) et *Shigella flexneri* (191) qui sont impliquées dans des infections d'origine alimentaire. Le variant *armA2* a été identifié récemment dans deux isolats de *A. baumannii* producteurs de carbapénémase de type OXA-23 et provenant du Myanmar (151).

1.3.3.4 RmtA

L'enzyme RmtA, décrite également en 2003, est la seconde RMTase acquise découverte après ArmA. On pensait initialement que ce gène *rmtA* était uniquement présent dans les bactéries isolées en Asie car il a été identifié principalement chez *P. aeruginosa* au Japon (145, 192–194) ainsi que chez *E. coli* (195), *K. pneumoniae* (195) et *P. aeruginosa* (196) en Corée du Sud. Il a également été identifié en Inde dans des isolats de *A. baumannii* (197) et de *E. coli* pouvant produire une carbapénémase de type New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) (168, 198). Cependant, il a ensuite été détecté chez une *K. pneumoniae* de ST147 produisant aussi une NDM, en Suisse (199).

1.3.3.5 RmtB

Peu de temps après la description de *armA* et *rmtA*, l'équipe de Yoshichika Arakawa décrit une souche de *Serratia marcescens* montrant un haut niveau de résistance aux AG lié à la présence d'un nouveau gène codant une RMTase appelé *rmtB*. Comme *armA*, *rmtB* (*rmtB1-4*) est l'un des gènes de RMTases acquises les plus largement distribués dans le monde puisqu'il a également été trouvé sur l'ensemble des cinq continents (91, 128, 171). Le gène *rmtB* a également été identifié dans une série de bactéries à Gram négatif, principalement des Enterobacterales (178, 179, 200–204) ainsi que *P. aeruginosa* (162, 176, 205, 206) et beaucoup moins fréquemment chez *A. baumannii* (176). Les variants *rmtB2* et *rmtB3* ont été déposés sur Genbank par Castanheira *et al.* et ont été trouvés dans plusieurs isolats : un *E. cloacae* possédant *rmtB2* isolé au Mexique, un isolat de *E. coli* provenant des Etats-Unis ainsi qu'un isolat de *E. cloacae* et un isolat de *K. pneumoniae* provenant du Mexique portant *rmtB3*. Le variant *rmtB4*

a été trouvée dans deux isolats de *P. aeruginosa* du Népal (162) et aux Royaume-Uni (205) et dans un isolat de *P. mirabilis* (153).

1.3.3.6 RmtC

Comme *armA* et *rmtB*, *rmtC* a été identifié en Europe, en Afrique, en Asie, en Amérique du Nord, en Amérique du Sud, au Moyen-Orient et en Océanie (170, 180, 207–211). Le gène *rmtC* a été principalement identifié chez les Enterobacterales (170, 181, 198, 207, 208, 212–215), en particulier dans les isolats cliniques de *K. pneumoniae*, mais a également été identifié dans des pathogènes alimentaires tels que *Salmonella* spp. (216–218). De plus, *rmtC* a été identifié chez *A. baumannii* en Inde (219) et en Uruguay (220) ainsi que chez *P. aeruginosa* en Inde (221), au Royaume-Uni (205) et en Roumanie (222). On peut noter également que la RMTase RmtC est souvent associée à la carbapénémase NDM que ce soit dans des souches de Enterobacterales ou de *P. aeruginosa*.

1.3.3.7 RmtD

Depuis sa description en 2005, RmtD (RmtD1 à RmtD3) a été principalement trouvée chez *P. aeruginosa* et chez des Enterobacterales isolés en Amérique du Sud : en Argentine, au Chili et au Brésil (155, 156, 163, 179, 223). A noter une diffusion particulière au Brésil, où les *P. aeruginosa* exprimant *rmtD* possédaient également fréquemment la carbapénémase Sao Paulo metallo-β-lactamase (SPM) et appartenait au ST235 (155, 223, 224). Le dernier variant décrit *rmtD3* a notamment été rapportée dans des isolats cliniques de *P. aeruginosa* provenant du Myanmar (157, 206), de la Pologne, où la souche produisait aussi la carbapénémase NDM (225), et au Royaume-Uni, où les quatre isolats décrits produisaient des carbapénémases (NDM ou Verona integron-encoded metallo-β-lactamases (VIM)) (205). Ces résultats indiquent que la RMTase RmtD commencerait à se répandre en dehors de l'Amérique du Sud.

1.3.3.8 RmtE

Le nombre de rapports concernant les producteurs de RmtE (RmtE1 à RmtE3) est également limité, trois provenant des Etats-Unis (tous les *E. coli*) (158, 226, 227), deux *E. coli* produisant RmtE2 en Chine (159) et, récemment, un *P. aeruginosa* producteur de NDM-1 au Myanmar (206). En 2022, le variant *rmtE3* a été décrit dans un isolat de *A. baumannii* produisant une carbapénémase OXA-72 (OXA-24-like) provenant du Royaume-Uni (160).

1.3.3.9 RmtF

RmtF (RmtF1 et RmtF2) est la RMTase la plus répandue, après ArmA, RmtB et RmtC. La première description de RmtF a été faite dans un isolat de *K. pneumoniae* provenant de l'île de La Réunion en 2011 (161). Ensuite, la RMTase RmtF a été décrite chez des Enterobacterales isolées en Inde (168, 228–230), au Népal (213, 231), au Pakistan (232), à Taïwan (233), en Chine (234), à Singapour (235), en Australie (207), aux Emirats Arabes Unis (236, 237), en Egypte (238), en Afrique du Sud (239), au Royaume-Uni (180), en Suisse (240), au Canada (241) et aux Etats-Unis (242–244) ; et chez *P. aeruginosa* au Myanmar (206), au Népal (162), en France (245) et au Royaume-Uni (205). Le variant *rmtF1* est principalement retrouvé chez des *K. pneumoniae* produisant une carbapénémase alors que le variant *rmtF2* est exclusivement retrouvé chez *P. aeruginosa*.

1.3.3.10 RmtG

Comme *rmtD*, *rmtG* a été principalement retrouvé en Amérique du Sud chez des *K. pneumoniae* dont certaines produisaient des carbapénémases de type *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) (163, 246–248). Ce gène *rmtG* a également été retrouvé dans des *P. aeruginosa* essentiellement de ST235 et isolés chez des patients atteints de mucoviscidose en Amérique du Sud (249, 250). En dehors ce continent, *rmtG* a été retrouvé chez des isolats de *K. pneumoniae* aux Etats-Unis (251), en Suisse (252) et en Inde, également chez *E. coli* (229).

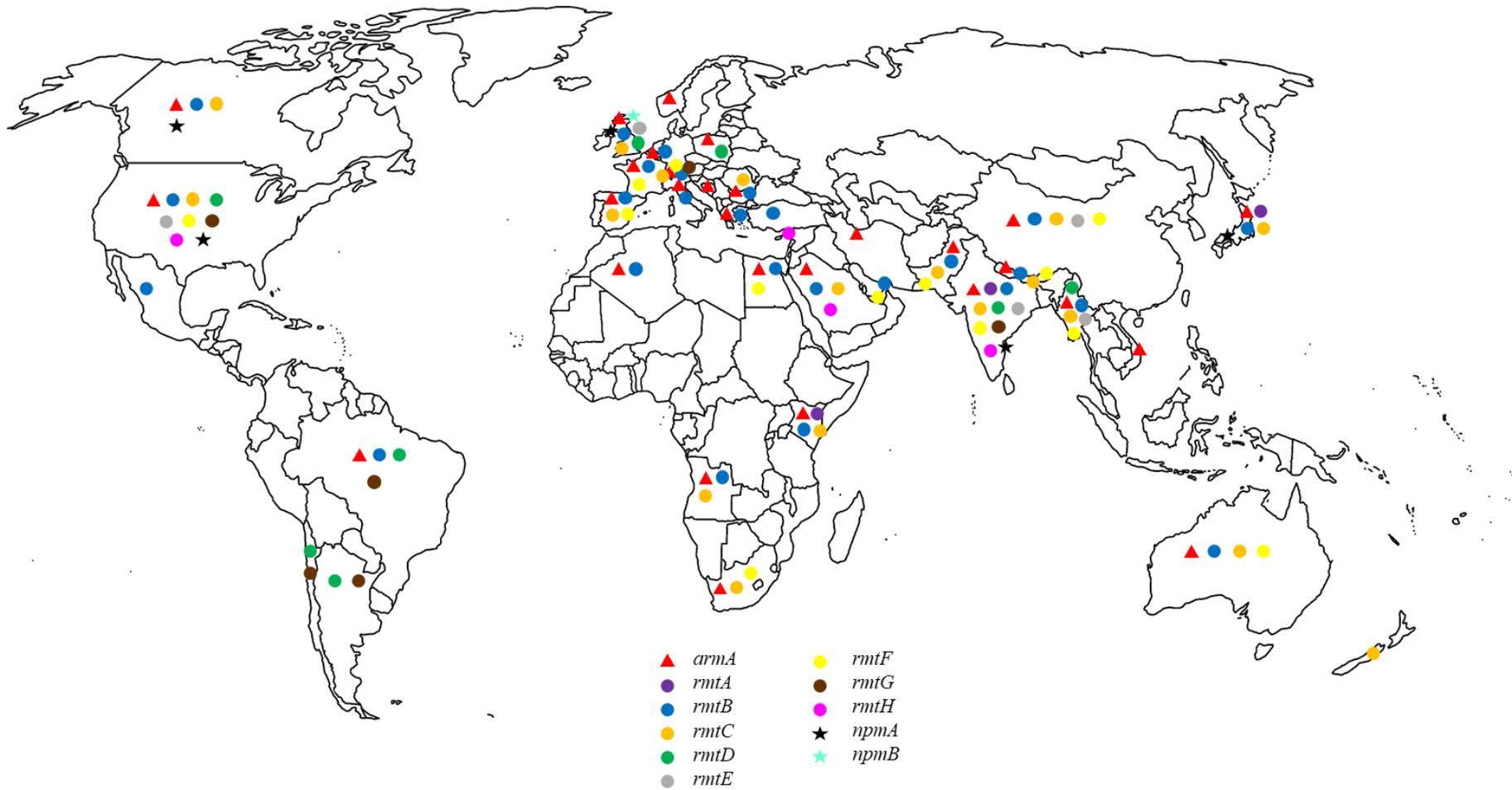


Figure 7. Distribution mondiale des RMTases. La légende indique les différentes RMTases décrites par pays. Adaptée de Wachino *et al.* (128)

1.3.3.11 RmtH

Initialement décrit en 2013, *rmtH* a été identifié dans une souche de *K. pneumoniae* de ST48 isolée d'une plaie d'un soldat américain blessé en Iraq (164). Contrairement à d'autres gènes de RMTases, le gène *rmtH* a été identifié sur le chromosome de la souche. Cette RMTase avait plus de 60% d'identité en acides aminés avec RmtB et RmtA. Elle a ensuite été retrouvée uniquement dans un plasmide d'une souche de *K. pneumoniae* de ST1157 isolée au Liban (253) et chez des *E. coli* producteurs de carbapénémase de type NDM en Inde (168).

1.3.4 Prévalence de la résistance par production de RMTase

Plusieurs études ont été menées dans le monde pour calculer la prévalence des RMTases dans leurs pays respectifs. Les RMTases semblent être retrouvées à des taux très variables entre les régions du monde, notamment entre l'Asie du Sud Est et l'Europe, parfois même entre pays d'une même région. Des taux de 0,5-1% (2/446 pour *E. coli* et 1/103 pour *K. pneumoniae*) ont été trouvés chez des Enterobacterales isolées d'animaux de compagnie du Japon (254), similaire au taux de 0,6% (16/2877) dans une collection d'isolats cliniques de bacilles à Gram négatif issue de plusieurs hôpitaux japonais (193). En Europe, ces prévalences sont légèrement plus faibles chez les Enterobacterales avec un taux de 0,12% (66/56172) au Royaume Uni (181), 0,15% (6/4080) en Grèce (255) ou de 0,12% (19/15386) en Belgique (178). Des occurrences plus importantes sont rapportées dans des populations de bactéries ayant déjà des résistances aux β -lactamines: des taux de 1,3 % (5/373) et 0,7% (1/139) sont retrouvés chez des Enterobacterales productrices de BLSE respectivement en France (256) et en Turquie (257), ils montent à 5,1% (24/468) en Espagne et à 7,7% (23/300) en Grèce chez des Entérobactéries productrices de carbapénémases (255, 258).

D'autres études ont révélé la présence de gènes de RMTase chez des Enterobacterales à des taux variables en fonction des pays et des régions du monde : dans 46 % (57/123), 5,6 % (10/177), 1,5 % (20/1301), 1,1 % (1/90) et 2,1% (22/1052) des isolats provenant respectivement d'Inde (259), d'Iran (260), de Bulgarie (261) du Kenya (262) et du Brésil (201). Chez *P. aeruginosa* et *A. baumannii* peu d'études se sont intéressées à la prévalence sans critères de résistance au préalable, on peut noter l'étude de l'équipe de Arakawa associée à la description de *rmtA*, où la prévalence de RMTases (*rmtA* uniquement) était de 0,8% (9/1113) dans des isolats japonais (145), et les études sur des *A. baumannii* isolés en Chine et au Vietnam où, respectivement, 36% (40/110) et 70% (70/101) des isolats produisaient une RMTase (176, 263). La majorité des études ont été réalisées à partir d'isolats présentant un premier niveau de

résistance, généralement aux β -lactamines, voir une multirésistance. Les taux de RMTases dans les isolats MDR de *A. baumannii* ont été trouvés à 89% (48/54) en Inde (219), 76,2% (32/42) en Corée du Sud (264) et 33% (23/70) en Bulgarie (173). Avant le début de ce projet, une seule étude s'était intéressée à évaluer la prévalence de RMTases dans une collection de Enterobacterales productrices de BLSE en France (256), les autres descriptions de RMTase en France étaient des cas sporadiques (143, 161, 189, 200, 245, 265–271).

Comme indiqué précédemment, les AME sont le mécanisme le plus fréquent de résistance aux AG et des études ont prouvé qu'ils sont plus fréquents que les RMTases. Castanheira *et al.* ont identifié que 17% (728/4217) des Enterobacterales collectés en Europe et dans les pays voisins étaient porteurs d'AME, contre 1,4% (60/4217) d'isolats produisant des RMTases (272). Costello *et al.* ont identifié que 81% (162/200) des bacilles à Gram négatif (Enterobacterales, *A. baumannii* et *P. aeruginosa*) provenant d'hôpitaux d'Europe, d'Amérique du Nord et latine participant au programme de surveillance antimicrobienne SENTRY produisaient des AME, contre 10,5 % (21/200) d'isolats produisant des RMTases incluant 90% (19/21) produisant au moins une AME associée à la RMTase (153). Enfin, Galani *et al.* ont identifié que 85,3 % (256/300) des isolats de *K. pneumoniae* producteurs de carbapénémase provenant d'hôpitaux grecs produisaient des AME, contre 7,7 % (23/300) produisant des RMTases (273). Cela montre que la prévalence des gènes codant des RMTases est relativement faible par rapport aux AME, mais plusieurs facteurs rendent leur émergence actuelle inquiétante.

1.3.5 Impact des RMTases sur la santé publique

L'émergence des RMTases est préoccupante car elles confèrent une résistance de haut niveau (CMI >256 mg/L) aux AG avec un seul gène par rapport aux autres mécanismes de résistance, en particulier les AME, qui, en dehors du variant *aac(6')-Ib₁₁*, nécessitent plusieurs gènes pour atteindre le même niveau de résistance (91, 108, 128, 171). Bien que les AME soient le mécanisme de résistance aux AG le plus fréquent, les RMTases acquises ont rapidement été mises en évidence au niveau mondiale depuis leurs premières identifications (91, 128, 171). Outre leur mécanisme d'action rendant l'utilisation des AG inefficace, d'autres facteurs viennent s'ajouter comme la présence d'éléments génétiques mobiles dans les environnements génétiques des gènes codant ces RMTases et leur association avec d'autres mécanismes de résistance importants, tels que la production de la carbapénémase NDM. Ces RMTases sont couramment détectées dans des bactéries à Gram négatif responsables d'infections communautaires et nosocomiales (164, 186, 194). De plus, certaines des espèces bactériennes

les plus décrites comme produisant des RMTases font partie des agents pathogènes inclus dans le groupe des "ESKAPE" comprenant les six pathogènes bactériens hautement virulents et résistants aux antibiotiques *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* et *Enterobacter* spp. (31). Ainsi, l'association de tous ces facteurs font actuellement des RMTases un problème de santé publique dans plusieurs pays du monde, comme l'Inde ou la Chine, et certainement un futur problème dans les régions peu touchées par cette résistance pour le moment, comme l'Amérique du Nord et l'Europe de l'Ouest.

1.3.5.1 Association avec d'autres gènes de résistance aux antibiotiques

Depuis leurs premières descriptions en 2003, les gènes codant les RMTases acquises ont été trouvés associés aux gènes BLSE (274, 275). Le gène le plus courant auquel ils sont associés est *bla*_{CTX-M-15}, qui a été identifié associé avec *armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* (163, 164, 221, 238, 248, 257, 276, 277) mais n'a pas encore été trouvé associé à *rmtE*, *npmA* ou *npmB*.

On a constaté également que les gènes codant les RMTases acquises étaient associés à d'autres gènes de résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif. Les gènes codant une carbapénémase sont fréquemment retrouvés associés à une RMTase en particulier le gène *bla*_{NDM}, qui a été trouvé associé à *armA* (278–281), *rmtB* (162, 282, 283), *rmtC* (211, 213, 221, 283), *rmtE* (206), *rmtF* (161, 233, 241) et *rmtH* (168) tandis que *rmtD* semble être associé à *bla*_{SPM-1} (spécifiquement dans les isolats de *P. aeruginosa*) (155, 224, 284–286) mais a également été signalé dans les isolats possédant *bla*_{KPC-2} de même que *rmtG* (163, 252). A notre connaissance, les gènes *npmA* et *npmB* n'ont pas été associés à des gènes codant une carbapénémase.

Les gènes codant les RMTases, en particulier *armA* et *rmtB*, ont également été associés à des gènes de résistance aux quinolones médiés par des plasmides (*plasmid-mediated quinolone resistance* :PMQR) tels que *qnrB*, *qnrS* ainsi que *aac(6')-Ib-cr* (187, 287–290), et *rmtB* a également été étroitement associé au gène acquis codant une pompe d'efflux des quinolones QepA (291–294).

L'association des gènes codant une RMTase acquises avec les gènes codant des BLSE, des carbapénémases et des PMQR signifie qu'en cas d'infection avec un bacille à Gram négatif portant ces gènes, les options de traitement seront limitées, car les AG, les β -lactamines et les fluoroquinolones sont trois des principales classes d'antibiotiques utilisées pour traiter les infections à bactéries à Gram négatif (31, 295).

1.3.5.2 Association avec des éléments génétiques mobiles

Les MGE sont des structures d'ADN mobile qui peuvent porter des gènes de résistance aux antibiotiques mais également des gènes codant pour plusieurs types de protéines responsables de leurs mouvements (transposases, resolvase, système de sécrétion de type IV...) au sein d'un génome mais parfois aussi entre bactéries (296). Ces MGE sont transmis par des mécanismes de transferts horizontaux, principalement par transformation (incorporation au sein d'une cellule dite compétente d'un ADN libre circulant), transduction (incorporation d'ADN *via* un bactériophage) ou conjugaison (transfert d'un élément conjugatif) (Figure 8).

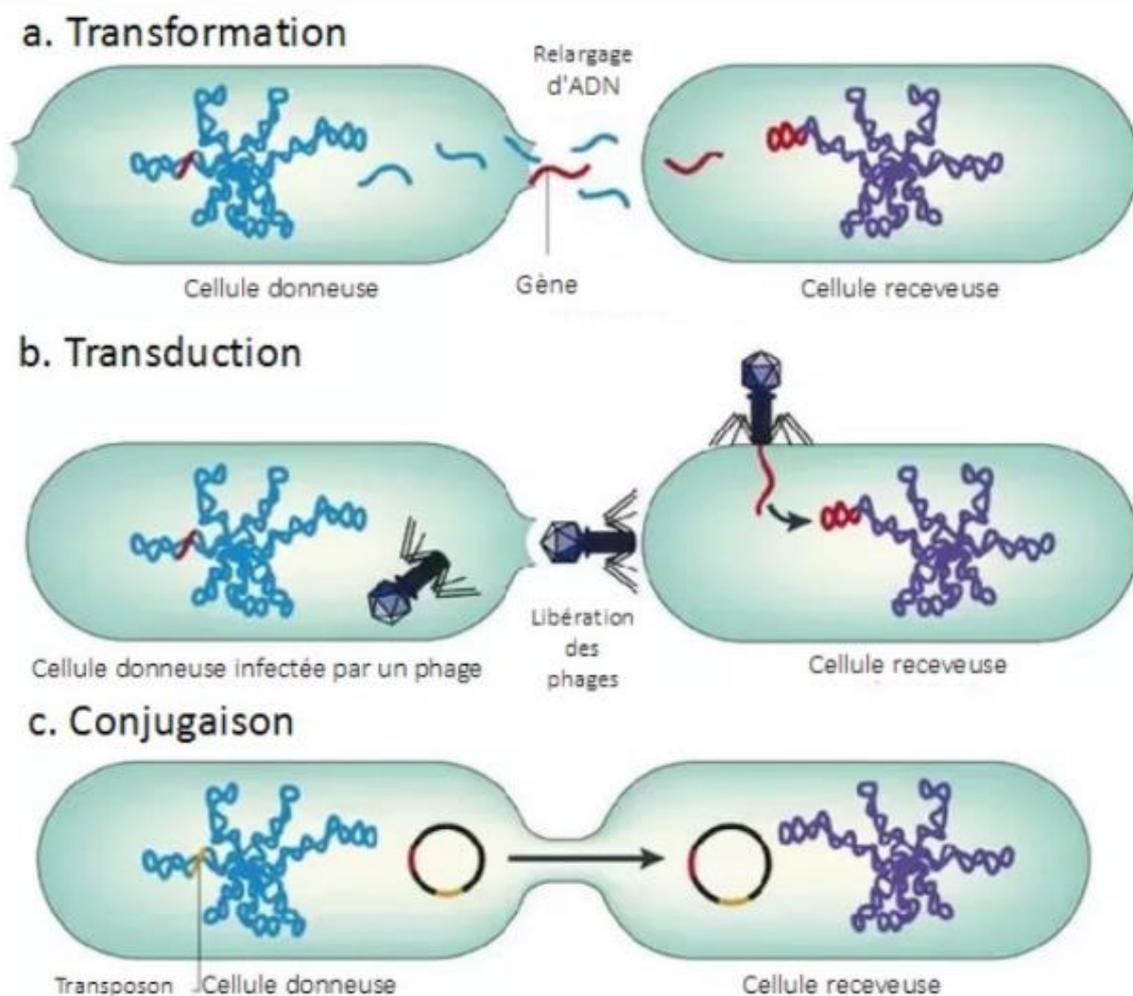


Figure 8. Mécanismes de transfert horizontal de gènes. a. Transformation : l'ADN relargué par une bactérie donneuse peut être capté par une bactérie receveuse naturellement compétente et incorporé à son propre génome par recombinaison homologue. b. Transduction : une bactérie donneuse, portant un prophage en son chromosome ou infectée par un phage peut se voir emporter une partie de son génome, lors de l'assemblage des nouveaux virions. Ainsi le nouveau phage peut aller transmettre ces séquences à une nouvelle bactérie, lors de son infection. c. Conjugaison : mécanisme de transfert impliquant un élément conjugatif et/ou mobilisable, qui va ainsi transférer du nouveau matériel génétique à une bactérie receveuse lors de la conjugaison. Adaptée de (297).

Ces MGE sont très diversifiés (Figure 9) :

(i) les plasmides : ce sont des molécules d'ADN extra-chromosomiques, circulaires, et capables de se répliquer indépendamment du chromosome (298). Ces structures sont principalement transmises par conjugaison. Les plasmides conjugatifs codent pour la machinerie nécessaire à leur transfert. D'autres dits « mobilisables » ne peuvent pas se transférer par eux-mêmes mais seulement à l'aide d'un autre plasmide conjugatif. Les plasmides participent aussi à la dissémination de nombreux autres MGE comme des transposons ou des intégrons. Les plasmides sont donc des acteurs majeurs des transferts de gènes de résistance.

(ii) les bactériophages : les virus infectant des bactéries (ou bactériophages) sont des particules intracellulaires obligatoires. Ils s'appuient sur la machinerie cellulaire de la cellule hôte afin d'effectuer les mécanismes moléculaires nécessaires à leur survie et à leur prolifération (réplication, transcription, traduction) (296). Leur génome peut s'intégrer dans le génome de l'hôte sous forme de prophage qui va se répliquer au rythme de la cellule hôte.

(iii) les éléments transposables : ce sont des structures génétiques qui peuvent se déplacer à l'intérieur et entre les génomes par un processus connu sous le nom de transposition (26, 299). Au cours de ce processus, une transposase codée par l'élément transposable clive les liaisons phosphodiester au sein de l'ADN, qui libèrent l'élément transposable pour qu'il puisse s'insérer ailleurs (296). Les groupes 3'-OH aux extrémités de l'élément transposable libéré servent alors de nucléophiles, qui attaquent les groupes 5'-phosphate de l'ADN cible pour permettre l'insertion (299, 300). Les lacunes adjacentes à l'élément transposable sont ensuite comblées par les systèmes de réparation de l'ADN, générant les répétitions qui encadrent l'élément transposable et signent la transposition (300). Il existe plusieurs types d'éléments transposables, notamment, les séquences d'insertion (IS), les transposons, les intégrons et les éléments ISCR (*insertion sequence with common regions*). Tous ont été trouvés associés aux gènes de RMTase, permettant leur propagation entre plasmides et chromosomes ainsi qu'entre bactéries.

(iv) Les éléments conjugatifs et intégratifs (ICE) ou transposons conjugatifs : Ce sont des éléments chromosomiques capables de s'exciser du chromosome, d'induire leur transfert par conjugaison et leur intégration dans le génome. Ces éléments portent les gènes nécessaires à la machinerie de conjugaison, par homologie avec les plasmides, mais ils ne sont pas capables de se répliquer de façon autonome, d'où leur intégration nécessaire au sein du chromosome. Ces ICE sont connus pour être des vecteurs de la dissémination de l'antibiorésistance.

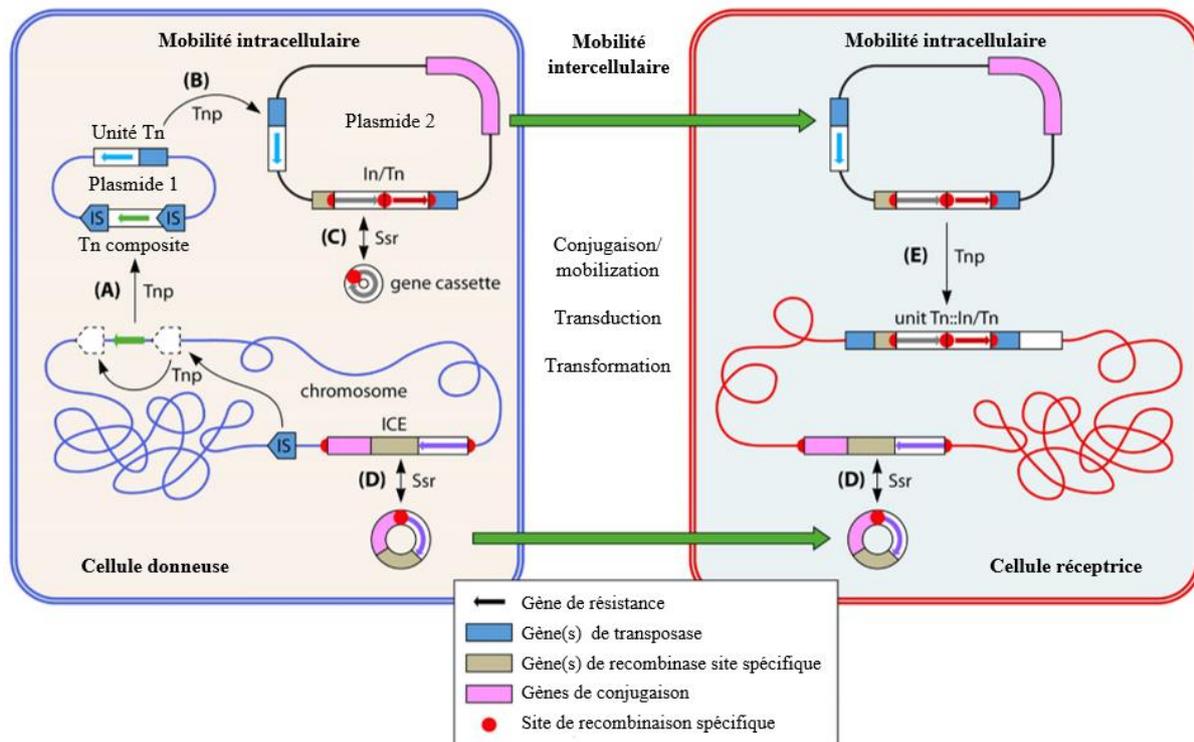


Figure 9. Exemple d'éléments génétiques mobiles (MGE) et processus impliqués dans la mobilité intracellulaire ou le transfert extracellulaire de gènes de résistance aux antibiotiques. Deux cellules de différentes souches ou espèces sont représentées, l'une jouant le rôle de donneur (enveloppe et chromosome en bleu, contient deux plasmides) et l'autre celui de receveur (en rouge). Différents MGE sont représentés, avec les fonctions des gènes qu'ils portent selon un code couleur, comme indiqué dans la légende. Les différents gènes de résistance associés aux différents MGE sont représentés par de petites flèches de différentes couleurs. Les flèches noires fines indiquent les processus intracellulaires, ceux médiés par une protéine transposase étant étiquetés Tnp et ceux médiés par une protéine recombinaise spécifique de site étant étiquetés Ssr. Les flèches vertes épaisses représentent le transfert intercellulaire (horizontal). Des insertions successives du même IS des deux côtés d'un gène de résistance peuvent permettre de le capturer et de le déplacer vers une autre molécule d'ADN (par exemple, du chromosome vers un plasmide) dans le cadre d'un transposon composite (Tn composite) (A). Un transposon (unité Tn) portant un gène de résistance peut transposer entre des plasmides (B) ou d'un plasmide vers le chromosome ou *vice versa*. Une cassette de gène qui est mobile peut se déplacer entre un intégron (In) (une structure In/Tn de classe 1 est représentée ici) *via* la formation d'un intermédiaire circulaire (C). Un ICE peut être intégré dans le chromosome ou excisé sous la forme d'un élément circulaire qui peut ensuite se conjuguer dans une cellule réceptrice et s'intégrer (de manière réversible) dans le chromosome au niveau d'un site de recombinaison spécifique (D). Un plasmide peut être capable d'assurer son propre transfert intercellulaire par conjugaison ou, s'il ne possède pas de région de conjugaison, être mobilisé par un autre plasmide (ou, alternativement, se déplacer horizontalement par transduction ou transformation phagique). Les transposons et/ou les intégrons et les gènes de résistance associés sur un plasmide entrant peuvent se déplacer dans le chromosome ou d'autres plasmides dans la cellule réceptrice (E), comme illustré ici pour In/Tn de classe 1, qui sont connus pour cibler l'unité Tn. Voir les sections pertinentes du texte pour plus de détails. Figure adaptée de (26).

(v) Les intégrons : Cette structure particulière n'est pas mobile de façon autonome mais les gènes qui s'y réintègrent participent grandement à la plasticité génomique. Ainsi, les intégrons sont des plateformes d'acquisition et d'expression de gènes cassettes que les intégrons mobilisent par l'intégrase encodée dans la partie 5' conservée (299). Les gènes sont exprimés, en règle général, grâce à la présence du promoteur principal P1 présent en amont du site de recombinaison et parfois avec l'aide d'un second promoteur P2. Les intégrons ne sont pas, en eux-mêmes, des MGE mais seront mobilisés s'ils sont présents au sein d'autres MGE tels que les transposons ou les plasmides (301).

(vi) Les îlots génomiques. Ce sont des segments chromosomiques acquis par transfert horizontal qui auraient un impact positif sur la physiologie de la bactérie (302). Ils véhiculent des gènes qui vont permettre à son hôte de s'adapter à une niche écologique particulière (302).

Une caractéristique troublante des gènes de RMTase est qu'ils sont associés à des MGE, qui consistent en des éléments transposables et des plasmides, facilitant leur propagation à d'autres bactéries par transfert horizontal (91).

1.3.5.2.1 Séquences d'insertion

Les séquences d'insertion (IS) sont les éléments transposables les plus petits et les plus simples. Leur taille varie de 0,5 à 2 kb et ils ne codent que pour les gènes impliqués dans la transposition (26, 303). Les éléments IS ne possèdent qu'un seul gène codant pour une transposase ainsi que des répétitions inversées à courte terminaison (~15-40 pb), qui servent de sites de liaison pour la transposase.

1.3.5.2.2 Transposons

Les transposons diffèrent des éléments IS car ils codent des gènes pour la transposition ainsi que pour d'autres fonctions telles que la résistance aux antibiotiques (26, 304). Il existe deux types de transposons : les transposons composites et les transposons complexes.

Les transposons composites ont une structure modulaire, où des éléments de type IS identiques flanquent une région contenant des gènes codant pour une fonction telle que la résistance aux antibiotiques, mais ne contiennent pas de gènes impliqués dans la transposition (305). Au contraire, les gènes impliqués dans la transposition sont fournis par les IS, qui agissent également comme sites de reconnaissance pour la transposase. Le gène de la RMTase *npmA* a déjà été identifié dans un transposon composite car il était flanqué de deux éléments IS26 (Figure 10) (165). De la même manière, la mobilisation du gène *armA* inclus dans le transposon Tn1548 flanqué de deux IS26 a été décrite expérimentalement (191).

Les transposons complexes contiennent des gènes qui sont impliqués à la fois dans la transposition et dans la fonction (comme la résistance aux antibiotiques) mais sont flanqués de courtes répétitions terminales inversées (~15-40 pb) (306). Tn3 est l'un des transposons complexes les plus courants identifiés chez les bactéries à Gram négatif, en particulier les Enterobacterales et *P. aeruginosa* (26, 306, 307), et est fréquemment associé au gène *rmtB* codant pour une RMTase (Figure 10) (152, 257, 287, 308, 309). Cependant, le transposon Tn3 associée au gène *rmtB* était auparavant mal classée, il a a maintenant été reclassée en Tn2 (310).

1.3.5.2.3 Les éléments conjugatifs et intégratifs

Les éléments conjugatifs et intégratifs (*Integrative and conjugative element*, ICE), ou transposons conjugatifs, sont des éléments génétiques mobiles localisés sur le chromosome de bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Les ICE sont capables de s'exciser du chromosome, d'induire leur transfert par conjugaison et leur intégration dans le génome (311, 312). Ces éléments portent les gènes nécessaires pour l'intégration et l'excision ainsi que la machinerie de conjugaison (système de sécrétion de type IV), par homologie avec les plasmides, mais ils ne sont pas capables de se répliquer de façon autonome, d'où leur intégration nécessaire au sein du chromosome. Les ICE sont de taille variable (de ~20 kb à >500 kb) et possèdent une structure mosaïque contenant des régions regroupant des gènes ayant des fonctions similaires (312). De nombreux ICEs portent des régions variables appelées « cargo » contenant des gènes qui ne sont pas impliqués dans le fonctionnement de l'ICE et pouvant conférer un bénéfice aux cellules hôtes (312). Ces ICE sont connus pour être des vecteurs de diffusion de la résistance aux antibiotiques, comme par exemple l'ICE SXT chez *Vibrio cholerae* qui porte la résistance au chloramphénicol, au triméthoprime, aux sulfonamides et à la streptomycine (313). Récemment le gène *rmtD3* a été retrouvé dans une région cargo d'un ICE localisé sur le chromosome d'un *P. aeruginosa* isolée en Pologne (225)

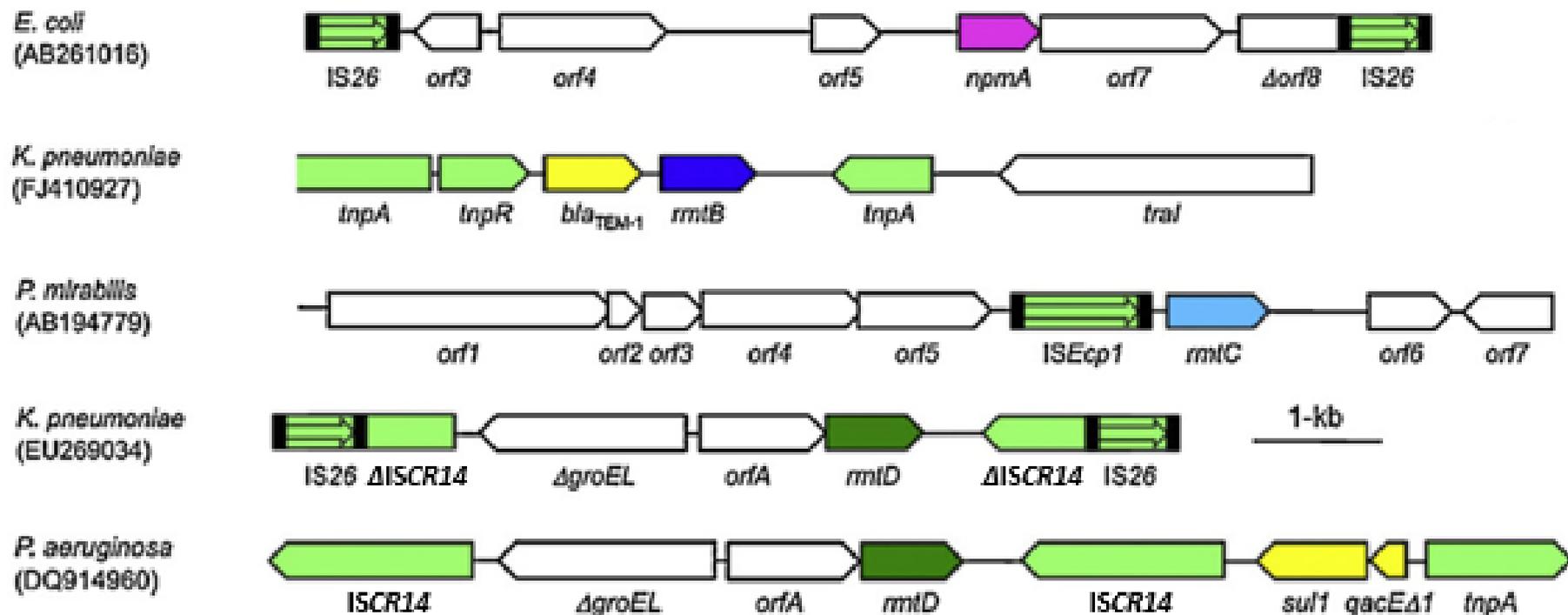


Figure 10. Association des séquences d'insertion IS26 avec *npmA* et *rmtD*, du transposon Tn2 avec *rmtB*, de la séquence *ISEcp1* avec *rmtC* et des séquences *ISCR14* avec *rmtD*. Les flèches vertes claires représentent les MGE ; les flèches jaunes représentent les gènes de résistance aux antibiotiques autres que les gènes codant une RMTase ; la flèche rose représente *npmA*, la flèche bleue foncée représente *rmtB*, la flèche bleue claire représente *rmtC* et la flèche verte foncée représente *rmtD*. Figure adaptée de (128).

1.3.5.2.4 Intégrons

Au cours des années 1980, il a été montré que des gènes de résistance aux antibiotiques pouvaient être insérés à des sites spécifiques dans des transposons ou des plasmides par un processus qui semblait faire intervenir un évènement de recombinaison spécifique de site. Des plasmides comme R46 ainsi que des transposons tels que Tn21, hébergeaient des gènes de résistance aux antibiotiques différents mais les séquences flanquantes de ces gènes restaient très conservées (314–316). Les gènes étaient orientés toujours dans le même sens. De chaque côté du groupe de gènes de résistance insérés étaient situées des séquences conservées désignées régions 5' et 3' conservées. La distribution assez large de ces éléments génétiques suggérait la mobilité des éléments centraux car retrouvés dans différents plasmides et transposons (317). Cependant, ils ne présentaient pas eux-mêmes de séquences répétées aux extrémités, caractéristiques des éléments transposables (transposons, séquences d'insertion) ni de séquences nécessaires à la transposition, et le nom « intégron » a été proposé par Stokes et Hall en 1989 pour désigner ces éléments. Les intégrons possèdent en commun une région 5' conservée dont le brin complémentaire porte un gène *intI* codant une intégrase. L'intégrase permet l'excision de la partie 5' conservée et l'insertion au niveau du site de recombinaison appelé *attI* du gène cassette. De multiples cassettes de gènes ont été décrites avec des tailles et des fonctions très variables mais elles possèdent une organisation commune : une cassette qui est constitué d'un gène de résistance et, à sa partie 3' terminale, d'un site spécifique de recombinaison nommé *attC* reconnu par l'intégrase et qui est impliqué dans leur recombinaison (299). La région 5' conservée contient un promoteur P1 situé 214 pb en amont de la séquence du site *attI* (318). Les cassettes de gènes sont insérées dans le site *attI* par l'intégrase pour former un réseau continu de gènes, où la cassette de gènes la plus récente est la plus proche du gène *intI* et est la mieux exprimée (319). Généralement les cassettes sont de petite taille de l'ordre de 500 à 1000 pb. Trois régions permettant une classification en intégron de classe 1, 2 et 3 ont été bien caractérisées et sont impliquées dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. La région 3' conservée des différentes classes d'intégrons varie considérablement.

Les intégrons complexes de classe 1 comprennent un élément *ISCR* au niveau de la région 3' conservée, tel que *ISCR1*, qui est associé à une autre région variable codant pour des gènes de résistance aux antibiotiques, eux-mêmes séparés de la région contenant les cassettes de gène (319). Le gène *armA* codant une RMTase ainsi que les gènes de résistance aux macrolides *mphE* et *msrE* se trouvent souvent dans cette région variable dans l'intégron complexe de classe 1 présent dans Tn1548 (178, 187, 188, 191) (Figure 11).

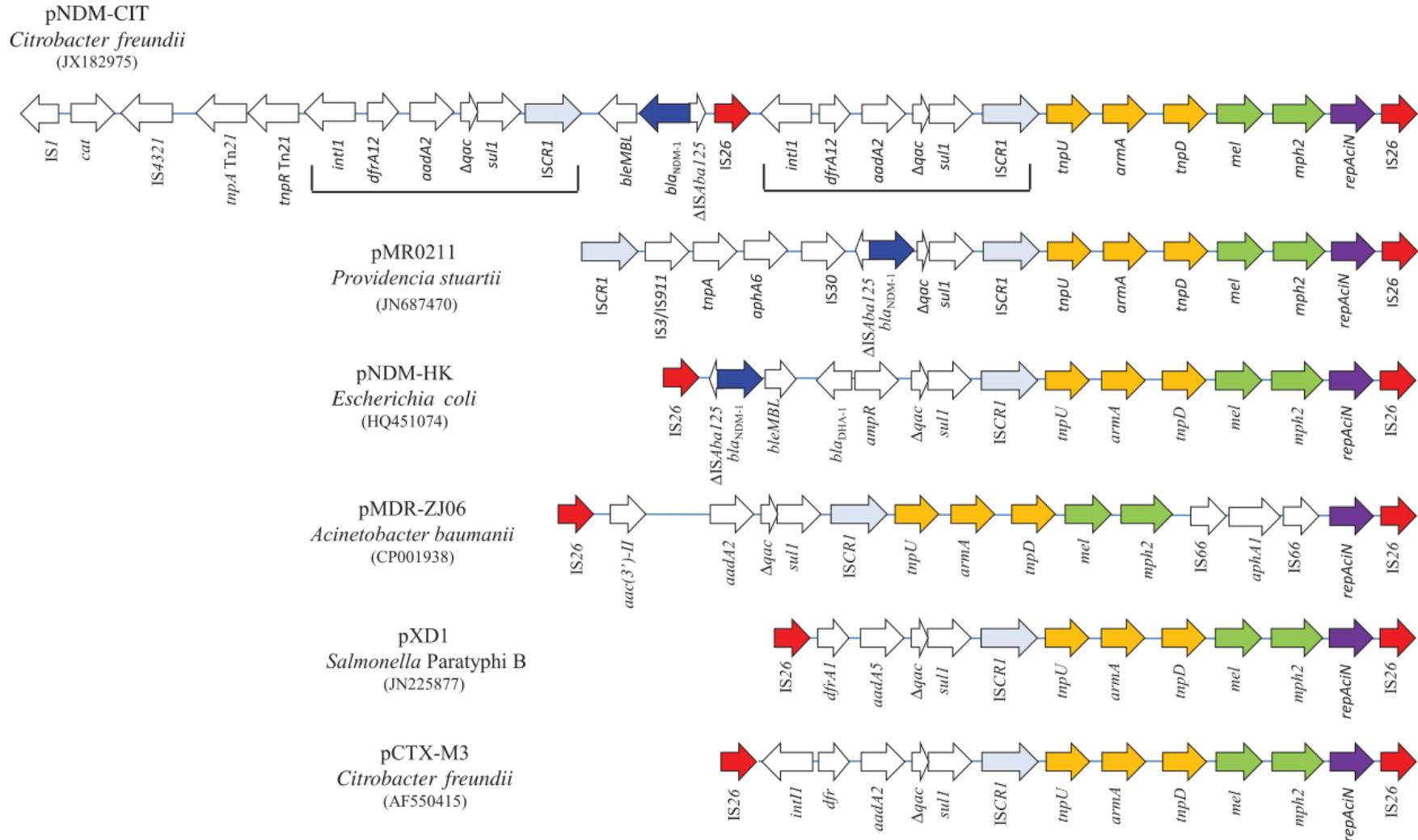


Figure 11. Comparaison de *Tn1548* associé à *armA* dans les plasmides pNDM-CIT, pMR0211, pNDM-HK, pMDR-ZJ06, pXD1 et pCTX-M-3. *Tn1548* est représenté par des flèches orange ; *bla_{NDM-1}* est désigné par des flèches bleues ; *mel* et *mph2* sont désignés par des flèches vertes ; *ISCR1* et *IS26* sont désignés respectivement par des flèches grises et rouges, et les flèches violettes représentent le gène *repAcIN* codant pour une réplicase. Deux intégrons complexes de classe 1 sont indiqués sur la séquence du plasmides pNDM-CIT. Figure adaptée de (279).

1.3.5.2.5 Elément ISCR

Contrairement aux autres éléments transposables, les ISCR se transposent par un processus appelé réplication en « roling circle ». Ils ont des répétitions terminales distinctes connues sous le nom de *oriIS* et *terIS*, où la réplication en « roling circle » est initiée à l'*oriIS* et terminée à *terIS* (319). Au cours de cette réplication, un seul brin de l'élément ISCR est entaillé à l'extrémité 5' près de l'*oriIS* et devient lié de manière covalente à la transposase (320). Une nouvelle copie de l'élément ISCR est générée en utilisant le brin d'ADN intact comme modèle par un complexe de réplication, qui déplace le brin entaillé pendant la réplication, formant une boucle d'ADN simple brin (320). Une fois que le *terIS* est atteint, la boucle simple brin est déplacée, avec la transposase toujours liée à l'extrémité 5'. Le groupe 3'-OH libre à l'extrémité 3' du simple brin peut être utilisé comme nucléophile pour attaquer un site d'ADN cible pour l'insertion. Cela génère un nouveau groupe 3'-OH dans l'ADN cible, qui attaque l'extrémité 5' de l'élément ISCR attaché à la transposase, conduisant à l'insertion de l'élément ISCR (320).

Cependant, dans environ 1,0 % à 10,0 % des cas, le site de terminaison *terIS* n'est pas reconnu et la réplication continue en aval du *terIS* jusqu'à ce qu'elle se termine sur un autre *terIS*-like (319, 320). Cela signifie que des gènes tels que les gènes de résistance aux antibiotiques qui sont adjacents au *terIS* peuvent être mobilisés en tant que partie de l'élément ISCR en raison de la mauvaise lecture du *terIS* initiale et on pense que c'est la raison de la génération d'intégrons complexes de classe 1 (319, 320).

Plusieurs gènes de RMTases 16S ont été trouvés associés aux éléments ISCR, notamment *ISCR14* (*rmtD*), qui a été initialement nommé orf494 (Figure 10) (321) et *ISCR2* (*rmtH*) (Figure 12) (253). De plus, *rmtC* a été trouvé associé à *ISEcp1* (Figure 10) (154, 217, 322) [201,311,339], qui présente des similitudes en termes de transposition avec les éléments ISCR en raison de la mobilisation des gènes adjacents par l'échec de la terminaison (305). Cependant, *ISEcp1* montre moins de capacité de mobilisation que les éléments ISCR car la taille des séquences qui peuvent être mobilisée par *ISEcp1* semble être limitée (305).

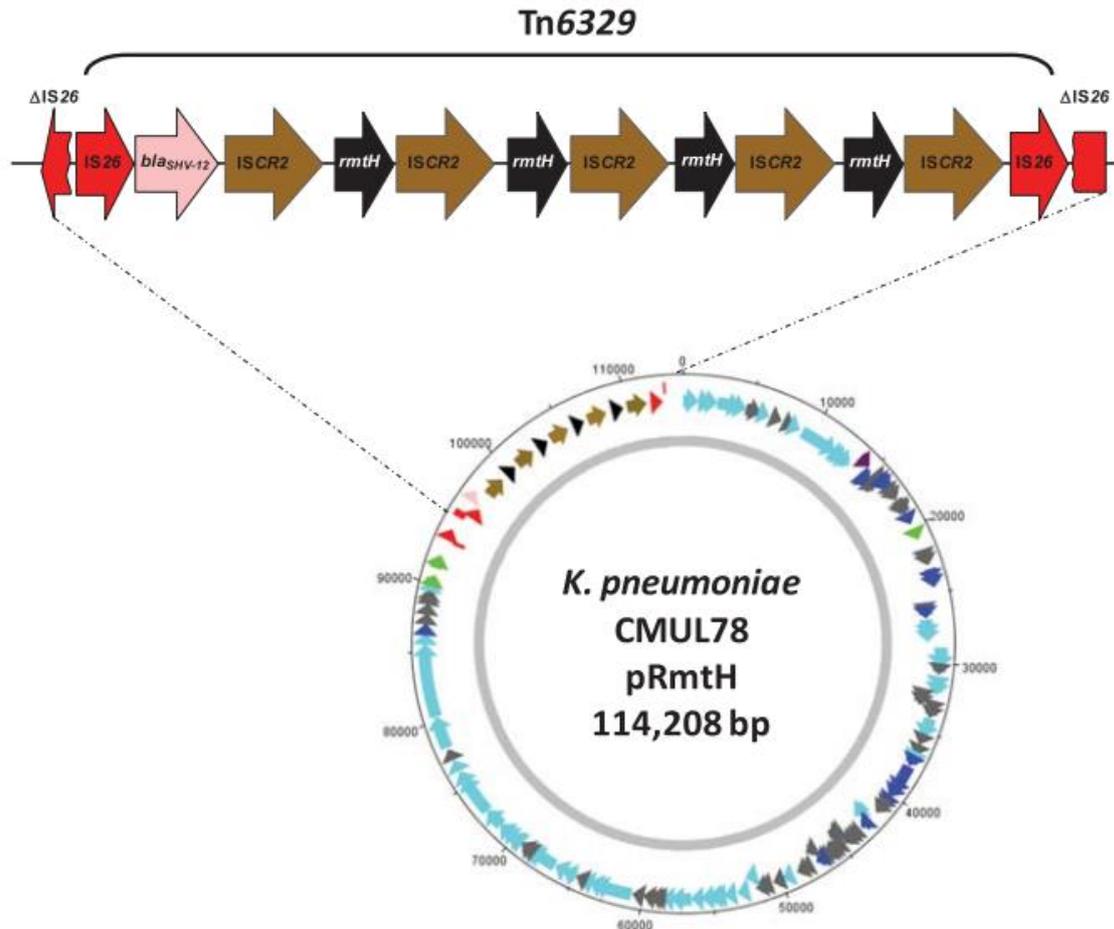


Figure 12. Représentation schématique du plasmide pRmtH en mettant l'accent sur le transposon composite Tn6329 composé de deux IS26 qui abrite la répétition en tandem quadruple de l'unité ISCR2-*rmtH*. Figure adaptée de (253).

1.3.5.2.6 Plasmides

Dans la plupart des cas, les RMTases acquises sont portées par des plasmides. La classification de plasmides en groupes basés sur leur parenté phylogénétique est utile pour analyser leur distribution mais aussi pour évaluer leur relation avec les cellules hôtes (323). En 1971, Datta et Hedges ont proposé un schéma de catégorisation des plasmides sur la base des éléments de la coexistence des plasmides après la conjugaison (324). Ils ont défini le terme "Incompatibilité" comme l'incapacité de deux plasmides apparentés, qui partagent un contrôle commun de la réplication, à se propager dans l'organisme (325), ces plasmides appartiennent donc au même "groupe d'incompatibilité". Depuis 2005, un schéma de typage des réplicons basé sur la PCR est disponible pour cibler les réplicons des principales familles de plasmides présentes chez les Enterobacterales (326). Les principaux groupes d'incompatibilité chez les Enterobacterales sont HI1, HI2, I1, X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A/C, T, K, et B/O. Les plasmides

principalement associés aux gènes de résistance aux antibiotiques sont IncF, IncA/C, IncL/M, IncI1, IncHI2, et IncN (26).

Les RMTases acquises sont généralement portées par des plasmides appartenant aux groupes IncA/C, IncN, IncL/M et IncF (Tableau 6). Les plasmides IncA/C ont fait l'objet d'études approfondies au cours des dix dernières années, car ils se sont révélés être les principaux plasmides responsables de la propagation du gène *bla*_{CMY-2} codant une céphalosporinase répandu parmi les isolats de *E. coli* et de *Salmonella* spp. en Amérique du Nord et en Europe (210). Ce sont des plasmides à large spectre d'hôtes, ils peuvent donc se répliquer chez les Enterobacterales mais aussi dans des bactéries comme *Photobacterium damsela* et *Aeromonas salmonicida*. Les plasmides de type IncA/C ont été détectés dans des isolats provenant de l'homme et de l'animal. Les plasmides de type IncN ont été principalement associés à des souches d'origine animale, ils sont en outre impliqués dans la transmission du gène *bla*_{CTX-M-1}, suggérant un réservoir animal pour cette BLSE. Ces plasmides sont très répandus chez les *E. coli* de la flore fécale aviaire et chez les *Salmonella* spp. isolées de la viande vendue au détail et des animaux destinés à l'alimentation (327).

RMTase acquise	Groupe d'incompatibilité de plasmide
<i>armA</i>	IncL/M, IncHI2, IncN, IncA/C, IncF
<i>rmtA</i>	IncA/C
<i>rmtB</i>	IncI1, IncA/C, IncFI, IncFII
<i>rmtC</i>	IncA/C
<i>rmtD</i>	IncA/C
<i>rmtE</i>	IncI1
<i>rmtF</i>	IncF
<i>rmtG</i>	IncN, IncL/M, IncA/C
<i>rmtH</i>	IncF
<i>npmA</i>	IncF
<i>npmB</i>	Non déterminé

Tableau 6. Plasmides historiquement décrits comme porteurs de RMTase. Ce tableau ne prend pas en compte les plasmides décrits dans cette Thèse.

Les plasmides appartenant à la famille IncL/M ont un large spectre d'hôte et ont été associés à la propagation de *bla*_{CTX-M-3}. Le plasmide pCTX-M-3 isolé d'une souche clinique de *C. freundii* en Pologne est le plasmide représentatif de cette famille (137). Les plasmides de type IncF sont des plasmides à faible taux de replication limités aux Enterobacterales au niveau de leur spectre d'hôtes (310). Ils ne constituent pas un groupe homogène, présentant une grande variation de taille (de 50 à 200 kb), et ils portent souvent plus d'un réplicon, car ils peuvent porter le réplicon repFII seul ou en combinaison avec repFIA et/ou repFIB. Ces plasmides IncF ont été largement associés à la dissémination de la β -lactamase pandémique CTX-M-15 (26, 34, 311).

On a constaté que le gène *armA* était situé sur les plasmides IncA/C et IncHI2 dans les souches asiatiques isolées avant 2001, mais par la suite, il est devenu principalement lié à IncF, IncL/M et à des plasmides non typables (169). Il a été suggéré que ces plasmides étaient responsables de l'émergence de *K. pneumoniae* multirésistants dans ces pays (305). À cette époque, les plasmides IncL/M étaient associés à la dissémination du gène *armA* dans des isolats cliniques provenant de pays européens, le pCTX-M-3 étant spécifiquement considéré comme responsable de la propagation de cette RMTase acquise en Pologne (312). Toutefois, il est important de souligner que le gène *armA* était localisé sur un plasmide IncN d'origine animale en Espagne (313), et plus récemment, l'émergence de plasmides IncA/C portant *armA* et *bla*_{NDM-1} a été décrite (230).

1.3.5.3 Identification chez les animaux

Des gènes codant une RMTase ont également été identifiés chez des animaux (incluant des animaux de compagnie et des animaux d'élevage) et dans des bactéries provenant de la viande de supermarché. Les gènes de RMTase *armA* et surtout *rmtB* ont été identifiés chez des animaux d'élevage tels que la volaille (187, 218, 328–331), les porcs (287, 308, 309, 332) et les bovins (333), en particulier en Chine où la majorité de ces études sur les animaux ont été menées. La présence de gènes de RMTase dans des bactéries provenant d'animaux d'élevage constitue une menace non seulement *via* la chaîne alimentaire, mais aussi pour les personnes qui se trouvent à proximité des animaux d'élevage. Par exemple, un enfant de 11 mois a été infecté par un isolat de *Salmonella enterica* sérotype Stanley producteur de ArmA après avoir été en contact avec des animaux d'élevage en Inde (188) et des plasmides contenant le gène *rmtB* ont été trouvés disséminés chez des travailleurs agricoles et des porcs provenant d'une ferme en Chine (309). Plusieurs cas de détection de gènes de RMTase 16S dans des bactéries isolées de viandes de supermarché (217, 271), en particulier de volailles, indiquent que la viande peut être une source potentielle de bactéries porteuses de RMTase dans la communauté. De plus, l'identification de

ces gènes chez les animaux de compagnie (334) signifie qu'ils peuvent également servir de réservoir en communautaire. Cependant, il n'est pas clair si les animaux de boucherie, d'élevage ou de compagnie ont acquis les gènes de RMTase indépendamment ou à partir des humains. Il est donc nécessaire de poursuivre la surveillance des animaux (de compagnie et d'élevage) afin de limiter leur propagation à la population humaine et de soutenir le concept " One Health ". Le concept " One Health " est une approche collaborative entre les responsables gouvernementaux et les professionnels de la santé, tels que les cliniciens, les scientifiques et les vétérinaires, afin d'obtenir de meilleurs résultats en matière de santé publique chez l'Homme, les animaux, les plantes et l'environnement par le biais de la recherche ou de la législation.

1.3.5.4 Identification dans l'environnement

Outre les échantillons cliniques et les animaux, des gènes de RMTase ont également été trouvés dans l'environnement. L'analyse métagénomique des eaux usées des toilettes des avions arrivant dans un aéroport international de Copenhague, au Danemark, a identifié la présence de *npmA* (335). De plus, l'analyse des eaux usées des hôpitaux ainsi que des influents et des effluents des stations d'épuration de Bâle, en Suisse, a permis d'identifier les gènes *armA* et *rmtB* dans les isolats de *E. coli* (336). La présence de gènes de RMTase dans les eaux usées, en particulier dans l'eau qui a été traitée, est préoccupante car elle indique que les eaux usées constituent un réservoir potentiel de bactéries hébergeant des gènes de RMTase (ainsi que d'autres gènes de résistance aux antibiotiques) et qu'un traitement supplémentaire des eaux usées est nécessaire pour garantir l'éradication des bactéries résistantes aux antibiotiques. La RMTase RmtD a été identifiée dans un isolat de *P. aeruginosa* prélevé dans la rivière Tietê au Brésil (284), ce qui indique que les environnements aquatiques servent déjà de réservoirs pour ces gènes, ainsi que pour d'autres gènes de résistance aux antibiotiques, augmentant le potentiel de disséminer dans la communauté.

1.3.6 Aminoglycosides actifs sur les bactéries productrices de RMTase

La plazomicine est le dernier AG commercialisé sous le nom de Zemdri, avec une indication dans le traitement des infections urinaires compliquées causées par des Enterobacterales, aux Etats-Unis seulement (101). Il a été développé par la compagnie pharmaceutique Achaogen et a été initialement conçu pour être utilisé contre les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes car cette molécule a la capacité de résister à la modification par des AME cliniquement pertinents, incluant AAC(3), AAC(6'), ANT(2'') et APH(2'') (91, 101, 128). Cependant, il présente une activité minimale contre *A. baumannii* et *P. aeruginosa* (337) en raison de la

régulation ascendante des pompes d'efflux, des modifications de la perméabilité membranaire ou de la perte de porine chez ces espèces (338). Par conséquent, il n'est pas utile pour traiter les *A. baumannii* et *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes. Par ailleurs, la plazomicine n'est pas active contre les isolats qui produisent une RMTase acquise. Ce phénomène est surtout observé pour les entérobactéries productrices de NDM qui coproduisent fréquemment une RMTase (339). Il est donc nécessaire de produire une future génération d'AG qui ne soient pas sensibles aux RMTases afin de contribuer à la lutte contre la résistance.

L'apramycine est un ancien AG utilisé en milieu vétérinaire pour lequel il y a un regain d'intérêt. En effet, cet AG appartenant à la famille des monosubstitué-DOS garde une efficacité sur les souches productrices de RMTase du groupe N7-G1405. Cet antibiotique montre des CMI relativement basses pour tous les entérobactéries productrices de carbapénémases incluant ceux produisant une NDM-1 (339). L'apramycine semble également être active sur *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (340). Quelques études ont évalué l'apramycine sur des bactéries productrices de RMTase, notamment dans des souches productrices de carbapénémase en Grèce (273), dans des entérobactéries en Belgique (178), en Chine (293, 334), en France (161) ou en Espagne (341). Dans l'étude de Fritsche *et al.*, sur les 20 souches d'entérobactéries productrices de RMTase testées seulement une présentait une CMI à l'apramycine > 8 mg/L (179). Enfin l'étude de Juhas *et al* a évalué l'apramycine sur un panel de 1232 isolats cliniques incluant des souches productrices de RMTase (116). Les isolats résistants étaient principalement retrouvés parmi les isolats de *A. baumannii* producteurs de ArmA et les isolats producteurs de l'enzyme AAC(3)-IV. Cette dernière enzyme avait déjà été décrite comme un mécanisme de résistance à l'apramycine (342). Cette molécule semble néanmoins prometteuse pour encourager son développement pour une utilisation chez l'Homme.

1.4 Objectifs du travail de thèse

Dans cette partie bibliographique, on observe que l'émergence des RMTases est préoccupante car leur production par les bactéries provoquant une résistance de haut niveau au AG. Cette résistance est apportée par le gain d'un seul gène et engendre une perte d'activité des AG utilisés pour traiter les infections bactériennes à bacilles à Gram négatif. Leur association avec les MGE et d'autres gènes de résistance aux antibiotiques, en particulier les gènes codant les carbapénémases, signifie que leur émergence contribuera à la génération de bactéries MDR pour lesquelles les options de traitement disponibles sont très limitées. Bien que la première description d'un isolat producteur de RMTase acquise ait été faite en France, cette résistance reste peu décrite dans ce pays.

Au commencement de ce travail, nous avons observé l'émergence des RMTases en France, principalement en raison d'une association avec des plasmides contenant des gènes de carbapénémase ou des clones bactériens dits "à haut risque" connus pour abriter des gènes de carbapénémase. Les RMTases restaient peu décrites dans les bactéries dépourvues de gènes de carbapénémase.

Les objectifs de cette étude étaient de : (i) identifier des bactéries productrices de RMTase en France, (ii) déterminer la prévalence des gènes RMTase dans les bactéries à Gram négatif en France, (iii) analyser phylogénétiquement les isolats producteurs de RMTase, (iv) caractériser les supports génétiques de cette résistance, et (v) tester l'activité d'autres antibiotiques pour identifier des alternatives thérapeutiques potentielles.

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

2 Travaux expérimentaux

2.1 CHAPITRE I : Caractérisation génomique des *E. coli* producteurs de RMTase en région parisienne.

2.1.1 Introduction à la publication n°1

Ce premier article aborde l'identification et la caractérisation génomique des *E. coli* producteurs de RMTase au sein d'une collection multicentrique d'isolats pan-résistants aux AG, incluant l'amikacine et la gentamicine, classiquement utilisés en clinique humaine pour le traitement des infections graves.

Au moment de cette étude, les données concernant la prévalence des RMTases dans les souches cliniques de Enterobacterales en France et en Europe étaient rares. Seules quelques études, le plus souvent monocentriques et/ou utilisant des collections de souches résistantes, avaient été publiées et elles rapportaient des taux de prévalence faibles en Europe (178, 179, 256). Le choix d'explorer les isolats de *E. coli* producteurs de RMTases avait été décidé pour plusieurs raisons : (i) historiquement, le laboratoire possède une expertise importante dans la caractérisation génomique de cette espèce bactérienne, sur le plan de la résistance comme sur celui de la phylogénie ; (ii) cette espèce est connue pour avoir développé une résistance à l'ensemble des classes antibiotiques utilisées en clinique avec des taux de résistance assez élevés et ; (iii) *E. coli* est la bactérie à Gram négatif la plus fréquemment responsable d'infection à l'hôpital en Europe et aux Etats-Unis (343, 344). Ces différentes caractéristiques permettaient de réunir l'ensemble des conditions pour étudier un mécanisme de résistance rare comme les RMTases.

Cette collection est composée de 137 isolats cliniques obtenus entre 2008 et 2014 provenant de neuf hôpitaux situés en région parisienne et préalablement caractérisée phénotypiquement dans le cadre du Master 2 de Florence Morel. Dans ce cadre, nous avons pu identifier 30 isolats présentant un haut niveau de résistance aux AG faisant suspecter la présence d'une RMTase. Pour confirmer cette hypothèse, des PCR multiplexes ciblant l'ensemble des gènes codant une RMTase connue avaient été réalisées sur l'ADN de ces 30 isolats, confirmant la présence de RMTase dans chacun d'eux. Ces 30 isolats ont été séquencés en technologie Illumina afin de caractériser leurs génotypes de résistance, d'analyser leurs liens phylogénétiques et d'identifier les supports et les environnements génétiques des gènes codant les RMTases. Pour l'analyse des supports génétiques des gènes de RMTase, nous avons également réalisé des transformants

dans une souche sauvage *E. coli* TOP10 que nous avons aussi séquencés en technologie Illumina.

Les gènes de RMTase les plus fréquemment identifiés étaient *rmtB* (n=18) suivie de *armA* (n=11) et *rmtC* (n=1). L'ensemble de ces isolats étaient MDR mais tous restaient sensibles à la tigécycline et à la colistine. Concernant les β -lactamases, 90% produisaient une BLSE correspondant à l'expression du variant *bla*_{CTX-M-3} qui était coproduit avec *armA* ou des variants *bla*_{CTX-M-55} et *bla*_{CTX-M-14} associés à *rmtB*. Par ailleurs, 10% (3/30) des isolats produisaient une carbapénémase appartenant à la classe B de Ambler. Les niveaux de résistance aux fluoroquinolones étaient plus élevés dans les isolats producteurs de RmtB que dans ceux produisant ArmA (respectivement 94% vs 36% de résistance). L'analyse phylogénétique des 30 isolats a montré que les isolats appartenaient à six phylogroupes génétiques incluant 21 ST différents, avec une diversité de ST plus importante chez les *E. coli* producteurs de ArmA que chez ceux produisant RmtB. Un arbre phylogénétique basé sur les SNP du core-génome (soit 172 771 SNPs) a permis d'identifier six clades correspondant aux différents phylogroupes ainsi que trois clusters nous permettant de suspecter des cas de transmissions intra-hospitalières (isolats V02 et V03 et isolats HM04 et HM05) et inter-hospitalière (isolats LB01 et SL09) pour une paire d'isolats.

L'analyse des supports génétiques de *armA* a permis d'identifier quatre réplicons de plasmides différents (IncL/M, IncA/C, IncX, IncF) et sept isolats possédant un plasmide IncL/M très proche du plasmide pCTX-M-3 porteur de *armA* décrit initialement (143, 144). Les environnements génétiques autour de *armA* étaient très conservés entre les isolats et homologues au transposon Tn1548 décrit précédemment par Galimand *et al.* (191). Chez les producteurs de RmtB, deux réplicons de plasmides porteurs de *rmtB* ont été identifiés, incluant majoritairement des réplicons de type IncF. Néanmoins pour six isolats, le plasmide porteur de *rmtB* n'a pas pu être identifié du fait de la limite de la technologie « short read » d'Illumina. Les environnements génétiques entourant *rmtB* étaient composés de différents MGE. La séquence d'insertion ISCR3 et le gène de résistance aux fluoroquinolones *qepA* ont été retrouvés en aval du gène dans cinq isolats comme décrit précédemment (291). De plus, des séquences IS26, IS6100 et IS*Cfr1* en amont et des séquences ISL3 et ISCR1 en aval du gène *rmtB* ont été retrouvées. L'isolat (HM21) possédant la séquence ISL3 avait été décrit précédemment (267). Pour le seul isolat producteur de RmtC, le gène était porté par un plasmide de type IncA/C avec en amont un gène codant une carbapénémase de type NDM (345).

PUBLICATION 1

Genomic characterization of 16S rRNA methyltransferase-producing *Escherichia coli* isolates from the Parisian area, France.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2020

François Caméléna, Florence Morel, Manel Merimèche, Jean-Winoc Decousser, Hervé Jacquier, Olivier Clermont, Mélanie Darty, Mary Mainardis, Emmanuelle Cambau, Olivier Tenailon, Erick Denamur and Béatrice Berçot on behalf of the IAME Resistance Group.

Genomic characterization of 16S rRNA methyltransferase-producing *Escherichia coli* isolates from the Parisian area, France

François Caméléna^{1,2}, Florence Morel^{2,3}, Manel Merimèche^{1,2}, Jean-Winoc Decousser^{2,4}, Hervé Jacquier^{2,3}, Olivier Clermont², Mélanie Darty⁴, Mary Mainardis¹, Emmanuelle Cambau^{2,3}, Olivier Tenaillon², Erick Denamur^{2,5} and Béatrice Bercot^{1,2*} on behalf of the IAME Resistance Group†

¹AP-HP, Service de Microbiologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; ²Université de Paris, INSERM, IAME, Paris, France; ³AP-HP, Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital Lariboisière, Paris, France; ⁴AP-HP, Service de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France; ⁵AP-HP, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Hôpital Bichat, Paris, France

*Corresponding author. E-mail: beatrice.bercot@aphp.fr

†Other members of the IAME Resistance Group are listed in the Acknowledgements section.

Received 11 October 2019; returned 3 December 2019; revised 15 January 2020; accepted 27 February 2020

Background: The resistance to all aminoglycosides (AGs) conferred by 16S rRNA methyltransferase enzymes (16S-RMTases) is a major public health concern.

Objectives: To characterize the resistance genotype, its genetic environment and plasmid support, and the phylogenetic relatedness of 16S-RMTase-producing *Escherichia coli* from France.

Methods: We screened 137 *E. coli* isolates resistant to all clinically relevant AGs from nine Parisian hospitals for 16S-RMTases. WGS was performed on clinical isolates with high-level AG resistance (MIC \geq 256 mg/L) and their transformants.

Results: Thirty of the 137 AG-resistant *E. coli* produced 16S-RMTases: 11 ArmA, 18 RmtB and 1 RmtC. The 16S-RMTase producers were also resistant to third-generation cephalosporins (90% due to a *bla*_{CTX-M} gene), co-trimoxazole, fluoroquinolones and carbapenems (*bla*_{NDM} and *bla*_{VIM} genes) in 97%, 83%, 70% and 10% of cases, respectively. Phylogenomic diversity was high in ArmA producers, with 10 different STs, but a similar genetic environment, with the Tn1548 transposon carried by a plasmid closely related to pCTX-M-3 in 6/11 isolates. Conversely, RmtB producers belonged to 12 STs, the most frequent being ST405 and ST complex (STc) 10 (four and four isolates, respectively). The *rmtB* gene was carried by IncF plasmids in 10 isolates and was found in different genetic environments. The *rmtC* gene was carried by the pNDM-US plasmid.

Conclusions: ArmA and RmtB are the predominant 16S-RMTases in France, but their spread follows two different patterns: (i) dissemination of a conserved genetic support carrying *armA* in *E. coli* with high levels of genomic diversity; and (ii) various genetic environments surrounding *rmtB* in clonally related *E. coli*.

Introduction

Aminoglycosides (AGs) are an important weapon in the antimicrobial arsenal for dealing with life-threatening infections, generally in combinations with β -lactam agents.¹ The recent emergence and worldwide spread of MDR pathogens has led to AGs being considered one of the few remaining treatment options for many infections, particularly those caused by Gram-negative pathogens.² AG resistance may occur through several mechanisms: (i) enzymatic modification and inactivation of the antibiotic by AG-modifying enzymes (AMEs); (ii) increases in efflux; (iii) decreases in permeability; and (iv) target modification. The target modification mechanism involves the post-transcriptional modification of 16S rRNA by 16S rRNA methyltransferase enzymes (16S-RMTases),

abolishing interaction between the antibiotic and its target.³ These enzymes, which confer high-level resistance (MIC \geq 256 mg/L) to all clinically relevant AGs, are mostly encoded by plasmids; they were initially discovered in Gram-negative bacteria, but have more recently also been detected in Gram-positive bacteria.⁴ Since their first description in Enterobacterales in the first decade of the 21st century, 10 acquired 16S-RMTase genes have been described.^{5–7} ArmA and RmtB, the predominant 16S-RMTase enzymes, have spread worldwide among Enterobacterales.⁷ The success of ArmA and RmtB can be explained in part by the large animal reservoir of the corresponding resistance genes, due to the massive use of AGs in food animals.^{8–10} Data regarding the prevalence of 16S-RMTases in clinical strains of Enterobacterales in France and Europe are scarce. Only a few, mostly single-centre, studies have

been published and they have reported low prevalence rates in Europe.^{11–13} However, alarmingly high rates have been reported among clinical isolates of Enterobacteriales from South Korea (2.8%–11.4%) and in diseased animals and clinical isolates of Enterobacteriales from China (5.4%–6.2%).^{14–18} Poiré *et al.* recently reported high rates of colonization (56%) by 16S-RMTase-producing Enterobacteriales in a population of hospitalized children in Angola.¹⁹

Escherichia coli is a commensal bacterium and a major pathogen in humans, causing both nosocomial and community-acquired infections. It has been implicated in the spread of resistance genes, including ESBL genes in particular.^{20–22} Moreover, *E. coli* has developed resistance to every known class of antibiotics, including carbapenems, fluoroquinolones and AGs. *E. coli* is currently the Gram-negative organism most frequently isolated in cases of infection in patients from the USA and Europe.^{23,24}

We therefore focused on *E. coli*, by characterizing 16S-RMTase-producing isolates and analysing the genetic support for this resistance. We established a multicentre collection of clinical isolates of AG-resistant *E. coli*: (i) to identify 16S-RMTase producers among *E. coli* isolates resistant to all AGs; (ii) to characterize their resistance genotypes and the plasmid support on which the 16S-RMTase genes were located; and (iii) to analyse their phylogenetic relatedness. The 16S-RMTase-producing isolates were subjected to WGS.

Materials and methods

Clinical isolates

We collected 140 non-duplicate (one isolate per patient) clinical isolates of presumed *E. coli* (colonization or infection) from nine hospitals in the Parisian area: Avicenne ($n=1$), Beaujon ($n=16$), Bichat ($n=23$), Henri-Mondor ($n=23$), Lariboisière ($n=7$), Louis-Mourier ($n=18$), Robert Debré ($n=16$), Saint-Louis ($n=19$) and Versailles ($n=17$). These isolates were obtained between 2008 and 2014 (except for LM18 and LM19, isolated in 2001 and 2003, respectively) and were classified as resistant to all the AGs usually tested (gentamicin, amikacin and tobramycin) in the disc diffusion assay at the original laboratory (regardless of the diameter of the zone of inhibition). Isolate identification was checked by MALDI-TOF MS (MALDI Biotyper 2.0, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Antimicrobial susceptibility testing

Antibiotic susceptibility was tested by the disc diffusion method or with Etest strips (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) on Mueller–Hinton agar, in accordance with EUCAST recommendations (www.eucast.org), at the nine participating hospitals. For all 137 isolates, MICs of gentamicin, amikacin and tobramycin were determined by the broth microdilution method, on 96-well microtitre plates, with 50 μ L of Mueller–Hinton broth per well, supplemented with a range of AG concentrations. Readings were obtained on a 96-well Tecan infinite plate reader and were interpreted according to the EUCAST guidelines (www.eucast.org).²⁵ Susceptibility to colistin was assessed by determining the MIC by broth microdilution (Sensititre, Thermo Fisher Scientific, Dardilly, France). All isolates with high levels of resistance (MIC ≥ 256 mg/L) to the three AGs tested were suspected to produce 16S-RMTases and were sequenced.

Molecular screening for 16S rRNA methylases

DNA was isolated from the 137 isolates with the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). We detected the 10 genes

encoding 16S rRNA methylases (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* and *npmA*) by multiplex PCR.^{26–30} The details of the PCR method are reported in the Supplementary data available at JAC Online (see Table S1).

Transfer of AG resistance genes

Plasmid DNA was extracted from *E. coli* isolates, with positive molecular screening and with high levels of resistance to the three AGs tested, with the Qiaprep Midiprep Kit (Qiagen, Valencia, Spain) and was used to electroporate competent *E. coli* TOP10 cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturer's protocol. Transformants were selected on Mueller–Hinton agar supplemented with gentamicin (30 mg/L) and amikacin (30 mg/L).

Sequencing and de novo assembly

The whole genomes of all *E. coli* isolates harbouring high levels of resistance to the three AGs tested, and those of their transformants, were sequenced with Illumina technology. The Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) was used to prepare libraries for sequencing. Samples were multiplexed and sequenced on an Illumina NextSeq or MiSeq sequencer, for 300 cycles (151 paired-end reads). Quality control was performed on the raw data for Illumina paired-end sequencing, with FastQC v0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). All the WGS reads were assembled *de novo* with SPAdes v3.11., using the default settings and kmers 21, 33, 55 and 77.³¹ The analysis was optimized by trimming the adapters in the input FASTQ files with the trimming function of the *de novo* assembly app (SPAdes) and removing contigs that were less than 200 bases long. The quality assessment tool for genome assemblies (QUAST) v4.6.3 was used to evaluate the quality of the assembled genomes, by aligning each sequence to the *E. coli* K-12 MG1655 reference genome (GenBank accession no. NC_000913.3).³² All genomic data are publicly available through bioproject PRJNA554273.

Genomic analysis

MLST was performed on all samples with an *in silico* method, in which the assembled sequences were compared with the reference MLST profiles of the seven housekeeping loci of the Warwick University scheme (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* and *recA*) and the eight housekeeping loci of the Pasteur Institute scheme (*dinB*, *icd*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB* and *uidA*) downloaded from the pubmlst database (<https://pubmlst.org/data/>). The Blast database for MLST sequences was compiled with NCBI Blast + software suite v2.6.0 and a custom-written script was used to attribute sequence tags.³³ The isolates studied were assigned to the seven main *E. coli* phylogroups *in silico* with ClermonTyper software.³⁴ Serotype and the *fimH* allele were determined with SerotypeFinder and CHTyper, respectively, via the Center for Genomic Epidemiology platform. Annotation was performed by the Genoscope server, with the MicroScope platform (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/>).³⁵ The resistome was evaluated for each isolate with CARD and ResFinder.^{36,37} Contigs were screened for plasmid content with PlaScope and PlasmidFinder, via the Center for Genomic Epidemiology platform.^{38,39}

Plasmid sequencing and identification of the 16S-RMTase gene-carrying plasmid

For confirmation of the plasmid sequence data obtained by WGS of the clinical *E. coli* isolates, we performed transformation assays for all suspected 16S-RMTase-producing isolates, in *E. coli* TOP10. The whole genome of each transformant was sequenced and analysed as described above. We then compared the *E. coli* TOP10 transformant genomes with the *E. coli* TOP10 complete reference sequence, using QUAST. Unaligned contigs (i.e. plasmid sequences) were analysed with ResFinder and PlasmidFinder.

Core-genome SNP analysis

An analysis based on core-genome SNPs was performed. For this purpose, we used the Harvest suite v1.1.2: the assembled genomes were first compared with the reference sequence from *E. coli* K-12 with Parsnp v1.2, generating a core-genome multiple alignment and a maximum likelihood phylogenetic tree including rapid bootstrap analysis (100 runs), with the Gamma20-based distribution model for substitution rate heterogeneity between sites.⁴⁰ The newick-formatted core-genome SNP tree was visualized and annotated with an online tool called interactive tree of life (iTOL v3).⁴¹ A variant-calling file (multiple-sample) was produced with the harvest tools v1.2 software, specifying *E. coli* K-12 MG1655 as the reference sequence; there were 172 771 positions.⁴⁰

Results

Clinical isolates

We recovered 140 non-duplicate clinical isolates of *E. coli* classified as resistant to all AGs tested in the original laboratory from nine hospitals in the Parisian region. The mean age of the patients from whom these isolates were recovered was 71 years and the sex ratio (male/female) was 1.47. The patients were hospitalized in a non-surgical ward for 52%, an ICU for 22% and a surgical unit for 6%; the type of unit was not reported for 20% of patients. About half of the isolates were associated with infection and they were obtained from urine (49%), blood cultures (16%), perioperative samples (13%), respiratory tract samples (5%) and samples from other sites (17%). The remaining isolates were obtained from rectal swab screening. Three isolates were excluded from the study because MALDI-TOF-MS showed that they had been misidentified as *E. coli* (Figure S1). The 137 *E. coli* isolates recovered included 107 (78%) that were non-susceptible (i.e. displaying intermediate or full resistance) to gentamicin, amikacin and tobramycin. These 107 *E. coli* isolates non-susceptible to all AGs included 30 (28%) with high-level resistance (MIC \geq 256 mg/L) to all AGs (Figure S1). These isolates grew in contact with the AG discs used for antimicrobial susceptibility testing. The presence of a 16S-RMTase gene was detected by PCR in 30 of the 137 isolates, all of them being the *E. coli* isolates with high-level resistance to all AGs. All these isolates were sequenced by WGS, which confirmed the presence of a 16S-RMTase gene following comparisons with the CARD and ResFinder databases. The most frequently identified 16S-RMTase genes were *rmtB* ($n=18$), followed by *armA* ($n=11$) and *rmtC* ($n=1$) (Table 1). No 16S-RMTase-producing *E. coli* isolates were obtained at Avicenne Hospital, whereas six were isolated from Louis-Mourier Hospital (the mean number of isolates per hospital was 3.3). All the 16S-RMTase genes sequenced (*armA*, *rmtB* and *rmtC*) were 100% identical to the reference DNA sequences (GenBank accession nos. AY220558, AB103506 and AB194779 for *armA*, *rmtB* and *rmtC*, respectively). None of the isolates carried two 16S-RMTase genes.

Clinical characteristics and co-resistances of 16S-RMTase producers

Thirteen of the 30 16S-RMTase-producing *E. coli* isolates were obtained in a context of infection (Table 1), the others being obtained from rectal swabs used for screening purposes ($n=17$). The 16S-RMTases were associated with at least one additional AME gene in 26 (87%) of the isolates, with *ant(3'')-I* (63%, 19/30

isolates) and *aac(3)-II* (47%, 14/30 isolates) being the most frequently detected AME genes (Table 1). All the isolates were MDR according to the definition of Magiorakos *et al.*,⁴² but none of them was resistant to tigecycline or colistin (Table 1).

Three of the *E. coli* isolates in this collection were found to produce carbapenemases: NDM ($n=2$) or VIM ($n=1$) (Table 1). Twenty-seven (90%) 16S-RMTase-producing isolates produced ESBL enzymes encoded by seven different *bla*_{CTX-M} genes. The *bla*_{CTX-M-3} gene was mostly associated with ArmA-producing isolates (73%, 8/11 ArmA-producing isolates), whereas the *bla*_{CTX-M-55} (39%, 7/18 RmtB-producing isolates) and *bla*_{CTX-M-14} (22%, 4/18 RmtB-producing isolates) genes were recovered only from RmtB-producing *E. coli* isolates (Table 1).

In addition, 21 (70%), 25 (83%) and 7 (23%) isolates were also resistant to fluoroquinolones, co-trimoxazole and fosfomycin, respectively. Fluoroquinolone resistance was mostly explained by mutations affecting the QRDR of the GyrA (S83L and D87N) and ParC (S80I) proteins associated with the plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qepA* and *aac(6')-Ib-cr*. The frequency of fluoroquinolone resistance was higher among RmtB producers (94%, 17/18 isolates) than among ArmA producers (36%, 4/11 isolates). Six RmtB-producing *E. coli* isolates were found to be resistant to fosfomycin due to production of the fosfomycin-modifying enzyme FosA3 (Table 1).

Phylogenetic analysis of clonal relationships between the strains

The 30 *E. coli* isolates were assigned to six phylogroups on the basis of WGS data. Phylogroup B1 was the most frequent ($n=10$), followed by phylogroups A ($n=8$), D ($n=6$), B2 ($n=4$), C ($n=1$) and F ($n=1$) (Table 1). All the phylogroup D isolates were RmtB-producing *E. coli*, whereas phylogroup B2 contained only ArmA-producing isolates (Table 1 and Table S2). MLST analysis revealed that the 30 producers of 16S-RMTase belonged to 21 different STs according to the Warwick University MLST scheme and 20 different STs according to the Pasteur Institute MLST scheme. For the Warwick scheme, the most frequently identified STc/STs (where STc stands for ST complex) were STc10 (four ST10, one ST167 and one ST617, $n=6$) and ST405 ($n=4$). A larger number of STs was found among ArmA producers than among RmtB producers: 10 different STs were found among the 11 ArmA-producing isolates, whereas 12 different STs were detected among the 18 RmtB isolates (Table 1 and Table S2). Four of the RmtB isolates belonged to ST405, four to STc10 and two to ST156; the remaining isolates were singletons. Twenty-four different serotypes were found among the 30 isolates. All ArmA producers had different serotypes, whereas only 12 different serotypes were identified among the RmtB producers (Table S2). The most frequent serotypes were O102:H6 ($n=3$) and O89/162:H9 ($n=3$) among RmtB-producing isolates. We detected 15 different *fimH* alleles. The most frequent alleles were *fimH27* ($n=6$), mostly present in RmtB producers, followed by *fimH54* ($n=4$), which was equally frequent among isolates producing ArmA and isolates producing RmtB (Table S2). Three clones, defined as unique combinations of phylogroup, STs from the Warwick University/Pasteur Institute schemes, serotypes and H types, and accounting for more than one isolate, were identified among RmtB producers: A_ST10/2_O89/162:H9_ *fimH27* ($n=2$), B1_ST156/19_O:-H25_ *fimH38* ($n=2$) and D_ST405/477_

Table 1. Characteristics of the 30 16S-RMTase-producing *E. coli*

Isolate ^a	Origin	Year	ST (Warwick University)	Phylogroup	AGS	Resistome			16S-RMTase-encoding plasmid
						β-lactams ^b	others	Plasmid(s)	
BI01	rectal swab	2014	101	B1	<i>armA</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i> , <i>ant(3'')-I</i> , <i>aph(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-4} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	Incl, Col, IncF, IncA/C	IncA/C
BI09	rectal swab	2013	58	B1	<i>armA</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>ant(3'')-I</i> , <i>aph(3'')-I</i> , <i>aph(6)-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-47}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	Incl/M, IncQ, IncF	Incl/M
BI16	rectal swab	2014	224	B1	<i>armA</i> , <i>ant(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{CMY-47}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	IncF, IncB/O/K/Z	IncX
LB05	rectal swab	2014	3672	B2	<i>armA</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>sul</i>	Incl/M	Incl/M
LM03	rectal swab	2011	131	B2	<i>armA</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>ant(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CMY-47} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	IncF	IncF
LM18	urine	2001	10	A	<i>armA</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>ant(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{TEM-30}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	Incl/M, IncB/O/K/Z	Incl/M
LM19	rectal swab	2003	121	B2	<i>armA</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>ant(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	Incl/M, IncY	Incl/M
RD04	stools	2012	93	A	<i>armA</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>ant(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-47}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	Incl/M	Incl/M
RD06	stools	2010	141	B2	<i>armA</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i> , <i>ant(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	IncF, IncN, Incl/M	Incl/M
SL10	rectal swab	2013	162	B1	<i>armA</i> , <i>ant(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	IncA/C, IncY, Incl	IncA/C
V16	rectal swab	2010	10	A	<i>armA</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>ant(3'')-I</i> , <i>aph(3'')-I</i> , <i>aph(6)-I</i>	<i>bla</i> _{CMY-6}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	IncF/Incl/M, IncQ	Incl/M
BI10	rectal swab	2013	617	A	<i>rmtB</i> , <i>aph(6)-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>fosA3</i> , <i>dfr</i>	IncF	IncF
BJ01	rectal swab	2011	2003	D	<i>rmtB</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>aph(3'')-II</i> , <i>aph(6)-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>dfrA</i>	IncF, IncQ, IncX	ND
BJ05	rectal swab	2013	167	A	<i>rmtB</i> , <i>aac(3)-II</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-24} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-47}	–	IncQ1, IncF, Incl	IncF
BJ08	rectal swab	2013	345	B1	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-1}	–	IncF, Col	ND
HM05***	respiratory	2014	405	D	<i>rmtB</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>aac(6)-I</i> , <i>ant(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	IncN, IncF, Incl	IncF
HM06***	blood culture	2014	405	D	<i>ant(3'')-I</i> , <i>aph(6)-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	IncF, Incl, IncX	IncF
HM15	rectal swab	2012	345	B1	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>fosA3</i> , <i>sul</i>	Incl, IncF	IncF
HM21	blood culture	2014	38	D	<i>rmtB</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>ant(3'')-I</i> , <i>aph(3'')-I</i> , <i>aph(6)-I</i>	<i>bla</i> _{VIM-4} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	Incl, IncF	IncF
LB01*	rectal swab	2013	10	A	<i>rmtB</i> , <i>ant(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-47}	<i>fosA3</i> , <i>dfrA</i> , <i>sul</i>	IncF, IncY, Incl	ND
LB02	rectal swab	2013	354	F	<i>rmtB</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>aph(3'')-I</i> , <i>ant(3'')-I</i> , <i>aph(6)-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-47}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	IncF, IncR, IncN, IncX	ND
LB07	respiratory	2011	405	D	<i>rmtB</i> , <i>aph(3'')-I</i> , <i>aph(6)-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-70}	<i>sul</i>	IncQ, IncF, Incl	ND
LM12	surgical	2008	405	D	<i>rmtB</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>ant(3'')-I</i> , <i>ant(2'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-2}	<i>dfrA</i>	IncF, Col	IncF
LM14	urine	2008	351	B1	<i>rmtB</i> , <i>aph(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-65} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>fosA3</i> , <i>dfrA</i> , <i>sul</i>	IncA/C, Incl, IncF	IncF
LM15	surgical	2008	3631	A	<i>rmtB</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i> , <i>ant(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>fosA3</i> , <i>dfrA</i> , <i>sul</i>	IncX, Incl, IncF	IncF
SL09*	urine	2014	10	A	<i>rmtB</i> , <i>ant(3'')-I</i> , <i>aph(3'')-II</i> , <i>aph(6)-I</i>	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>fosA3</i> , <i>dfrA</i> , <i>sul</i>	IncN, IncF, IncX, IncR	ND
SL16	rectal swab	2014	90	C	<i>rmtB</i> , <i>ant(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{NDM-5} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-42}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	Incl, IncF	IncF
V02**	urine	2009	156	B1	<i>rmtB</i> , <i>aac(6)-I</i> , <i>ant(3'')-I</i> , <i>aph(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	Incl	Incl
V03**	urine	2009	156	B1	<i>rmtB</i> , <i>aac(6)-I</i> , <i>ant(3'')-I</i> , <i>aph(3'')-I</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	Incl	Incl
LB04	rectal swab	2014	162	B1	<i>rmtC</i> , <i>aac(6)-I</i> , <i>aph(3'')-I</i> , <i>aph(6)-I</i>	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-6}	<i>dfrA</i> , <i>sul</i>	Incl, IncF, IncA/C	IncA/C

ND, not determined.

^aIsolates belonging to the same clone (see Table S2) are indicated by asterisks: *A_ST102_089/162:H9_fimH27 clone; **B1_ST156/19_O:H25_fimH38 clone; and ***D_ST405/477_0102:H6_fimH27 clone.^bESBL and carbapenemase resistance genes co-localized on the 16S-RMTase-encoding plasmid are underlined (see Table S3).

isolates (BI09, LM18, LM19, RD04, RD06 and V16), with a percentage identity exceeding 99% and a coverage of 88% to 99% of the pCTX-M-3 genome, depending on the isolate considered (Figure 2a and Table S3).⁴³ The IncA/C plasmid from the SL10 isolate was similar to pAR060302 (about 167 kb, GenBank accession no. NC_012692.1) and was identified on a single contig of 168 kb, with more than 99% identity and coverage.⁴⁴ The genetic regions surrounding the *armA* gene were highly conserved between isolates. A novel genetic environment was found in two isolates (BI16 and LB05) harbouring an inserted sequence of *bla*_{CTX-M-3} and *ISEcp1* within the *ISCR1* element (Figure 2a and Table S3).

In the 18 RmtB producers, the *rmtB* gene was carried by the IncF and IncI plasmids in 10 and 2 *E. coli* isolates, respectively. The IncI plasmids carried identical resistance genes and were found in two isolates (V02 and V03) from the same clone differing by only 78 SNPs (Figure 2b and Table S3). IncF plasmids harbouring a diverse set of resistance genes were found in seven different clones. For the remaining isolates, the plasmid carrying the 16S-RMTase gene could not be identified precisely. Illumina technology for WGS was unable to analyse the complete genetic context of the *rmtB* gene, probably due to the multiple ISs located around this gene. Nevertheless, the downstream region was well conserved in eight isolates harbouring the *ISCR3* element followed by *qepA*, located on IncF plasmids in five cases (Figure 2b and Table S3). Three isolates (LB01, SLO9 and LB02) harboured an original downstream region consisting of the *ISCR1* element followed by a class 1 integron (partial for LB02) previously described in a 122 kb IncI plasmid (pEC008, GenBank accession no. KY748190.1).⁴⁵ In a previous study, we described the complete genetic context of *rmtB* for one isolate, HM21, identifying a novel IS from the ISL3 family.⁴⁶ When available, the sequence of the upstream region was also found to be conserved, with *bla*_{TEM-1} in nine isolates, five of which also had *ISCR3* and *qepA* in their downstream regions, preceded by various mobile genetic elements (Figure 2b and Table S3). Partial Tn2 transposon structures (*tnpA-tnpR-bla*_{TEM-1}) were found in six isolates, and two isolates (HM05 and HM06) harboured an insertion of IS26 in the *tnpR* gene. The SL16 isolate presented an insertion of IS6100 in the *ΔtnpA* gene and the HM21 isolate displayed an insertion of IS26 in the *ΔtnpA* gene. In addition, two isolates (LB01 and SLO9) had *ISCF1* upstream from the *bla*_{TEM-1} gene (Figure 2b and Table S3). This environment was previously described in pEC008 carrying the *rmtB* gene.⁴⁵

In the RmtC-producing isolate, the *rmtC* gene was located on a broad-host range IncA/C plasmid (Table 1). An analysis of the genetic environment highlighted the presence, close to the *rmtC* gene, of an IS from the IS1 family and *bla*_{NDM} encoding the carbapenemase NDM-1, previously identified on a 140.8 kb IncA/C plasmid (pNDM-US; GenBank accession no. CP006661.1) in *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-2146 (Figure 2c and Table S3).⁴⁷

Discussion

The global dissemination of MDR bacteria producing 16S-RMTases is a serious public health concern. The 16S-RMTase-encoding genes were mostly found on plasmids carrying multiple antibiotic resistance genes that could easily be transferred to other bacterial species; the potential for dissemination was therefore high.⁴⁸ Moreover, these MDR bacteria often had other antibiotic resistance genes, such as ESBL and carbapenemase genes. This is particularly

problematic as these 16S-RMTase producers are resistant to most of the antimicrobial agents used to treat infections caused by Gram-negative bacilli, including the new AG, plazomicin.⁷

This study in several hospitals in the Parisian area is, to the best of our knowledge, the first multicentre study in France to investigate the molecular epidemiology and genetic support of 16S-RMTases in clinical *E. coli* isolates. The diverse collection of isolates obtained originated from cases of infection and colonization in adults and children. The 16S-RMTases accounted for 28% of the AG-non-susceptible *E. coli* isolates (30/107 isolates); the most frequent 16S-RMTases in the Parisian area were RmtB and ArmA, consistent with the findings of previous epidemiological studies in Europe.^{12,13,49} The 16S-RMTases were strongly associated with carbapenemase-producing members of the Enterobacteriales (10% of 16S-RMTase-producing isolates in this study also produced carbapenemase), consistent with findings for the UK and Ireland (93% of the 16S-RMTase-producing isolates were also carbapenemase producers) and Greece (8% of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates also produced 16S-RMTases).^{50,51}

Based on the determination of STs according to both the Warwick University and Pasteur Institute schemes, serotypes and *fimH* alleles (Table S1), 26 clones from six phylogroups were identified among the 30 *E. coli* isolates producing 16S-RMTases. These isolates were therefore highly diverse. The most frequently identified STc/STs were STc10 and ST405, both of which have disseminated worldwide and are associated with MDR strains.^{52,53} Interestingly, we also identified one ArmA-producing isolate (LM03) from the widespread, highly virulent human ST131 clone.²² The acquisition of 16S-RMTase and carbapenemase genes by this clone is a matter of major concern. STc10 strains have frequently been reported to produce 16S-RMTase and carbapenemase in China, Algeria, Switzerland and Angola.^{15,19,54,55} In a recent study in the UK and Ireland, ST405 accounted for 21.8% (19/87) of the 16S-RMTase-producing *E. coli* isolates.⁵⁰ RmtB-producing isolates were also assigned to this ST in the USA and Italy.^{56,57} Our data suggest a possible diffusion and transmission of ST405 associated with the narrow-host range IncF plasmids harbouring the *rmtB* gene. The emergence of IncF plasmids bearing *bla*_{CTX-M-55}, *rmtB* and *fosA* has recently been reported in animals in France and we have described two isolates (BI10 and HM15) with an IncF plasmid encoding these resistance genes (Table S3).⁵⁸ This is a matter of major concern, as the spread of these narrow-host range plasmids could jeopardize the efficacy of vital antimicrobial treatments. In addition, Illumina sequencing was unable to determine the genetic environment in some cases, suggesting the presence of numerous mobile genetic elements around the *rmtB* gene, favouring its mobilization. Further studies are, therefore, required, to explore these uncharacterized genetic environments.

Ten different STs were identified among the 11 ArmA producers, demonstrating non-clonal diffusion, as confirmed by the core SNP-based phylogeny in this study (Figure 1). The complete Tn1548 sequence flanked by two IS26 elements was identified in 6 of 11 isolates. This genetic environment has been reported to promote efficient *armA* mobilization in Enterobacteriales.⁵⁹ Moreover, IncI/M plasmids are thought to be broad-host range plasmids, which could, therefore, mediate widespread dissemination. The genetic background of the *armA* gene is consistent with the spread of the Tn1548 transposon and/or the IncI/M plasmid in

strains with different genetic backgrounds. Conversely, 15 clones corresponding to 12 different STs were identified in RmtB producers, suggesting a more clonal spread, with ST405 and STc10, in particular, known to be involved in MDR. Three clusters of two isolates each were identified, suggesting possible bacterial transmission events between patients (Figure 1 and Table S2).

For the single RmtC-producing isolate, the genetic support for the resistance gene was identified as the previously described pNDM-US identified in the USA from a *K. pneumoniae* isolate obtained from a patient receiving medical care in India.⁴⁷ Interestingly, the RmtC producer was isolated from a patient from Mauritius who reported regular travel to this island, suggesting probable acquisition during his travels.

The limitations of this work are those inherent to most retrospective studies: the difficulty of assembling a complete analysis of isolates collected over a long time period and a lack of clinical information concerning recent travel or previous admissions to hospital in other countries. We could also have included other Enterobacteriales known to produce 16S-RMTase, including *K. pneumoniae*, in this analysis, to compare the genetic background of the resistance genes in these species with that in *E. coli*. We now plan to conduct a prospective study to assess the prevalence of rectal carriage of 16S-RMTase-producing Enterobacteriales, based on culture on a specific medium containing AGs for a defined period of time. This work will also provide clinical data. Long-read sequencing technology would also facilitate the accurate determination of plasmid structure.

Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first study to describe the molecular epidemiology and genetic background of 16S-RMTase-producing clinical isolates of *E. coli* in France. We observed high levels of phylogenomic diversity among ArmA-producing *E. coli*, supporting the hypothesis that the spread of *armA* results from its conserved genetic environment and plasmid support. Conversely, the genetic environment surrounding *rmtB* was more heterogeneous and associated with clonally related *E. coli*. The dissemination of 16S-RMTase-encoding genes in lineages spreading worldwide and associated with MDR, such as ST405, STc10 and ST131, is a matter of great concern. Surveillance, control and prospective studies should be reinforced, to prevent the massive spread of 16S-RMTases. This study also highlighted the frequent co-localization of 16S-RMTase- and ESBL-encoding genes on the same plasmid, as observed here with CTX-M determinants, suggesting a considerable potential for further expansion of the threat represented by MDR Enterobacteriales.

Acknowledgements

We would like to thank Laurent Poiré, Patrice Nordmann, Yohei Doi, Margaret Davis and Patrick McGann for providing controls for the 16S-RMTase-producing isolates.

Other members of the IAME Resistance Group

Clotilde ROUSSEAU, Thibaut PONCIN, Aymeric BRAILLE (Saint-Louis Hospital), Marlène AMARA (Versailles Hospital), Hedi MAMMERI, Laurence ARMAND-LEFEVRE (Bichat Hospital), Sylvain KUMANSKI (Lariboisière Hospital), Guilhem ROYER (Henri-Mondor Hospital), Suzanne BIALEK

(Beaujon Hospital), Luce LANDRAUD, Catherine BRANGER (Louis-Mourier Hospital), Etienne CARBONNELLE (Avicenne-Jean-Verdier Hospital) and Stéphane BONACORSI (Robert Debré Hospital).

Funding

This work was supported by internal funding.

E.D. received partial support from the 'Fondation pour la Recherche Médicale' (Equipe FRM 2016, grant number DEQ20161136698). The funder had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation or writing of the report.

Transparency declarations

None to declare.

The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

Supplementary data

Supplementary data, including Tables S1 to S3 and Figure S1, are available as Supplementary data at JAC Online.

References

- 1 Becker B, Cooper MA. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chem Biol* 2013; **8**: 105–15.
- 2 Jackson J, Chen C, Buisson K. Aminoglycosides: how should we use them in the 21st century? *Curr Opin Infect Dis* 2013; **26**: 516–25.
- 3 Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 2007; **45**: 88–94.
- 4 Marsh JW, Pacey MP, Ezeonwuka C et al. *Clostridioides difficile*: a potential source of NpmA in the clinical environment. *J Antimicrob Chemother* 2019; **74**: 521–3.
- 5 Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2565–71.
- 6 Yokoyama K, Doi Y, Yamane K et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003; **362**: 1888–93.
- 7 Doi Y, Wachino J-I, Arakawa Y. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 2016; **30**: 523–37.
- 8 Woolhouse M, Ward M, van Bunnik B et al. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos Trans R Soc B* 2015; **370**: 20140083.
- 9 Yao Q, Zeng Z, Hou J et al. Dissemination of the *rmtB* gene carried on IncF and IncN plasmids among Enterobacteriaceae in a pig farm and its environment. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2475–9.
- 10 van Duijkeren E, Schwarz C, Bouchard D et al. The use of aminoglycosides in animals within the EU: development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: a review. *J Antimicrob Chemother* 2019; **74**: 2480–96.
- 11 Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH et al. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1843–5.
- 12 Berçot B, Poiré L, Nordmann P. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 4526–7.

- 13 Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C et al. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 459–64.
- 14 Kang HY, Kim KY, Kim J et al. Distribution of conjugative-plasmid-mediated 16S rRNA methylase genes among amikacin-resistant Enterobacteriaceae isolates collected in 1995 to 1998 and 2001 to 2006 at a university hospital in South Korea and identification of conjugative plasmids mediating dissemination of 16S rRNA methylase. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 700–6.
- 15 Deng Y-T, Zeng Z-L, Tian W et al. Prevalence and characteristics of *rmtB* and *qepA* in *Escherichia coli* isolated from diseased animals in China. *Front Microbiol* 2013; **4**: 198.
- 16 Park Y-J, Lee S, Yu JK et al. Co-production of 16S rRNA methylases and extended-spectrum β -lactamases in AmpC-producing Enterobacteriaceae, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 907–8.
- 17 Yu F, Wang L, Pan J et al. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese teaching hospital: coexistence of *rmtB* and *armA* genes in the same isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; **64**: 57–63.
- 18 Yu F, Yao D, Pan J et al. High prevalence of plasmid-mediated 16S rRNA methylase gene *rmtB* among *Escherichia coli* clinical isolates from a Chinese teaching hospital. *BMC Infect Dis* 2010; **10**: 184.
- 19 Poirel L, Goutines J, Aires-de-Sousa M et al. High rate of association of 16S rRNA methylases and carbapenemases in Enterobacteriaceae recovered from hospitalized children in Angola. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**: e00021–18.
- 20 Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; **2**: 123–40.
- 21 Tenaille O, Skurnik D, Picard B et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2010; **8**: 207–17.
- 22 Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* 2014; **27**: 543–74.
- 23 Chopra I, Schofield C, Everett M et al. Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement. *Lancet Infect Dis* 2008; **8**: 133–9.
- 24 Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 2010; **362**: 1804–13.
- 25 Jacquier H, Birgy A, Le Nagard H et al. Capturing the mutational landscape of the β -lactamase TEM-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 13067–72.
- 26 Davis MA, Baker KNK, Orfe LH et al. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 2666–9.
- 27 Berçot B, Poirel L, Nordmann P. Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **71**: 442–5.
- 28 Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1543–50.
- 29 Bueno MFC, Francisco GR, O'Hara JA et al. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 2397–400.
- 30 O'Hara JA, McGann P, Snesrud EC et al. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 2413–16.
- 31 Bankevich A, Nurk S, Antipov D et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012; **19**: 455–77.
- 32 Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N et al. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013; **29**: 1072–5.
- 33 Cock PJA, Chilton JM, Grüning B et al. NCBI BLAST+ integrated into Galaxy. *Gigascience* 2015; **4**: 39.
- 34 Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H et al. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate *in silico* method for *Escherichia coli* strain phylogeny. *Microb Genom* 2018; **4**: e000192.
- 35 Vallenet D, Calteau A, Cruveiller S et al. MicroScope in 2017: an expanding and evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* 2017; **45**: D517–28.
- 36 Jia B, Raphenya AR, Alcock B et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 2017; **45**: D566–73.
- 37 Zankari E, Hasman H, Cosentino S et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2640–4.
- 38 Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A et al. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 3895–903.
- 39 Royer G, Decousser JW, Branger C et al. PlaScope: a targeted approach to assess the plasmidome from genome assemblies at the species level. *Microb Genom* 2018; **4**: e000211.
- 40 Treangen TJ, Ondov BD, Koren S et al. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol* 2014; **15**: 524.
- 41 Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 2016; **44**: W242–5.
- 42 Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 268–81.
- 43 Golebiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M et al. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum β -lactamase gene *bla*_{CTX-M-3}. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 3789–95.
- 44 Call DR, Singer RS, Meng D et al. *bla*_{CMY-2}-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 590–6.
- 45 Yuan L, Liu JH, Du XD et al. Comparative genomics of *rmtB*-carrying Inc11 ST136 plasmids in avian *Escherichia coli* isolates from chickens in China. *Int J Antimicrob Agents* 2018; **51**: 659–62.
- 46 Morel F, Decousser J-W, Kumanski S et al. Association of the 16S rRNA methylase gene *rmtB* with a novel insertion sequence element belonging to the ISL3 family. *Int J Antimicrob Agents* 2017; **49**: 117–18.
- 47 Hudson CM, Bent ZW, Meagher RJ et al. Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. *PLoS One* 2014; **9**: e99209.
- 48 Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; **73**: 750–74.
- 49 Plekarska K, Zacharczuk K, Wolkowicz T et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary care hospital in Poland. *Adv Clin Exp Med* 2016; **25**: 539–44.
- 50 Taylor E, Skiskandan S, Woodford N et al. High prevalence of 16S rRNA methyltransferases among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the UK and Ireland. *Int J Antimicrob Agents* 2018; **52**: 278–82.
- 51 Galani I, Nafplioti K, Adamou P et al. Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. *BMC Infect Dis* 2019; **19**: 167.

- 52** Li DX, Zhang SM, Hu GZ et al. Tn3-associated *rmtB* together with *qnrS1*, *aac(6')-Ib-cr* and *bla_{CTX-M-15}* are co-located on an F49:A-B- plasmid in an *Escherichia coli* ST10 strain in China. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 236–8.
- 53** Mathers AJ, Peirano G, Pitout J. The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* 2015; **28**: 565–91.
- 54** Ayad A, Drissi M, de Curraize C et al. Occurrence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in extended-spectrum β-lactamases producing *Escherichia coli* in Algerian hospitals. *Front Microbiol* 2016; **7**: 1409.
- 55** Zurfluh K, Bagutti C, Brodmann P et al. Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase- and 16s rRNA methylase-producing Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 2017; **50**: 436–40.
- 56** Tian G-B, Rivera JI, Park YS et al. Sequence type ST405 *Escherichia coli* isolate producing QepA1, CTX-M-15, and RmtB from Detroit, Michigan. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3966–7.
- 57** Bitar I, Piazza A, Gaiarsa S et al. ST405 NDM-5 producing *Escherichia coli* in Northern Italy: the first two clinical cases. *Clin Microbiol Infect* 2017; **23**: 489–90.
- 58** Lupo A, Saras E, Madec JY et al. Emergence of *bla_{CTX-M-55}* associated with *fosA*, *rmtB* and *mar* gene variants in *Escherichia coli* from various animal species in France. *J Antimicrob Chemother* 2018; **73**: 867–72.
- 59** Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P et al. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2949–53.

MATERIELS SUPPLEMENTAIRE

Supplementary data

Table S7. Sequences of primers used for 16S-RMTases genes detection

PC R	Targ et	Prime r	Primer sequence (5' to 3')	Siz e (bp)	Positive strain	control	Referen ce
PC R 1	<i>npm</i> A	npmA- - multi F npmA - multi R	GGGCTATCTAATGTGGTG TTTTTATTTCCGCTTCTTCGT	22 9	<i>E. coli</i> TOP10 pMCL-BE ^a		Berçot <i>et al.</i> ²⁷
	<i>arm</i> A	armA- multi F armA- multi R	ATTTTAGATTTTGGTTGTGGC ATCTCAGCTCTATCAATATCG	10 1	<i>E. coli</i> COP ^a		Berçot <i>et al.</i> ²⁷
	<i>rmtB</i>	rmtB- multi F rmtB- multi R	ACTTTTACAATCCCTCAATAC AAGTATATAAGTTCTGTTCCG	17 1	<i>E. coli</i> VOG ^a		Berçot <i>et al.</i> ²⁷
PC R 2	<i>rmtA</i>	rmtA- multi F2 rmtA- multi R2	ATGAGCTTTGACGATGCCC TGATCTAAAATCCGCCGTAC	89	<i>E. coli</i> TOP10 pCR2.1TOPO <i>rmtA</i> ^a		This study

<i>rmtC</i>	rmtC- multi F rmtC- multi R	CAGGGGTTCCAACAAGT AGAGTATATAGCTTGAACATA AGTAGA	24 6	<i>E. coli</i> TOP10 pCR2.1TOPO- <i>rmtC</i> ^a	Berçot <i>et al.</i> ²⁷
<i>rmtD1</i>	rmtD- multi F2 rmtD- multi R2	GGAAAAGGACGYGGACA TCCATCGATTCCACMGG	17 1	<i>P. aeruginosa</i> <i>16</i> ^a (<i>rmtD1</i>) <i>K. pneumoniae</i> 2970 ^c (<i>rmtD2</i>)	This study
PC R 3	<i>rmtE</i> rmtE- multi F rmtE- multi R	TTAGGCGACATTGAAGCGGT AGTAATGGCAACGCAAATGG	10 6	<i>E. coli</i> TOP10 pCR-Blunt II- TOPO- <i>rmtE</i> ^b	This study
<i>rmtF</i>	rmtF- multi F rmtF- multi R	TGTTTATGGAGCTTTTGCCG CAGATGAATGTCCATGCCC	34 4	<i>K. pneumoniae</i> Oman 13 ^a	This study
<i>rmtG</i>	rmtG- multi F rmtG- multi R	AAATACCGCGATGTGTGTCC ACACGGCATCTGTTTCTTCC	25 0	<i>K. pneumoniae</i> KPC-2 ^c	This study
<i>rmtH</i>	rmtH- multi F rmtH- multi R	CACAAAAAGCCCAAGCAGG GATAGGTATCCAGCCGCTC	17 2	<i>K. pneumoniae</i> MRSN 2404 ^d	This study

Kindly provided by Pr Nordmann and Dr Poirel^a, by Pr Davis^b, by Pr Doi^c and by Pr McGann^d

PCR screening of 16S-RMTases encoding genes- All isolates were screened by 3 multiplex PCR for all variants of 16S-RMTases genes described to date (*npmA*, *armA*, *rmtB1-2*, *rmtC*, *rmtD1-2*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH*). The genes *npmA*, *armA*, and *rmtB1-2* were detected using a multiplex PCR 1 previously developed.²⁷ The genes *rmtA*, *rmtC* and *rmtD1-2* were screened by multiplex PCR 2. Primers used for detection of *rmtC* were previously developed by Berçot *et al.*²⁷ On the basis of GenBank nucleotide sequences, degenerate primers were designed in order to detect the both variants *rmtD1* (accession number DQ914960) and *rmtD2* (accession number HQ401565), not allowed by primers previously described for *rmtD*.²⁷ New primers were also designed for *rmtA* on the basis of its nucleotide sequence (GenBank accession number AB083212) in order to detect our positive control (Table S1). The quadruplex PCR 3 which detects the genes encoding the most recently 16S-RMTases described (*rmtE*, *rmtF*, *rmtG* and *rmtH*) was developed for this study, with the same conditions of amplification as multiplex PCR 1 and PCR 2: denaturation at 94 °C for 5 min; followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min; followed by a single, final, elongation step at 72 °C for 5 min. Primers were designed on the basis of GenBank nucleotide sequence for the 4 genes (accession number: *rmtE* GU201947, *rmtF* JQ808129, *rmtG* JX486113 and *rmtH* KC544262).

PCR multiplex 3 was realized in a 50 µL reaction mixture containing 5 µL of 10X polymerase buffer with 15 mM MgCl₂, 5 µL of 10X DXTP, 2.5 µL of each for and reverse primers at 10 pmol/µL, 0.4 µL of Taq DNA polymerase at 5 U/µL, 17.6 µL of sterile water and 2 µL of DNA (Roche Applied Science).

Table S2. Characteristics of the phylogroups, the ST/STc of two MLST schemes (Warwick University and Pasteur Institute), the serotypes and the *fimH* alleles and number of SNP within identical clone for the 16S-RMTase-producing *E. coli* isolates. Identical clone isolates are highlighted in gray.

Isolate	P G	STc Warwick	ST Warwick	ST Pasteur	Serotype	<i>fimH</i> allele	Global typing	SNPs within clone isolates
LM18	A	10	10	2	O141:H32	54	Distinct clone	-
V16	A	10	10	2	O89/162:H37	54	Distinct clone	-
LB01	A	10	10	2	O89/162:H9	27	Identical clone	82
SL09	A	10	10	2	O89/162:H9	27		
BJ05	A	10	167	2	O89/162:H17	-	Distinct clone	-
BI10	A	10	617	2	O89/162:H9	54	Distinct clone	-
RD04	A	168	93	83	O5:H4	32	Distinct clone	-
LM15	A	none	3631	924	O8:H21	-	Distinct clone	-
BI09	B1	155	58	24	O8:H25	32	Distinct clone	-
V02	B1	156	156	19	O-:H25	38	Identical clone	78
V03	B1	156	156	19	O-:H25	38		
LB04	B1	469	162	294	O9:H19	32	Distinct clone	-
SL10	B1	469	162	893	O-:H19	27	Distinct clone	-
BI01	B1	101	101	88	O160:H31	191	Distinct clone	-
BI16	B1	none	224	479	O9:H30	61	Distinct clone	-
BJ08	B1	none	345	636	ND	368	Distinct clone	-
HM15	B1	none	345	636	O9:H18	31	Distinct clone	-
LM14	B1	none	351	846	O18:H7	31	Distinct clone	-
LM19	B2	28	121	725	O113:H6	90	Distinct clone	-
LM03	B2	131	131	43	O25:H4	30	Distinct clone	-
RD06	B2	none	141	923	O2:H6	14	Distinct clone	-
LB05	B2	none	3672	315	O140:H14	5	Distinct clone	-
SL16	C	23	90	922	O8:H9	142	Distinct clone	-

HM2 1	D	38	38	8	O11:H30	5	Distinct clone	-
LM1 2	D	405	405	44	O102:H6	29	Distinct clone	-
HM0 5	D	405	405	477	O102:H6	27	Identical clone	13
HM0 6	D	405	405	477	O102:H6	27		
LB07	D	405	405	477	O102:H6	27	Distinct clone	2313 with HM05 2318 with HM06
BJ01	D	none	2003	8	O1:H15	65	Distinct clone	-
LB02	F	354	354	39	O1:H34	54	Distinct clone	-

PG: Phylogoup; ND: Not determined

Table S3. Major antimicrobial resistance genes present in each 16S-RMTase-encoding plasmid harbored by the respective *E. coli* transformant

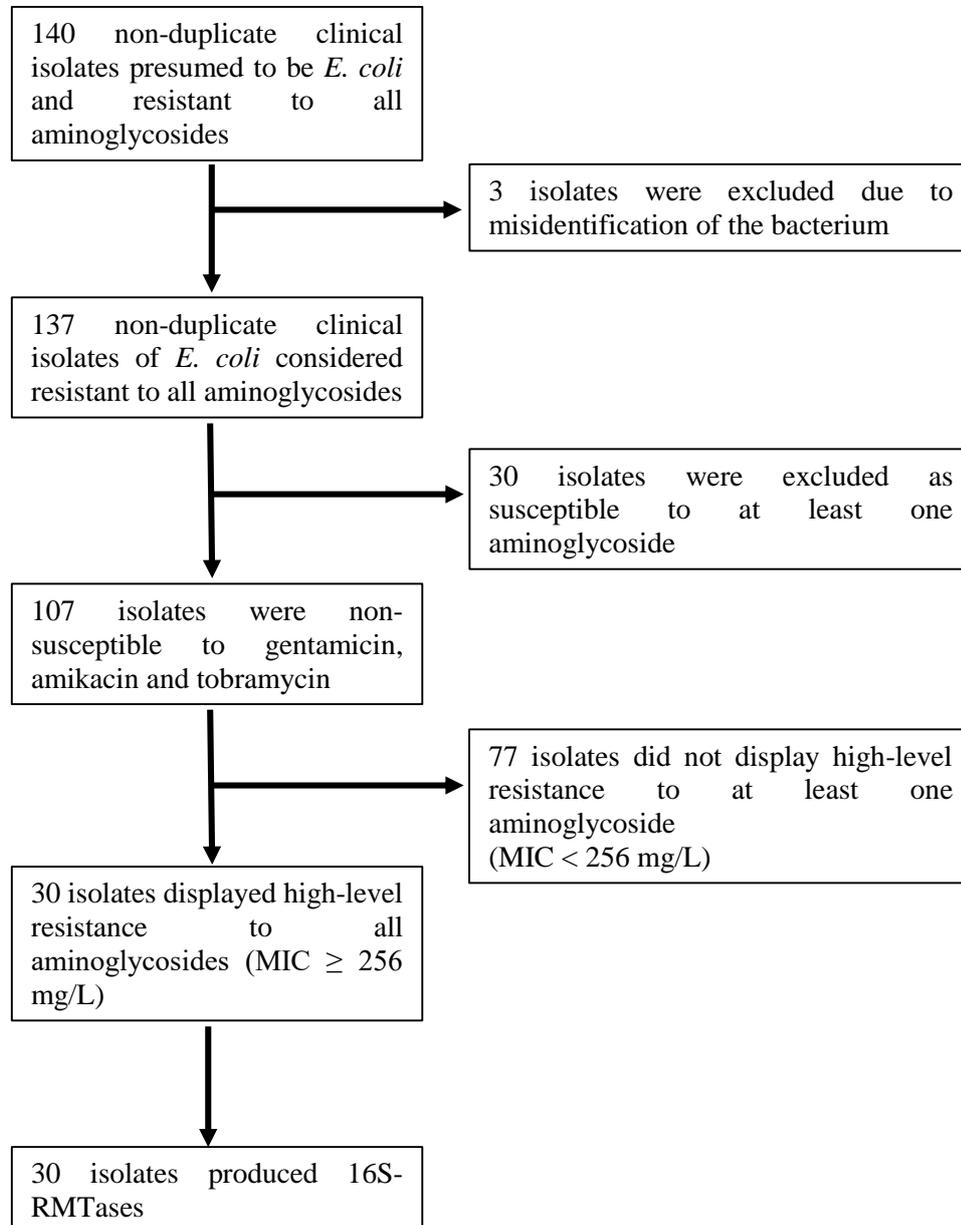
Transformant Isolate	Plasmid	Genes	Proteins
<i>E. coli</i> Top10 BI01	IncA/C	<i>armA</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase
		<i>bla_{CMY-4}</i>	β-lactamase
		<i>dfrA17</i>	Dihydrofolate reductase
		<i>sulI</i>	Dihydropteroate synthase
<i>E. coli</i> Top10 BI09	IncL/M	<i>armA</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>aac(3)-II</i>	Aminoglycoside acetyltransferase
		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase
		<i>bla_{CTX-M-15}</i>	β-lactamase
		<i>bla_{TEM-1}</i>	β-lactamase
		<i>dfrA12</i>	Dihydrofolate reductase
		<i>sulI</i>	Dihydropteroate synthase
<i>E. coli</i> Top10 BI16	IncX	<i>armA</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>bla_{CTX-M-3}</i>	β-lactamase
		<i>sulI</i>	Dihydropteroate synthase
<i>E. coli</i> Top10 LB05	IncL/M	<i>armA</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Aminoglycoside acetyltransferase
		<i>bla_{CTX-M-3}</i>	β-lactamase
		<i>bla_{TEM-1}</i>	β-lactamase
		<i>bla_{OXA-1}</i>	β-lactamase
		<i>catB3</i>	Chloramphenicol O-acetyltransferase
		<i>arr-3</i>	Rifampin ADP-ribosyl transferase
<i>sulI</i>	Dihydropteroate synthase		
<i>E. coli</i> Top10 LM03	IncF	<i>armA</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>aac(3)-II</i>	Aminoglycoside acetyltransferase
		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase
		<i>bla_{TEM-30}</i>	β-lactamase
		<i>dfrA12</i>	Dihydrofolate reductase
<i>E. coli</i> Top10 LM18	IncL/M	<i>armA</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>aac(3)-II</i>	Aminoglycoside acetyltransferase
		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase
		<i>bla_{CTX-M-3}</i>	β-lactamase
		<i>bla_{TEM-1}</i>	β-lactamase
		<i>sulI</i>	Dihydropteroate synthase
<i>E. coli</i> Top10 LM19	IncL/M	<i>armA</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>aac(3)-II</i>	Aminoglycoside acetyltransferase

		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase
		<i>bla</i> _{CTX-M-3}	β-lactamase
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase
		<i>dfrA12</i>	Dihydrofolate reductase
		<i>sulI</i>	Dihydropteroate synthase
<i>E. coli</i> Top10 RD04	IncL/M	<i>armA</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>aac(3)-II</i>	Aminoglycoside acetyltransferase
		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase
		<i>bla</i> _{CTX-M-3}	β-lactamase
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase
		<i>sulI</i>	Dihydropteroate synthase
		<i>dfrA12</i>	Dihydrofolate reductase
<i>E. coli</i> Top10 RD06	IncL/M	<i>armA</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase
		<i>bla</i> _{CTX-M-3}	β-lactamase
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase
		<i>sulI</i>	Dihydropteroate synthase
		<i>dfrA12</i>	Dihydrofolate reductase
<i>E. coli</i> Top10 SL10	IncA/C	<i>armA</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase
		<i>bla</i> _{CMY-6}	β-lactamase
		<i>dfrA12</i>	Dihydrofolate reductase
		<i>sulI</i>	Dihydropteroate synthase
<i>E. coli</i> Top10 V16	IncL/M	<i>armA</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>aac(3)-II</i>	Aminoglycoside acetyltransferase
		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase
		<i>bla</i> _{CTX-M-3}	β-lactamase
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase
		<i>sulI</i>	Dihydropteroate synthase
		<i>dfrA12</i>	Dihydrofolate reductase
<i>E. coli</i> Top10 BI10	IncF	<i>rmtB</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>aph(6)-I</i>	Aminoglycoside phosphotransferase
		<i>bla</i> _{CTX-M-55}	β-lactamase
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase
		<i>fosA3</i>	Glutathione S-transferase
		<i>dfrA14</i>	Dihydrofolate reductase
<i>E. coli</i> Top10 BJ05	IncF	<i>rmtB</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>aac(3)-II</i>	Aminoglycoside acetyltransferase
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase
<i>E. coli</i> Top10 HM05	IncF	<i>rmtB</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase
		<i>qepA1</i>	Quinolone efflux pump

<i>E. coli</i> Top10 HM06	IncF	<i>rmtB</i>	16S rRNA methyltransferase	
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase	
		<i>qepA1</i>	Quinolone efflux pump	
<i>E. coli</i> Top10 HM15	IncF	<i>rmtB</i>	16S rRNA methyltransferase	
		<i>bla</i> _{CTX-M-55}	β-lactamase	
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase	
		<i>fosA3</i>	Glutathione S-transferase	
<i>E. coli</i> Top10 HM21	IncF	<i>rmtB</i>	16S rRNA methyltransferase	
		<i>bla</i> _{CTX-M-15}	β-lactamase	
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase	
		<i>sul1</i>	Dihydropteroate synthase	
<i>E. coli</i> Top10 LM12	IncF	<i>rmtB</i>	16S rRNA methyltransferase	
		<i>aac(3)-II</i>	Aminoglycoside acetyltransferase	
		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase	
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase	
		<i>dfrA17</i>	Dihydrofolate reductase	
		<i>qepA1</i>	Quinolone efflux pump	
<i>E. coli</i> Top10 LM14	IncF	<i>rmtB</i>	16S rRNA methyltransferase	
		<i>aph(3'')-I</i>	Aminoglycoside phosphotransferase	
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase	
		<i>dfrA12</i>	Dihydrofolate reductase	
		<i>sul1</i>	Dihydropteroate synthase	
		<i>qepA1</i>	Quinolone efflux pump	
<i>E. coli</i> Top10 LM15	IncF	<i>rmtB</i>	16S rRNA methyltransferase	
		<i>aac(3)-II</i>	Aminoglycoside acetyltransferase	
		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase	
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase	
		<i>dfrA17</i>	Dihydrofolate reductase	
		<i>sul1</i>	Dihydropteroate synthase	
		<i>catA1</i>	Chloramphenicol acetyltransferase	O-
		<i>tet(B)</i>	Tetracycline efflux pump	
<i>E. coli</i> Top10 SL16	IncF	<i>rmtB</i>	16S rRNA methyltransferase	
		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase	
		<i>bla</i> _{NDM-5}	Carbapenemase	
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase	
		<i>sul1</i>	Dihydropteroate synthase	
		<i>dfrA12</i>	Dihydrofolate reductase	
<i>E. coli</i> Top10 V02	IncI	<i>rmtB</i>	16S rRNA methyltransferase	
		<i>aac(6')-I</i>	Aminoglycoside acetyltransferase	
		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase	

		<i>aph(3')-I</i>	Aminoglycoside phosphotransferase
		<i>bla</i> _{CTX-M-55}	β-lactamase
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase
		<i>catB3</i>	Chloramphenicol acetyltransferase O-
		<i>tet(D)</i>	Tetracycline efflux pump
		<i>dfrA12</i>	Dihydrofolate reductase
		<i>sulI</i>	Dihydropteroate synthase
		<i>qepA1</i>	Quinolone efflux pump
<i>E. coli</i> Top10 V03	IncI	<i>rmtB</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>aac(6')-I</i>	Aminoglycoside acetyltransferase
		<i>ant(3'')-I</i>	Aminoglycoside adenylyltransferase
		<i>aph(3')-I</i>	Aminoglycoside phosphotransferase
		<i>bla</i> _{CTX-M-55}	β-lactamase
		<i>bla</i> _{TEM-1}	β-lactamase
		<i>catB3</i>	Chloramphenicol acetyltransferase O-
		<i>tet(D)</i>	Tetracycline efflux pump
		<i>dfrA12</i>	Dihydrofolate reductase
		<i>sulI</i>	Dihydropteroate synthase
<i>E. coli</i> Top10 LB04	IncA/C	<i>rmtC</i>	16S rRNA methyltransferase
		<i>aac(6')-I</i>	Aminoglycoside acetyltransferase
		<i>bla</i> _{NDM-1}	Carbapenemase
		<i>bla</i> _{CMY-6}	β-lactamase
		<i>sulI</i>	Dihydropteroate synthase

Figure S1. Flowchart of aminoglycoside resistance in the 140 presumed *E. coli* isolates. In total, 137 of the 140 isolates were confirmed to be *E. coli*. Resistance to gentamicin, amikacin and tobramycin was detected in 107 *E. coli* isolates, including 30 with high-level resistance to all aminoglycosides mediated by 16S-RMTase production.



2.1.3 Commentaires de la publication n°1

Ce premier travail décrit l'épidémiologie moléculaire des *E. coli* producteurs de RMTase en région parisienne sur la période 2008-2014 et la caractérisation des supports génétiques de cette résistance.

Au sein de notre collection, les déterminants responsables de la pan-résistance aux AG étaient majoritairement des mécanismes n'impliquant pas une RMTase car seulement 28% des isolats (30/107) en étaient producteurs. Néanmoins, l'ensemble des isolats pan-résistants aux AG pour lesquels les CMI à l'amikacine, la gentamicine et la tobramycine étaient supérieures à 256 mg/L, étaient producteurs de RMTase montrant que ce trait phénotypique était étroitement lié à la production de ces enzymes. Les RMTases les plus fréquemment retrouvées dans notre collection étaient RmtB et ArmA, résultats similaires aux études réalisées en Europe et en Asie (178, 182, 256). Dans une étude épidémiologique récente réalisée aux Royaume-Uni et en Irlande, les auteurs trouvaient que 49%, 25%, 21% des *E. coli* producteurs de RMTase (n=152) possédait respectivement le gène *rmtB*, *rmtC* et *armA* confirmant que RmtB était la RMTase la plus fréquente chez *E. coli* (180). Par contre, la répartition des gènes de RMTase est différente chez les autres espèces de Enterobacterales notamment chez *K. pneumoniae* où ArmA est la RMTase la plus fréquente suivie par RmtF (180, 181, 346).

Une carbapénémase de classe B (de type NDM ou VIM) était retrouvée dans 10% de nos isolats, une prévalence bien supérieure au taux de *E. coli* producteurs de carbapénémase en France (moins de 1%) sur la même période. En effet, de nombreuses études rapportent des taux de prévalence importants de RMTase chez les bactéries productrices de carbapénémase notamment de type NDM. Dans une étude réalisée au Myanmar sur des *K. pneumoniae* productrices de NDM, une RMTase était retrouvée dans 50% (19/38) des cas, principalement ArmA (347). Une autre étude réalisée au Royaume-Uni retrouvait que 87% (69/79) des producteurs de RMTase (68 Enterobacterales et 11 *A. baumannii*) produisaient une carbapénémase, dont 67% était de type NDM (181). Nos résultats associés à ceux d'autres études confirment le lien épidémiologique entre production de RMTase et de carbapénémase, et particulièrement les enzymes de type NDM dont le gène peut être colocalisé sur le même plasmide que le gène de RMTase, comme pour l'isolat LB04.

Une grande diversité de clone a été observée dans notre étude, retrouvant 26 clones différents appartenant à six phylogroupes parmi les 30 *E. coli* producteurs de RMTase. Les clones les plus fréquemment observés appartenaient au ST405 et au complexe clonal ST10. La production de

RMTase (*rmtB* et *armA* en majorités) chez ces clones a été rapportée dans d'autres études réalisées sur des isolats issus de différents continents (180, 277, 294, 309, 348, 349). Dans l'étude de Taylor *et al.*, le ST405 rassemblait 22% (19/87) des *E. coli* produisant une RMTase provenant du Royaume-Uni et d'Irlande. D'autres *E. coli* ST405 producteurs de RmtB ont été décrits en Italie et aux Etats-Unis, démontrant l'importance de ce clone dans la diffusion de RMTases et particulièrement du gène *rmtB* (294, 350). Le clone *E. coli* ST405 de phylogroupe D est considéré comme un clone à « haut risque », il a été associé à l'acquisition de BLSE de type CTX-M, de carbapénémase et du gène *mcr-1* (351, 352). Dans notre étude, aucun isolat appartenant à ce ST ne produisait de carbapénémase ou MCR-1. Les *E. coli* appartenant au complexe clonal ST10 producteurs de RMTase ont été retrouvés ponctuellement en Chine dans une souche bovine produisant RmtB et en Algérie dans des isolats cliniques producteurs de ArmA (277, 349).

De manière intéressante, nous avons également trouvé un isolat producteur de ArmA (LM03) appartenant au clone mondial hypervirulent ST131. Cet isolat était de sérotype O25b et de *fimH30*. Ce type O25b-*fimH30* est fréquemment retrouvé au sein du ST131 et associé à la résistance aux fluoroquinolones et à la production de l'enzyme codant une BLSE de type CTX-M-15 (353). Dans notre cas, l'isolat produisait une BLSE de type CTX-M-3, ce qui diffère par rapport au profil typique de ce clone. De même, le gène *armA* était localisé sur un plasmide IncF, constituant l'unique plasmide porteur de *armA* de ce réplicon dans notre étude.

Globalement, les résultats de phylogénie de notre étude démontrent une diffusion principalement non-clonale des RMTases chez *E. coli* en France, avec une exception pour les clones produisant RmtB et appartenant aux ST405 et ST10, retrouvés chacun dans deux isolats issus de deux hôpitaux distincts.

Les environnements génétiques entourant le gène *armA* étaient particulièrement conservés avec 6/11 isolats possédant le transposon complet Tn1548 flanqué de deux éléments IS26 comme précédemment décrit (191). Cet élément, dont la capacité de mobilisation a été démontrée, a été retrouvé majoritairement sur des plasmides IncL/M à larges spectres d'hôtes proches du plasmide pCTX-M-3 précédemment décrit en Pologne (144, 191, 354). Ces plasmides IncL/M portant *armA* sont potentiellement conjugatifs. Dans l'étude de Galimand *et al.*, les auteurs ont retrouvé chez 12 souches de cinq espèces différentes, que le plasmide IncL/M portant *armA* était capable de conjuguer dans un *E. coli* sélectionné avec de l'acide nalidixique et de l'amikacine (191). Ce taux diminuait légèrement (11/12 souches) lorsque le transconjugant était sélectionné sans AG. De manière intéressante, le transconjugant ne portant pas *armA*,

possédait bien le plasmide IncL/M mais semblait avoir perdu le transposon Tn1548 portant *armA*.

Récemment, Carattoli *et al.* ont démontré que les plasmides IncL/M devraient être interprétés comme des groupes d'incompatibilité distincts (355). Cette distinction est basée sur plusieurs critères incluant des tests d'incompatibilité, montrant la coexistence possible de plasmides IncL et IncM au sein du même transformant, et des comparaisons phylogénétiques révélant la présence de deux branches (IncL et IncM). De plus, en raison des différences entre les plasmides IncM, deux groupes ont été définis et appelés IncM₁ et IncM₂. En prenant en compte cette nouvelle classification, les plasmides porteurs de *armA* précédemment décrits de réplicon IncL/M appartiennent au groupe IncM₂. Les autres plasmides portant *armA* (4/11) possédaient d'autres réplicons (IncC, IncF et IncX). Ces résultats apportent de nouvelles données sur les plasmides porteurs de *armA*, confirmant que les plasmides IncM sont les principaux vecteurs de *armA* (191). Les autres réplicons ont également été identifiés, plus rarement, chez des plasmides portant *armA* : IncF en France et en Corée, IncC en Corée, au Japon et en Grèce et IncX en Inde (177, 230, 256, 356, 357). La diversité des plasmides hébergeant *armA* pourrait être liée à la capacité du transposon Tn1548, flanqué de deux éléments IS26, de transposer par transposition replicative et de s'intégrer dans différents plasmides (358, 359). En effet, des auteurs ont montré, avec un modèle pOX38, que le plasmide possédant le transposon Tn1548 (pAT783) était capable de s'intégrer au plasmide pOX38 formant un plasmide pOX38::pAT783 portant le transposon (191). Ce dernier plasmide était également capable de conjuguer dans une souche de *E. coli* après sélection avec de l'amikacine. Ce transposon semblait se mobiliser par transposition replicative générant des duplications directes de 8 bp (CTTTTTTG) au niveau du site où il s'était intégré.

Dans notre étude, les environnements entourant le gène *rmtB* montraient plus de diversité, que ceux décrits pour le gène *armA*, notamment au niveau des séquences d'insertion en amont et en aval de ce gène. Pour neuf isolats (BJ05, V02, V03, LM12, LB07, HM05, HM06, LM14 et LM15), le gène *rmtB* était suivi de la séquence ISCR3 et du gène *qepA* codant une pompe d'efflux impliquée dans la résistance plasmidique aux fluoroquinolones. Ces environnements sont similaires à l'environnement du plasmide pIP1206 décrit par Périchon *et al.* (360). Dans cette étude, les auteurs ont décrit le plasmide pIP1206, appartenant au groupe d'incompatibilité IncFI et provenant d'un *E. coli* isolé en Belgique, et ont retrouvé que la région portant *rmtB* et *qepA* était flanquée par deux IS26. Cette région faisait partie d'une plus grande structure de 33 kb hébergeant cinq IS26, incluant deux IS26 encadrant la structure, et l'ensemble des gènes de

résistance du plasmide (*bla*_{TEM-1}, *rmtB*, *qepA*, *tetA*, *catA*, *sul1*, *aadA4* et *dfrA17*). L'analyse des régions flanquantes de chaque IS26 a retrouvé deux répétitions directes identiques de 8 pb, une en amont de la première IS26 et la deuxième en aval de la cinquième IS26. Ces deux IS26 étaient dans des orientations opposées suggérant deux mécanismes d'acquisition potentiels : (i) une transposition complète de la structure à partir d'un autre support (chromosome, plasmide...) médiée par IS26 ou (ii) l'intégration successive de différents éléments mobiles dans un plus petit fragment flanqué par ces deux IS26 déjà présentes sur le plasmide. L'année suivante, une équipe chinoise a caractérisé une souche clinique de *K. pneumoniae* possédant *rmtB* avec, cette fois, le transposon Tn2 (Tn3 dans la publication) complet (204). Néanmoins, les séquences inversées répétées droite et gauche (IRR et IRL), synonyme de transposition, ont été localisées en amont de la transposase et en aval de *bla*_{TEM-1} n'incluant pas le gène *rmtB*. L'absence de ces séquences en aval de *rmtB* suggère la non-mobilisation de ce gène par le transposon Tn2 (310). Par ailleurs, le rôle de ISCR3 en aval de *rmtB* reste à élucider mais il est possible que cette séquence soit responsable de l'acquisition initiale de *rmtB* via un mécanisme de *rolling circle* au sein d'une structure mobilisable flanquée de IS26.

Pour trois isolats, nous avons décrit un autre environnement du gène *rmtB*, celui-ci étant suivi de la séquence ISCR1 localisée à la place de ISCR3 et orienté dans le sens inverse de *rmtB*, et pour deux isolats une séquence ISCFr1 en amont de *rmtB*. Ce type d'environnement avait déjà été décrit dans des souches de *E. coli* isolées chez le poulet en Chine (361). Dans cette étude, les auteurs décrivent trois plasmides possédant *rmtB* (pEC006-008) avec deux environnements génétiques similaires notamment avec la présence de ISCFr1 en amont de *rmtB* et ISCR1 en aval. Dans les trois cas, les auteurs retrouvent des séquences IS26 inversement orientées entourant ces séquences. Néanmoins, aucune répétition directe n'a été retrouvée flanquant les IS26 suggérant que cette structure aurait été acquise par recombinaison homologue plutôt que par transposition. Dans notre étude, la taille des contigs ne permettait pas d'identifier IS26 mais la présence de l'intégron de classe 1 en aval de ISCR1 suggèrerait des mécanismes de mobilisations similaires.

Un autre type d'environnement a été décrit pour l'isolat HM21 où la séquence en aval de *rmtB* possédait une nouvelle séquence d'insertion appartenant à la famille des ISL3 dont les séquences IRR et IRL, synonyme de transposition, étaient observées de part et d'autre de l'élément ISL3 (267). Cet environnement a également été décrit dans des entérobactéries productrices de carbapénémases (VIM, KPC et OXA-48) isolées en Grèce (362). De manière intéressante, notre isolat possédait également un gène *bla*_{VIM} porté par un autre plasmide que

celui portant *rmtB* (porté par un plasmide IncF) alors qu'il était porté par sur même plasmide IncC-IncR dans un *P. stuartii* isolé en Grèce (363)

Concernant l'unique isolat possédant *rmtC*, l'environnement génétique retrouvé était identique à celui du plasmide pNDM-US, précédemment décrit dans un isolat de *K. pneumonia* retrouvé aux Etats-Unis chez un patient ayant reçu des soins médicaux en Inde (345). Initialement, Wachino *et al.* avaient montré que le gène *rmtC* était mobilisé par une *ISEcp1* placé en amont du gène (276). Les auteurs avaient pu mettre en évidence la transposition de la structure *ISEcp1-rmtC* dans un modèle de plasmide R388 en identifiant les IRL et IRR encadrant cette structure. Le gène *rmtC* a par la suite été décrit dans un isolat produisant également une carbapénémase *bla_{NDM-1}*. Le plasmide portant ces deux gènes a été séquencé et il a été montré que la séquence *ISEcp1* était tronquée par l'insertion d'une séquence *ISKpn14*, appartenant à la famille des *IS1*, comme c'est le cas pour l'isolat LB04 dans notre étude (210). Ces plasmides portant *rmtC* et *bla_{NDM-1}* appartenaient également au groupe IncC (IncA/C dans la publication).

Cette étude a permis de décrire l'épidémiologie moléculaire des *E. coli* producteurs de RMTase dans une large collection d'isolats cliniques provenant de région parisienne. Les isolats producteurs de RMTases possèdent une grande diversité génétique avec, néanmoins, la présence de certains clones « à haut risque » retrouvés dans plusieurs hôpitaux et très proches d'un point de vue phylogénétique. Enfin l'étude des environnements génétiques a montré l'éventails des structures entourant les RMTases et impliquées dans leurs mobilisations. Les régions contenant *armA* se trouvaient sur des supports génétiques conservés impliquant majoritairement le transposon *Tn1548* et un plasmide IncM proche de pCTX-M-3 ; alors que les environnements génétiques entourant *rmtB* présentaient plus de diversités avec l'insertion d'une variété d'IS en amont et en aval du gène.

2.2 CHAPITRE II : Détection d'isolats de *K. pneumoniae* coproducteurs de carbapénémase et de la RMTase RmtF à Paris

2.2.1 Introduction à la publication n°2

Différentes études ont rapporté l'association entre carbapénémase et RMTase chez les Enterobacterales. Nous avons observé également ce lien dans notre étude sur les *E. coli* producteurs de RMTase (voir Chapitre I). L'émergence de cette double résistance est particulièrement préoccupante car elle constitue un défi pour l'antibiothérapie, compromettant l'activité de la plupart des antibiotiques disponibles en cas d'infections sévère à bacilles à Gram négatif. De plus, les informations concernant la prévalence des RMTases parmi les Enterobacterales productrices de carbapénémases sont rares, et la plupart des rapports proviennent des résultats collatéraux d'autres études axées sur la caractérisation d'autres mécanismes de résistance émergents (carbapénémase en majorité). Dans l'ensemble, la plupart de ces études indiquent que l'association des carbapénémases et des RMTases est en augmentation dans différents contextes, mais particulièrement dans les pays d'Asie de l'Est, d'Afrique et, dans une moindre mesure, d'Europe, chez lesquels les métallo- β -lactamases comme NDM sont répandues ou en augmentation (228, 256, 348). En France, très peu d'études ont identifié des RMTases chez des entérobactéries productrices de carbapénémases. En 2011, Berçot *et al.* ont identifié quatre isolats producteurs de NDM-1 et possédant différents gènes de RMTase (*armA*, *rmtC* et *armA+rmtB*). En 2012, la première description de la RMTase RmtF avait été effectuée à partir d'un isolat de *K. pneumoniae* producteur de la carbapénémase NDM-1 (161). Une autre étude décrivant l'émergence en France du ST258 parmi les *K. pneumoniae* productrices de carbapénémase avait retrouvé que sept isolats parmi 63 producteurs de la carbapénémase KPC possédaient le gène *rmtB* (364).

L'objectif de notre étude était de caractériser les isolats producteurs à la fois de RMTase et de carbapénémase. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés particulièrement à l'espèce bactérienne *K. pneumoniae* qui correspond à l'espèce bactérienne la plus fréquemment productrice de carbapénémase en France ainsi que dans notre groupe hospitalier (365). Pour commencer, nous avons d'abord identifié les *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases détectées par PCR (Carba-R, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) et résistant à la fois à l'amikacine et à la gentamicine sur la base des antibiogrammes réalisés à l'hôpital. Cette étape nous a permis de sélectionner 29 isolats uniques chez lesquels nous avons recherché une résistance de haut niveau à l'ensemble des AG utilisés en clinique (amikacine, gentamicine et tobramycine). Cette

sélection s'est déroulé en deux étapes : dans un premier temps nous avons mis en culture les isolats sur une gélose contenant des AG (30 mg/L d'amikacine et de gentamicine) puis, dans un second temps, pour les isolats poussant sur cette gélose sélective, nous avons mesuré les CMI à l'amikacine, la gentamicine et la tobramycine pour rechercher le caractère de résistance de haut niveau aux AG (CMI \geq 256 mg/L). De plus, nous avons testé un large panel d'antibiotiques, incluant les nouvelles β -lactamines comme l'association ceftazidime-avibactam et le céfédrocol, pour identifier les alternatives thérapeutiques.

Parmi les 29 isolats testés, cinq présentaient une résistance de haut niveau aux AG. Ces isolats (KP24, KP25, KP70, KP71 et KP75) ont été isolés en 2014 et en 2017 à l'hôpital Saint-Louis chez cinq patients différents. Les cinq isolats étudiés provenaient d'écouvillons rectaux dans le cadre d'un dépistage de portage de bactéries multirésistantes (BMR). Quatre patients étaient hospitalisés en réanimation et le cinquième était hospitalisé en service de maladies infectieuses. La moyenne d'âge des patients était de 53 ans (de 20 à 69 ans) et quatre étaient des hommes. Parmi eux, deux patients avaient séjourné récemment en Inde et en Egypte. Durant leurs hospitalisations, trois patients décédèrent, dont deux concomitamment à une bactériémie à *K. pneumoniae* présentant le même phénotype de résistance que celui des *K. pneumoniae* retrouvées de leurs écouvillons rectaux respectifs.

En plus de la pan-résistance aux AG, tous les isolats étaient résistants aux fluoroquinolones, au cotrimoxazole et à l'ensemble des β -lactamines excepté l'association ceftazidime-avibactam et le céfidérocol qui restaient sensibles respectivement pour deux et quatre isolats. L'ensemble des isolats restaient sensibles à la tigécycline et à la colistine. L'antibiogramme effectué par la méthode des disques par diffusion en milieu gélosé de isolats KP24 est présenté dans la figure 13.

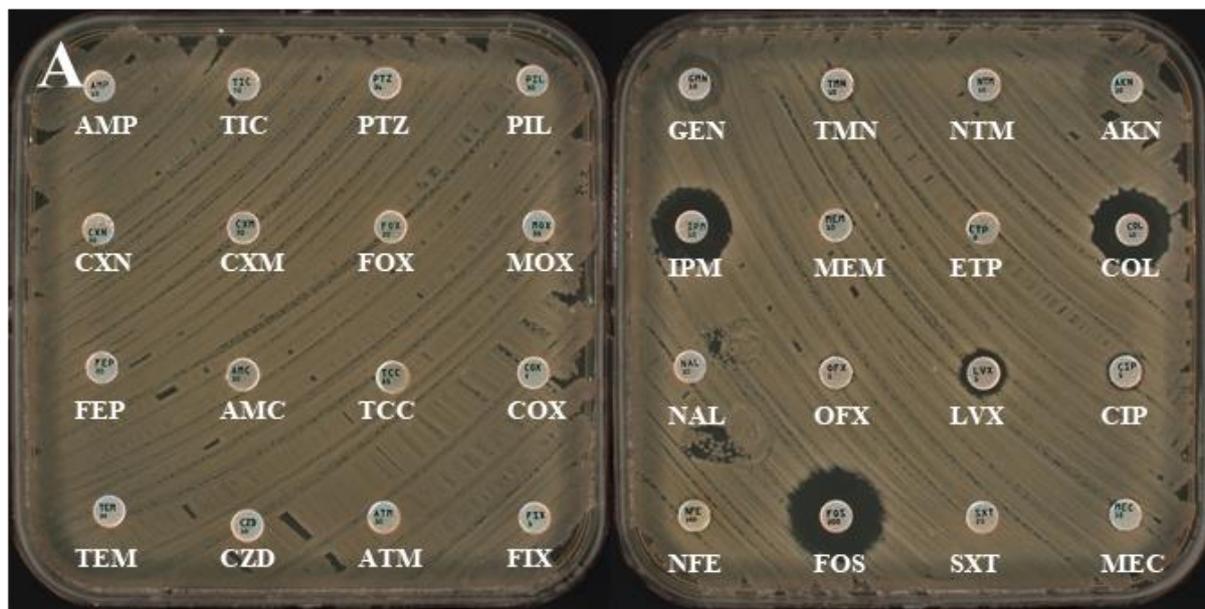


Figure 13. Antibiogramme de l'isolat KP24 producteurs de carbapénémase et résistant à haut niveau aux AG. La double zone autour des disques de gentamicine et d'amikacine est caractéristique de la résistance par production de RMTase. AMP : ampicilline, TIC : ticarcilline, PTZ : pipéracilline-tazobactam, PIL : pipéracilline, CXN : céfalexine, CXM : céfuroxime, FOX : céfoxitine, MOX : moxalactam, FEP : céfépime, AMC : amoxicilline-clavulanate ; TCC : ticarcilline-clavulanate ; COX : céfotaxime ; TEM : témocilline ; CZD : ceftazidime ; ATM : aztréonam ; FIX : céfixime, GEN : gentamicine ; TMN : tobramycine ; NTM : nétilmicine, AKN : amikacine ; IPM : imipénème ; MEM : méropénème ; ETP : ertapénème ; COL : colistine ; NAL : acide nalidixique ; OFX : ofloxacine ; LVX : lévofloxacine ; CIP : ciprofloxacine ; NFE : nitrofurantoïne ; FOS : fosfomycine ; SXT : cotrimoxazole ; MEC : mécilinam.

Pour caractériser génétiquement ces isolats un double séquençage, en « short read » par Illumina (San Diego, CA, USA) et en « long read » par Nanopore (Oxford, UK), a été réalisé.

L'analyse du séquençage par méthode Illumina (short reads) a permis de déterminer le résistome des cinq isolats ainsi que leurs typages. Les isolats appartenaient au ST231 (KP24, KP25 et KP75) et au ST147 (KP70 et KP71). Toutes les souches possédaient la RMTase RmtF1 associée aux carbapénémases OXA-232 (n=2), OXA-48 (n=1), NDM-1 (n=1) et OXA-48 plus NDM-1 (n=1). En plus de ces gènes codant les carbapénémases et les RMTases, ces cinq isolats possédaient aussi de multiples gènes de résistance dont *bla_{CTX-M-15}*, *aac(6')-Ib*, et *arr-2* codant pour une résistance à la rifampicine, ainsi que que les mutation chromosomique conférant une résistance aux fluoroquinolones (GyrA S83L et ParC S80I).

Néanmoins, nous n'avons pas pu identifier les supports génétiques des gènes codant les carbapénémases et les RMTases à partir des données de séquençage « short read ». Pour pallier à ces limites, nous avons combiné le séquençage par technique Illumina (short reads) et par technique Nanopore (long reads) dans le but d'obtenir le génome complet de chaque isolat.

L'assemblage hybride des deux séquençages a permis d'obtenir l'ensemble des génomes circularisés et d'identifier les plasmides porteurs des différents gènes codant les carbapénémases et *rmtF*. Ces gènes étaient portés en général par deux plasmides différents au sein d'une même bactérie exceptée pour l'isolat KP75 où les deux gènes étaient co-localisés sur le même plasmide. Les gènes *rmtF* étaient portés par trois types de plasmides différents : un plasmide IncFIB(pQil)-IncFII(K) respectivement de 140 kb et 115 kb pour KP24 et KP25, un plasmide IncR respectivement de 100 kb et 77 kb pour KP70 et KP71 et un plasmide IncFIA-IncFIB(AP001918)-IncFIB(pQil)-IncFII de 279 kb pour KP75.

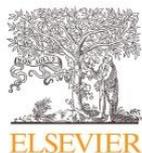
Les gènes codant les carbapénémases étaient portés par différents plasmides : un plasmide ColKP3 de 6 kb pour *bla_{OXA-232}*, un plasmide IncL/M de 63 kb pour *bla_{OXA-48}*, un plasmide IncFIB(pQil)-IncFII(K) de 118 kb pour *bla_{NDM-1}* pour KP70 et le même plasmide que *rmtF* pour KP75.

PUBLICATION 2

Detection of *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing the plasmid-encoded 16S rRNA methyltransferase RmtF and carbapenemase in Paris, France

International Journal of Antimicrobial Agents, 2022

François Caméléna, Thibaut Poncin, Mélanie Magnan, Hervé Jacquier, Manel Merimèche, and Béatrice Berçot



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Letter to the Editor

Detection of *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing the plasmid-encoded 16S rRNA methyltransferase RmtF and carbapenemase in Paris, France

Editor: Dr Minggui Wang

Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (CP-KP) has become a major challenge in public health. Isolates producing carbapenemases often carry 16S rRNA methyltransferases (16S-RMTases) conferring high-level aminoglycoside (AG) resistance [minimum inhibitory concentration (MIC) ≥ 256 mg/L] [1]. We report the genomic characterization of five *K. pneumoniae* isolates coproducing carbapenemase and the 16S-RMTase RmtF from Saint-Louis Hospital in Paris, France.

Retrospective screening for CP-KP with a high level of AG resistance was undertaken, focusing on isolates obtained between 2014 and 2018. Antibiotic susceptibility was tested using the disc diffusion method and broth microdilution in accordance with EUCAST recommendations. The MICs of amikacin, gentamicin and tobramycin were determined using Etest. Among 29 non-duplicate CP-KP isolates resistant to amikacin and gentamicin available in our collection, only five isolates had an MIC ≥ 256 mg/L for all three AGs tested, and were therefore considered to be likely to produce 16S-RMTases. These five isolates were also resistant to fluoroquinolones, trimethoprim/sulfamethoxazole and most β -lactams, except ceftazidime-avibactam (only KP70 and KP75 were resistant) and cefiderocol (only KP70 was resistant). All five isolates remained susceptible to colistin and tigecycline. These five isolates were obtained from rectal swabs in 2014 or 2017 (Table 1). Three patients died during hospitalization, and two of these deaths occurred following bloodstream infections caused by CP-KP.

Whole-genome sequencing of the five isolates was performed using both short-read (Illumina, MiSeq/NextSeq) and long-read (Oxford Nanopore, MinION) platforms. A hybrid assembly of the Illumina and Nanopore sequences was generated using Unicycler. Resistome analysis was performed using ResFinder. Analysis of core-genome single nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed using Parsnp. Annotation was performed using Prokka, and insertion sequence and plasmid contents were determined using ISFinder and PlasmidFinder, respectively.

The five isolates harboured the variant *rmtF1* gene encoding a 16S-RMTase enzyme. The carbapenemase genes identified in the five isolates were *bla*_{OXA-232} (2/5), *bla*_{OXA-48} (1/5), *bla*_{NDM-1} (1/5) and *bla*_{NDM-1} plus *bla*_{OXA-48} (1/5). The antibiotic resistance genes of each plasmid of the isolates are listed in Table 1. The carbapenemase and *rmtF1* genes were located on different plasmids in all but the KP75 isolate. The *rmtF1* genes were located on plasmids harbouring different replicons: (i) 140-kb and 115-kb IncFII_{K2} plasmids in KP24 and KP25, respectively, related to a 139-kb plasmid isolated from *K. pneumoniae* in the USA (Accession No. CP044045); (ii) 100-kb and 77-kb IncR plasmids from KP70 and KP71, respec-

tively, related to a 120-kb p47733_CTX-M-15 plasmid (Accession No. CP050364) isolated in the Czech Republic from a patient hospitalized previously in India; and (iii) a 279-kb IncF plasmid, also bearing *bla*_{NDM-1}, in KP75 that appeared to be a fusion of two plasmids related to pKP46 (Accession No. LC613146) and pCIMI16316 (Accession No. CP023816) (Fig. S1, see online supplementary material). Both the *bla*_{OXA-232} genes were carried on a ColKP3 plasmid identical to pOXA-232 (Accession No. JX423831), and the *bla*_{OXA-48} genes were carried on a IncL/M plasmid related to pOXA-48a (Accession No. JN626286) (Fig. S2, see online supplementary material). The *bla*_{NDM-1} genes were located on a 118-kb IncFII_{K2} plasmid in KP70 that was identical to the p2 plasmid described in the USA (Accession No. CP009115).

The *rmtF* locus had a very similar structure (80–100% coverage, >99% identity) to the Tn6229 transposon, related to the transposons of the Tn3 family, described previously in *K. pneumoniae* from Canada (Fig. S3, see online supplementary material) [2]. The right inverted repeats of the Tn6229 transposon were found in four isolates, whereas the left inverted repeats were absent from all of the isolates. Interestingly, the upstream terminal region of the Tn6229 transposon was interrupted in all of the isolates by either IS or *tnpA* truncated genes, resulting in the absence of the *tnpR* resolvase of the Tn6229 transposon in three isolates (Fig. S3, see online supplementary material). An ISCR-like element was present in the vicinity of the *rmtF* gene. This element was 96% identical to the ISCR21 present in Tn125, which has been implicated in the acquisition of *bla*_{NDM-1}. The putative oriS sequence defining the origin of replication of this ISCR-like element was identified 236 bp downstream, and displayed a high degree of identity (19 of 21 bp) to those of ISCR5, which belongs to the same group as ISCR21. The *bla*_{NDM-1} genes were carried by a remnant Tn125 transposon truncated in the downstream terminal region in both the KP70 and KP75 isolates, and upstream from ISAb125 in the KP75 isolate alone (Fig. S4, see online supplementary material).

Whole-genome sequencing analyses revealed that the five isolates belonged to two different sequence types (STs): KP70 and KP71 belonged to ST147; and KP24, KP25 and KP75 belonged to ST231. Both of these STs were also major carbapenemase-producing clones [1]. Between five and 117 SNPs differed between the three *K. pneumoniae* ST231 isolates (KP24, KP25 and KP75 isolates), and 85 SNPs differed between the two *K. pneumoniae* ST147 strains (KP70 and KP71). Bacterial transmission was considered possible for two cases (KP24/KP25 and KP70/KP71, respectively), as the patients were hospitalized in the same unit during the same period. Furthermore, *K. pneumoniae* ST147 and ST231 isolates coproducing RmtF and NDM or OXA-48-like carbapenemases have been reported previously in various countries, and involved in recent outbreaks in Switzerland and Spain, confirming the worldwide dissemination of these clones [1,3–6]. To our knowledge, this association has not been reported in France since the initial description

Table 1
Characteristics of the five RmtF-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates.

Isolate	Year	ST	Origin	Replicons	Size (bp)	Inc group	Carbapenemase genes	16S-RMTase gene	Other resistance genes		
KP24	2014	231	Rectal	Chromosome	5372630	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SPV-1} , <i>foxA</i>		
				pKP24_1	139545	IncFIB(pQII)- IncFII(K)	-	rmtF1	rmtF1	aac(6)-Ib , arr-2 , catA1	
				pKP24_2	7819	Col440I	-	-	-	-	-
				pKP24_3	6141	ColKP3	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	-	-	-
				pKP24_4	2101	Col(BS512)	-	-	-	-	-
KP25	2014	231	Rectal	Chromosome	5371225	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SPV-1} , <i>foxA</i>		
				pKP25_1	71300	IncFIA- IncFII(pAMA1167- NDM-5)	-	-	-	arr(3)-I , erm(B) , mph(A) , suI1 , dfrA12	
				pKP25_2	4863	Col440I	-	-	-	-	
KP70	2017	147	Rectal	pKP25_3	6139	ColKP3	<i>bla</i> _{OXA-232}	-	-		
				pKP25_4	115089	IncFIB(pQII)- IncFII(K)	-	rmtF1	aac(6)-Ib , arr-2 , catA1		
				pKP71_5	4715	ColIRNAI	-	-	-	-	
				Chromosome	5458394	-	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SPV-11} , <i>foxA</i>	
				pKP70_1	99827	IncR	-	rmtF1	aac(6)-Ib , arr-2 , catA1		
KP71	2017	147	Rectal	pKP70_2	7927	Col440I	-	-	-		
				pKP70_3	118062	IncFIB(pQII)- IncFII(K)	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>ant(3'')-I</i> , <i>aph(3')-IV</i> , <i>qnrS1</i>	
				pKP70_4	71300	IncFII(pKPX1)	-	-	-	-	
				pKP70_5	63318	Inc-LJM(pOXA-48)	<i>bla</i> _{OXA-48}	-	-	-	
				pKP70_6	4715	ColIRNAI	-	-	-	-	
				Chromosome	5385762	-	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SPV-11} , <i>foxA</i>	
KP75	2017	231	Rectal	pKP71_1	77408	IncR	-	rmtF1	aac(6)-Ib , arr-2 , catA2		
				pKP71_2	12314	Col440I	-	-	-	-	
				pKP71_3	97086	IncFII(pKPX1)	-	-	-	-	
				pKP71_4	63255	Inc-LJM(pOXA-48)	<i>bla</i> _{OXA-48}	-	-	-	
				pKP71_5	4715	ColIRNAI	-	-	-	-	
Chromosome	5317893	-	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SPV-1} , <i>foxA</i>					
KP75	2017	231	Rectal	pKP75_1	279257	IncFIA- IncFIB(pQII)-IncFII	bla _{NDM-1}	rmtF1	bla _{TEM-1} , aac(6)-Ib , qnrB1 , arr-2 , erm(B) , mph(A) , catA2		
				pKP75_2	3998	-	-	-	-		

ST, sequence type obtained by multi-locus sequence typing.
Plasmid replicons containing the *rmtF1* gene are shown in bold.

of RmtF by Galimand et al. from a strain (also producing NDM-1) originally isolated on La Reunion Island in 2011 [7]. Further studies are needed to assess the dissemination of these clones coproducing carbapenemase and 16S-RMTase RmtF in Europe.

Funding

None.

Ethical approval

Not required.

Sequence information

The genomes were released under Bioproject PRJNA785157.

Declaration of Competing Interest

None declared.

Acknowledgements

The authors wish to thank Julie Sappia of Alex Edelman & Associates for careful reading and English language editing of the manuscript. The authors also wish to thank Sylvain Brisse and Carla Rodrigues for helpful discussion and careful reading.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.ijantimicag.2022.106634](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106634).

References

- [1] Taylor E, Bal AM, Balakrishnan I, Brown NM, Burns P, Clark M, et al. A prospective surveillance study to determine the prevalence of 16S rRNA methyltransferase-producing Gram-negative bacteria in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2021;76:2428–36.
- [2] Mataseje LF, Boyd DA, Lefebvre B, Bryce E, Embree J, Gravel D, et al. Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Complete sequences of a novel blaNDM-1-harboring plasmid from *Providencia rettgeri* and an *Flh*-type plasmid from *Klebsiella pneumoniae* identified in Canada. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:637–42.
- [3] Lee CS, Vasoo S, Hu F, Patel R, Doi Y. *Klebsiella pneumoniae* ST147 coproducing NDM-7 carbapenemase and RmtF 16S rRNA methyltransferase in Minnesota. *J Clin Microbiol* 2014;52:4109–10.
- [4] Mancini S, Poirer L, Tritten M-L, Lienhard R, Bassi C, Nordmann P. Emergence of an MDR *Klebsiella pneumoniae* ST231 producing OXA-232 and RmtF in Switzerland. *J Antimicrob Chemother* 2017;73:821–3.
- [5] Shankar C, Muthurandani Sethuvel DP, Neeravi AR, Venkatesan M, Devanga Ragupathi NK, Anandan S, et al. Identification of plasmids by PCR based replicon typing in bacteremic *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Pathog* 2020;148:104429.
- [6] Mari-Almirall M, Cosgaya C, Pitart C, Viñes J, Muñoz L, Campo I, et al. MERCY-CAT Study Group. Dissemination of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* high-risk clones in Catalan healthcare institutions. *J Antimicrob Chemother* 2021;76:345–54.
- [7] Galimand M, Courvalin P, Lambert T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:3960–2.

François Caméléna, Thibaut Poncin

Department of Bacteriology, Saint-Louis-Lariboisière Hospital Group,
Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Paris, France
Université de Paris, INSERM 1137, IAME, Paris, France

Mélanie Magnan
Université de Paris, INSERM 1137, IAME, Paris, France

Hervé Jacquier, Manel Merimèche, Béatrice Berçot*
Department of Bacteriology, Saint-Louis-Lariboisière Hospital Group,
Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Paris, France
Université de Paris, INSERM 1137, IAME, Paris, France

*Corresponding author: Department of Bacteriology, Saint-Louis Hospital, 1 av. Claude Vellefaux 75010 Paris, France.
E-mail address: beatrice.bercot@aphp.fr (B. Berçot)

Supplementary data

FIG S1 BRIG comparisons of *rmtF1*-carrying plasmids: a) pKP75_NDM_rmtF, pECIMT16316 (CP023816) and pKP46 (LC613146) plasmids; b) pKP24_rmtF, pKP25_rmtF and pCP044045 (CP044045) plasmids; c) pKP70_rmtF, pKP71_rmtF and p47733_CTX-M-15 (CP050364) plasmids.

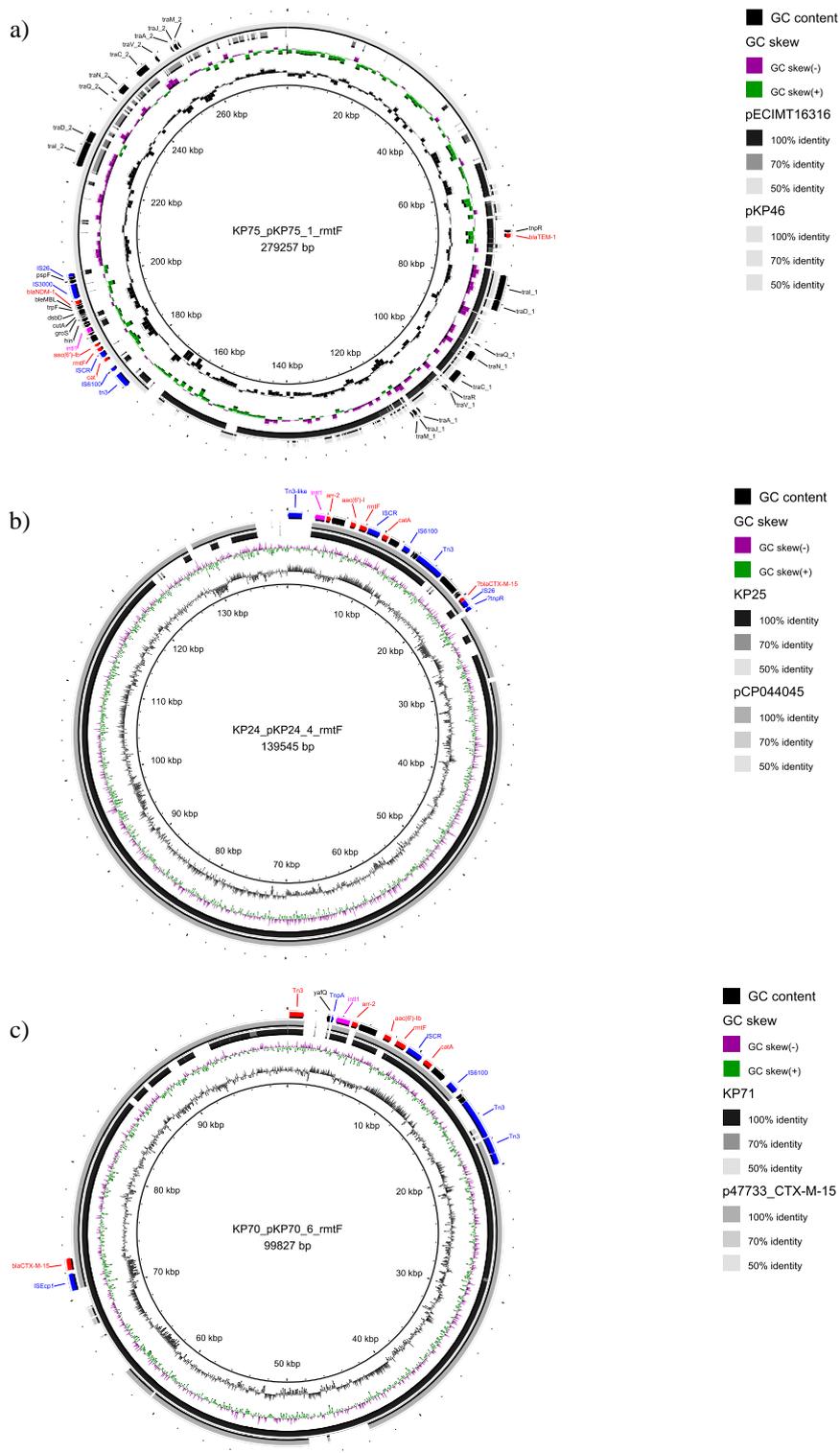


FIG S2 BRIG comparisons of carbapenemase-carrying plasmids: a) ColE *bla*_{OXA-232} (JX423831), pKP24_OXA-232 and pKP25_OXA-232 plasmids; b) pOXA48a (JN626286), pKP70_OXA-48 and pKP71_OXA-48 plasmids; c) pKP70_NDM and p2 plasmids.

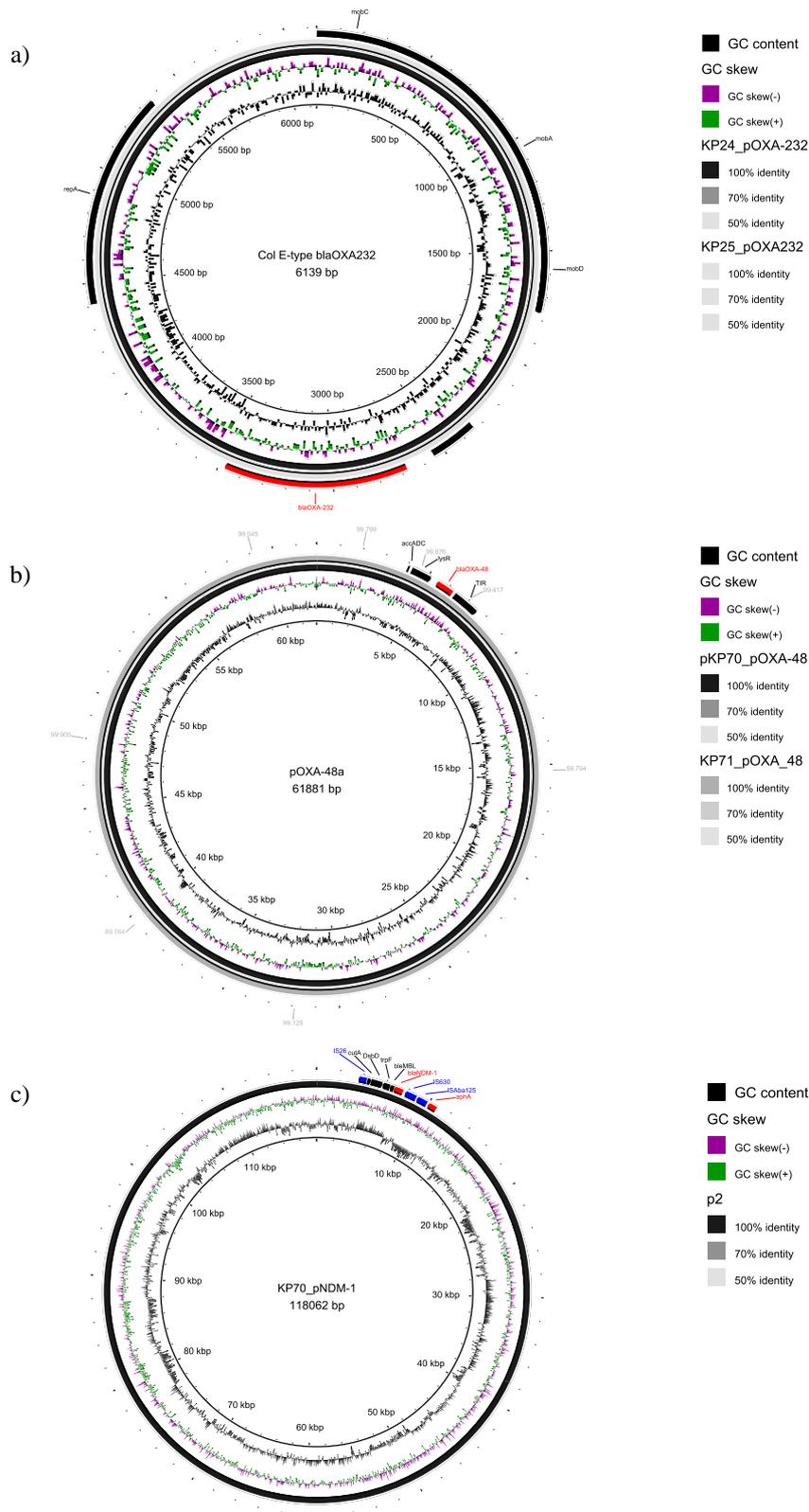


FIG S3 Genetic structures surrounding the *rmtF* gene in the five *K. pneumoniae* isolates, compared to the Tn6229 transposon. Arrows indicate ORFs and their orientations. The resistance genes are shown in red, mobile genetic elements are shown in blue, the integrases of class 1 integrons are shown in green, and other ORFs are shown in black. Gray shading indicates homologous regions and their degree of sequence identity. Graphical representations were generated with Easyfig v 2.2.2.. IRL: left inverted repeat, IRR: right inverted repeat.

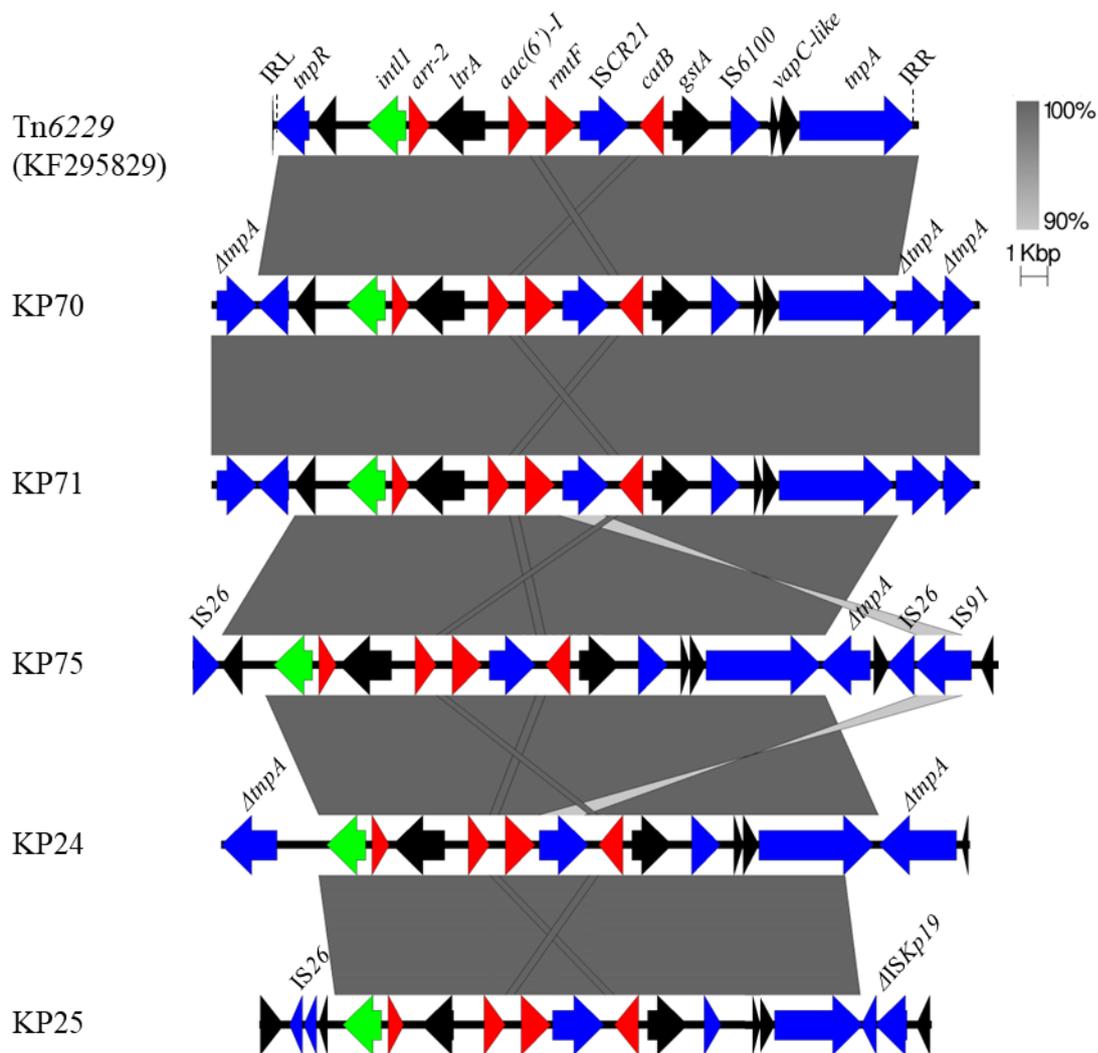
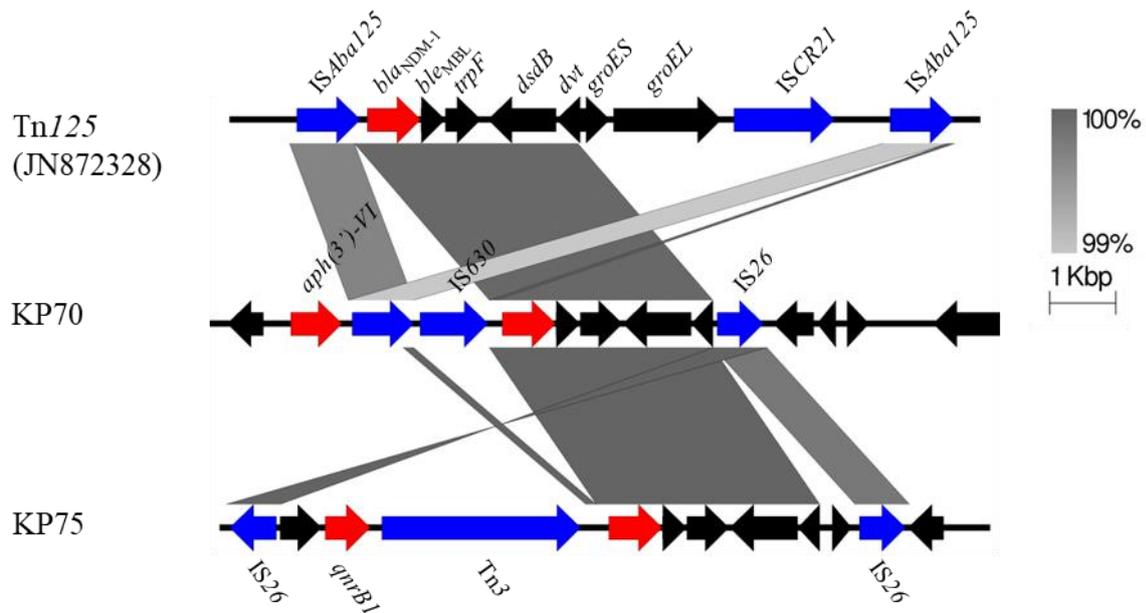


FIG S4 Genetic structures surrounding the *bla_{NDM-1}* gene in Tn125 and in the two NDM-1-producing *K. pneumoniae* isolates. Arrows indicate ORFs and their orientations. The resistance genes are shown in red, mobile genetic elements are shown in blue, integrases of class 1 integrons are shown in green, and other ORFs are shown in black. Gray shading indicates homologous regions and their degree of sequence identity. The graphical representation was generated with Easyfig v 2.2.2.



2.2.3 Commentaire de la publication n°2

Dans ce travail nous avons décrit cinq isolats de *K. pneumoniae* co-producteurs de carbapénémase et de la RMTase RmtF en France.

Ces cinq isolats avaient été obtenus de patients hospitalisés majoritairement dans des services de soins intensifs. Certains d'entre eux avaient séjournés dans des pays à forte prévalence de carbapénémases (*i.e.* Egypte et Inde). Pour deux patients, la notion de séjour à l'étranger n'était pas indiquée dans le dossier. Ces observations rejoignent les facteurs de risques de colonisation à BMR ou Bactéries Hautement Résistantes et émergentes (BHRe). L'information concernant l'exposition aux antibiotiques dans les mois précédents l'hospitalisation était inconnue. Dans l'étude de Taylor *et al.*, les auteurs ont essayé d'identifier les facteurs de risque d'acquisition de bactéries productrices de RMTase (181). L'analyse multivariée montrait une tendance vers une augmentation du risque d'acquisition chez les patients masculins et en cas d'utilisation de polymyxine ($p = 0,1$ chacun). En revanche, le domicile au Royaume-Uni et la prise d'AG était des facteurs protecteurs (respectivement $p=0,003$ et $p=0,006$). Ces facteurs sont à interpréter avec précautions car ils peuvent être le reflet d'une connaissance antérieure de colonisation (pour l'utilisation des antibiotiques) ou du risque d'habiter dans un pays à forte prévalence (Asie, Afrique) par rapport aux pays à faible prévalence (Europe, Amérique du Nord).

Dans notre étude, peu d'antibiotiques restaient actifs excepté, la colistine et la tigécycline qui restaient sensibles sur l'ensemble des isolats. La colistine et la tigécycline sont des antibiotiques de derniers recours à cause de leurs effets indésirables, de leurs propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques et enfin du risque d'apparition de résistance sous traitement par mutations (366–368). L'association ceftazidime-avibactam gardait une activité sur les *K. pneumoniae* ne produisant pas de carbapénémase de type NDM (*i.e.* KP24, KP25 et KP71) conformément à son spectre d'action (369). Enfin la céphalosporine sidérophore céfidérol était active sur l'ensemble des isolats sauf KP70, qui produisait deux carbapénémases (NDM-1 et OXA-48). La résistance au céfidérol chez des bactéries productrices de NDM avait déjà été rapportée (370). Néanmoins, la présence de l'enzyme seule n'explique pas la résistance, d'autres facteurs comme des mutations dans des gènes régulateurs chromosomiques peuvent participer à cette résistance (371, 372). Nous n'avons pas analysé si ces mutations étaient présentes ou non dans notre isolat.

Tous nos isolats possédaient le gène *rmtF1*. Depuis sa première description ce gène a été retrouvé presque exclusivement dans des *K. pneumoniae*. Seulement quelques études ont

rapporté ce gène dans d'autres espèces : un isolat de *E. cloacae* producteur de NDM-1 en Afrique du Sud, des isolats de *E. coli*, *C. freundii* et *E. cloacae* en Inde et trois *E. coli* au Royaume-Uni (168, 180, 228, 229, 239). Le variant *rmtF2*, par contre, a été retrouvé uniquement chez *P. aeruginosa* en Asie du Sud Est, au Royaume-Uni et en France (162, 205, 206, 245, 373). Chez *K. pneumoniae*, le gène *rmtF* a été décrit sur l'ensemble des continents (161, 207, 213, 236, 238, 240, 374, 375). De manière intéressante, ce gène est fréquemment associé à une carbapénémase. Dans l'étude de Arca-Suarez *et al.*, les auteurs ont constaté que 5% (24/468) des Enterobacterales productrices de carbapénémases (majoritairement de type OXA-48) isolées en Espagne étaient porteuses d'une RMTase, majoritairement *rmtF* chez *K. pneumoniae* (21/24, 87%) (258). Dans l'étude de Fournier *et al.* basée sur la collection du centre national de référence de la résistance aux antibiotiques suisse (NARA), 26 *K. pneumoniae* portaient le gène *rmtF* dont 73% (19/26) coproduisaient une carbapénémase (KPC-like et OXA-48-like majoritairement) (346). Dans une étude au Royaume-Uni basée sur la collection du centre national de référence de la résistance aux antibiotiques anglais (AMRHAI), 155 isolats de *K. pneumoniae* portant *rmtF* ont été détectés dont 92% (143/155) possédaient un gène codant une carbapénémase (OXA-48-like et/ou NDM) (180). Dans notre étude, tous les isolats produisaient des carbapénémases : OXA-48-like (n=3), NDM (n=1) et OXA-48+NDM (n=1). A noter que le variant *bla*_{OXA-232}, identifié dans notre étude, a été retrouvé à plusieurs reprises associé à *rmtF* (240, 243, 374).

Dans notre étude, deux isolats appartenait au ST147 et trois au ST231. L'analyse des SNP a montré que deux couples d'isolats présentaient moins de 100 SNPs d'écart. Ces couples avaient été isolés de patients hospitalisés dans le même service en même temps suggérant une possible transmission. Néanmoins la transmission semble plus probable entre les patients porteurs des isolats KP24 et KP25 car ces deux isolats ne présentaient que 5 SNPs de différence et ils étaient hospitalisés au même moment dans le même service. De manière intéressante, les *K. pneumoniae* productrices de RmtF montrent peu de diversité en terme de ST, seul 10 ST différents ont été décrits : ST11, ST15, ST16, ST17, ST23, ST101, ST147, ST231, ST336 et ST383 (180, 181, 207, 230–234, 236–238, 240, 242–244, 346, 374, 376). Les ST les plus fréquemment retrouvés sont les ST231 et ST147 et ils ont été observés sur plusieurs continents.

Les plasmides porteurs de *rmtF* possédaient différents réplicons : IncFIB-IncFII (KP24 et KP25), IncR (KP70 et KP71) et IncFIA-IncFIB-IncFII pour KP75. Pour les isolats KP24 et KP25, les plasmides pKP24_1 et pKP25_4 étaient similaires entre eux (84% de couverture, 100% d'identité) et avec le plasmide de 139 kb d'une souche de *K. pneumoniae* isolée aux

Etats-Unis (79-84% de couverture, 100% identité) (Genbank CP044045). Contrairement aux plasmides pKP24_1 et pKP25_4, le plasmide américain possédait l'opéron *tra* complet impliqué dans la conjugaison. Ces trois plasmides appartenait au groupe IncFII_{K2}. D'autres plasmides IncF porteur de *rmtF* ont été décrit en Chine, en Inde, au Népal et en Suisse (230, 231, 234, 240).

Chez KP70 et KP71, le gène *rmtF* était porté par des plasmides de type IncR (pKP70_1 et pKP71_1) similaires entre eux (93% de couverture, 100% d'identité) et avec le plasmide p47733_CTX-M-15 (Genbank CP050364) de 120kb retrouvé chez un patient en République Tchèque (82-83% de couverture, 100% d'identité) (377). De manière intéressante, la *K. pneumoniae* possédant p47733_CTX-M-15 appartenait également au ST147 et possédait sur d'autres plasmides les gènes *bla_{NDM-5}* et *bla_{OXA-181}*. Une souche similaire (*K. pneumoniae* ST147 portant *rmtF*, *bla_{NDM-5}* et *bla_{OXA-181}*) a été retrouvé aussi en Suisse (346). Ces plasmides IncR ne possèdent pas l'opéron *tra* mais semblent mobilisable (354). Des plasmides IncR portant *rmtF* ont aussi été retrouvés en Inde dans des isolats de *K. pneumoniae* ne produisant pas de carbapénémase (228).

Pour KP75, le plasmide porteur de *rmtF* était un plasmide IncF de formule FAB F2:A1:B49 et possédant l'opéron *tra*. Ce plasmide pourrait être le résultat de la fusion de deux plasmides IncF, le plasmide pKP46 (Genbank LC613146) de formule FAB K5:A-B- (couverture 96%, identité 100%) contenant les gènes *rmtF* et *bla_{NDM-1}* et le plasmide pEcIMT16316 (Genbank CP023816) de formule FAB F1:A1:B49 (couverture 79%, identité 98%) portant *bla_{CTX-M-15}* et *aac(3)-II*. Le premier plasmide a été retrouvé chez un isolat de *K. pneumoniae* appartenant au ST231 isolée un prélèvement d'urine en Thaïlande en 2014. Le second a été décrit dans un *E. coli* isolé chez un oiseau en Allemagne.

Les loci *rmtF* avaient une structure très similaire (couverture de 80 à 100 %, identité >99 %) à celle du transposon Tn6229 (Genbank KF295829), apparenté aux transposons de la famille Tn3, précédemment décrit chez *K. pneumoniae* au Canada (241). Les répétitions inversées droites du transposon Tn6229 (IRR : TTACGTTGGTTTTTCGGTTCCATTGCTCCCCAAACCCC) ont été trouvées pour quatre isolats, en aval du gène codant la transposase du transposon, alors que les répétitions inversées gauches, localisées en amont du gène codant la resolvase du transposon (IRL : GGGGTTTGGGGAGCAATGGAACCAAAAACCAACGTAAG) étaient absentes de tous les isolats. Il est intéressant de noter que la région terminale en amont du transposon Tn6229 a été interrompue dans tous les isolats par des gènes tronqués codant des IS ou des transposases *tnpA*,

ce qui a entraîné la disparition de la résolvasse *tnpR* de ce transposon dans trois isolats. Dans l'étude de Shi *et al.*, les auteurs ont décrit trois isolats de *K. pneumoniae* ST15 possédant les gènes *rmtF* et *bla_{OXA-232}* isolés en Chine (234). Le plasmide p2 de réplicon incFIB portant *rmtF*, était similaire à pPMK1-B (GenBank CP008931), sauf au niveau d'une région de multirésistance (MRR) de 16,8 kb portant tous les gènes de résistance du plasmide p2 (*rmtF*, *aac(6')-Ib*, *cat* et *arr-2*) et similaire à celle décrite sur le transposon Tn6229 (16,8 kb). Cette observation est un argument en faveur de la capacité de mobilisation de ce locus. Par ailleurs, les auteurs ont comparé ce locus *rmtF* aux loci portant *rmtF* sur 17 plasmides entièrement séquencés disponibles dans Genbank (16 de type IncF et un IncR). Cette comparaison montrait que cette structure était conservée entre les plasmides, notamment la partie *aac(6')-Ib-rmtF-IS91* présente chez l'ensemble des plasmides, mais que les parties en amont, et dans une moindre mesure en aval, pouvaient diverger, notamment avec la disparition de la résolvasse *tnpR* du transposon remplacée par des IS, comme observé dans notre étude.

L'*IS91*, à proximité de *rmtF*, correspondait à une séquence de type ISCR identique à 96% à ISCR21 (GenBank CP003022) décrit dans le transposon Tn125 impliqué dans la mobilisation de *bla_{NDM-1}* chez *A. baumannii* (378). La séquence *oriIS* putative, définissant l'origine de répllication de cet élément de type ISCR, a été identifiée 236 pb en aval du gène, et présentait un degré élevé d'identité avec celle de ISCR5 (19/21 pb identiques) appartenant au même groupe de ISCR que ISCR21. De plus, le pourcentage de GC était très proche entre cette séquence et *rmtF* (respectivement, 68% et 67,5%). L'ensemble de ces données permettent de penser que le gène *rmtF* a été initialement mobilisé par un processus de transposition en cercle roulant médié par cette transposase à partir d'un progéniteur bactérien encore inconnu et s'intégrant au sein de Tn6229 contenant initialement un intégron de classe 1.

Les gènes codant des carbapénémases étaient retrouvés sur des plasmides précédemment décrits. Les gènes *bla_{OXA-232}* étaient hébergés sur des plasmides ColKP3 identiques au plasmide pOXA-232 précédemment décrit (379). Le gène *bla_{OXA-48}* était retrouvé sur un plasmide de 63 kb IncL identique au plasmide épidémique pOXA-48a (380). Le gène *bla_{NDM-1}* était localisé sur un plasmide de 118 kb de type IncFII_{K2} identique (couverture 99%, identité 100%) au plasmide p2 (Genbank CP009115) retrouvé aux Etats-Unis dans une *K. pneumoniae* ST395 isolée de l'urine d'un patient provenant d'Egypte (381). Les environnements génétiques de ces gènes étaient également similaires à ceux précédemment décrits, notamment autour de *bla_{NDM-1}* retrouvé dans des Tn125 rémanents (382).

Par ailleurs, une à trois copies du gène *bla*_{CTX-M-15} toujours précédé de *ISEcp1* ont été trouvées sur le chromosome des cinq isolats de *K. pneumoniae* comme cela a été signalé précédemment chez les *K. pneumoniae* producteurs de *rmtF* isolés dans les EAU (236). En outre, le gène *bla*_{CTX-M-15} était également porté par les deux plasmides IncR possédant également *rmtF*.

En conclusion, la diffusion du gène *rmtF* au niveau mondial semblent particulièrement associée à certains clones de *K. pneumoniae* producteurs de carbapénémase, ayant également diffusés en France. L'association de ce gène de résistance avec des gènes de carbapénémases empêchent l'utilisation de la plupart des antibiotiques. Des études génomiques utilisant un nombre de génomes plus important permettraient de mieux comprendre les mécanismes de diffusion du gène *rmtF* au sein de ces clones, et de mettre en place des stratégies pour limiter leurs propagations.

2.3 CHAPITRE III : Caractérisation génomique des *P. aeruginosa* producteurs de RMTase isolés au groupe hospitalier Saint-Louis-Lariboisière-Fernand Widal à Paris.

2.3.1 Introduction à la publication n°3

Dans la continuité de nos travaux sur la caractérisation génomique des *E. coli* producteurs de RMTase, nous avons étudié les *P. aeruginosa* producteurs de RMTase provenant de la collection de souches des hôpitaux Saint-Louis – Lariboisière – Fernand Widal.

Au niveau mondial, peu d'études se sont intéressées aux RMTases produites par les souches de *P. aeruginosa*. Historiquement, la seconde RMTase, RmtA, décrite en 2003, a été retrouvée dans une souche de *P. aeruginosa* isolée d'un crachat en 1997 au Japon (145). Depuis cette description, on compte dans la littérature seulement une trentaine d'articles faisant référence à des *P. aeruginosa* produisant une RMTase pour la plupart isolées dans des pays situés en Asie (Corée du Sud, Japon, Chine, Népal, Inde, Myanmar, Vietnam) et possédant une variété de gènes (*rmtA*, *armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*), soulignant l'existence d'un possible réservoir de bactéries productrices de RMTase dans cette région du monde (157, 176, 182, 184, 185, 196, 206, 373, 383–385). Des *P. aeruginosa* producteurs de RMTase ont également été fréquemment identifiés au Brésil, avec la particularité que ces isolats étaient souvent producteurs de la carbapénémase SPM-1 (*São Paulo metallo-β-lactamase*), et seuls les gènes *rmtD* et *rmtG* ont été décrits (249, 386–388). La première description en Europe a été faite au Royaume-Uni en 2016, elle correspondait à un *P. aeruginosa* ST277 producteur de SPM-1 et RmtD1, retrouvé chez un patient rapatrié après avoir été hospitalisé au Brésil (286). Depuis, seulement deux études ont décrit des *P. aeruginosa* producteurs de RMTase en Europe. L'étude de Bour *et al.*, décrit deux *P. aeruginosa* producteurs de RmtF2 retrouvés chez des patients rapatriés de l'île Maurice et d'Afghanistan (245). L'étude de Taylor *et al.*, a identifié 19 *P. aeruginosa* producteurs de RMTase, isolés au Royaume-Uni ou en Irlande, dans la collection du centre de référence de la résistance aux antibiotiques britannique (AMRHAI Reference Unit) (205).

Dans ce contexte, nous avons recherché des isolats de *P. aeruginosa* producteurs de RMTase dans notre collection afin de décrire l'épidémiologie moléculaire de cette résistance dans cette espèce en France.

Pour cette étude, nous avons sélectionné les isolats de *P. aeruginosa* résistants aux AG isolés dans les hôpitaux Saint-Louis et Lariboisière – Fernand Widal entre 2011 et 2021. Nous avons

identifié 119 *P. aeruginosa* présentant un haut niveau de résistance (CMI \geq 256 mg/L) aux AG (amikacine, gentamicine et tobramycine). Ces 119 isolats ont été séquencés en technologie Illumina afin d'identifier les isolats producteurs de RMTase et caractériser leurs génotypes de résistance.

Nous avons identifié 27 *P. aeruginosa* producteurs de RMTase (23%, 27/119) parmi les isolats résistants à haut niveau aux AG. La prévalence de *P. aeruginosa* producteurs de RMTase sur la période était de 0,26% (27/10399). Les gènes de RMTase les plus fréquemment retrouvés étaient *rmtF2* (n = 20) suivie de *rmtB4* (n = 5), *armA* et *rmtD3* (n = 1 pour chaque).

Selon les définitions, l'ensemble des isolats étaient considéré comme MDR, 81% (22/27) étaient XDR, et 81% (22/27) possédaient les critères de « difficile à traiter » (*Difficult-to-treat*, DTR) (389, 390). Tous les isolats étaient résistants à l'association pipéracilline-tazobactam et à la ciprofloxacine, et 93% (25/27) étaient résistants au céfépime ainsi qu'aux carbapénèmes. A l'inverse, tous les isolats étaient sensibles à la colistine et 93% (25/27) étaient sensibles au céfidérocol. Concernant les β -lactamases, 15% (4/27) des isolats produisaient une carbapénémase, exclusivement NDM-1, et toutes les souches de *P. aeruginosa* portant le gène *rmtF2* produisaient la BLSE GES-9. On peut également noter que l'isolat possédant *armA* produisaient deux β -lactamases acquises, CMY-6 et OXA-10. Les gènes codant une RMTase étaient associés à au moins un gène codant une AME dans tous les isolats, majoritairement les enzymes codées par les gènes *aac(6')-Ib* (78%, 21/27) et *ant(2'')-Ia* (70%, 19/27).

L'analyse phylogénétique des 27 isolats a montré que les isolats appartenait à six ST différents avec le ST235 très largement majoritaire (67%, 18/27). Nous avons ensuite comparé ces 27 génomes à 43 génomes de *P. aeruginosa* producteurs de RMTase décrits dans la littérature et deux génomes de *P. aeruginosa* ST235 ne produisant pas de RMTase isolés au laboratoire. Au total, 15 ST différents ont été identifiés, incluant sept ST retrouvés dans au moins deux pays et trois ST chez lesquels plusieurs gènes de RMTase ont été retrouvés. Un arbre phylogénétique basé sur les SNP du core-génome (121487 SNP) a permis d'identifier deux clusters (ST235 et ST773) nous faisant suspecter des cas de transmissions hospitalières pour ces isolats.

Pour caractériser précisément les environnements génétiques de ces souches, neuf isolats (cinq ST différents) ont été séquencés également avec une technique long read par Nanopore, en plus de leur séquençage short read en Illumina.

L'analyse de l'environnement génétique de *armA* montrait une structure proche du Tn1548 précédemment décrit chez les Enterobacterales (191). Le contig possédant *armA* possédait

également des gènes retrouvés sur le chromosome de *P. aeruginosa* suggérant que le gène *armA* était localisé sur le chromosome. Il est intéressant de noter que qu'une structure également proche de Tn1548 était également retrouvée dans un plasmide pBM413 provenant d'un *P. aeruginosa* isolé en Chine (183).

Concernant *rmtB4*, l'environnement génétique retrouvait des copies directes de *ISCR14/24* entourant ce gène, comme précédemment décrit dans un *P. aeruginosa* ST773 (391). Dans les trois isolats ST773, les gènes *rmtB4* et *bla_{NDM-1}* étaient insérés sur une structure de type ICE proche de l'ICE6660, excepté au niveau d'une région variable cargo2 possédant les gènes de RMTase, précédemment décrit porteur de *rmtD3* chez *P. aeruginosa* ST234 en Pologne (225). De manière intéressante, une structure similaire à ICE6660 a été identifié dans l'isolat producteurs de *rmtD3* avec également des différences au niveau des régions variables cargo1 et cargo2.

Deux nouveaux environnements génétiques ont été identifiés pour le gène *rmtF2* dans l'isolat MLPA31 appartenant au ST357 et dans les isolats de *P. aeruginosa* ST235. Chez MLPA31, l'environnement génétique était identique à celui précédemment décrit dans un *P. aeruginosa* au Royaume-Uni excepté l'insertion de *ISPa21* en amont de *rmtF2* (181). Cet environnement présentait une structure très proche de Tn6229 possédant *rmtF1* et précédemment décrit chez *K. pneumoniae* (241). Dans les isolats appartenant au ST235 séquencés en technologie short et long read, le gène *rmtF2* était retrouvé sur une structure de type ICE possédant le squelette de ICE_{clc}(B13) retrouvé chez *P. aeruginosa* (224). Pour les 15 isolats ST235 séquencés uniquement en Illumina, les contigs portant *rmtF2* étaient similaires à la séquence retrouvée chez MLPA82 séquencée par méthode long read. Concernant ces 15 isolats la localisation plasmidique ou chromosomique n'a pas pu être déterminée.

PUBLICATION 3

Genomic characterization of 16S rRNA methyltransferase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Paris, France

Projet de manuscrit, 2022

Mathilde Liberge*, **François Caméléna***, Manel Merimèche, and Béatrice Berçot

*Ces auteurs ont contribué à parts égales à ce travail.

2.3.2 Publication n°3

1 **Genomic characterization of 16S rRNA methyltransferase-producing *Pseudomonas***
2 ***aeruginosa* isolates from Paris, France**

3 Mathilde Liberge^{1,2*}, François Caméléna^{1,2*}, Manel Merimèche^{1,2}, Béatrice Bercot^{1,2}

4 ¹Department of Bacteriology, Saint-Louis-Lariboisière Hospital Group, Assistance Publique -
5 Hôpitaux de Paris, Paris, France;

6 ²Université de Paris Cité, INSERM 1137, IAME, Paris, France;

7 *These authors contribute equally to this work.

8 **Background:** The acquisition of 16S rRNA methyltransferase (16S-RMTase) gene confers
9 high-level resistance (MIC \geq 256 mg/L) to all clinically relevant aminoglycosides (AG).

10 **Objectives :** To detect and characterize the resistance, the phylogenetic relatedness and the
11 genetic support of 16S-RMTase genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Paris, France.

12 **Methods :** We screened *P. aeruginosa* isolates resistant to all clinically relevant AG. WGS was
13 performed on clinical isolates with high-level AG resistance to identify and characterize 16S-
14 RMTase producers.

15 **Results :** 16S-RMTase genes were found in 23% (27/119) of high-level AG resistant isolates.
16 The most frequent 16S-RMTase gene identified was *rmtF2* (20/27) followed by *rmtB4* (5/27),
17 and single isolate harbored *armA* and *rmtD3*. Carbapenemase genes were found in 15% (4/27)
18 of isolates, exclusively *bla_{NDM-1}*. Twenty-two isolates were XDR and six different STs were
19 identified among 16S-RMTase producers including high-risk clones (ST235, ST308 and
20 ST357). Comparison with internationally identified 16S-RMTase-producing *P. aeruginosa*
21 isolates show phylogenomic diversity, with 15 different STs, notably for RmtB4 and RmtF2
22 producers. The *rmtF2* gene was associated to *bla_{GES-9}* and located in a structure similar to
23 Tn6229 transposon inserted in a variable region of an integrative and conjugative elements
24 (ICE). The *rmtB4* and *rmtD3* gene were flanked by ISCR elements inserted in an ICE structure
25 related to ICE6660. The genetic environment of *armA* was partially similar to the Tn1548
26 transposon.

27 **Conclusion :** 16S-RMTase genes were linked to efficient mobile genetic element including
28 ICE. Dissemination of 16S-RMTase in high-risk clones argues for the need to reinforce the
29 surveillance of this resistance.

30

31 **Introduction**

32 *Pseudomonas aeruginosa* is one of the major causes of nosocomial infection, notably in patients
33 hospitalized in intensive care unit (1). This pathogen has the capacity to develop resistance to
34 almost all available antibiotics by selection of mutation in chromosomal genes involve in
35 permeability defects, efflux overproduction and expression of β -lactamase. This pathogen can
36 also acquire resistance gene from transferable resistance determinants, particularly those
37 encoding carbapenemase gene and resistance to aminoglycosides (AGs).

38 AGs are broad-spectrum antibiotics widely used in combination with β -lactams to treat severe
39 infections due to MDR *P. aeruginosa*. Several mechanisms of AGs resistance in Gram-negative
40 bacteria exist : (i) inactivation of the antibiotic by AG-modifying enzyme (AME), (ii) increases
41 in efflux notably with the upregulation of MexXY-OprM efflux pump system, (iii) decreases in
42 permeability and (iv) target modification (2, 3). The latter mechanism involves the post-
43 transcriptional modification of 16S rRNA by 16S rRNA methyltransferase enzymes (16S-
44 RMTases), abolishing interaction between the antibiotic and its target (4). These enzymes
45 confer high-level resistance (MIC \geq 256 mg/L) to all clinically relevant AGs, including
46 plazomicin. Since their first description in Enterobacterales in the early 2000s (5), 11 acquired
47 16S-RMTase genes have been described (*armA*, *rmtA-rmtH*, *npmA-npmB*) (6, 7).

48 The first 16S-RMTase identified in *P. aeruginosa* was *rmtA*, isolated in Japan from a sputum
49 sample (8). Since then, 16S-RMTase-encoding genes have been reported worldwide in *P.*
50 *aeruginosa* clinical isolates, mostly in Asia but also in South America, North Africa and Europe
51 (9–13). In France, four *P. aeruginosa* producing the class C β -lactamase PAC-1 and the 16S-
52 RMTase RmtF2 isolated from patients repatriated from Asia were recently reported. However,
53 the molecular epidemiology of 16S-RMTase-producing *P. aeruginosa* in France remains
54 unknown.

55 The aim of this study is to identify and phenotypically and genotypically characterize 16S-
56 RMTase-producing *P. aeruginosa* isolates collected in two Parisian university hospital (Saint-
57 Louis and Lariboisière hospitals) in France.

58

59 **Materials and methods**

60

61 **Clinical isolates.** A retrospective study was conducted between January 2011 and December
62 2021 in the Saint-Louis – Lariboisiere hospitals. *P. aeruginosa* isolates responsible for
63 colonization or infection and classified as resistant to all AGs tested (gentamicin, amikacin and
64 tobramycin) according to EUCAST recommendations were collected. Isolate identification was
65 performed by MALDI-TOF MS using VITEK MS (Biomérieux, Marcy l’Etoile, France) or
66 Microflex LT MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germanic) according to the manufacturer’s
67 instructions.

68

69 **Antimicrobial susceptibility testing.** To identify high level of resistance to all AGs (MIC \geq
70 256 mg/L), *P. aeruginosa* isolates were first selected on Mueller-Hinton agar supplemented
71 with both amikacin and gentamicin (30 mg/L each). For isolates growing on this medium, MICs
72 of AGs (amikacin, gentamicin and tobramycin) were determined by Etest strips (bioMérieux,
73 Marcy-l’Etoile, France). All isolates with high levels of resistance (MIC \geq 256 mg/L) to the
74 three AGs tested with Etest were suspected to produce 16S-RMTases and were sequenced.
75 MICs of 15 relevant antibiotics were determined by broth microdilution methods (Sensititre
76 (ThermoFisher Scientific, Dardilly, France) and ComASP for cefiderocol (Liofilchem, Roseto
77 degli Abruzzi, Italy)) for 16S-RMTases isolates and interpreted according to EUCAST v12.0.

78

79 **Sequencing analysis** Whole genomes of all *P. aeruginosa* isolates harboring high levels of
80 resistance to the three AG tested were sequenced using Illumina platforms. DNA was isolated
81 with the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) or with
82 automated QIA Symphony extraction (QIAGEN, Crawley, UK) using DSP DNA Mini Kit
83 (QIAGEN) according to manufacturer’s instructions. The Nextera DNA Sample Preparation
84 Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) was used to prepare libraries for sequencing. Samples
85 were sequenced on an Illumina NextSeq or MiSeq sequencer, for 300 cycles (150 paired-end
86 reads). All the WGS reads were assembled *de novo* with SPAdes v3.14 (14). For isolates
87 sequenced also by MinIon (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK), DNA was extracted
88 using the NucleoMag 96 Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Nanopore (Oxford,
89 UK) sequencing was performed using the Rapid Barcoding kit SQK- RBK004 and a MinION
90 device with a R9.4 flowcell. Hybrid assembly of the Illumina and Nanopore sequences was
91 performed using Unicycler software (v0.4.0) (15). The resistome was evaluated for each isolate
92 with CARD and ResFinder databases (16, 17). Contigs were screened for replicon plasmid

93 content with PlasmidFinder (18). Multilocus sequence typing (MLST) and ribosomal MLST
94 (rMLST) were deduced, as described by the protocols of the PubMLST
95 (<https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas-aeruginosa/>) database. Insertion sequences were
96 identified by ISFinder (<https://isfinder.biotoul.fr>) (19). ICEFinder 2.0 ([http://db-
97 mml.sjtu.edu.cn/ICEberg/](http://db-mml.sjtu.edu.cn/ICEberg/)) was used to identify integrative and conjugative elements (ICEs)
98 (20). Genomes were annotated by prokka software (21). Genome structures were compared
99 using BLASTn and illustrated using Easyfig v2.2.2 (22).

100 To determine phylogenetic relationship between isolates, we used the genomes sequenced as
101 part of the study as well as 43 genomes of unrelated, internationally identified 16S-RMTase-
102 producing *P. aeruginosa* isolates downloaded from Genbank, and two genomes of *P.*
103 *aeruginosa* belonging to ST235 isolated in our laboratory and not producing 16S-RMTase.
104 Characteristics of these isolates are presented in supplementary materials (Table S1). Single
105 nucleotide polymorphisms (SNP) calling analysis was carried out by comparing the assembled
106 genomes to the complete reference sequence *P. aeruginosa* PA01 (Accession no. NC_002516)
107 using Parsnp v1.2 (23). Phylogenetic trees were visualized and annotated using Interactive Tree
108 of Life (iTOL) (24).

109

110 **Results**

111 **Clinical isolates.** We identified in our database 10399 non-duplicate clinical isolates of *P.*
112 *aeruginosa* among which 4.9% (506/10399) were classified as resistant to all tested AGs. Only
113 196 isolates were recovered from the laboratory strain collection and 154 grew on agar
114 supplemented with AGs. Among them, 119 isolates showed high levels of resistance (MIC \geq
115 256 mg/L) to all AGs (gentamicin, amikacin and tobramycin). All the 119 isolates were
116 sequenced and the presence of 16S-RMTase gene were detected in 23% (27/119) of isolates.
117 Flowchart of the screening of 16S-RMTase-producing *P. aeruginosa* isolates can be found in
118 the supplementary material (Fig S1). The prevalence on the period was 0.26% (27/10399) (3.2%
119 (337/10399) if we consider all missing isolates as resistant to all AGs and 16S-RMTase
120 producers). The most frequently identified 16S-RMTase genes were *rmtF2* (n=20) followed by
121 *rmtB4* (n=5), *rmtD3* (n=1) and *armA* (n=1). None of the isolates carried two 16S-RMTase
122 genes. The *rmtC*, *rmtE*, *rmtG*, *rmtH*, *npmA* and *npmB* genes were not detected.

123 The mean age of the patients from whom these 16S-RMTase-producing isolates were recovered
124 was 33 years and the sex ratio (male/female) was 1.7. The patients were hospitalized in

124 The mean age of the patients from whom these 16S-RMTase-producing isolates were recovered
125 was 33 years and the sex ratio (male/female) was 1.7. The patients were hospitalized in
126 hematology unit (56%; 15/27), in medical ICU (22%; 6/27), in burn ICU (11%; 3/27) or in
127 other units (11%; 3/27). Isolates were obtained from skin swabs (22%; 6/27), blood culture
128 (19%; 5/27), urine (19%, 5/27), respiratory samples (15%; 4/27), or samples from other sites
129 (4%; 1/27). The remaining isolates were obtained from rectal swabs screening (22%; 6/27). No
130 16S-RMTase producer was isolated from patient hospitalized at Lariboisière – Fernand Widal
131 hospitals.

132 **Phenotypic characterization.** According to the definitions, five, 22 and 22 isolates were MDR,
133 XDR and difficult-to-treat (DTR) *P. aeruginosa* isolates, respectively (25, 26). Antimicrobial
134 susceptibility testing by broth microdilution revealed that all 16S-RMTase-producing *P.*
135 *aeruginosa* isolates were resistant to piperacillin-tazobactam and ciprofloxacin. Only two (7%,
136 2/27) isolates were susceptible to carbapenems, they were also the only isolates susceptible to
137 cefepim (LIMPA26 and MLPA15). Fifteen (56%, 15/27) and 25 (93%, 25/27) isolates were
138 resistant to the associations ceftazidim-avibactam and ceftolozan-tazobactam, respectively.
139 Imipenem-relebactam were active in 56% (14/25) of imipenem-resistant isolates. The
140 association meropenem-vaborbactam did not restore the activity of meropenem. Two isolates
141 (7%, 2/27) were resistant to cefiderocol and remained susceptible only to aztreonam (1/2),
142 colistin and fosfomycin (MLPA115 and MLPA88). Fosfomycin was resistant in only two
143 isolates (7%, 2/27) which were susceptible to only colistin and cefiderocol. All 16S-RMTase-
144 producing *P. aeruginosa* isolates were susceptible to colistin. All MICs results were presented
145 in Table S2.

146 **Resistance genes in the 16S-RMTase producers.** 16S-RMTases genes were associated with
147 at least one additional AME gene in all isolates, with *aac(6')-Ib* (78%, 21/27) and *ant(2'')-Ia*
148 (70%, 19/27) being the most frequently detected (Table 1). All isolates carrying the 16S-
149 RMTase gene *rmtF2* harbored the *bla_{GES-9}* gene encoding a class A extended-spectrum β -
150 lactamase (ESBL). The only carbapenemase gene detected was *bla_{NDM-1}* in four isolates
151 including three *rmtB4*-positive and the *rmtD3*-positive isolates. The only ArmA-producing
152 isolate also carried *bla_{CMY-6}* and *bla_{OXA-10}* β -lactamase genes. Other acquired antibiotic
153 resistance genes that were commonly identified in the 16S-RMTase-positive isolate were *dfr*
154 (78%, 21/27), *sul1* (96%; 26/27), *catB* (93%, 25/27), *floR* (22%; 6/27), *mph(D)* (67%, 18/27)
155 and *tet(G)* (22%; 6/27) (Table 1). Additionally, the previously described QRDR mutations
156 GyrA T83I and ParC S87L were found in 26 (96%, 26/27) isolates each.

157 **Phylogenetic analysis of 16S-RMTase-producing *P. aeruginosa* isolates.** The 27 16S-
158 RMTase-producing *P. aeruginosa* isolates belonged to six different STs. The most frequently
159 identified ST were ST235 (67%; 18/27), followed by ST773 (11%; 3/27), ST316 (7%; 2/27),
160 ST357 (7%; 2/27) and ST308 and ST709 (4%; 1/27, each) (Table 1). All the ST235 were RmtF2
161 producers, while the two remaining belonged to ST357. For the five isolates harboring *rmtB4*,
162 three and two belonged to ST773 and to ST316, respectively. The RmtD3- and ArmA-
163 producing *P. aeruginosa* isolates were singleton and belonged to ST308 and ST709,
164 respectively.

165 The 27 16S-RMTase-producing *P. aeruginosa* isolates were compared with 43 internationally
166 isolated 16S-RMTase producers (from China, Nepal, Myanmar, Brazil, United Kingdom,
167 Ireland and France) and two *P. aeruginosa* ST235 not producing 16S-RMTase. All the genomes
168 were isolated from human samples. For the core genome-based phylogeny, 121487 SNP sites
169 were identified, leading to clusters consistent with the inferred STs (Figure 1). Population
170 structure analysis based on MLST unveiled genetic diversity among the 16S-RMTase-
171 producing *P. aeruginosa* isolates, with different 15 STs. We observed that the ST identified in
172 our study were also detected in other countries, except for the MLPA33 isolate producing ArmA
173 belonging to ST709. Within ST308, our isolate CL35 had the same 16S-RMTase as isolate 61
174 from the UK. Similarly, the three isolates belonging to ST773 also had the same 16S-RMTase
175 as isolate JUNP12 isolated from Nepal. On the other hand, ST357, ST316 and ST235 isolates
176 harboring different RMTase genes, up to 5 different genes for ST357, found mainly in the UK.
177 Among the 15 STs, seven STs were identified in several countries, six of which are described
178 in France (five in this study). All ST664 isolates harbored *rmtF2* gene and differed by a
179 maximum of 81 SNPs. Both ST308 isolates possessed *rmtD3* and *bla_{NDM-1}* genes and differed
180 by 27 SNPs. The four ST773 isolates had *rmtB4* and *bla_{NDM-1}* genes and differed from them by
181 8-41 SNPs. The number of SNPs observed in ST773 is mainly due to the isolate JUNP13 from
182 Nepal as French isolates differed only by 8-14 SNPs. In this cluster, transmission events were
183 considered possible as two patients were hospitalized in the same unit at the same time. The
184 three isolates were from patients. ST357 isolates harboring different 16S-RMTase and β -
185 lactamase genes differed by 35-315 SNPs. All of them were isolated in Europe. ST1047 isolates
186 harbored mainly *rmtF2* genes and differed by 1-82 SNPs. Among them, seven isolates differed
187 by only 1-9 SNPs and were isolated in Nepal in 2019. ST316 isolates harbored four different
188 16S-RMTase genes and differed by a maximum of 689 SNPs, mainly due to the MLPA15
189 isolates, which differed from the others by 620-689 SNPs. ST235 isolates harbored three

190 different 16S-RMTase genes and differed by 2-152 SNPs. French ST235 isolates differed by 2-
191 71 SNPs and RmtF2-producing isolates differed by 2-37 SNPs. In this cluster, the patients were
192 hospitalized between 2014 and 2019 in three different units, mainly in hematology unit (78%,
193 14/18), therefore, transmission was considered possible.

194

195 **Genetic environment of the 16S-RMTase-encoding genes.** Analysis of the genetic
196 environment of *armA* identified the gene on an 8656-bp contig which was partially similar to
197 the Tn1548 (accession no. AF550415) previously described in *Enterobacteriales* (Fig 2a). In
198 MLPA33, *ISEc29* was truncated by an insertion of IS26, the sequence downstream
199 corresponded to *P. aeruginosa* chromosomal genes. The sequence upstream *ISCR1* was
200 unavailable due to the limit of read assembling. Interestingly, the genetic environment of *armA*
201 in the plasmid pBM413 found in a *P. aeruginosa* (accession no. CP016215), isolated from a
202 sputum in China, was also close to the Tn1548 and diverge only by the insertion of two *IS1399*,
203 the fluoroquinolone resistant gene *qnrVC6*, and a different cassette genes array in the class 1
204 integron (Fig 2).

205 The genetic environment of *rmtB4* was the same as previously described in the *P. aeruginosa*
206 strain ST773 chromosome (accession no. CP041945.1) with *rmtB4* gene surrounded by two
207 direct copies of *ISCR14/24*. The upstream region of *rmtB4* in MLPA15 and LIMPA26 did not
208 carried multiple direct copies of *ISCR14/24* and *bla_{NDM-1}* gene (Fig 2b). In the three ST773
209 isolates (MLPA88, MLPA114 and MLPA115), the *rmtB4* and *bla_{NDM-1}* genes was in a 116231
210 bp-long structure inserted into a tRNA^{Gly} gene. This structure was an integrative and
211 conjugative element (ICE) close to the *ICE6660* (accession no. MK497171) previously
212 described except in the variable region cargo2 (~30 kb) located into the DNA methyltransferase
213 gene and harboring multiple resistance genes (Fig S1) (27). The *ICE6660* was found in a *P.*
214 *aeruginosa* ST234 producing *rmtD3* isolated in Poland.

215 *rmtD3* was identified on a 251358-bp contig that shared 100% identity with *P. aeruginosa* strain
216 MyNCGM481 sequence carrying *rmtD3* (accession no. LC229801) previously described (28).
217 The structure containing *rmtD3* was also similar to the *ICE6660* except in a variable region
218 cargo1 (~25 kb) located between the P4 integrase and relaxase genes (Fig S1). In addition, the
219 variable region cargo2 containing multiple resistance genes slightly differed from *ICE6660*. In
220 CL35 isolates, *bla_{NDM-1}* and *rmtD3* were in cargo2 with three *ISCR*-like elements whereas
221 *ICE6660* carried *bla_{NDM-1}*, *bla_{PME-1}* and *rmtD3* with five *ISCR*-like elements (Fig 2c and S1).

222 Two novel genetic environments were identified for the *rmtF2* gene in the MLPA31 ST357
223 isolate and in the *P. aeruginosa* ST235 isolates (MLPA29, MLPA82 and MLPA65). In the
224 MLPA31 isolate, the genetic environment was partially similar to that found in *P. aeruginosa*
225 ST654 in UK (accession no. MN991291) except the insertion of *ISPa21* and *intl1* truncated by
226 *mpA* upstream *rmtF2* (Fig 2d). The *rmtF2* gene was found in a 1649679-bp contig
227 corresponding to a part of the chromosome. This environment was also close to a region of the
228 Tn6229 harboring *rmtF1* in *K. pneumonia* (Fig 2d). In *P. aeruginosa* ST235 isolates, *intl1*,
229 *bla_{GES-9}* and *aac(6')-Ib* were found upstream of *rmtF2*, and *ISCR21* were found downstream.
230 Beyond these genes, *mpA* and *mpR* genes were found upstream and downstream (Fig 2d). The
231 *rmtF2* gene was located on the chromosome in the three isolates. The regions containing *rmtF2*
232 gene in this three isolates corresponded to ICE-related structure inserted in the vicinity of tRNA
233 genes in the chromosome. The regions varied between 80 and 120 kb and resembled also the
234 ICE_{clc(B13)} backbone (Fig S2). Notably, the putative ICE in MLP29 was similar to
235 ICE_{Pae3483} (accession no. MF168944) but differed resistance genes in cargo variable region
236 (Fig S2). For the remaining ST235 isolates (n=15) which were not sequenced by Nanopore
237 technology, the contigs carrying *rmtF2* shared 99-100% identity with the environment of
238 MLPA82 except for LIMPA14. In this latter, *rmtF2* was located at the end of the contig and
239 only the downstream region of *rmtF2* was present, which was similar to that found in MLPA31.
240 For the 15 remaining isolates, the location of *rmtF2* gene could not be determined due to lack
241 of plasmid- or chromosome-specific genes on the contig.

242 **Discussion**

243 Worldwide dissemination of MDR *P. aeruginosa* is a serious public health problem. 16S-
244 RMTase production is not the most common AG resistant mechanism, even in isolates showing
245 high level of resistance, but the presence of these genes in widely disseminated clones is of
246 concern. Moreover, these 16S-RMTase producers often present resistance to most of the
247 antibiotics by acquisition of resistance gene and chromosomal mutations. This study provides
248 novel important insights on the prevalence, molecular epidemiology and genetic support of
249 16S-RMTases in clinical *P. aeruginosa* isolates from hospitals located in Paris. Notably, about
250 80% of these isolates met the XDR criteria and the recently proposed DTR criteria reinforcing
251 the need to control the spread of this resistance. To note, DTR *P. aeruginosa* prevalence was
252 established at 2.3% in US hospitals and at 13.2% in European intensive care units, in recent
253 studies (26, 29).

254 The prevalence of 16S-RMTases-producing *P. aeruginosa* isolates accounted for 0.26% (to
255 3.2% if we consider all missing isolates (n=352) as 16S-RMTase producers) of all *P.*
256 *aeruginosa* isolates and for 5.3% (27/506) and 23% (27/119) of the AG-resistant and of the
257 high level of AG resistance isolates, respectively. In Japan, a study has reported a prevalence
258 of 0.08% (n=384) of 16S-RMTases in a multicentric collection of 18037 *P. aeruginosa* isolated
259 in 2004 (30). However, only five RMTase genes were described at this time resulting in a
260 reduction of the prevalence rate. Recently, Taylor *et al* found a prevalence of 8.6% (19/221) of
261 *P. aeruginosa* harbored 16S-RMTase genes among high level pan-AG resistant isolates (31).
262 In comparison, the prevalence of 16S-RMTases in Enterobacterales is slightly lower than that
263 observed in our study: 0.12% (19/15386), 0.15% (6/4080) and 0.12% (66/56172) in Belgium,
264 Greece and the United Kingdom, respectively (13, 32, 33). These results suggest that the high
265 level of resistance to AG are mostly generate by 16S-RMTase non-related mechanisms, such
266 as combination of AME and efflux pumps, and that the 16S-RMTase genes were slightly more
267 frequent in *P. aeruginosa* than in Enterobacterales.

268 The most frequent 16S-RMTase genes in our collection were *rmtF2* followed by *rmtB4*. The
269 16S-RMTase gene variants (*rmtF2*, *rmtB4* and *rmtD3*) were rarely reported and almost
270 exclusively in *P. aeruginosa* isolates in Nepal, Myanmar, Poland, United Kingdom and France
271 (10, 27, 31, 34–36). In our study, RmtF2-producing *P. aeruginosa* ST235 presented less than
272 40 SNPs difference, suggesting possible bacterial transmission events between patients
273 hospitalized in hematological unit over the years, resulting in the overrepresentation of *rmtF2*
274 gene. We also identified one *P. aeruginosa* harboring *armA*. Although *armA* was the most
275 described 16S-RMTase gene, principally in Enterobacterales and *Acinetobacter baumannii*, it
276 has been rarely report in *P. aeruginosa*, mainly in Asia (3, 9, 37, 38).

277 The 16S-RMTase were associated with carbapenemase genes mainly in Enterobacterales but
278 recent reports suggest also this association in *P. aeruginosa* (3, 13, 35). Carbapenemase genes
279 were identified in 15% (4/27) of *P. aeruginosa* including three RmtB4 and the single RmtD3
280 producers, exclusively NDM-1 carbapenemase. This association was more pronounced in a
281 study in United Kingdom where 89% (17/19) of 16S-RMTase-producing *P. aeruginosa* also
282 produced a carbapenemase, mostly VIM-2 and NDM-1 (13). However, this association seems
283 to vary between regions as in Nepal, only 8% (1/12) of *P. aeruginosa* producing 16S-RMTase
284 also produced a carbapenemase. In our study, *bla_{GES-9}* was the most frequently found acquired
285 β -lactamase gene (20/27, 74%) and it was identified exclusively in *P. aeruginosa* ST235
286 producing RmtF2. This gene encodes a class A ESBL enzyme and it has recently report in

287 RmtF2- and NDM-1-producing *P. aeruginosa* ST654 from United Kingdom and RmtF2-
288 producing *P. aeruginosa* ST1203 in Nepal (13, 35). In France, this gene was firstly identified
289 in *P. aeruginosa* in 2004, and recently, it was identified in *P. aeruginosa* ST235 resistant to the
290 associations ceftazidim-avibactam and ceftolozan-tazobactam (39, 40).

291 Six different STs were identified among the 27 *P. aeruginosa* isolates producing 16S-RMTase,
292 among which three were considered as high-risk clones (ST235, ST308 and ST357) (41). The
293 acquisition of 16S-RMTase genes by these clones is a matter of concern. Among the 43
294 internationally 16S-RMTase-producing *P. aeruginosa* isolates, 15 different STs were identified
295 including seven corresponding to high-risk clones (ST233, ST235, ST244, ST277, ST308,
296 ST357 and ST654) (41). Four STs, not considered as high-risk clones, were detected in at least
297 two different countries suggesting worldwide emergence of 16S-RMTase in these clones
298 (ST316, ST664, ST773 and ST1047). Interestingly, certain 16S-RMTase genes were more
299 widespread, *rmtB4* and *rmtF2* were found in seven different STs each, *rmtD3* in five, *armA* in
300 two, whereas the others were only report in a single ST each. ST235, ST316, ST357 and ST664
301 had isolates harboring 16S-RMTase gene diversity (at least three different genes), indicating
302 that these clones are particularly worrisome

303 Furthermore, the genetic environment surrounding the 16S-RMTase genes had mobile genetics
304 elements which could facilitate horizontal gene transfer. The *armA* gene was carried by a
305 structure close to the well described Tn1548 truncated by the insertion of IS26 (Figure 2a) (42).
306 This structure was partially identified due to the limit of contig generate by Illumina
307 sequencing, but the downstream sequence corresponded to chromosome-specific gene. A
308 plasmid pKB-F19-4 of 412 kb carrying *armA* was described in *P. aeruginosa* ST244 in China
309 showing a structure similar to Tn1548, which differed by the insertion of IS1394 (37). *rmtB4*,
310 *rmtD3* and *rmtF2* were identified in ICE-type structure. Notably, *rmtB4* and *rmtD3* were found
311 in a variable region cargo2 of the ICE6660 encoding multiple resistance gene including the
312 *bla_{NDM-1}* carbapenemase gene (Figure S1) (27). Multiple ISCR elements were located in the
313 vicinity of *rmtB4* and *rmtD3* genes as previously described, thus, facilitating the capture and
314 the transfer of these genes (27, 43). For RmtF2-producing *P. aeruginosa* ST235 isolates, the
315 16S-RMTase gene was located into the variable region of an ICE structure similar to
316 ICEPae3483 identified in *P. aeruginosa* isolated in Portugal. For MLPA31, *rmtF2* was
317 identified on the chromosome but we were unable to identify ICE structure. However, the
318 genetic environment was close to Tn6229 carrying *rmtF1* gene in *K. pneumoniae* (44).
319 Interestingly, the structure surrounding *bla_{GES-9}* in the vicinity of *rmtF2* was similar (70%

320 coverage, 99% identity) to the original structure described by Poirel *et al* (39). The structure
321 *aac(6')-Ib-rmtF-ISCR21* was conserved between all isolates suggesting that *ISCR21* mediated
322 the mobilization of these genes.

323 There were a number of limitation of this work including the small number of *P. aeruginosa*
324 isolates producing 16S-RMTase, the difficulty to obtain in culture all the isolates collected over
325 a long time period and potential transmission between patients, which introduce bias in the
326 epidemiological picture. Large-scale surveillance and molecular epidemiological studies are
327 required to assess the global emergence of 16S-RMTase-producing *P. aeruginosa*.
328 Furthermore, the lack of long-read sequencing did not allow us to elucidate the genetic structure
329 for all the isolates.

330 In conclusion, this is the first genomic molecular epidemiological study examining 16S-
331 RMTase-producing *P. aeruginosa* isolates in France. The results showed a diversity of 16S-
332 RMTase genes and STs including high-risk clones. The genetic environment of 16S-RMTase
333 genes involved transposons, *ISCR* elements and ICE structure. Which role ICE plays in the
334 spread of 16S-RMTase in *P. aeruginosa* warrants further investigations.

335 **Acknowledgments**

336 We would like to thank the laboratory staff for carrying out Illumina sequencing of the
337 bacterial isolates. We also wish to thank Julie Sappa of Alex Edelman & Associates for
338 careful reading and English language editing of the manuscript.

339 **Funding**

340 This work was supported by internal funding.

341 **Transparency declarations**

342 We have no conflicts of interest to declare.

343 **Supplementary data**

344 Tables S1 and S2 and Figures S1 and S2 are available as Supplementary data from *JAC* Online.

345 -

346 References

- 347 1. Behzadi P, Baráth Z, Gajdács M. 2021. It's Not Easy Being Green: A Narrative
348 Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-
349 Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot (Basel, Switzerland)* 10:1–29.
- 350 2. Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, Lomovskaya O, Plésiat P.
351 2003. MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of
352 *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1371–
353 5.
- 354 3. Wachino J-I, Doi Y, Arakawa Y. 2020. Aminoglycoside Resistance: Updates with a
355 Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am*
356 34:887–902.
- 357 4. Doi Y, Arakawa Y. 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance
358 mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 45:88–94.
- 359 5. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. 2003. Plasmid-mediated high-level resistance to
360 aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob*
361 *Agents Chemother* 47:2565–71.
- 362 6. Doi Y, Wachino J-I, Arakawa Y. 2016. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of
363 Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 30:523–
364 537.
- 365 7. Kawai A, Suzuki M, Tsukamoto K, Minato Y, Doi Y. 2021. Functional and Structural
366 Characterization of Acquired 16S rRNA Methyltransferase NpmB1 Conferring Pan-
367 Aminoglycoside Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 65:e0100921.
- 368 8. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato
369 H, Arakawa Y. 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas*
370 *aeruginosa*. *Lancet (London, England)* 362:1888–93.
- 371 9. Gurung M, Moon DC, Tamang MD, Kim J, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC. 2010.
372 Emergence of 16S rRNA methylase gene *armA* and cocarriage of *blaIMP-1* in
373 *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*
374 68:468–470.
- 375 10. Tada T, Hishinuma T, Watanabe S, Uchida H, Tohya M, Kuwahara-Arai K, Mya S,

- 376 Zan KN, Kirikae T, Tin HH. 2019. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant
377 *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Hospitals in Myanmar. *Antimicrob Agents*
378 *Chemother* 63:1–6.
- 379 11. Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. 2007. Coproduction of novel 16S
380 rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant
381 *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 51:852–6.
- 382 12. Meradji S, Barguigua A, Bentakouk MC, Nayme K, Zerouali K, Mazouz D, Chettibi H,
383 Timinouni M. 2016. Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-
384 producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria.
385 *Burns* 42:906–18.
- 386 13. Taylor E, Bal AM, Balakrishnan I, Brown NM, Burns P, Clark M, Diggle M,
387 Donaldson H, Eltringham I, Folb J, Gadsby N, Macleod M, Ratnaraja NVD V,
388 Williams C, Wootton M, Srisikandan S, Woodford N, Hopkins KL. 2021. A prospective
389 surveillance study to determine the prevalence of 16S rRNA methyltransferase-
390 producing Gram-negative bacteria in the UK. *J Antimicrob Chemother* 0:1–9.
- 391 14. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich A a., Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM,
392 Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin A V., Sirotkin A V., Vyahhi N, Tesler
393 G, Alekseyev M a., Pevzner P a. 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm
394 and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477.
- 395 15. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. 2017. Unicycler: Resolving bacterial genome
396 assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13:e1005595.
- 397 16. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, Lago BA, Dave
398 BM, Pereira S, Sharma AN, Doshi S, Courtot M, Lo R, Williams LE, Frye JG,
399 Elsayegh T, Sardar D, Westman EL, Pawlowski AC, Johnson TA, Brinkman FSL,
400 Wright GD, McArthur AG. 2017. CARD 2017: expansion and model-centric curation
401 of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 45:D566–
402 D573.
- 403 17. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A,
404 Allesoe RL, Rebelo AR, Florensa AF, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B,
405 Werner G, Bender JK, Stingl K, Nguyen M, Coppens J, Xavier BB, Malhotra-Kumar
406 S, Westh H, Pinholt M, Anjum MF, Duggett NA, Kempf I, Nykäsenoja S, Oikkola S,

- 407 Wieczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S, Ragimbeau C, Lund O,
408 Aarestrup FM. 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J*
409 *Antimicrob Chemother* 75:3491–3500.
- 410 18. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L,
411 Møller Aarestrup F, Hasman H. 2014. In silico detection and typing of plasmids using
412 PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*
413 58:3895–903.
- 414 19. Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. 2006. ISfinder: the
415 reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 34:D32-6.
- 416 20. Liu M, Li X, Xie Y, Bi D, Sun J, Li J, Tai C, Deng Z, Ou H-Y. 2019. ICEberg 2.0: an
417 updated database of bacterial integrative and conjugative elements. *Nucleic Acids Res*
418 47:D660–D665.
- 419 21. Seemann T. 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*
420 30:2068–2069.
- 421 22. Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. 2011. Easyfig: a genome comparison visualizer.
422 *Bioinformatics* 27:1009–10.
- 423 23. Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, Phillippy AM. 2014. The Harvest suite for rapid
424 core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial
425 genomes. *Genome Biol* 15:524.
- 426 24. Letunic I, Bork P. 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display
427 and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 44:W242-5.
- 428 25. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG,
429 Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB,
430 Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-
431 resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international
432 expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol*
433 *Infect* 18:268–81.
- 434 26. Kadri SS, Adjemian J, Lai YL, Spaulding AB, Ricotta E, Rebecca Prevots D, Palmore
435 TN, Rhee C, Klompas M, Dekker JP, Powers JH, Suffredini AF, Hooper DC, Fridkin
436 S, Danner RL. 2018. Difficult-to-treat resistance in gram-negative bacteremia at 173

- 437 US hospitals: Retrospective cohort analysis of prevalence, predictors, and outcome of
438 resistance to all first-line agents. *Clin Infect Dis* 67:1803–1814.
- 439 27. Urbanowicz P, Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D, Ziółkowski G, Hryniewicz W,
440 Gniadkowski M. 2019. *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -
441 lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands. *J*
442 *Antimicrob Chemother* 74:3117–3119.
- 443 28. Tada T, Shimada K, Mya S, Zan KN, Kuwahara K, Kirikae T, Tin HH. 2018. A New
444 Variant of 16S rRNA Methylase, RmtD3, in a Clinical Isolate of *Pseudomonas*
445 *aeruginosa* in Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
- 446 29. Torrens G, van der Schalk TE, Cortes-Lara S, Timbermont L, Del Barrio-Tofiño E,
447 Xavier BB, Zamorano L, Lammens C, Ali O, Ruzin A, Goossens H, Kumar-Singh S,
448 Kluytmans J, Paling F, MacLean RC, Köhler T, López-Causapé C, Malhotra-Kumar S,
449 Oliver A, ASPIRE-ICU study team. 2022. Susceptibility profiles and resistance
450 genomics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from European ICUs participating in the
451 ASPIRE-ICU trial. *J Antimicrob Chemother* 1–11.
- 452 30. Yamane K, Wachino JI, Suzuki S, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Kimura K, Kai K,
453 Ishikawa S, Ozawa Y, Konda T, Arakawa Y. 2007. 16S rRNA methylase-producing,
454 gram-negative pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis* 13:642–646.
- 455 31. Taylor E, Jauneikaite E, Sriskandan S, Woodford N, Hopkins KL. 2022. Detection and
456 characterisation of 16S rRNA methyltransferase-producing *Pseudomonas aeruginosa*
457 from the UK and Republic of Ireland from 2003-2015. *Int J Antimicrob Agents*
458 59:106550.
- 459 32. Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R,
460 Rodriguez-Villalobos H, Struelens M, Glupczynski Y. 2007. Emergence of ArmA and
461 RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob*
462 *Chemother* 59:459–64.
- 463 33. Galani I, Souli M, Panagea T, Poulakou G, Kanellakopoulou K, Giamarellou H. 2012.
464 Prevalence of 16S rRNA methylase genes in Enterobacteriaceae isolates from a Greek
465 university hospital. *Clin Microbiol Infect* 18:E52-4.
- 466 34. Tada T, Shimada K, Satou K, Hirano T, Pokhrel BM, Sherchand JB, Kirikae T. 2017.
467 *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in Nepal Coproducing Metallo- β -

- 468 Lactamases and 16S rRNA Methyltransferases. *Antimicrob Agents Chemother* 61:1–7.
- 469 35. Takahashi T, Tada T, Shrestha S, Hishinuma T, Sherchan JB, Tohya M, Kirikae T,
470 Sherchand JB. 2021. Molecular characterisation of carbapenem-resistant *Pseudomonas*
471 *aeruginosa* clinical isolates in Nepal. *J Glob Antimicrob Resist* 26:279–284.
- 472 36. Bour M, Fournier D, Jové T, Pouzol A, Miltgen G, Janvier F, Jeannot K, Plésiat P.
473 2019. Acquisition of class C β -lactamase PAC-1 by ST664 strains of *Pseudomonas*
474 *aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 63:12–15.
- 475 37. Fang Y, Baloch Z, Zhang W, Hu Y, Zheng R, Song Y, Tai W, Xia X. 2022. Emergence
476 of Carbapenem-Resistant ST244, ST292, and ST2446 *Pseudomonas aeruginosa* Clones
477 in Burn Patients in Yunnan Province. *Infect Drug Resist* 15:1103–1114.
- 478 38. Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X, Wu S, Guo Y, Wang M. 2010. Distribution of 16S
479 rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level
480 resistance to aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29:1349–53.
- 481 39. Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P. 2005. Integron-encoded GES-type
482 extended-spectrum β -lactamase with increased activity toward aztreonam in
483 *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3593–3597.
- 484 40. Fournier D, Carrière R, Bour M, Grisot E, Triponney P, Muller C, Lemoine J, Jeannot
485 K, Plésiat P, Chardon H, Decroix V, Plassart C, Nicolas-Chanoine MH, Bonnet R,
486 Boyer S, Bille E, Belmonte O, Vachée A, Olive C, Podglajen I, Lepointeur M, Joly-
487 Guillou ML, Cattoir V, Dortet L, Negre V, Wallet F, Ruimy R, Jean-Pierre H,
488 Cremniter J, de Briel DA, Dubois V, Hochard H, Gaillard JL, Grare M, van der Mee-
489 Marquet N, Colot J, Caillon J, Koebel C, Carricajo A, Armand-Lefèvre L, Dauwalder
490 O, Aissa N, Cattoen C, Leyssene D. 2021. Mechanisms of resistance to
491 ceftolozane/tazobactam in *pseudomonas aeruginosa*: Results of the GERPA multicenter
492 study. *Antimicrob Agents Chemother* 65:1–15.
- 493 41. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. 2015. The increasing threat of
494 *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 21–22:41–59.
- 495 42. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. 2005. Worldwide disseminated
496 armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon
497 Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2949–53.

- 498 43. Khan A, Shropshire WC, Hanson B, Dinh AQ, Wanger A, Ostrosky-Zeichner L, Arias
499 CA, Miller WR. 2020. Simultaneous Infection with Enterobacteriaceae and
500 *Pseudomonas aeruginosa* Harboring Multiple Carbapenemases in a Returning Traveler
501 Colonized with *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother* 64:1–6.
- 502 44. Caméléna F, Poncin T, Magnan M, Jacquier H, Merimèche M, Berçot B. 2022.
503 Detection of *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing the plasmid-encoded 16S
504 rRNA methyltransferase RmtF and carbapenemase in Paris, France. *Int J Antimicrob*
505 *Agents* 106634.

506

507 Tables and Figures

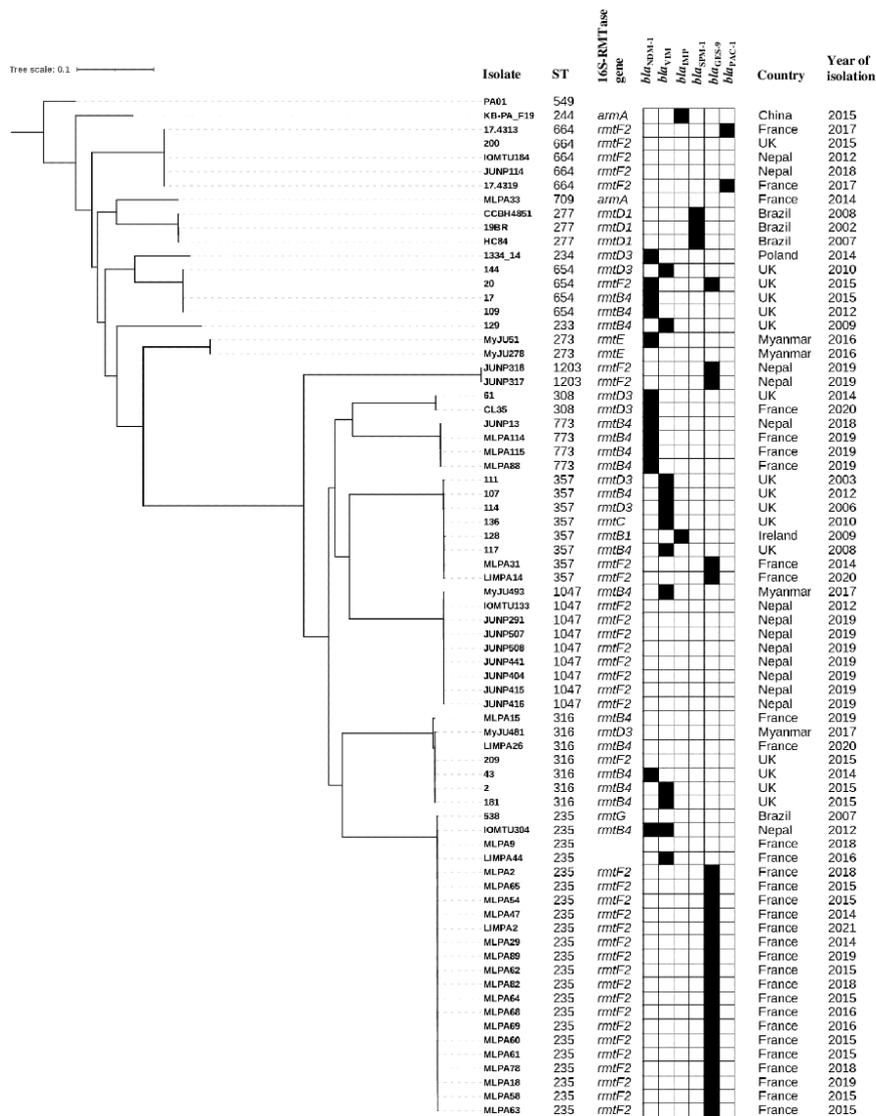
508 Table 1. Characteristics of the 27 16S-RMTase-producing *P. aeruginosa* isolates.

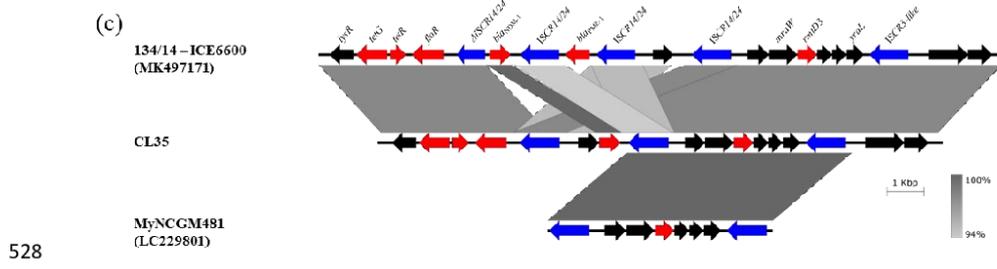
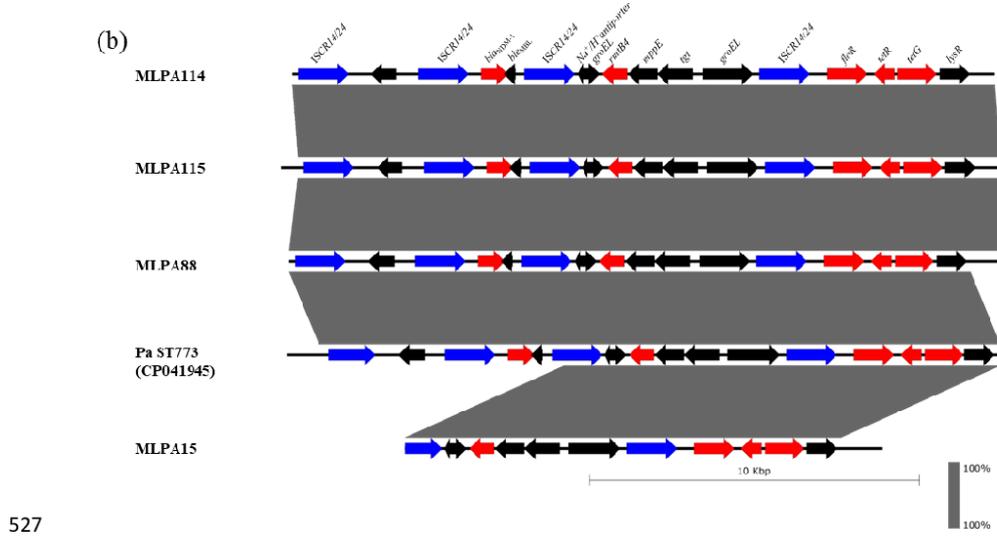
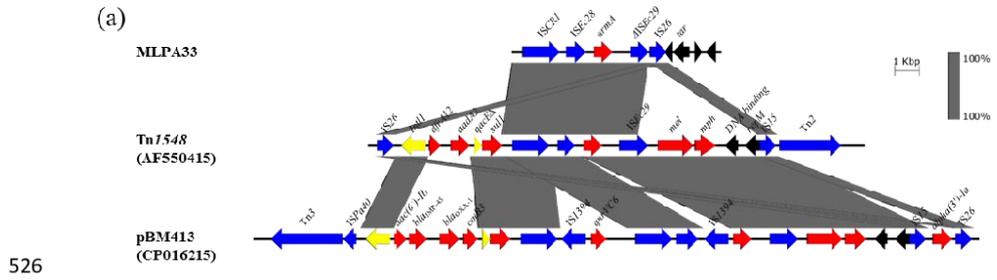
509 Figure 1. Phylogenetic tree and STs for the 27 16S-RMTase-producing *P. aeruginosa* isolates
510 found in this work and those available at GenBank. The tree is rooted on *P. aeruginosa* PA01
511 (Accession no. NC_002516). The phylogenetic tree was built from 121 487 total core SNP
512 positions with the maximum likelihood method, with parSNP.

513 Figure 2. Genetic structures surrounding 16S-RMTase genes. Comparison of the environment
514 of : (a) *armA* in MLPA33 with the Tn1548 (AF550415) and the plasmid pBM413 (CP016215)
515 found in *P. aeruginosa*; (b) *rmtB4* in MLPA114, MLPA115, MLPA88 and MLPA15 with *P.*
516 *aeruginosa* ST773 (CP041945) from US; (c) *rmtD3* in CL35 with *P. aeruginosa* MyNCGM481
517 (LC229801) from Myanmar and *P. aeruginosa* 134/14 (MK497171) from Poland and (d) *rmtF2*
518 in MLPA31, MLPA29, MLPA82 and MLPA65 with *P. aeruginosa* IOMTU487 (LC224309)
519 from Nepal, 17.4313 (MK534438) from France, 20 (MN991291) from UK, and the plasmid
520 pKP11-42 (KF295829) harboring *rmtF1* found in *K. pneumoniae*. Arrows indicate open reading
521 frames (ORFs) and their orientation. The resistance genes are shown in red as we, mobile
522 genetic elements are shown in blue, class 1 integrons are shown in yellow, and other *orf* are
523 shown in black. Gray shading indicates nucleotide identity.

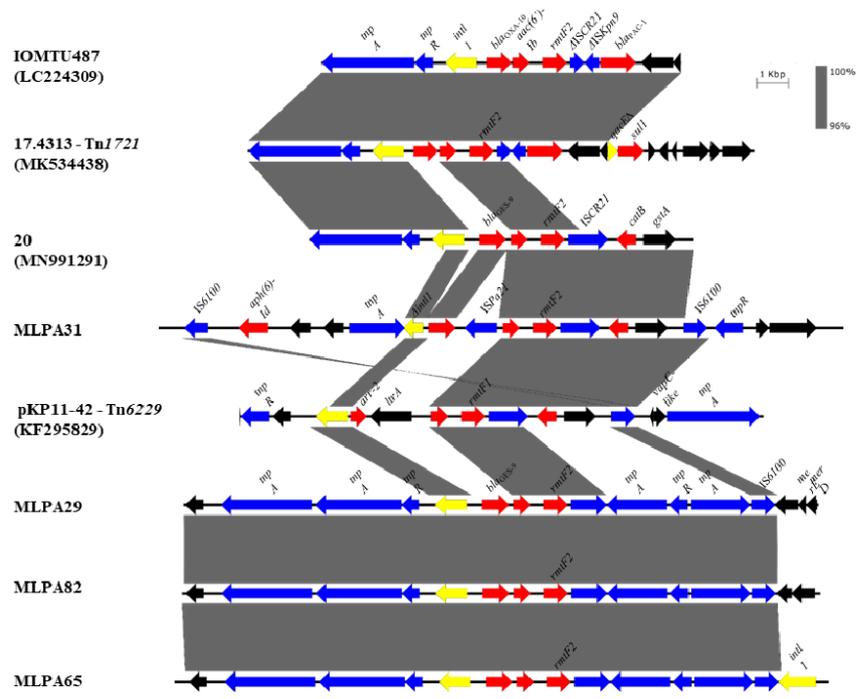
Isolate	Year of isolation	ST	16S-RMTase gene	β -lactamase gene(s)	AME genes	Mutation in QRDR		Other resistance genes
						GyrA	ParC	
MLPA33	2014	709	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{CMY-6}	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>	-	-	<i>dfrA12</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>
MLPA15	2019	316	<i>rmtB4</i>		<i>aph(3'')-I</i>	T83I	S87L	<i>sul1</i> , <i>tet(G)</i> , <i>catB</i> , <i>floR</i>
LIMPA026	2020	316	<i>rmtB4</i>		<i>aph(6)-I</i>	T83I	S87L	<i>sul1</i> , <i>tet(G)</i> , <i>catB</i> , <i>floR</i>
MLPA114	2019	773	<i>rmtB4</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>aadA10</i>	T83I	S87L	<i>sul1</i> , <i>tet(G)</i> , <i>catB</i> , <i>floR</i>
MLPA115	2019	773	<i>rmtB4</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>aadA10</i>	T83I	S87L	<i>sul1</i> , <i>tet(G)</i> , <i>catB</i> , <i>floR</i>
MLPA88	2019	773	<i>rmtB4</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>aadA10</i>	T83I	S87L	<i>sul1</i> , <i>tet(G)</i> , <i>catB</i> , <i>floR</i>
CL35	2020	308	<i>rmtD3</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>aac(3)-I</i> , <i>aadA10</i>	T83I	S87L	<i>dfrB5</i> , <i>sul(1)</i> , <i>tet(G)</i>
MLPA29	2014	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA47	2014	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA54	2015	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA58	2015	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA60	2015	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA61	2015	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA62	2015	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA63	2015	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA64	2015	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA65	2015	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA68	2016	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA69	2016	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA02	2018	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA78	2018	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA82	2018	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA18	2019	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA89	2019	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
LIMPA02	2021	235	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aadA11</i>	T83I	S87L	<i>dfrB1</i> , <i>sul1</i> , <i>catB</i> , <i>mph(D)</i>
MLPA31	2014	357	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(2'')-I</i> , <i>aph(3'')-I</i> , <i>aph(6)-I</i>	T83I	S87L	<i>sul1</i> , <i>catB</i>
LIMPA014	2020	357	<i>rmtF2</i>	<i>bla</i> _{GES-9}	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>aph(6)-I</i>	T83I	S87L	<i>dfrB5</i> , <i>catB</i>

524 ST: Sequence type; AME: Aminoglycoside-modifying enzyme; QRDR: Quinolone resistant determining regions





(d)



529

Supplementary data

Table S1. Characteristics of isolates used in phylogenetics analysis.

Isolate	ST	16S-RMTase gene	NDM	VIM	GES	IMP	SPM-1	PAC-1	Country	Year of isolation	Accession no.
129	233	RmtB4		VIM-2					UK	2009	ERR3181607
1334/14	234	RmtD3	NDM-1						Poland	2014	CP035739
538	235	RmtG							Brazil	2007	GCA_001680745.1
IOMTU304	235	RmtB4	NDM-1	VIM-2					Nepal	2012	GCA_023994435.1
LIMPA2	235	RmtF2			GES-9				France	2021	This study
LIMPA44	235	-		VIM-4					France	2016	This study
MLPA18	235	RmtF2			GES-9				France	2019	This study
MLPA2	235	RmtF2			GES-9				France	2018	This study
MLPA29	235	RmtF2			GES-9				France	2014	This study
MLPA47	235	RmtF2			GES-9				France	2014	This study
MLPA54	235	RmtF2			GES-9				France	2015	This study
MLPA58	235	RmtF2			GES-9				France	2015	This study
MLPA60	235	RmtF2			GES-9				France	2015	This study
MLPA61	235	RmtF2			GES-9				France	2015	This study
MLPA62	235	RmtF2			GES-9				France	2015	This study
MLPA63	235	RmtF2			GES-9				France	2015	This study
MLPA64	235	RmtF2			GES-9				France	2015	This study
MLPA65	235	RmtF2			GES-9				France	2015	This study
MLPA68	235	RmtF2			GES-9				France	2016	This study
MLPA69	235	RmtF2			GES-9				France	2016	This study
MLPA78	235	RmtF2			GES-9				France	2018	This study
MLPA82	235	RmtF2			GES-9				France	2018	This study
MLPA89	235	RmtF2			GES-9				France	2019	This study
MLPA9	235	-							France	2018	This study
KB-PA_F19-4	244	ArmA				IMP-45			China	2015	GCA_020771675.1
MyJU278	273	RmtE1							Myanmar	2016	GCA_021674455.1

MyJU51	273	RmtE1	NDM-1			Myanmar	2016	GCA_021674675.1
19BR	277	RmtD1			SPM-1	Brazil	2002	GCA_000223945.2
CCBH4851	277	RmtD1			SPM-1	Brazil	2008	GCA_000763245.1
HC84	277	RmtD1			SPM-1	Brazil	2007	GCA_002134825.1
61	308	RmtD3	NDM-1			UK	2014	ERR3181686
CL35	308	RmtD3	NDM-1			France	2020	This study
2	316	RmtB4		VIM-2		UK	2015	ERR3181601
43	316	RmtB4	NDM-1			UK	2014	ERR3181685
181	316	RmtB4		VIM-2		UK	2015	ERR3181612
209	316	RmtF2				UK	2015	ERR3181614
LIMPA26	316	RmtB4				France	2020	This study
MLPA15	316	RmtB4				France	2019	This study
MyJU481	316	RmtD3				Myanmar	2017	GCA_021674285.1
107	357	RmtB4		VIM-2		UK	2012	ERR3181604
111	357	RmtD3		VIM-2		UK	2003	ERR3181605
114	357	RmtD3		VIM-2		UK	2006	ERR3181689
117	357	RmtB4		VIM-2		UK	2008	ERR3181603
128	357	RmtB1			IMP-15	Ireland	2009	ERR3181606
136	357	RmtC		VIM-18		UK	2010	ERR3181608
LIMPA14	357	RmtF2			GES-9	France	2020	This study
MLPA31	357	RmtF2			GES-9	France	2014	This study
17	654	RmtB4	NDM-1			UK	2015	ERR3181602
20	654	RmtF2	NDM-1			UK	2015	ERR3181684
109	654	RmtB4	NDM-1			UK	2012	ERR3181688
144	654	RmtD3		VIM-2		UK	2010	ERR3181609
200	664	RmtF2				UK	2015	ERR3181613
17.4313	664	RmtF2				PAC-1 France	2017	NZ_SISN00000000.1
17.4319	664	RmtF2				PAC-1 France	2017	NZ_SISM00000000.1
IOMTU184	664	RmtF2				Nepal	2012	GCA_023994475.1
JUNP114	664	RmtF2				Nepal	2018	GCA_023995275.1
MLPA33	709	ArmA				France	2014	This study
1	773	RmtB4	NDM-1			UK	2015	ERR3181683

JUNP13	773	RmtB4	NDM-1		Nepal	2018	GCA_023995335.1
MLPA114	773	RmtB4	NDM-1		France	2019	This study
MLPA115	773	RmtB4	NDM-1		France	2019	This study
MLPA88	773	RmtB4	NDM-1		France	2019	This study
IOMTU133	1047	RmtF2			Nepal	2012	GCA_023994555.1
JUNP291	1047	RmtF2			Nepal	2019	GCA_023995015.1
JUNP292	1047	RmtF2			Nepal	2019	DRS151321
JUNP404	1047	RmtF2			Nepal	2019	GCA_023994835.1
JUNP415	1047	RmtF2			Nepal	2019	GCA_023994815.1
JUNP416	1047	RmtF2			Nepal	2019	GCA_023994795
JUNP441	1047	RmtF2			Nepal	2019	GCA_023994775.1
JUNP507	1047	RmtF2			Nepal	2019	GCA_023915345.1
JUNP508	1047	RmtF2			Nepal	2019	GCA_023994715.1
MyJU493	1047	RmtB4		VIM-2	Myanmar	2017	GCA_021674315.1
JUNP317	1203	RmtF2			Nepal	2019	GCA_023900115.1
JUNP318	1203	RmtF2			Nepal	2019	GCA_023994915

Table S2. Antimicrobial susceptibility of the 27 16S-RMTase-producing *P. aeruginosa* isolates.

Isolate	ST	16S-RMTase gene	MIC (mg/L)														Classification
			PTZ	CAZ	FEP	CZA	CZT	ATM	FDC	IMP	IMR	MER	MEV	COL	CIP	FOS	
MLPA33	709	<i>armA</i>	>32	>32	>16	8	>8	>32	0.5	>8	8	>16	>16	1	>8	64	XDR, DTR
LIMPA26	316	<i>rmtB4</i>	32	4	8	4	1	>32	0.064	4	2	2	1	1	>8	32	MDR
MLPA15	316	<i>rmtB4</i>	32	8	8	2	0.5	8	0.12	<1	0.25	0.25	0.25	1	>8	64	MDR
MLPA114	773	<i>rmtB4</i>	>32	>32	>16	>16	>8	16	1	>8	>8	>16	>16	2	>8	64	MDR
MLPA115	773	<i>rmtB4</i>	>32	>32	>16	>16	>8	>32	8	>8	>8	>16	>16	2	>8	64	XDR, DTR
MLPA88	773	<i>rmtB4</i>	>32	>32	>16	>16	>8	16	4	>8	>8	>16	>16	2	>8	64	MDR
CL35	308	<i>rmtD3</i>	>32	>32	>16	>16	>8	8	1	>8	>8	>16	>16	2	>8	64	MDR
LIMPA02	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	8	>8	>32	0.125	8	2	8	8	1	>8	32	XDR, DTR
MLPA02	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	8	>8	>32	0.5	>8	2	8	8	1	>8	64	XDR, DTR
MLPA18	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	16	>8	>32	0.5	>8	4	8	8	1	>8	64	XDR, DTR
MLPA29	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	8	>8	>32	0.25	8	2	8	8	1	>8	64	XDR, DTR
MLPA47	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	8	>8	>32	0.25	>8	2	8	8	1	>8	32	XDR, DTR
MLPA54	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	>16	>8	>32	1	>8	4	16	16	1	>8	64	XDR, DTR
MLPA58	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	8	>8	>32	0.25	8	2	8	8	1	>8	32	XDR, DTR
MLPA60	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	16	>8	>32	0.5	8	2	8	8	2	>8	32	XDR, DTR
MLPA61	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	16	>8	>32	0.25	8	2	8	8	1	>8	32	XDR, DTR
MLPA62	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	8	>8	>32	0.5	8	2	8	8	1	>8	64	XDR, DTR
MLPA63	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	16	>8	>32	1	8	2	16	8	1	>8	64	XDR, DTR
MLPA64	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	16	>8	>32	0.5	8	2	>16	>16	2	>8	64	XDR, DTR
MLPA65	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	>16	>8	>32	0.5	>8	>8	>16	>16	2	>8	64	XDR, DTR
MLPA68	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	16	>8	>32	0.25	>8	>8	16	16	1	>8	64	XDR, DTR
MLPA69	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	8	>8	>32	0.25	8	2	8	8	1	>8	128	XDR, DTR
MLPA78	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	8	>8	>32	0.12	8	2	8	4	1	>8	64	XDR, DTR
MLPA82	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	4	>8	32	0.25	8	2	4	4	1	>8	32	XDR, DTR
MLPA89	235	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	>16	>8	>32	0.12	>8	2	8	8	<0.5	>8	<16	XDR, DTR
LIMPA14	357	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	>16	>8	>32	1	>8	4	16	16	1	>8	>128	XDR, DTR
MLPA31	357	<i>rmtF2</i>	>32	>32	>16	>16	>8	>32	2	>8	4	>16	>16	2	>8	>128	XDR, DTR

PTZ: piperacillin-tazobactam; CAZ: ceftazidim; FEP: cefepim; CZA: ceftazidim-avibactam; CZT : ceftolozane-tazobactam ; ATM : aztreonam ; FDC : cefiderocol ; IMP : imipenem ; IMR : imipenem-relebactam ;MER :meropenem ;MEV :meropenem-vaborbactam ; COL : colistin ; CIP : ciprofloxacin ; FOS : fosfomicin ; MDR : multi drug-resistant ; XDR : extensively drug-resistant and DTR : Difficult-to-treat

Figure S1. Flowchart of the screening of 16S-RMTase-producing *P. aeruginosa* isolate.

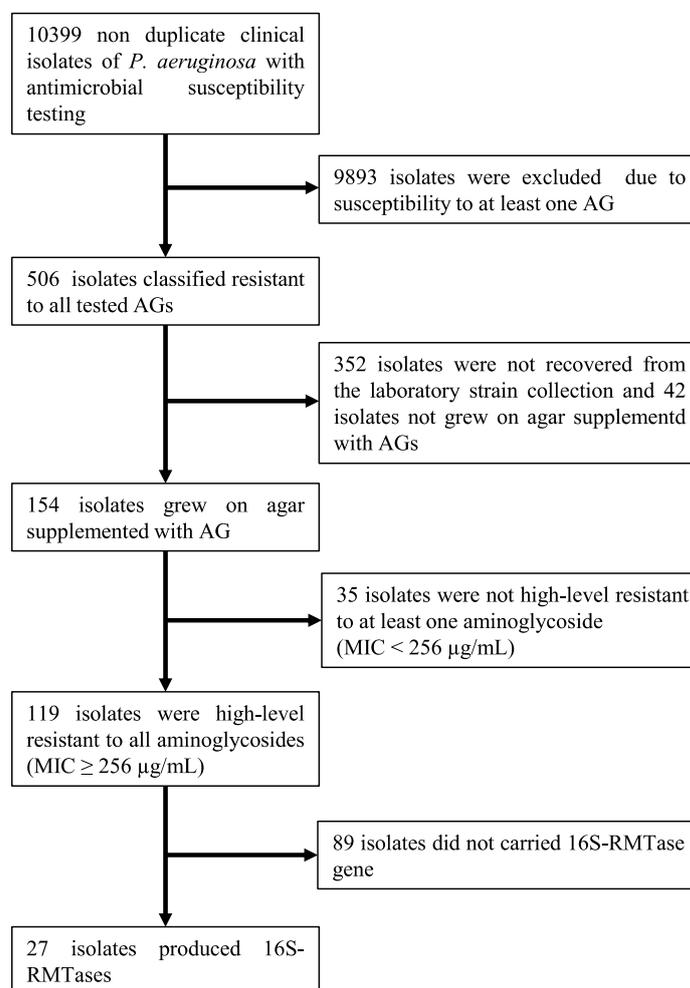


Figure S2. Genetic structures of ICE in CL35 and MLPA88 compared with ICE6660 (Accession no. MK497171) and ICE*clc*(B13) (Accession no. AJ617740). Arrows indicate open reading frames (ORFs) and their orientation. The resistance genes are shown in red, mobile genetic elements are shown in blue, ICE-related genes are shown in green, DNA methyltransferase ICE*clc*(B13) locus are shown in pink and other *orf* are shown in black. Gray shading indicates nucleotide identity.

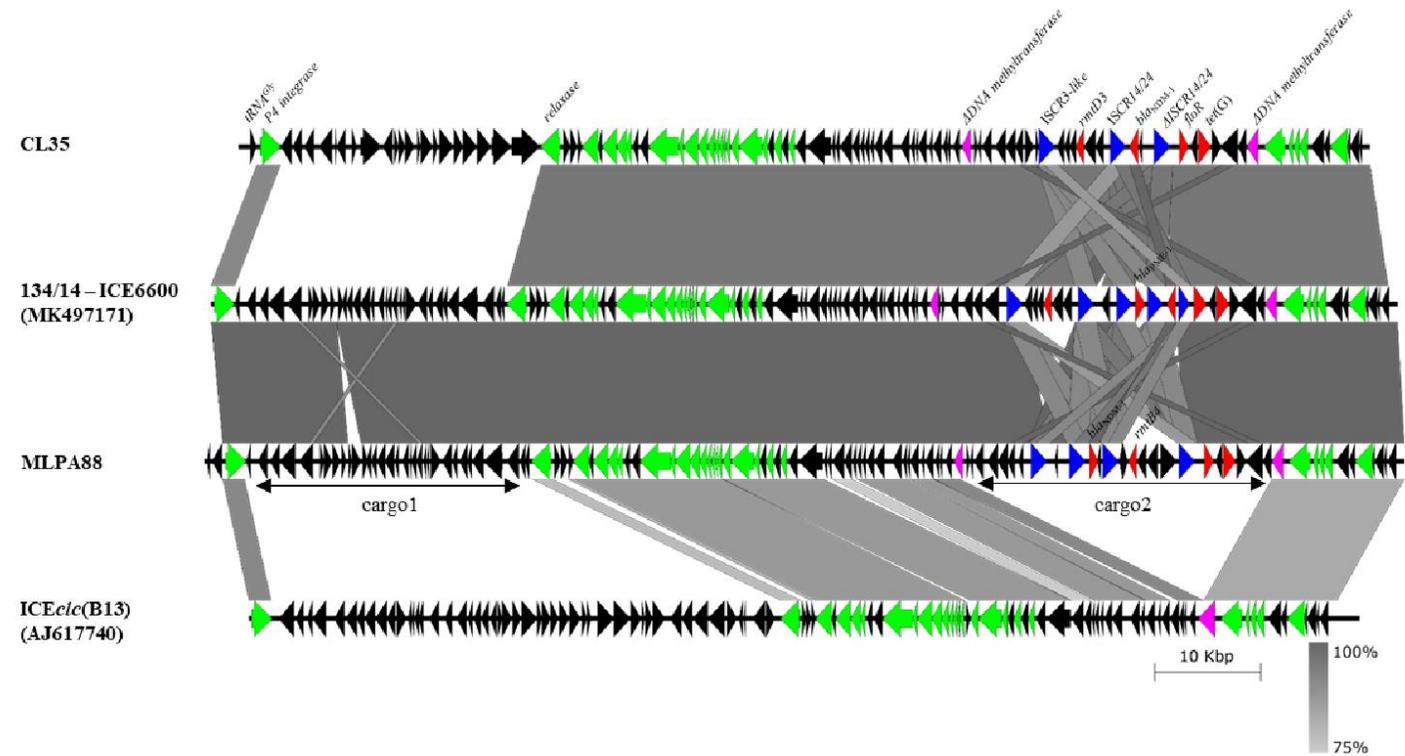
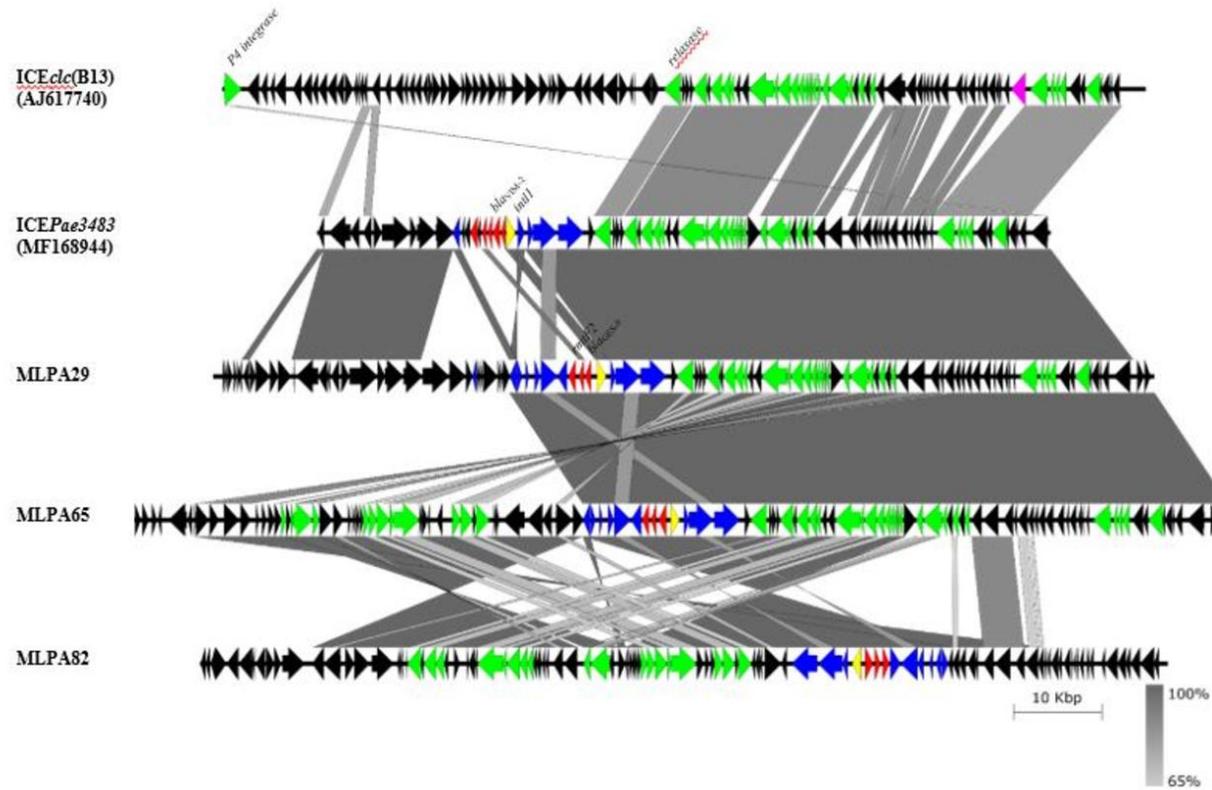


Figure S3. Genetic structures of ICE in MLPA29, MLP65 and MLPA82 compared with ICE*clc*(B13) (Accession no. AJ617740) and ICE*Pae3483* (Accession no. MK168944) and. Arrows indicate open reading frames (ORFs) and their orientation. The resistance genes are shown in red, mobile genetic elements are shown in blue, ICE-related genes are shown in green, DNA methyltransferase ICE*clc*(B13) locus are shown in pink, class 1 integron are shown in yellow and other *orf* are shown in black. Gray shading indicates nucleotide identity.



2.3.3 Commentaire de la publication n°3

Cette étude fournit de nouvelles informations importantes sur la prévalence, l'épidémiologie moléculaire et le support génétique des 16S-RMTases dans les isolats cliniques de *P. aeruginosa* provenant d'hôpitaux situés à Paris représentant la première étude de ce type en France.

Nous avons observé une prévalence sur la période de 0,26% (27/10399) de *P. aeruginosa* producteurs de RMTase parmi l'ensemble des *P. aeruginosa* isolés au laboratoire. Néanmoins, 352 isolats présentant une résistance à l'ensemble des AG n'ont pas pu être récupérés des collections pour rechercher la présence de RMTase. Si l'on considère l'ensemble de ces isolats comme producteurs de RMTase (probabilité extrêmement faible), la prévalence sur la période serait de 3,6% (379/10399). Peu d'études ont évalué la prévalence de RMTase chez *P. aeruginosa*. Dès 2004 (soit un an après la découverte des RMTases acquises), l'équipe de Yoshichika Arakawa au Japon, a estimé la prévalence des RMTases à 0,08% (384/18037), néanmoins à cette époque, seulement cinq gènes de RMTase avaient été décrits, présentant un biais dans la détection par PCR de RMTase (194). L'étude de Gurung *et al.* a retrouvé une prévalence de 14% (14/100) parmi 100 *P. aeruginosa* consécutifs isolés dans leur laboratoire (185). De manière surprenante, ces 14 isolats étaient les seuls isolats résistants à haut niveau aux AG et tous produisaient la RMTase ArmA. Le lien entre les isolats a été investigué par électrophorèse en champ pulsé, retrouvant huit pulsotypes différents suggérant une diversité génétique de ces isolats. Depuis aucune étude n'a permis de déterminer cette prévalence chez *P. aeruginosa*.

De manière intéressante, dans la base de données nationale du NCBI sur les organismes résistants aux antibiotiques (NDARO) regroupant 22000 génomes de *P. aeruginosa* (Août 2022), 317 possèdent un gène codant une RMTase soit 1,4%. Ce chiffre est supérieur à celui observé dans notre étude, ce qui peut être expliqué par plusieurs raisons : le dépôt de génomes dans la base de données correspondant à des isolats majoritairement résistants aux antibiotiques augmentant de fait la prévalence de résistance ; et des différences de prévalence au niveau géographique, notamment plus de la moitié des génomes (52%, 167/317) provenaient d'Asie et seulement 2,8% (9/317) d'Europe. Dans cette base de données, les gènes de RMTase les plus fréquents étaient *rmtB* (45%), suivie de *rmtF* (24%), *rmtD* (14%) et *armA* (14%). Dans notre étude, l'occurrence dans la population de *P. aeruginosa* résistant à haut niveau à l'ensemble des AG était de 23% (27/119). Ce résultat suggère que ce trait phénotypique est peu prédictif

de la présence de RMTase dans la souche, contrairement à ce qui était observé dans l'étude sur les *E. coli* producteurs de RMTase (voir chapitre I) ou dans l'étude sur les *K. pneumoniae* carbapénémase (voir chapitre II). En Chine, une étude retrouvait parmi 198 *P. aeruginosa* résistants à haut niveau à l'amikacine isolés en 2007, 97,5% d'isolats producteurs de RMTase, uniquement ArmA (67,5%) ou RmtB (30,3%) (182). De plus, seuls six gènes de RMTases étaient recherchés par PCR. En comparaison, deux études ont été faites en Europe, une au Royaume-Uni et l'autre en Grèce. Dans l'étude de Taylor *et al.*, l'occurrence de RMTase était de 8,6% (19/221) parmi les *P. aeruginosa* résistants à haut niveau aux AG, alors qu'elle était de 0% (0/33) dans l'étude de Nafplioti réalisée sur isolats provenant de cinq hôpitaux à Athènes (181, 362). Dans cette dernière étude, les primers utilisés ont été désignés avant la description de certains variants, notamment *rmtB4*, *rmtD3* et *rmtF2* (392). Ces études associées à nos résultats suggèrent que : (i) la résistance à haut niveau aux AG chez *P. aeruginosa* est principalement médiée par des mécanismes qui n'impliquent pas de RMTase, (ii) une diffusion restreinte des RMTases chez *P. aeruginosa*, et (iii) une hétérogénéité de diffusion en fonction des zones géographiques.

Environ 80 % de nos isolats répondaient aux critères XDR (et DTR), ce qui renforce le lien entre la présence de RMTase et le caractère extrêmement résistant de l'isolat. A titre de comparaison la prévalence de *P. aeruginosa* DTR dans les infections à *P. aeruginosa* a été établie à 2,3% dans les hôpitaux américains et à 13,2% dans les unités de soins intensifs européennes, dans des études récentes (390, 393).

Dans notre étude, une carbapénémase (uniquement NDM-1) était retrouvée dans 15% (4/27) des isolats, suggérant, comme chez les Entérobactéries, une association entre RMTase et carbapénémase, particulièrement les carbapénémases de type NDM. Plusieurs études rapportent un taux important de RMTase chez les *P. aeruginosa* producteurs de carbapénémase. Dans l'étude de Taylor *et al.*, les auteurs trouvaient que 89,5% (17/19) des *P. aeruginosa* producteurs de RMTase coproduisaient une carbapénémase majoritairement VIM-2 (42%) suivi de NDM-1 (32%). Ce chiffre élevé peut également être le reflet d'un biais de sélection des souches car leur collection était issue principalement d'isolats résistants aux carbapénèmes (181). Dans l'étude de Rahman *et al.*, sur 38 *P. aeruginosa* producteurs de NDM-1 isolés en Inde en 2014, 45% (17/38) produisaient une RMTase (221). A l'inverse, dans l'étude de Takahashi *et al.* réalisée au Népal, aucun isolat (0/12) ne produisait de carbapénémase (373). On peut également souligner une particularité au Brésil, où la carbapénémase SPM-1, appartenant à la classe B de Ambler, était associée fréquemment à *rmtD1* ou *rmtD3*, et retrouvée

majoritairement dans un clone de *P. aeruginosa* appartenant au ST277 qui a diffusé largement dans ce pays (155, 224, 284–286). Nos résultats ainsi que ceux des études citées suggèrent un lien épidémiologique entre RMTase et carbapénémase, néanmoins des études épidémiologiques à large échelle géographique semblent nécessaires pour confirmer cette association.

Une diversité de clone a été observée dans notre étude, retrouvant six ST différents (ST235, ST308, ST316, ST357, ST709, ST773) parmi les 27 *P. aeruginosa* producteurs de RMTase. Nous avons également identifié 43 génomes de *P. aeruginosa* producteurs de RMTase décrits dans la littérature, nous permettant d'identifier globalement 15 ST différents incluant un ST uniquement retrouvé dans notre étude (ST709). Certains gènes de 16S-RMTase étaient répandus dans plusieurs ST comme *rmtB4* et *rmtF2* (sept ST différents), *rmtD3* (cinq ST), *arma* (deux ST), alors que les autres gènes de RMTase n'ont été signalés que dans un seul ST chacun. Les isolats des ST316, ST357 et ST664 présentaient une diversité de gènes 16S-RMTase (au moins trois gènes différents), ce qui suggère que ces clones pourraient capter plus facilement ces gènes et par conséquent diffuser plus largement la résistance aux AG.

Certains de ces ST appartenaient à des clones à « haut risque ». Cette dénomination a été utilisée par Woodford *et al.* pour des clones de *P. aeruginosa* MDR/XDR ayant disséminés globalement dans plusieurs hôpitaux à travers le monde (394). Récemment, Oliver *et al.* ont décrit les différents ST de *P. aeruginosa* appartenant à ces clones à « haut risques » (395). Parmi les 15 ST identifiés, sept appartenaient à un clone à « haut risque » (ST233, ST235, ST244, ST277, ST308, ST357 and ST654) représentant 57% des isolats (40/70) dont 52,5% (21/40) étaient décrits dans cette étude (18 ST235, 2 ST357 et 1 ST308). Parmi ceux-ci, 47,5% (19/40) produisaient une carbapénémase, 50% (20/40) d'autres isolats produisaient la BLSE GES-9 (incluant les 18 ST235), enfin une souche seulement ne présentait pas de β -lactamase acquise. Les carbapénémases identifiées étaient toutes des métallo-bétalactamases et montraient une grande diversité (NDM, VIM, IMP et SPM). En comparaison, parmi les 30 isolats n'appartenant pas aux clones à « haut risque », 30% (9/30) produisaient une carbapénémase majoritairement dans les ST773 et ST316 (respectivement 5 et 3 isolats).

Nos résultats confirment le lien observé entre RMTase et carbapénémase, tous les variants de RMTase étaient majoritairement retrouvés chez des producteurs de carbapénémase exceptés les isolats producteurs de RmtF2 (3%, 1/36, 7 ST différents) et de RmtG (0%, 0/1). Les Enterobacterales productrices de RmtF1 (très majoritairement des *K. pneumoniae*) étaient, à l'inverse, très souvent coproductrices de carbapénémase (de type NDM et/ou OXA-48-like essentiellement) (voir chapitre II). Néanmoins la plupart des *P. aeruginosa* producteurs de

RmtF2 étaient également résistant aux carbapénèmes par d'autres mécanismes, n'excluant pas une co-sélection des producteurs de RmtF2 par les carbapénèmes comme suggéré avec les *K. pneumoniae* et RmtF1.

Globalement, les résultats de phylogénie retrouvent une diffusion de type épidémique non clonale. Cela signifie que la structure de cette population de *P. aeruginosa* est composée d'un nombre limité de clones répandus mondialement et appartenant fréquemment à des clones à haut risque.

L'analyse des 121487 SNP basée sur le core génome a permis de mettre en évidence deux clusters pouvant correspondre à des cas de transmissions de souches. Ces clusters correspondent : (i) aux trois isolats appartenant au ST272 possédant seulement 8 à 14 SNP d'écart et isolés la même année dans le même hôpital ; (ii) et au 18 isolats appartenant au ST235 possédant seulement entre 2 et 37 SNP et isolés dans le même hôpital sur la période 2014-2019, avec notamment 14 patients ayant séjournés dans le même service d'hématologie. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer l'origine de transmission et les liens entre les patients.

Le gène *armA* hébergé dans le génome de l'isolat MLPA33 a été identifié sur un contig long de 8 656 pb qui était partiellement similaire (74% de couverture, 100% d'identité) avec le transposon Tn1548 précédemment décrit comme principal support de *armA* chez les Enterobacterales (voir chapitre I). Ce transposon de 19 kb flanqué par IS26 et IS15 (variant de IS26) était retrouvé intact dans le plasmide pKB-PA_F19-4 (Genbank : CP086014) de 412 kb appartenant au groupe IncP2 chez *P. aeruginosa* appartenant au ST244 isolé d'un patient brûlé en Chine (184). Une structure proche de ce transposon a également été identifiée dans un plasmide pBM413 (Genbank : CP016215) chez *P. aeruginosa* isolé en Chine (183). Dans notre isolat, le reste de la séquence (1-2192 pb) correspondait à une séquence chromosomique de *P. aeruginosa* similaire (100% de couverture, 100% d'identité) à l'isolat AZPAE15042 (Genbank : CP041354) suggérant une localisation chromosomique du gène *armA*. Ces deux observations retrouvent le gène *armA* localisé sur des plasmides suggérant différentes voies d'acquisition de *armA* chez *P. aeruginosa* via le transposon Tn1548, confirmant son rôle primordial dans la dissémination du gène *armA*.

L'environnement génétique autour de *rmtB4* était identique chez les cinq isolats retrouvés dans notre étude. Cet environnement était identique à l'environnement précédemment décrit dans un *P. aeruginosa* ST773 (Genbank : CP041945) isolé chez une patiente hospitalisé aux Etats-Unis et

revenant d'Inde (391). Cet environnement était constitué d'une succession de *ISCR14/24* (4 copies), notamment deux copies directes flanquant le gène *rmtB4* pour tous les isolats. Ce type de structure suggère que des mécanismes de transpositions médiés par *ISCR14/24* et/ou de recombinaisons sont à l'origine de l'acquisition de *rmtB4* chez *P. aeruginosa*. Cependant, l'acquisition de *rmtB4* depuis un progéniteur ne semble pas liée à cette *ISCR* car les % de GC sont éloignés (56% pour *rmtB4* vs 69% pour *ISCR14/24*) (396). Le gène *bla_{NDM-1}* était situé à proximité immédiate du gène *rmtB4* encadré par deux copies de *ISCR14/24* dans les trois isolats appartenant au ST773 ainsi que dans l'isolat américain. Le séquençage en méthode « long read » de quatre isolats producteurs de RmtB4 (MLPA15, MLPA88, MLPA114 et MLPA115) nous permet d'observer que des séquences très longues hébergeant ce gène (345-1079 kb). Chez les trois isolats ST773 le gène *rmtB4* était localisé sur une structure de 116 kb de type ICE insérée dans un gène codant un ARNt^{Gly}. Son fragment d'environ 50 kb ressemblait au squelette de ICE*eclc*(B13) (GenBank : AJ617740), classifiant cette structure dans la famille ICE*eclc* (397). Cette structure possédait deux régions variables : cargo1 (environ 25kb), entre les gènes de l'intégrase et de la relaxase P4, et cargo2 (environ 30kb) dans le gène de méthyltransférase de l'ADN. Cette structure était proche de ICE6660 précédemment décrit dans un *P. aeruginosa* ST234 portant les gènes *bla_{NDM-1}* et *rmtD3* (225). La différence se situait dans la région cargo2 hébergeant l'ensemble des gènes de résistance, avec une composition en gène de résistance différente mais toujours encadrée par plusieurs copies directes de *ISCR14/24*. Cette dernière région contenait l'ensemble des gènes de résistance aux antibiotiques. Par ailleurs, aucune structure de type ICE n'a pu être identifiée dans l'isolat MLPA15 alors que nous avons séquencé la bactérie en méthode « long read ».

De manière intéressante, l'environnement génétique de *rmtD3* dans le génome de la souche CL35 était très proche de celui retrouvé dans le génome de la souche 1334/14 de *P. aeruginosa* isolée en Pologne, hormis l'absence du gène *bla_{PME-1}* (225). De la même manière que dans la souche 1334/14, le gène *rmtD3* dans CL35 était localisé dans une ICE très proche de ICE6660 (75% de couverture, 95% d'identité) excepté au niveau de la région variable cargo1 (225).

Les environnements génétiques entourant *rmtF2* étaient différents en fonction du fond génétique du *P. aeruginosa* (ST235 vs ST357). Dans l'isolat MLPA31 appartenant au ST357, l'environnement génétique entourant *rmtF2* était proche de celui retrouvé dans un *P. aeruginosa* ST654 isolé au Royaume Uni (Genbank : MN991291) (205). Ce gène était retrouvé sur un contig de 1,6 Mb suggérant une origine chromosomique. De manière intéressante, ces deux structures présentaient une similarité avec le transposon Tn6229 hébergeant *rmtF1* précédemment

décrit chez *K. pneumoniae* (241). La différence majeure était que la structure présente chez MLPA31 ne possédait ni la transposase ni la résolvasse décrite chez Tn6229 mais elle était encadrée par deux copies indirect de IS6100 potentiellement capable de mobiliser cette structure par un mécanisme de cointégration (398). A noter pour LIMPA14, le gène *rmtF2* était situé à la fin du contig de 43 kb, seul la région en aval du gène était présente, similaire à celle décrite chez MLPA31. Le reste de la séquence codait des gènes impliquaient les composants du système de sécrétion de type IV utilisé par les plasmides et les ICE pour conjuguer. Cette séquence ne permettait pas de déterminer si le gène était porté par le chromosome ou le plasmide.

Pour les isolats appartenant au ST235, les séquences obtenues en « short read » montraient que les contigs portant *rmtF2* partageaient 99-100% d'identité entre eux. Pour les 15 isolats ayant été séquencés uniquement en méthode « short read », l'emplacement du gène *rmtF2* n'a pas pu être déterminé en raison de l'absence de gènes spécifiques du plasmide ou du chromosome sur les contigs respectifs. Pour les trois isolats séquencés également en technique « long read », nous avons obtenus des contigs de 0,9 à 1,8 Mb suggérant une origine chromosomique. La séquence *intl1* - *bla*_{GES-9} - *aac(6')-I* - *rmtF2* - *ISCR21* présente chez les trois isolats était identique à la séquence de *P. aeruginosa* ST654 (Genbank : MN991291) décrite ci-dessus, excepté l'insertion d'une transposase en aval de *ISCR21* tronquant l'extrémité 3' de cet élément (181). Les régions contenant le gène *rmtF2* dans ces trois isolats correspondaient à une structure correspondant à un ICE insérée à proximité des gènes codant des ARNt (Gly et Lys) dans le chromosome. Les régions variaient entre 80 et 120 kb et ressemblaient également au squelette ICE_{clc(B13)} (397). Notamment, les ICE putatifs de MLPA29 et MLPA65 étaient similaires à ICE_{Pae3483} (Genbank : MF168944) excepté au niveau de la région variable contenant les gènes de résistances. Pour MLPA32, la structure de l'ICE semble plus complexe avec une duplication dans des sens opposés des gènes codant l'appareil de conjugaison de l'ICE. D'autres études sont nécessaires pour déterminer la cause et la fonction de cette structure.

Cette étude a permis de décrire l'épidémiologie moléculaire des *P. aeruginosa* producteurs de RMTase isolés dans deux hôpitaux universitaires parisiens. Les RMTases ne semblent pas être le mécanisme le plus fréquemment associé à la résistance à haut niveau aux AG. Les isolats producteurs de RMTase montraient une diversité caractérisée comme étant de type épidémique non clonale associés à des clones à « haut risque » retrouvés dans plusieurs pays. Les RMTases identifiées chez *P. aeruginosa* semblent être particulièrement liées à cette espèce (à part la RMTase ArmA). L'étude des environnements génétiques a permis de mettre en évidence leurs

diversités et leurs localisations chromosomiques chez certains isolats. Cette localisation chromosomique semble être associée à des structures de type ICE, précédemment décrites comme supports des gènes codant des carbapénémases chez *P. aeruginosa* (397). A notre connaissance, cette étude est la première décrivant une structure de type ICE comme support de mobilisation des gènes *rmtB4* et *rmtF2* chez *P. aeruginosa*. Ces différentes observations suggèrent que les ICE $_{clc}$ semblent responsables de la diffusion de ces gènes par transfert horizontal via l'ICE et/ou par l'expansion de certains clones à succès.

2.4 CHAPITRE IV : Epidémiologie des Enterobacterales et *A. baumannii* producteurs de RMTase à Paris.

2.4.1 Introduction

Dans le chapitre I, les données issues de la première collection de *E. coli* producteurs de RMTase ne permettaient pas d'estimer un taux de prévalence. De plus, ces isolats dataient de la période 2008-2014 au cours de laquelle la prévalence de bactéries MDR était plus faible qu'actuellement, notamment le taux de bactéries productrices de carbapénémase. C'est pourquoi une nouvelle étude a été menée afin d'identifier la prévalence actuelle des bactéries productrices de RMTase dans les collections disponibles au sein du laboratoire de bactériologie du groupe hospitalier Saint-Louis – Lariboisière – Fernand Widal.

Des études antérieures ont identifié la prévalence des RMTases comme étant plus faible en Europe qu'en Asie (128), les taux de gènes de RMTase dans les isolats non dupliqués de Enterobacterales étant respectivement de 0,12 % (19/15386), 0,15 % (6/4080) et 3,9 % (38/985) en Belgique, en Grèce et en Chine (178, 255, 399). D'autres études se sont concentrées sur les bactéries portant des gènes de résistance spécifiques : les taux de gènes de RMTase chez les Enterobacterales produisant des BLSE étaient de 1,3 % (5/373) en France, alors qu'il était de 18 % (12/67) en Algérie (256, 277). Des taux élevés ont également été trouvés dans les isolats de *K. pneumoniae* producteurs de carbapénémase, notamment 7,7% (23/300) en Grèce, 35,1 % (26/74) en Chine, 50% (19/38) au Myanmar, et 70,4 % (19/27) au Vietnam (273, 347, 400, 401). Peu d'études ont évalué la prévalence de RMTase chez *A. baumannii*, la plupart étant des études sur les *A. baumannii* résistants aux carbapénèmes (*Carbapenems-resistant A. baumannii*, CRAB). Une étude au Vietnam sur 93 *A. baumannii* isolés en réanimation retrouvait que 83% (77/93) des isolats possédaient le gène *armA* et 79% (58/93) produisaient une carbapénémase, majoritairement (56/58) OXA-23 (175). Aux Etats-Unis, un taux de prévalence de 47% (23/49) de *A. baumannii* producteur de ArmA a été retrouvé dont 78% (18/23) co-produisaient une OXA-23 (402).

De plus, des études ont identifié des taux élevés de gènes codant une RMTase chez les bactéries résistantes à l'amikacine, avec des taux de 97,5 % (193/198) chez les bactéries à Gram négatif en Chine, 85,7 % (30/35) chez *E. coli* et *K. pneumoniae* à Taiwan et 93,7 % (325/347) chez *A. baumannii* (résistant aussi à la gentamicine) en Grèce (182, 403, 404). Lee *et al.* ont souligné l'utilité du dépistage des bactéries à Gram négatif produisant des RMTases par la résistance élevée à l'amikacine (CMI \geq 1024 mg/L), ce qui a été soutenu par Doi et Arakawa qui ont

suggéré d'utiliser comme seuils des CMI ≥ 256 mg/L à la gentamicine, à l'amikacine et à l'arbakacine (si disponible) pour détecter les RMTases (172, 405). Par conséquent, une résistance élevée à l'amikacine et à la gentamicine devrait indiquer la production de RMTases, à l'exception de combinaison d'AME qui peuvent provoquer une résistance à l'amikacine, comme l'association AAC(6')-Ib et AAC(3)-II ou la présence d'une acétyltransférase à large spectre (70, 108).

Cette étude a donc été menée en utilisant comme critère de sélection une résistance élevée à l'amikacine, la tobramycine et à la gentamicine (CMI ≥ 256 mg/L) pour dépister les Enterobacterales et *A. baumannii* producteurs de RMTase au laboratoires du groupe hospitalier Saint-Louis – Lariboisière – Fernand Widal.

Le but de cette étude était : (i) d'identifier et de caractériser sur le plan génotypique les entérobactéries et *A. baumannii* producteurs de RMTase isolés dans notre structure et, (ii) de calculer la prévalence de cette résistance sur cette période.

2.4.2 Sélection des souches cliniques, séquençage et analyse bio-informatique

Nous avons sélectionné : les Enterobacterales isolées entre 2015 et 2021 et les *A. baumannii* isolés entre 2011 et 2021 dans les hôpitaux Saint-Louis – Lariboisière – Fernand Widal après extraction par le logiciel de laboratoire GLIMS (MIPS). Les critères d'inclusion étaient des isolats responsables de colonisation ou d'infection classés résistants aux AG (gentamicine, amikacine tobramycine (si testée) et nétilmicine (si testée)) selon les recommandations du CA-SFM, testés par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé ou en Vitek2 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Les souches redondantes ont été exclues. Lorsque plusieurs souches étaient retrouvées dans plusieurs prélèvements pour le même patient, il a été sélectionné la souche la plus récente (pour les Enterobacterales) ou la souche issue du prélèvement le plus profond (pour les *A. baumannii*). Une première sélection des souches résistantes aux AG a été réalisée sur des géloses Mueller-Hinton supplémentées avec de l'amikacine (Mylan) et de la gentamicine (Pan-pharma) à des concentrations finales de 30 mg/L. Pour les isolats poussant sur le milieu sélectif, la mesure des CMI à l'amikacine, la gentamicine et la tobramycine par bandelettes Etest (bioMérieux) a été effectuée.

L'extraction de l'ADN bactérien des souches résistantes à haut niveau aux AG a été effectuée avec le Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, WI, USA) ou avec le DSP DNA Mini Kit (QIAGEN, Crawley, UK) sur l'automate QIASymphony (QIAGEN) suivant les recommandations des fournisseurs. Le Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San

Diego, USA) a été utilisé pour préparer les bibliothèques pour le séquençage. Les échantillons ont été multiplexés et séquencés avec les séquenceurs NexSeq ou MiSeq (Illumina), en 300 cycles (150 paired-end-reads).

L'analyse des séquences a été réalisée comme précédemment (voir Chapitres I, II et III). Brièvement, tous les reads de NGS ont été assemblés *de novo* avec SPAdes v3.13 (406). Le contenu en gènes de résistance a été analysé à partir des assemblages à l'aide des bases de données CARD et ResFinder (23, 407). Un typage par Multilocus sequence typing (MLST) de ces souches a été effectué, comme décrit par les protocoles des bases de données PubMLST.

2.4.3 Résultats

Au total, 43 007 isolats de Enterobacterales et 1 192 de *A. baumannii* non redondants résistants ont été sélectionnés dont, respectivement, 205 (0,5%) et 151 (12,7%) isolats étaient résistants à l'ensemble des AG testés (amikacine, tobramycine et gentamicine). Les figures 14 et 15 représentent les diagrammes de sélection des souches. Parmi ces isolats de Enterobacterales et *A. baumannii*, respectivement, 159 et 101 ont pu être analysés, les autres isolats étant absent des soucheotèques. Parmi les 159 isolats de Enterobacterales, 64 étaient de haut niveau de résistance aux AG et 53 produisaient une RMTase. Pour les 100 *A. baumannii*, 61 présentaient un haut niveau de résistance aux AG dont 53 produisaient une RMTase. Parmi les isolats présentant un haut niveau de résistance aux AG, 83% (53/64) et 87% (53/61) des Enterobacterales et des *A. baumannii*, respectivement, étaient des producteurs de RMTases.

Sur la période 2015-2021, la prévalence de Enterobacterales producteurs de RMTase était de 0,12% (53/43007) (0,23% (99/43007) si l'on considère toutes les souches non-disponibles comme productrices de RMTase). Sur la période 2011-2021, la prévalence de *A. baumannii* producteurs de RMTase était de 4,4% (53/1192) (8,6% (103/1192) si l'on considère toutes les souches non-disponibles comme productrices de RMTase).

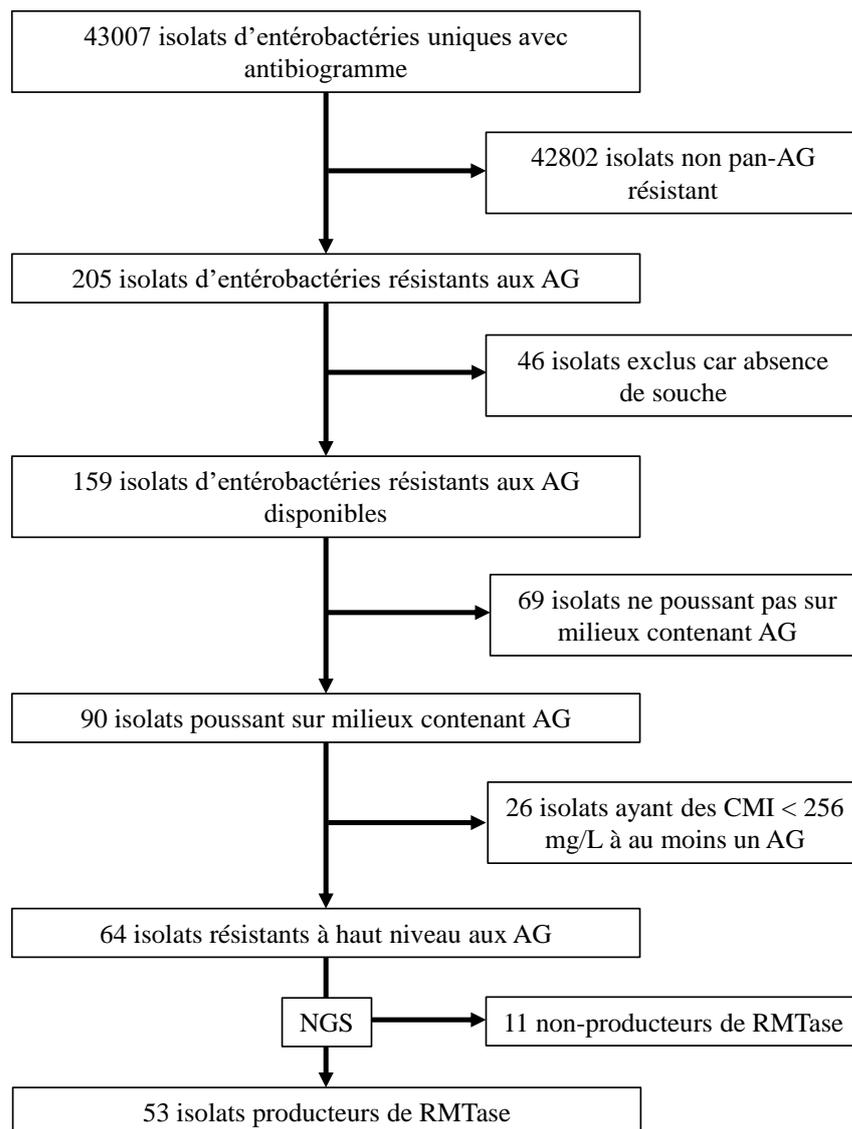


Figure 14. Diagramme de la sélection des Enterobacterales producteurs de RMTase. AG : aminoglycosides, CMI : Concentration minimale inhibitrice, NGS : Séquençage nouvelle génération, RMTase : méthyltransférase de l'ARNr 16S.

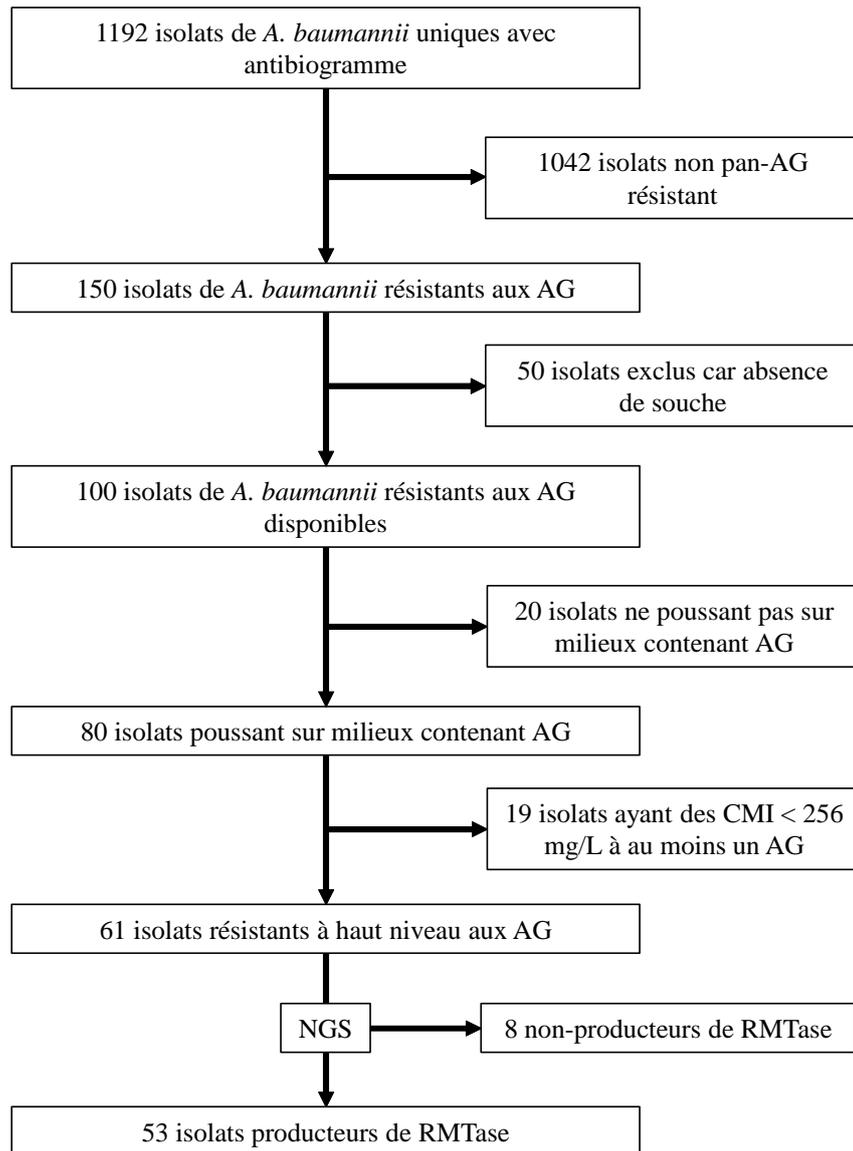


Figure 15. Diagramme de la sélection des *A. baumannii* producteurs de RMTase. AG : aminoglycosides, CMI : Concentration minimale inhibitrice, NGS : Séquençage nouvelle génération, RMTase : méthyltransférase de l'ARNr 16S.

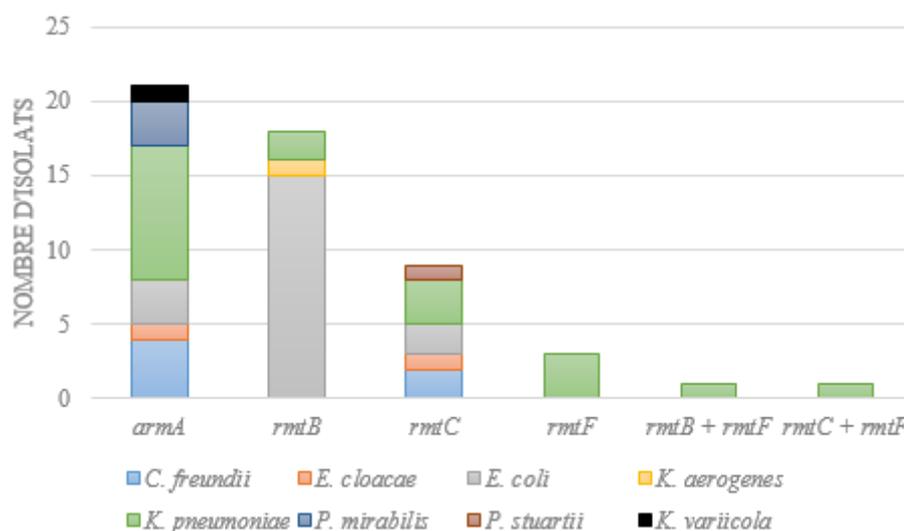


Figure 16. Nombre total de gènes de RMTase trouvés dans les isolats de Enterobacterales (n=53) du laboratoire de Bactériologie du groupe hospitalier Saint-Louis – Lariboisière – Fernand Widal du 1^{er} janvier 2015 au 31 Décembre 2021.

Les espèces de Enterobacterales productrices de RMTase étaient : *E. coli* (38%, 20/53), *K. pneumoniae* (36%, 19/53), *C. freundii* (11%, 6/53), *P. mirabilis* (6%, 3/53), *E. cloacae* (4%, 2/53), *K. aerogenes* (2%, 1/53) *K. variicola* (2%, 1/53) et *P. stuartii* (2%, 1/53). Les sites d'isolement des Enterobacterales étaient : des écouvillons rectaux (66%, 35/53), des prélèvements d'urine (2%, 13/53), des hémocultures ou dispositifs intravasculaires (8%, 4/53) et des prélèvements digestifs (2%, 1/53). Les sites d'isolement des *A. baumannii* étaient : des prélèvements cutanés (32%, 17/53), des hémocultures ou dispositifs intravasculaires (28%, 15/53), des écouvillons rectaux (21%, 11/53), des prélèvements d'urine (9%, 5/53), et des prélèvements respiratoires (9%, 5/53).

Le gène 16S RMTase le plus fréquemment détecté chez les Entérobacterales était *armA* (40%, 21/53), suivi de *rmtB* (34%, 18/53), *rmtC* (17%, 9/53), *rmtF* (6%, 3/53) et *rmtB + rmtF* (2%, 1/53) et *rmtC + rmtF* (2%, 1/53) (Figure 16). Aucun gène codant *rmtA*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtG*, *rmtH*, *npmA* ou *npmB* n'a été identifié. Les gènes *armA* et *rmtB* étaient plus courants chez, respectivement, *K. pneumoniae* (43%, 9/21) et *E. coli* (83%, 15/18). Concernant les *A. baumannii*, seul le gène *armA* (100%, 53/53) a été détecté.

Au total, 78% (83/106) des isolats producteurs de RMTase possédaient un ou plusieurs gènes de carbapénémase (Tableau 7).

Les carbapénémases étaient fréquemment identifiées chez les Enterobacterales producteurs de RMTase (64%, 34/53) et chez les Enterobacterales co-producteurs de RMTase et

carbapénémase, les carbapénémases de types NDM étaient les plus fréquentes (88%, 30/34) (Tableau 7). Le variant *bla*_{NDM-1} était couramment associé à *rmtC* (100 %, 10/10) alors que le variant *bla*_{NDM-5} était associé à *rmtB* (56%, 10/18). Le variant *bla*_{NDM-5} était particulièrement associé à *E. coli* (75%, 8/12), suivi de *K. pneumoniae* (25%, 4/12) (Tableau 8). Les gènes *bla*_{OXA-48} ont été retrouvés uniquement chez des *K. pneumoniae*. A noter que *bla*_{VIM} a été identifié dans un isolat de *C. freundii*. La combinaison *bla*_{NDM} + *bla*_{OXA-48-like} a été trouvée principalement chez *K. pneumoniae* (87,5%, 7/8) et n'était pas associée à une RMTase en particulier. Tous les *A. baumannii* producteurs de RMTase possédaient une carbapénémase. Le gène de carbapénémase *bla*_{OXA-23} était le plus fréquent (89%, 47/53) suivie de *bla*_{OXA-72} (11%, 6/53) codant une carbapénémase appartenant au groupe OXA-24/40 (408).

La RMTase la plus fréquemment associée à l'absence de carbapénémase était *armA* (74%, 17/23), suivie de *rmtB* (26%, 6/23). Les espèces les plus fréquemment productrices de RMTase sans carbapénémase étaient *E. coli* (39%, 9/23) suivi de *A. baumannii* et *K. pneumoniae* (17%, 4/23 chacun). A noter que ces isolats de *A. baumannii* et de *K. pneumoniae* étaient tous producteurs de la RMTase ArmA.

Gène(s) codant une carbapénémase	Gène(s) de RTMase						Total
	<i>armA</i>	<i>rmtB</i>	<i>rmtC</i>	<i>rmtF</i>	<i>rmtB</i> + <i>rmtF</i>	<i>rmtC</i> + <i>rmtF</i>	
Aucun	17	6	0	0	0	0	23
<i>bla</i> _{NDM-1}	2	2	7	1	0	0	12
<i>bla</i> _{NDM-5}	1	9	0	0	0	0	10
<i>bla</i> _{OXA-48}	2	0	0	1	0	0	3
<i>bla</i> _{NDM-1} + <i>bla</i> _{OXA-48}	1	0	3	1	0	0	5
<i>bla</i> _{NDM-1} + <i>bla</i> _{OXA-232}	0	0	0	0	0	1	1
<i>bla</i> _{NDM-5} + <i>bla</i> _{OXA-181}	0	1	0	0	1	0	2
<i>bla</i> _{OXA-23}	47	0	0	0	0	0	47
<i>bla</i> _{OXA-72}	2	0	0	0	0	0	2
<i>bla</i> _{VIM-4}	1	0	0	0	0	0	1
Total	73	18	10	3	1	1	106

Tableau 7. Gènes de carbapénémase retrouvés chez les isolats producteurs de RMTase (n=106) par NGS.

Gène(s) codant une carbapénémase	Espèce bactérienne									Total
	<i>A. baumannii</i>	<i>C. freundii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. variicola</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. stuartii</i>	
Aucun	0	2	1	8	1	4	1	2	0	19
<i>bla</i> _{NDM-1}	0	3	1	3	0	3	0	1	1	12
<i>bla</i> _{NDM-5}	0	0	0	8	0	2	0	0	0	10
<i>bla</i> _{OXA-48}	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3
<i>bla</i> _{NDM-1} + <i>bla</i> _{OXA-48}	0	0	0	1	0	4	0	0	0	5
<i>bla</i> _{NDM-1} + <i>bla</i> _{OXA-232}	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>bla</i> _{NDM-5} + <i>bla</i> _{OXA-181}	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2
<i>bla</i> _{OXA-23}	47	0	0	0	0	0	0	0	0	47
<i>bla</i> _{OXA-72}	6	0	0	0	0	0	0	0	0	6
<i>bla</i> _{VIM-4}	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	53	6	2	20	1	19	1	3	1	106

Tableau 8. Gènes de carbapénémase par bactérie productrice de RMTase (n=106) identifiés par NGS.

Des gènes codant des BLSE ont été retrouvés dans 70% (37/53) des Enterobacterales producteurs de RMTase : 60% (12/20) des *E. coli* et 89% (17/19) des *K. pneumoniae* (Tableau 9). Le gène *bla*_{CTX-M-15} codant une BLSE était le plus fréquemment retrouvé dans 49% (26/53) des isolats. Les gènes *bla*_{CTX-M-15} étaient retrouvés principalement chez *K. pneumoniae* (74%, 14/19). D'autres gènes codant des BLSE ont été identifiés comme *bla*_{SHV-12} (FC04, *K. variicola*), *bla*_{VEB-6} (FC23, *P. mirabilis*), et *bla*_{SFO-1} (PT32, *E. cloacae*). Aucune association entre un gène de BLSE et un gène de RMTase n'a été observé (Tableau 10).

Gène codant une BLSE	Espèce bactérienne								Total
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. freundii</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>K. variicola</i>	<i>P. stuartii</i>	
Aucun	8	2	2	2	0	1	0	1	16
<i>bla</i> _{CTX-M-3}	1	2	0	0	0	0	0	0	3
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	1	1	0	0	0	0	0	0	2
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	7	14	4	0	1	0	0	0	26
<i>bla</i> _{CTX-M-55}	2	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>bla</i> _{CTX-M-123}	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>bla</i> _{CTX-M-3} + <i>bla</i> _{SFO-1}	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>bla</i> _{SHV-12}	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>bla</i> _{VEB-6}	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Total	20	19	6	3	2	1	1	1	53

Tableau 9. Gènes de BLSE retrouvés chez les isolats de Enterobacterales producteurs de RMTase (n=53) par NGS.

Gène codant une BLSE	Gène(s) de RMTase						Total
	<i>armA</i>	<i>rmtB</i>	<i>rmtC</i>	<i>rmtF</i>	<i>rmtB</i> + <i>rmtF</i>	<i>rmtC</i> + <i>rmtF</i>	
Aucun	4	7	5	0	0	0	16
<i>bla</i> _{CTX-M-3}	2	1	0	0	0	0	3
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	1	1	0	0	0	0	2
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	10	7	4	3	1	1	26
<i>bla</i> _{CTX-M-55}	0	2	0	0	0	0	2
<i>bla</i> _{CTX-M-123}	1	0	0	0	0	0	1
<i>bla</i> _{SFO-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-3}	1	0	0	0	0	0	1
<i>bla</i> _{SHV-12}	1	0	0	0	0	0	1
<i>bla</i> _{VEB-6}	1	0	0	0	0	0	1
Total	21	18	9	3	1	1	53

Tableau 10. Gènes de BLSE en fonction des gènes de RMTase (n=53) retrouvés par NGS.

Les données de typage MLST étaient disponibles pour les isolats producteurs de RMTases soit *A. baumannii* (n=53), *E. coli* (n=20), *K. pneumoniae/variicola* (n=20), *C. freundii* (n=6), *E. cloacae* (n=2) et *K. aerogenes* (n=1). *P. mirabilis* et *P. stuartii* n'étaient pas typables par la méthode MLST car aucun schéma n'existe pour ces espèces.

Trois ST différents ont été identifiés parmi les 53 isolats de *A. baumannii*. Le ST de *A. baumannii* le plus commun était le ST2 (83%, 44/53) suivi du ST78 (11%, 6/53) et du ST25 (6%, 3/53). Tous les ST2 et ST25 produisaient la carbapénémase OXA-23 et tous les ST78 produisaient une carbapénémase (OXA-72).

Treize ST différents ont été identifiés chez *E. coli*. Les ST les plus fréquemment retrouvés étaient le ST167 (25%, 5/20) suivi du ST405 (15%, 3/20). Tous les autres ST retrouvés étaient des singletons. Tous les ST167 coproduisaient la RMTase RmtB et une carbapénémase de type NDM et tous les ST405 produisaient également la RMTase RmtB mais un isolat seulement produisait une carbapénémase (NDM-5).

Les ST de *K. pneumoniae* les plus communs étaient le ST147 (26%, 5/19) suivi du ST15 (21%, 4/19) et des ST11 et ST231 (11%, 2/19 chacun). Tous les autres ST étaient des singletons. Les isolats de *K. pneumoniae* ST147 produisaient les RMTases RmtF (2/5), RmtB (1/5), RmtB + RmtF (1/5) et ArmA (1/5) et tous avaient une carbapénémase. Ceux appartenant au ST15 produisaient les RMTases RmtC (2/4), RmtC + RmtF (1/4) et RmtB (1/4) et tous possédaient deux gènes codant des carbapénémase : *bla*_{NDM} plus *bla*_{OXA-48-like}. L'isolat de *K. variicola* appartenait au ST3201.

Parmi les six isolats de *C. freundii*, cinq ST différents ont été identifiés incluant deux isolats de ST8 produisant tous les deux la RMTase ArmA.

Chacun des deux isolats de *E. cloacae* producteurs de RMTase appartenait à un ST différent (ST78 et ST51). Enfin le seul isolat de *K. aerogenes* appartenait à un ST inconnu. Les caractéristiques des isolats sont résumées dans les tableaux 13 et 14.

Dix-neuf isolats avec un haut niveau de résistance aux AG mais ne possédant pas de RMTase ont été retrouvés incluant 11 Enterobacterales (sept *E. coli*, deux *E. cloacae*, une *K. pneumoniae* et un *P. mirabilis*) et huit *A. baumannii*. Ces isolats ont fait l'objet d'une analyse des AME pour déterminer le mécanisme de la résistance à l'amikacine, tobramycine et gentamicine à haut niveau. Les isolats de *E. coli* appartenait à six ST différents (ST101, ST106, ST131, ST744, ST998, ST1170 et ST1193) et les *A. baumannii* appartenait à quatre ST différents (ST1,

ST2, ST20 et ST623°. Les caractéristiques de ces isolats sont résumées dans les tableaux 11 et 12. Chez les Enterobacterales, les gènes codant des AMEs responsables de la résistance à haut niveau aux AG identifiés étaient : *aac(3)-II* plus *aac(6')-Ib-cr* (36%, 4/10), *aac(3)-II* + *aac(6')-I* (36%, 4/11), *aac(3)-II* plus *aph(3')-VI* (18%, 2/11) et *aac(6')-Ib* plus *aac(6')-II* (9%, 1/11). Pour les isolats de *A. baumannii*, les gènes codant des AMEs responsables de la résistance à haut niveau aux AG identifiées étaient : *aac(3)-I* plus *aac(6')-I* (50%, 4/8), *aph(3')-VI* plus *ant(2'')-I* (37%, 3/8), *aph(3')-VI* plus *ant(2'')-I* plus *aac(3)-I* (13%, 1/8). Tous les isolats possédaient des gènes conférant une résistance aux trois AG. Aucun gène de RMTase 16S précédemment décrit n'a été identifié dans ces isolats.

Isolat	Bactérie	Année	ST	Gènes codant des AME	Gène(s) codant des β-lactamases
FC33	<i>C. koseri</i>	2021	129	<i>aac(3)-II, aph(6)-I, aph(3')-VI</i>	<i>bla_{NDM-1}, bla_{TEM-1b}, bla_{CMY-4}</i>
PT15	<i>E. cloacae</i>	2016	133	<i>aac(6')-Ib, aac(6')-II</i>	<i>bla_{SHV-12}, bla_{TEM-1b}</i>
FC10	<i>E. cloacae</i>	2019	106	<i>aac(6')-II, aph(6)-I, aph(3')-I, aac(6')-I</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>
PT01	<i>E. coli</i>	2015	998	<i>aac(6')-Ib, aac(6')-II</i>	<i>bla_{CTX-M-15}, bla_{TEM-52}</i>
PT22	<i>E. coli</i>	2016	1170	<i>aac(3)-II, aadA1, aph(6)-Id, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>bla_{OXA-1}, bla_{TEM-1b}</i>
PT28	<i>E. coli</i>	2016	131	<i>aac(3)-II, aph(3'')-Ib, aadA5, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>bla_{OXA-1}, bla_{TEM-1b}</i>
PT30	<i>E. coli</i>	2016	131	<i>aac(3)-II, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>
PT39	<i>E. coli</i>	2017	744	<i>aac(3)-II, aac(6')-Ib, aadA1</i>	<i>bla_{TEM-1b}</i>
FC19	<i>E. coli</i>	2021	1193	<i>aac(3)-II, aph(6)-Id, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>
FC20	<i>K. pneumoniae</i>	2021	101	<i>aadA1, aac(6')-Ib, aac(3)-II</i>	<i>bla_{OXA-48}, bla_{OXA-9}, bla_{OXA-1}</i>
FC09	<i>P. mirabilis</i>	2019	NA	<i>aac(3)-II, aph(6)-Id, aph(3')-Ia, aph(3')-VI, aadA1, aadA5</i>	<i>bla_{TEM-2}</i>

Tableau 11. Caractéristiques des isolats de Enterobacterales résistants à haut niveau aux AG sans production de RMTase. Les gènes responsables de la résistance à haut niveau à l'amikacine, la gentamicine et la tobramycine sont en gras. ST : Sequence type ; AME : Enzyme modificateur d'AG ; NA : Non applicable.

Isolat	Bactérie	Année	ST	Gènes codant des AME	Gène(s) codant des β-lactamases
LMAB107	<i>A. baumannii</i>	2013	1	<i>aph(3')-VI, ant(2'')-I, aac(3)-I, aph(3')-I</i>	<i>bla_{OXA-23}</i>
MLAB110	<i>A. baumannii</i>	2012	20	<i>aph(3')-VI, ant(2'')-I</i>	<i>bla_{OXA-23}</i>
MLAB109	<i>A. baumannii</i>	2013	1	<i>aph(3')-VI, ant(2'')-I</i>	-
LIMAB62	<i>A. baumannii</i>	2015	623	<i>aph(3')-VI, ant(2'')-I, aph(6')-I</i>	<i>bla_{OXA-23}</i>
MLAB32	<i>A. baumannii</i>	2014	2	<i>aph(6)-I, aac(3)-I, aac(6')-I</i>	<i>bla_{OXA-23}, bla_{OXA-72}</i>
MLAB27	<i>A. baumannii</i>	2014	2	<i>aph(6)-I, aac(3)-I, aac(6')-I</i>	<i>bla_{OXA-72}</i>
MLAB104	<i>A. baumannii</i>	2011	2	<i>aph(6)-I, ant(3'')-I, aph(3')-I, aac(3)-I, aac(6')-I</i>	-
MLAB25	<i>A. baumannii</i>	2014	2	<i>aph(6)-Id, aac(3)-I, aac(6')-I</i>	<i>bla_{OXA-72}</i>

Tableau 12. Caractéristiques des *A. baumannii* résistants à haut niveau aux AG sans production de RMTase. Les gènes responsables de la résistance à haut niveau à l'amikacine, la gentamicine et la tobramycine sont mis en gras. ST : Sequence type ; AME : Enzyme modificateur d'AG ; BL : β-lactamase.

Isolat	Bactérie	Année	Type de pré-l.	ST	RMTase	Carbapénémase	BLSE	Autre(s) BL	AME	PMQR	QRDR	Autre(s)
FC01	<i>E. coli</i>	2020	ER	405	<i>rmtB</i>	-	-	<i>bla</i> _{DHA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	-	<i>qnrB4</i> , <i>qepA1</i>	S83L, D87N, S80I	<i>sul1</i> , <i>dfrA14</i> , <i>tet(B)</i>
FC02	<i>E. coli</i>	2019	ER	167	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	<i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aadA</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	-	S83L, D87N, S80I	<i>sul1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>tet(A)</i>
FC03	<i>E. cloacae</i>	2020	Urine	78	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aph(6)-I</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>aadA</i>	<i>qnrB1</i>	-	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA14</i> , <i>tet(A)</i> , <i>catA</i>
FC04	<i>E. coli</i>	2020	ER	3201	<i>armA</i>	-	<i>bla</i> _{SHV-12}	-	<i>aadA</i> , <i>aph(6)-I</i>	<i>qnrS1</i>	-	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA14</i> , <i>tet(A)</i> , <i>arr-3</i> , <i>floR</i>
FC05	<i>E. coli</i>	2020	ER	405	<i>rmtB</i>	-	-	<i>bla</i> _{DHA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	-	<i>qnrB4</i>	S83L, D87N, S80I	<i>sul1</i> , <i>dfrA14</i> , <i>tet(B)</i>
FC06	<i>E. coli</i>	2020	ER	155	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1} + <i>bla</i> _{OXA-48}	-	<i>bla</i> _{CMY-6}	<i>aac(6')-I</i>	-	-	<i>sul1</i>
FC07	<i>C. freundii</i>	2020	ER	362	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	<i>bla</i> _{CMY-6}	<i>aac(6')-I</i>	-	-	<i>sul1</i>
FC08	<i>K. pneumoniae</i>	2020	ER	15	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1} + <i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{CMY-6}	<i>aac(6')-I</i>	-	-	<i>sul1</i> , <i>dfrA14</i> , <i>dfrA30</i> , <i>tet(B)</i>
FC11	<i>E. coli</i>	2019	Urine	410	<i>rmtB</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-55}	-	<i>aph(6)-I</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>aph(3')-I</i> , <i>aadA</i>	<i>qnrB4</i> , <i>qepA1</i>	S83L, D87N, S80I	<i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA14</i> , <i>tet(A)</i>
FC13	<i>K. pneumoniae</i>	2021	HC	147	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-9} , <i>bla</i> _{TEM-1a}	<i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-I</i> , <i>aph(3')-I</i> , <i>aadA</i>	<i>qnrS1</i>	-	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA5</i> , <i>arr-3</i>
FC14	<i>K. pneumoniae</i>	2021	Urine	11	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}	-	<i>bla</i> _{DHA-1} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	<i>aac(6')-I</i> , <i>aph(3')-I</i>	<i>qnrB4</i>	S83L, S80I	<i>sul1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>catB</i> , <i>arr-3</i>
FC15	<i>C. freundii</i>	2020	ER	8	<i>armA</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{TEM-1a}	<i>aac(6')-I</i> , <i>aph(3'')-I</i> , <i>aph(6)-I</i> , <i>aadA</i>	-	-	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrB1</i> , <i>tet(D)</i>
FC16	<i>E. coli</i>	2020	Urine	101	<i>rmtB</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>bla</i> _{OXA-2}	<i>aadA</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>aph(6)-I</i> , <i>aph(3'')-I</i>	-	S83L, D87N, S80I	<i>sul2</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA29</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(G)</i> , <i>floR</i> , <i>catA</i>

FC17	<i>C. freundii</i>	2020	Urine	8	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{VIM-4}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-35} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac</i> (3)-II, <i>aac</i> (6')-I, <i>aadA</i>	-	-	<i>sul1</i> , <i>dfr12</i>
FC18	<i>K. pneumoniae</i>	2020	ER	147	<i>rmtB</i> + <i>rmtF</i>	<i>bla</i> _{NDM-5} + <i>bla</i> _{OXA-181}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aph</i> (6)-I, <i>aac</i> (6')-I, <i>aadA</i>	<i>qnrB1</i>	-	<i>sul1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>arr-2</i> , <i>catB</i> , <i>catA</i>
FC21	<i>K. aerogenes</i>	2021	ER	New	<i>rmtB</i>	-	-	<i>bla</i> _{DHA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1}	-	<i>qnrB4</i> , <i>qepA1</i>	-	<i>sul1</i> , <i>dfrA14</i>
FC22	<i>E. coli</i>	2021	ER	349	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}	-	<i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aadA</i>	-	-	<i>sul1</i> , <i>dfrA12</i>
FC23	<i>P. mirabilis</i>	2017	ER	NA	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{VEB-6}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-10}	<i>aac</i> (6')-Ib, <i>aac</i> (3)-II, <i>ant</i> (2'')-I, <i>aph</i> (6)-Id, <i>aadA</i>	<i>qnrA1</i> , <i>qnrVC</i> 1	-	<i>sul2</i> , <i>drfA1</i> , <i>dfrA17</i> , <i>dfrA32</i> , <i>tet</i> ©, <i>arr-3</i> , <i>floR</i> , <i>catB</i>
FC25	<i>K. pneumoniae</i>	2017	ER	15	<i>rmtC</i> , <i>rmtF</i>	<i>Bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-232}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{CMY-6} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aph</i> (6)-Id, <i>aac</i> (6')-Ib	<i>qnrB1</i>	-	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA14</i> , <i>arr-2</i> , <i>catB</i>
FC26	<i>E. coli</i>	2017	ER	4450	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}	-	<i>bla</i> _{CMY-141} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aadA</i>	-	-	<i>sul1</i> , <i>dfrA12</i>
FC27	<i>E. coli</i>	2017	ER	226	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	<i>bla</i> _{CMY-6}	<i>aac</i> (6')-Ib	-	-	<i>sul1</i> , <i>tet</i> (B)
FC28	<i>K. pneumoniae</i>	2017	ER	New	<i>armA</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	<i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac</i> (3)-II, <i>aadA</i>	-	-	<i>sul1</i> , <i>dfrA12</i>
FC29	<i>E. coli</i>	2020	ER	744	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}	-	<i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3')-Ia, <i>aadA</i>	-	S83L, D87N, S80I	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA17</i> , <i>tet</i> (B), <i>catA</i>
FC30	<i>K. pneumoniae</i>	2017	ER	147	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac</i> (3)-II, <i>aph</i> (6)-I, <i>aadA</i>	<i>qnrS1</i>	-	<i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>tet</i> (A)
FC32	<i>P. mirabilis</i>	2017	Urine	NA	<i>armA</i>	-	-	<i>bla</i> _{CMY-16} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac</i> (6')-I, <i>aac</i> (3)-I, <i>aadA</i>	-	-	<i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>tet</i> (A), <i>tet</i> (J), <i>catA</i>
MP11 3	<i>E. coli</i>	2018	ER	167	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>aph</i> (6)-I, <i>aph</i> (3'')-I	<i>aac</i> (6') -Ib-cr	S83L, D87N, S80I	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA12</i>
MP34	<i>E. coli</i>	2015	ER	405	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aadA</i> , <i>aac</i> (6')- Ib-cr	<i>aac</i> (6') -Ib-cr	S83L, D87N, S80I	<i>sul1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>tet</i> (B)
MP53	<i>K. pneumoniae</i>	2016	ER	231	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CMY-16} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac</i> (3)-II, <i>aph</i> (6)-I, <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>aph</i> (3'')-I, <i>aadA</i>	<i>aac</i> (6') -Ib-cr	-	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA14</i> , <i>floR</i>

MP56	<i>K. pneumoniae</i>	2016	ER	383	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	-	<i>aph</i> (3')-I, <i>aph</i> (6)-I, <i>aph</i> (3'')-I	-	-	<i>sul1, sul2, dfrA5, tet(A), catA</i>
MP57	<i>C. freundii</i>	2016	ER	655	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	-	<i>aac</i> (6')-I, <i>aph</i> (3')-VI	<i>qnrB38</i>	-	<i>sul1</i>
MP59	<i>K. pneumoniae</i>	2016	ER	11	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CMY-6} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac</i> (3)-II, <i>aph</i> (3')-VI, <i>aac</i> (6')-I	-	-	<i>sul1</i>
MP60	<i>E. coli</i>	2017	Urine	167	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CMY-42}	<i>aadA, aac</i> (6')-Ib-cr	-	S83L, D87N, S80I	<i>sul1, dfrA12</i>
MP70	<i>K. pneumoniae</i>	2017	ER	147	<i>rmtF</i>	<i>bla</i> _{NDM-1} + <i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-9} , <i>bla</i> _{TEM-1a}	<i>aac</i> (6')-I, <i>aph</i> (6)-I, <i>aph</i> (3'')-I, <i>aph</i> (3')-VI, <i>aadA</i>	<i>qnrB1</i> , <i>qnrS1</i>	S83L, S80I	<i>sul1, dfrA12, dfrA14, arr-2, catA</i>
MP71	<i>K. pneumoniae</i>	2017	ER	147	<i>rmtF</i>	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>aac</i> (6')-I, <i>aph</i> (6)-I, <i>aph</i> (3'')-I	<i>qnrB1</i>	S83L, S80I	<i>sul1, dfrA14, catB</i>
MP75	<i>K. pneumoniae</i>	2017	ER	231	<i>rmtF</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac</i> (6')-I	<i>qnrB1</i>	S83L, S80I	<i>arr-2, catB</i>
MP77	<i>E. coli</i>	2017	ER	648	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}	-	<i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aadA</i>	-	S83L, D87N, S80I	<i>sul1, dfrA12</i>
MP90	<i>K. pneumoniae</i>	2017	ER	14	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1a}	<i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>aph</i> (3')-VI, <i>aph</i> (6)-I, <i>aph</i> (3'')-I, <i>aac</i> (3)-II, <i>aadA</i>	<i>aac</i> (6')-Ib-cr	-	<i>sul1, sul2, dfrA1, dfrA12, arr-2, catA, catB</i>
PT08	<i>E. coli</i>	2015	ER	10	<i>rmtB</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-55}	<i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aph</i> (3')-II, <i>aadA</i> , <i>aph</i> (3'')-I, <i>aph</i> (6)-I	-	S83L, D87N, S80I	<i>sul1, sul2, dfrA12, tet(A), catA</i>
PT16	<i>K. pneumoniae</i>	2016	Urine	14	<i>armA</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac</i> (3)-II, <i>aadA</i>	-	-	<i>sul1, dfrA12, tet(D), catB</i>
PT17	<i>P. mirabilis</i>	2016	Urine	NA	<i>armA</i>	-	-	<i>bla</i> _{CMY-16} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac</i> (6')-I	-	-	<i>sul1, sul2, dfrA12, dfrA1, tet(A), tet(J), catA</i>
PT26	<i>E. coli</i>	2016	ER	617	<i>armA</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{CMY-16} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (3)-II, <i>aadA</i>	-	S83L, D87N, S80I	<i>sul1, sul2, dfrA12, dfrA17, tet(B)</i>

PT32	<i>E. cloacae</i>	2016	ER	51	<i>armA</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{SFO-1}	<i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac(6')-I</i>	-	-	<i>sul1, dfrA12</i>
PT35	<i>K. pneumoniae</i>	2017	Urine	3335	<i>armA</i>	-		<i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac(3)-II, aadA</i>	-	-	<i>sul1, dfrA12</i>
PT43	<i>E. coli</i>	2017	Urine	7358	<i>armA</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>aac(3)-II, aph(6)-I, aadA</i>	-	S83L, D87N, S80I	<i>sul1, sul2, dfrA17, tet(A), tet(B), catB</i>
PT51	<i>K. pneumoniae</i>	2018	Urine	340	<i>armA</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-33}	<i>aac(3)-II, aadA</i>	<i>qnrB1</i>	-	<i>sul1, dfrA12, dfrA14</i>
PT55	<i>K. pneumoniae</i>	2018	Urine	15	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{CMY-6}	<i>aac(6')-I</i>	-	-	<i>sul1, dfrA14</i>
PT57	<i>C. freundii</i>	2018	Urine	169	<i>armA</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1b} , <i>bla</i> _{CMY-6}	<i>aph(6)-Id, aadA</i>	<i>qnrB1</i> , <i>qnrB38</i>	-	<i>sul1, sul2, dfrA12, dfrA14, tet(A), catA</i>
PT58	<i>C. freundii</i>	2018	Urine	NEW	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac(6')-Ib, aac(3)-II, aph(6)-Id, aph(3'')-I, aadA</i>	<i>qnrB6</i>	-	<i>sul1, dfrA12</i>
PT60	<i>P. stuartii</i>	2018	HC	NA	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aadA</i>	-	-	<i>sul1, dfrA14, tet(A)</i>
PT61	<i>E. coli</i>	2018	ER	167	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aph(4)-I, aadA</i>	-	S83L, D87N, S80I	<i>sul1, sul2, dfrA17, dfrA12, tet(A), catB, catA1</i>
PT65	<i>E. coli</i>	2019	ER	156	<i>armA</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-123}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aph(4)-Ia, aadA, aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV</i>	<i>qnrS1</i>	S83L, D87Y, S80I	<i>sul1, dfrA12, tet(A)</i>
PT67	<i>K. pneumoniae</i>	2019	ER	15	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM-5} , <i>bla</i> _{OXA-181}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>aadA</i>	-	-	<i>dfrA12, tet(A)</i>
PT69	<i>E. coli</i>	2019	HC	167	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>aac(6')-Ib, aadA</i>	-	S83L, D87N, S80I	<i>sul1, dfrA12, tet(A)</i>

Tableau 13. Caractéristiques des Enterobacterales producteurs de RMTase. ST : Sequence type ; RMTase : Methyltransférase de l'ARNr 16S ; BLSE : β -lactamase à spectre étendue ;BL : β -lactamase ; AME : Enzyme modificateur d'aminoglycoside ; PMQR : Résistance aux quinolones médiée par un plamide ; QRDR : Région génétique déterminant la résistance aux quinolones ; ER : Ecouvillon rectal ; HC : Hémoculture

Isolat	Année	Type de prél.	ST	RMTase	Carbapénémase	Autre(s) BL	AME	Autre(s)
LIMAB15	2021	Respiratoire	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(6)-Id,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
LIMAB33	2021	Respiratoire	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(6)-Id,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
LIMAB34	2021	HC	78	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-72}	<i>bla</i> _{CARB-5}	<i>aac(6')-Ian, aadA5</i>	<i>sul1, sul2,</i>
LIMAB35	2021	Respiratoire	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(6)-Id,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
LIMAB36	2021	HC	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(6)-Id,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
LIMAB37	2021	KT	78	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-72}			<i>sul1, sul2,</i>
LIMAB38	2021	HC	78	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-72}	<i>bla</i> _{CARB-5}	<i>aac(6')-Ian</i>	<i>sul1, sul2,</i>
LIMAB41	2019	ER	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(3')-VIa,aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>tet(B)</i>
LIMAB48	2019	ER	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
LIMAB50	2015	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aac(6')-Ib3,aph(3')-Ia, aadA1</i>	<i>sul1, tet(B), caB</i>
LIMAB54	2014	Urine	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>tet(B)</i>
LIMAB57	2014	Respiratoire	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>tet(B)</i>
LIMAB63	2015	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aac(6')-Ib3,aph(3')-Ia, aadA1</i>	<i>sul1, tet(B), catB</i>
LIMAB64	2017	ER	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(3')-VIa,aph(6)-Id</i>	<i>sul1, tet(B), catA</i>
LIMAB65	2018	ER	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>tet(B)</i>
LIMAB66	2015	ER	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>tet(B)</i>
LIMAB80	2016	ER	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>tet(B)</i>
LIMAB84	2014	HC	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>tet(B)</i>
LIMAB86	2021	HC	78	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-72}			<i>sul1</i>
LIMAB87	2021	Urine	78	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-72}	<i>bla</i> _{CARB-5}	<i>aac(6')-Ian</i>	<i>sul1, sul2,</i>
LIMAB88	2021	HC	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(6)-Id,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
LIMAB89	2021	ER	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(6)-Id</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
LIMAB90	2021	ER	78	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-72}	<i>bla</i> _{CARB-5}	<i>aac(6')-Ian, aadA5</i>	<i>sul1, sul2,</i>
MLAB101	2014	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB102	2014	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(6)-Id,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB103	2014	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB105	2014	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB106	2014	HC	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB108	2013	ER	25	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(6)-Id,aac(3)-IIa,aac(6')-Ian,</i>	<i>sul1, sul2, tet(B)</i>
MLAB111	2018	Urine	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(6)-Id,aph(3')-VIa,aph(3')-Ia,</i>	<i>tet(B)</i>
MLAB26	2014	ER	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB30	2014	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>

MLAB34	2014	HC	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB35	2014	Respiratoire	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB36	2014	HC	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB37	2014	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB38	2014	KT	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB39	2014	KT	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB40	2014	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB41	2014	Urine	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB42	2014	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB43	2014	HC	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB45	2014	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB46	2014	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB48	2014	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB55	2015	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia, aac(6')-Ib3, aadA1</i>	<i>sul1, tet(B), catB</i>
MLAB79	2018	Cutané	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,</i>	<i>tet(B)</i>
MLAB92	2014	HC	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB95	2016	KT	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>sul2, tet(B)</i>
MLAB96	2015	ER	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(6)-Id,aph(3')-Via,</i>	<i>tet(B)</i>
MLAB97	2012	Cutané	25	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(6)-Id,aac(3)-IIa,aac(6')-Ian,</i>	<i>sul1, sul2, tet(B), arr-2</i>
MLAB98	2011	Urine	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{TEM-1D}	<i>aph(3')-VIa,aph(6)-Id,aph(3')-Ia,</i>	<i>tet(B)</i>
MLAB99	2012	Cutané	25	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}		<i>aph(6)-Id,aac(3)-IIa,aac(6')-Ian,</i>	<i>sul1, sul2, tet(B), arr-2</i>

Tableau 14. Caractéristiques des *A. baumannii* producteurs de RMTase. ST : Sequence type ; RMTase : Methyltransférase de l'ARNr 16S ; BLSE : β -lactamase à spectre étendue ; BL : β -lactamase ; AME : Enzyme modifcatrice d'aminoglycoside ; ER : Ecouvillon rectal ; HC :Hémoculture ; KT : Cathéter

2.4.4 Discussion

Dans cette étude, les Enterobacterales isolées entre 2015 et 2021 et les *A. baumannii* isolés entre 2011 et 2021 au laboratoire des hôpitaux Saint-Louis et Lariboisière – Fernand Widal ont été dépistés afin d'identifier les isolats producteurs de RMTase.

Au total, 83% (53/64) des isolats de Enterobacterales résistantes à haut niveau aux AG et isolées entre 2015 et 2021 étaient producteurs de RMTase. Concernant les *A. baumannii*, 87% (53/61) des isolats résistants à haut niveau aux AG et isolés entre 2011 et 2021 étaient producteurs de RMTases.

Chez les isolats de Enterobacterales, les gènes de RMTase les plus fréquemment identifiés étaient *armA* (40%, 21/53) suivi de *rmtB* (34%, 18/53), qui représentent les gènes les plus souvent rapportés à travers le monde (91, 171). Aucun gène *rmtA*, *rmtE*, *rmtG*, *rmtH*, *npmA* ou *npmB* n'a été identifié. Les combinaisons de deux gènes de RMTase n'ont été identifiées que dans 4% (2/53) des isolats producteurs de RMTases, ce qui montrent qu'elles sont actuellement très rares. Ces combinaisons de RMTases chez des Enterobacterales ont déjà été rapportés dans d'autres études et particulièrement dans des isolats provenant d'Asie et d'Europe (180, 213, 221). Des isolats hébergeant plus d'une RMTase 16S ont été signalés dans d'autres continents (207, 239, 259, 334, 351).

Dans l'ensemble, 33% (53/159) des isolats de Enterobacterales panrésistants aux AG présentaient un gène de RMTase. Le gène *rmtF* était retrouvé uniquement chez *K. pneumoniae*, tandis que *rmtB* était principalement identifié chez *E. coli* (15/18). Les gènes *armA* et *rmtC* étaient retrouvés dans plus de quatre espèces de Enterobacterales différentes. La prévalence, plus importantes des gènes de RMTase chez *K. pneumoniae* et *E. coli*, est préoccupante car ce sont des pathogènes majeurs, qui ont la capacité d'accumuler de multiples gènes de résistances et de diffuser massivement, favorisant la propagation de ces gènes en milieu hospitalier et communautaire (31).

Les 11 isolats résistants à haut niveau aux AG qui ne possédaient pas de gènes de RMTase se sont avérés abriter des combinaisons d'AME qui leur conféraient cette résistance. Ces isolats montraient une diversité en terme d'espèce bactérienne avec quatre espèces différentes décrites incluant néanmoins une majorité (6/11) de *E. coli*. Au sein de cette espèce, nous avons identifié cinq ST différent suggérant une diffusion non-clonal. L'ensemble de ces isolats représentaient 17% des Enterobacterales résistant à haut niveau aux AG. Ce nombre est légèrement supérieur à celui retrouvé dans l'étude de prévalence de Taylor *et al.* réalisée sur 6 mois en 2016 au

Royaume Uni (181). Dans cette étude, les auteurs ont identifié 69 isolats de Enterobacterales résistants à haut niveau à l'amikacine dont 96% produisaient une RMTase. Les trois isolats n'en produisant pas possédaient une combinaison d'AME leur conférant cette résistance ainsi qu'une résistance à la gentamicine et la tobramycine. Les combinaisons de gènes d'AME retrouvaient les associations *aac(6')-Ib-cr* plus *aac(3)-IIa* plus *aph(3')-VIb* (n=2) et *aac(6')-Ib-cr* plus *aac(3)-IIa* (n=1) similaires à celle retrouvées dans nos isolats. Ces trois isolats appartenaient à trois espèces bactériennes différentes incluant un *E. coli* et une *K. pneumoniae* appartenant à des ST différents de ceux retrouvés dans nos isolats ne possédant pas de RMTase. Dans une étude précédente, Taylor *et al.* ont retrouvé que 5,5% (44/806) des isolats de Enterobacterales ayant un haut niveau de résistance aux AG ne possédaient pas de RMTase (180). Dans cette étude, les auteurs ne décrivaient pas les génotypes de résistance de ces isolats. Enfin dans notre étude précédente sur les *E. coli* producteurs de RMTase (voir Chapitre I), tous les isolats résistants à haut niveau aux AG produisaient une RMTase (30/30).

Chez *A. baumannii*, les 53 isolats produisaient la RMTase ArmA. Cette RMTase est la plus fréquente chez *A. baumannii*, néanmoins, d'autres gènes codant des RMTases ont été décrit dans cette espèce comme *rmtA* et *rmtD* en Inde, *rmtB* au Vietnam et *rmtC* en Uruguay (91, 176, 197, 220). Récemment, un nouveau variant du gène *rmtE*, *rmtE3*, a été décrit dans un isolat anglais (160). Nous avons également identifié que 13% (8/61) des isolats résistants à haut niveau aux AG ne possédaient pas de RMTase. Dans une étude en Chine, 28% (21/75) des *A. baumannii* présentant un haut niveau de résistance aux AG ne possédaient pas de RMTase, le reste des isolats possédait le gène *armA* (409). La combinaison de gènes d'AME la plus fréquente était *aac(6')-Ib* plus *ant(2'')-Ia* (n=5), cependant aucun de nos isolats de *A. baumannii* ne présentait cette association. Dans une étude réalisée au Royaume-Uni, 2,7% (15/550) des *A. baumannii* résistants à haut niveau aux AG ne possédaient pas de RMTase (160). La combinaison de gènes d'AME la plus fréquente était *aph(3')-VI* plus *ant(2')-I*, elle était fréquemment retrouvée dans nos isolats (50% , 4/8) également.

Notre étude rapporte la première estimation de prévalence des Enterobacterales et *A. baumannii* producteurs de RMTase dans un laboratoire hospitalier en France. Les prévalences sur les périodes étaient de 0,12-0,23% pour les Enterobacterales (période 2015-2021) et 4,4-8,7% pour les *A. baumannii* (période 2011-2021).

La prévalence chez les Enterobacterales est similaire à celles observées dans d'autres pays d'Europe : 0,12% (19/15386), 0,15% (6/4080) et 0,12% (66/56172) respectivement en Belgique, en Grèce et au Royaume Uni (178, 181, 255). Cette prévalence était légèrement plus

importante dans une étude réalisée sur des isolats bulgares en 2005 (seul le gène *armA* était recherché) où une prévalence de 1,5% (20/1310) était observée (261). Enfin cette prévalence semble plus importante en Chine où un taux de 3,9% était observé. De manière intéressante, cette prévalence augmente si l'on considère uniquement les isolats de Enterobacterales produisant une carbapénémase. Dans notre collection, 326 isolats de Enterobacterales étaient producteurs de carbapénémase dont 10,4% (34/326) produisaient une RMTase. Ce taux est proche de celui observé chez des *K. pneumoniae* producteurs de carbapénémase en Grèce (7,7%) mais inférieurs à ceux observés en Asie (> 30%) (273, 347, 400, 401).

La prévalence que nous avons observée chez *A. baumannii* est plus élevée que celle observée chez les Enterobacterales. Cette prévalence chez les *A. baumannii* est similaire à celle observée au Royaume Uni (3,3%, 11/338) mais inférieure à celle observée au Vietnam (83%) (175, 181). Dans notre collection, 242 *A. baumannii* étaient producteurs de carbapénémase dont 22% (53/242) étaient producteurs de RMTase. Dans une étude en Grèce 100% (325/325) des *A. baumannii* producteurs de RMTase (100% de *armA*) produisaient également une carbapénémase, majoritairement (98,5%, 320/325) OXA-23 (404). Dans une autre étude grecque, 88% (37/42) des *A. baumannii* producteurs de carbapénémase hébergeaient le gène *armA* (410).

Cette étude a montré que les gènes de RMTase sont étroitement associés aux gènes de carbapénémase, puisque 78% (83/106) des isolats ayant une RMTase possédaient un gène codant une carbapénémase. Cette observation suggère que les gènes de RMTase diffusent en raison de leur association avec les gènes de carbapénémase, bien qu'il ne s'agisse pas d'une association exclusive. Dans une étude récente en Suisse, Fournier *et al.* ont observé que 10% (99/991) des isolats de Enterobacterales résistants aux carbapénèmes possédaient une RMTase (346). La carbapénémase la plus fréquemment identifiée chez les producteurs de RMTase était NDM, principalement chez *K. pneumoniae*. À noter que la RMTase la plus fréquente était *armA*. L'association entre *armA* et carbapénémase, principalement OXA-23, chez *A. baumannii* semble encore plus importante car seulement quelques cas de *A. baumannii* producteurs de RMTase ne possédant pas de carbapénémase ont été décrits. Au Royaume-Uni, 95,5% des *A. baumannii* producteurs de *armA* possédaient une carbapénémase, 100% en Grèce, dans les deux cas OXA-23 principalement (160, 404).

Dans cette étude de prévalence, on a constaté que plusieurs clones bactériens "à haut risque" abritaient des gènes de RMTase, notamment, *E. coli* ST405 et ST167, *K. pneumoniae* ST15 et ST147 et *A. baumannii* ST2 appartenant au clone international ICII. Le ST167 et le ST405 sont

des clones associés à de la multirésistance, notamment au carbapénémase de type NDM (294, 377, 411). De manière intéressante, nous avons déjà identifié ces clones chez des *E. coli* producteurs de RmtB (voir chapitre 1). *K. pneumoniae* ST147 est un clone bactérien à "haut risque" connu pour être porteur de carbapénémases telles que *bla*_{NDM} ainsi que de carbapénémases de type *bla*_{OXA-48} (412, 413). Une association particulière entre ce clone et *rmtF* a été observé comme précédemment (voir Chapitre II). Chez *A. baumannii*, le clone international ST2 est fréquemment associé à la production de carbapénémase de type OXA et notamment OXA-23 (414). Récemment, des isolats appartenant à ce clone et producteurs de carbapénémase OXA-23 et de la RMTase ArmA ont été rapportés en Europe (410, 415). L'acquisition chez ce clone de la RMTase ArmA est particulièrement préoccupante car peu d'alternatives thérapeutiques restent disponibles en cas d'infection.

Cette étude présente plusieurs limites, notamment les détails cliniques recueillis sont insuffisants, ce qui aurait permis de mieux comprendre les types d'infection auxquelles les bactéries productrices de RMTase sont associées et si les isolats producteurs de RMTase représentaient une colonisation plutôt que des infections. De même, les antécédents d'expositions récentes aux antibiotiques, et la notion de résidence ou d'hospitalisation à l'étranger étaient inconnus. On ignore également combien d'isolats producteurs de RMTase ont été acquis à l'hôpital. Une étude sur les cas d'infections à bactéries productrices de RMTase permettrait d'identifier les patients et les risques d'échec de traitement. Enfin, notre étude utilise des bactéries isolées dans deux hôpitaux universitaires parisiens représentant un bassin de population très dense mais une zone géographique peu étendue. De plus, certains isolats n'ont pas pu être récupérés dans notre collection, introduisant un biais potentiel de représentation ainsi qu'une sous-estimation de la prévalence. Une étude plus large, idéalement prospective, est nécessaire pour évaluer l'épidémiologie moléculaire et la prévalence des producteurs de RMTase à l'échelle nationale. L'analyse des supports et des environnements génétiques des producteurs de RMTase reste à faire afin de déterminer si les environnements génétiques sont similaires dans le temps. La technologie de séquençage « long read » reste à faire pour la détermination précise de la structure des supports et environnements génétiques des gènes de RMTase sur la période.

En conclusion, cette étude a permis de déterminer le taux de prévalence des Enterobacterales producteurs de RMTase dans notre institution entre 2015 et 2021, qui était de 0,1% ; et celui des *A. baumannii* producteurs de RMTase sur la période 2011 à 2021, qui était de 4,4%. Les gènes codant les RMTases semblent avoir une forte association avec les gènes codant des

carbapénémases, principalement *bla_{NDM}*, ce qui suggère une émergence en France par co-sélection.

2.5 CHAPITRE V : Activité de l'apramycine sur une collection de bacilles à Gram-négatif producteurs de RMTase.

2.5.1 Introduction à la publication n°4

Les AG sont des antibiotiques à large spectre particulièrement utilisés en cas d'infections sévères dont l'action peut être empêchée par les RMTases ou les AME. La plazomicine, le dernier AG mis sur le marché, a été élaborée dans le but de résister à l'action de la plupart des AME par ajouts de différents groupements sur la structure de la sisomicin. Ces modifications lui permettent de résister à l'ensemble des AME, excepté lorsque la bactérie produit une AAC(2')-I (enzyme naturellement produite par *Providencia stuartii*) et l'APH(2'')-IV (enzyme retrouvée principalement chez les entérocoques). La plazomicine sera inactive si la souche produit une RMTase (272).

Quelques AG maintiennent leur activité sur des bactéries productrices de RMTase du résidu G1405, RMTases les plus répandues dans le monde. En effet, la méthylation de la G1405 bloque l'action des AG appartenant au groupe 4,6-2-DOS, mais n'a aucun effet pour ceux présentant une structure différente. Ainsi, la spectinomycine, la streptomycine, la néomycine, la paromomycine et l'apramycine pourraient constituer des alternatives thérapeutiques en cas de production de RMTase ciblant le résidu G1405 de l'ARNr 16S. Une étude a évalué l'activité de la néomycine, la streptomycine, la paromomycine et l'apramycine sur des isolats cliniques de Enterobacterales produisant des carbapénémases. Les auteurs retrouvent une sensibilité de plus de 60% pour ces quatre AG, variant de 65% pour la paromomycine à 95% pour l'apramycine (416). A titre de comparaison, l'amikacine et la gentamicine n'étaient sensibles que dans respectivement 55% et 28% des cas. Cependant, ces antibiotiques ne sont disponibles que sous forme de topiques (oculaire, cutanée, digestif) ou pour injection intramusculaire, ce qui n'est pas adapté pour traiter des infections sévères. Concernant l'apramycine, elle n'est actuellement autorisée que pour un usage vétérinaire mais un essai de phase I (ClinicalTrial.gov NCT04105205) chez l'Homme vient de montrer l'innocuité de son utilisation à doses potentiellement thérapeutiques (417). Cet AG est particulièrement intéressant du fait de sa structure unique (DOS monosubstitué) différente des autres AG. La résistance acquise à cet antibiotique est rare, seules les gènes *aac(3)-IV*, *apmA* (codant une AAC(2')), *npmA* et *npmB* (codant des RMTases du résidu A1408) ont été décrits comme conférant cette résistance (147, 171, 418, 419). D'autres mécanismes de résistances impliquant de l'imperméabilité et/ou de l'efflux ont été évoqués (420, 421).

Les premières études évaluant l'activité de l'apramycine utilisaient des bactéries isolées chez les animaux d'élevage du fait de son usage vétérinaire. En 1989, Chaslus-Dancla *et al.* ont décrit des entérobactéries isolées dans des prélèvements cliniques et résistantes à l'apramycine par production de l'AME AAC(3)-IV, suggérant la diffusion dans des souches cliniques de cette résistance. Par la suite, quelques études ont évalué l'activité de l'apramycine sur des isolats cliniques, majoritairement sur des collections d'entérobactéries, et plus rarement sur des bactéries à Gram négatif non-fermentaires comme *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (116, 340, 404, 422–424).

L'efficacité de l'apramycine sur les bacilles à Gram négatif produisant une RMTase n'est pas bien connue à l'heure actuelle. Elle a été évaluée sur quelques isolats de Enterobacterales et de *A. baumannii* producteurs de RMTase avec des taux de sensibilité variables selon les études (156, 179, 404, 421, 425).

Dans ce contexte, nous avons utilisé la collection constituée au laboratoire pour évaluer l'activité de l'apramycine sur les bactéries productrices de RMTase par la technique de microdilution en milieu liquide. Cette collection est composée de 164 isolats producteurs de RMTase dont 84 Enterobacterales, 53 *A. baumannii* and 27 *P. aeruginosa* incluant respectivement, 48, 49 et quatre producteurs de carbapénémases. L'espèce la plus fréquente chez les Enterobacterales était *E. coli* (n=49) suivi de *Klebsiella* spp. (n=23). La distribution des gènes de RMTase est présentée dans le tableau 15.

	Gènes de RMTase (n)							
	<i>armA</i>	<i>rmtB1</i>	<i>rmtB4</i>	<i>rmtC</i>	<i>rmtD3</i>	<i>rmtF1</i>	<i>rmtF2</i>	<i>rmtB1 + rmtF1</i>
Enterobacterales	31	35	0	12	0	5	0	1
<i>E. coli</i>	15	30	0	4	0	0	0	0
<i>Klebsiella</i> spp.	9	4	0	3	0	5	0	1
<i>C. freundii</i>	4	1	0	0	0	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	1	0	0	2	0	0	0	0
<i>P. mirabilis</i>	2	0	0	1	0	0	0	0
<i>P. stuartii</i>	0	0	0	2	0	0	0	0
Non-fermentants	54	0	5	0	1	0	20	0
<i>A. baumannii</i>	53	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	0	5	0	1	0	20	0
Total	85	35	5	12	1	5	20	1

Tableau 15. Distribution des gènes de RMTase par espèce bactérienne.

Chez les Enterobacterales, les principales carbapénémases retrouvées étaient NDM (n=24) suivi de NDM + OXA-48-like (n=7), OXA-48-like (n=6) et VIM (n=2). Les carbapénémases produites par les isolats de *A. baumannii* étaient des OXA-23 (n=47) ou des OXA-72 (n=6) appartenant au groupe OXA-24/40. Chez les *P. aeruginosa*, les carbapénémases étaient toutes des NDM-1 (n=4).

L'apramycine ne possède pas de seuils d'interprétation de la résistance, que ce soit au niveau de la société savante européenne (EUCAST) ou américaine (CLSI). Ainsi, afin d'interpréter nos CMI, nous nous sommes basés sur les seuils épidémiologiques pour *E. coli* fournis par l'autorité européenne de sûreté des aliments (EFSA) pour les Enterobacterales (sensible à l'apramycine si CMI \leq 8mg/L et résistant si CMI $>$ 8 mg/L) et sur les valeurs de seuils épidémiologiques établies pour *A. baumannii* dans la publication de Juhas *et al.* pour les bactéries non fermentaires (sensible à l'apramycine si CMI \leq 16 mg/L et résistant si CMI $>$ 16 mg/L) (116, 421).

Au total, 95% (156/164) des isolats étaient sensibles à l'apramycine avec une CMI₅₀ et une CMI₉₀ de respectivement 4 et 16 mg/L. Pour les Enterobacterales, 96% (81/84) des isolats étaient sensibles avec une CMI₉₀ à 8 mg/L avec des CMI statistiquement plus élevées chez les non producteurs de carbapénémase que chez les producteurs ($p < 0,0001$). A l'inverse, les CMI étaient significativement plus faibles chez les isolats de *Klebsiella* spp. que chez les autres espèces de Enterobacterales ($p = 0.0012$). Chez les Enterobacterales, le type de RMTase produite n'avait pas d'impact sur les CMI. Concernant les bactéries non-fermentaires, 95% (79/84) des isolats étaient sensibles avec une CMI₉₀ à 16 mg/L avec des CMI significativement plus élevées chez *P. aeruginosa* que chez *A. baumannii* ($p < 0,0001$).

Au total, huit isolats étaient résistant à l'apramycine incluant trois *P. aeruginosa*, deux *A. baumannii*, deux *E. coli* et un *C. freundii*. Après analyse des génomes, seul un isolat de *E. coli* PT65 possédait le gène *aac(3)-IV* conférant la résistance à l'apramycine et présentait une CMI $>$ 64mg/L. Pour les sept autres isolats, aucun gène de résistance à l'apramycine (*aac(3)-IV*, *apmA*, *npmA* et *npmB*) n'a été détecté suggérant que d'autres mécanismes de résistance comme de l'efflux et/ou de l'imperméabilité pouvaient en être la cause.

Ce gène *aac(3)-IV* a été retrouvé dans l'isolat *E. coli* PT65 appartenant au ST156. Nous avons analysé le contig de 8 kb sur lequel se trouvait le gène. Ce contig était identique (100% de couverture et d'identité) avec une séquence provenant du plasmid pAH01-4 isolée dans un *E. coli* ST602 en Chine provenant d'un poulet. D'autres gènes de résistance étaient retrouvés sur ce

contig, *aph(4)-I* conférant la résistance à l'hygromycine, un AG non-utilisé en clinique et en vétérinaire, et le gène *sul2* conférant la résistance au sulfaméthoxazole. Plusieurs gènes codant des IS étaient également présentes sur le contig ainsi que sur le plasmide pAH01-4. Cependant, le plasmide portant le gène *aac(3)-IV* dans *E. coli* PT65 n'a pas pu être identifié précisément car il possédait plusieurs réplicons et la technologie Illumina n'a pas permis d'analyser le contexte génétique complet, probablement en raison des IS situées autour du gène.

PUBLICATION 4

***In vitro* activity of apramycin in 16S-RMTase-producing Gram-negative isolates.**

Soumis à Clinical Microbiology and Infection, Septembre 2022

François Caméléna, Mathilde Liberge, Inès Rezzoug, Manel Merimèche, Thierry Naas
et Béatrice Berçot

2.5.2 Publication n°4

Clinical Microbiology and Infection



***In vitro* activity of apramycin against 16S-RMTase-producing Gram-negative isolates**

Journal:	<i>Clinical Microbiology and Infection</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Camelena, François; Hôpital Saint-Louis, Bacteriology Liberge, Mathilde; Hôpital Saint-Louis, Bacteriology Rezzoug, Ines; Hôpital Saint-Louis, Bacteriology Merimeche, Manel; Hôpital Saint-Louis, Bacteriology Naas, Thierry; Bicêtre hospital, Assistance Publiques des Hôpitaux de Paris, Bacteriology-Hygiene unit; Paris-Sud University, LabEx Lermite, Faculty of Medecine, EA7361 "Structure, dynamic, function and expression of broad spectrum β -lactamases" BERCOT, BEATRICE; Groupe hospitalier St Louis-lariboisiere-FW, Bacteriology; Universite Paris Diderot UFR de Medecine, IAME-UMR1137
Key Words:	Apramycine, carbapenemase, Enterobacterales, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Aminoglycosides, armA, rmtB, methylase, rmtF
Abstract:	<p>Objectives: Apramycin is an aminoglycoside (AG) with a unique structure that is little affected by plasmid-mediated mechanisms of AG resistance, including most AG-modifying enzymes (AME) and 16S rRNA methyltransferases (16S-RMTases). We evaluate the activity of apramycin against a collection of 16S-RMTase-producing isolates, including Enterobacterales, non-fermenting bacteria and carbapenemase producers.</p> <p>Methods: In total, 164 non-duplicate 16S-RMTase-producing isolates, including 84 Enterobacterales, 53 <i>A. baumannii</i> and 27 <i>P. aeruginosa</i> isolates, were included in the study. Whole-genome sequencing (WGS) was performed on all isolates with Illumina technology. The MIC of apramycin was determined by broth microdilution with customized Sensititre plates (Thermo Fisher Scientific, Dardilly, France).</p> <p>Results: We found that 95% (156/164) of the 16S-RMTase-producing isolates were susceptible to apramycin, with a MIC₅₀ of 4 mg/L and a MIC₉₀ of 16 mg/L, respectively. Resistance rates were higher in <i>P. aeruginosa</i> (11%) than in <i>A. baumannii</i> (4%) or Enterobacterales (4%) ($p < 0.0001$ for each comparison). In Enterobacterales, the MIC of apramycin was higher in isolates not producing carbapenemase than in carbapenemase producers ($p = 0.0001$). Eight isolates were resistant to apramycin including, one isolate with a MIC > 64 mg/L due to acquisition of the <i>aac(3)-IV</i> gene. The genetic environment of the <i>aac(3)-IV</i> gene was similar to that in the pAH01-4 plasmid of an <i>E. coli</i> isolate from chicken.</p>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	Conclusions: Resistance to apramycin remains rare in 16S-RMTase-producing isolates. Apramycin may, therefore, be an interesting alternative treatment for infections caused by 16S-RMTase producers.

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 ***In vitro* activity of apramycin against 16S-RMTase-producing Gram-negative isolates**

2 François Caméléna^{1,2*}, Mathilde Liberge^{1,2*}, Inès Rezzoug¹, Manel Merimèche^{1,2}, Thierry
3 Naas^{3,4,5}, Béatrice Berçot^{1,2}

4 ¹Department of Bacteriology, Saint-Louis-Lariboisière Hospital Group, Assistance Publique -
5 Hôpitaux de Paris, Paris, France;

6 ²Université de Paris Cité, INSERM 1137, IAME, Paris, France;

7 ³Department of Bacteriology-Hygiene, Bicêtre Hospital, Assistance Publique - Hôpitaux de
8 Paris, Le Kremlin-Bicêtre, France;

9 ⁴Université de Paris-Saclay, INSERM 1184, RESIST Unit, Le Kremlin-Bicêtre, France;

10 ⁵French National Reference Centre for Antimicrobial Resistance, Le Kremlin-Bicêtre, France.

11 *These authors contributed equally to this work.

14 Running Head: Activity of apramycin against 16S-RMTase producers

16 **Corresponding author:** Pr. Béatrice Berçot, Department of Bacteriology, Saint-Louis
17 Hospital, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, 1 av. Claude Vellefaux 75010 Paris, France.

18 E-mail: beatrice.bercot@aphp.fr.

20 Length of the abstract: 238 words

21 Length of the paper: 1996 words

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

22 **Abstract**

23 **Objectives:** Apramycin is an aminoglycoside (AG) with a unique structure that is little affected
24 by plasmid-mediated mechanisms of AG resistance, including most AG-modifying enzymes
25 and 16S rRNA methyltransferases (16S-RMTases). We evaluate the activity of apramycin
26 against a collection of 16S-RMTase-producing isolates, including Enterobacterales, non-
27 fermenting bacteria and carbapenemase producers.

28 **Methods:** In total, 164 non-duplicate 16S-RMTase-producing isolates, including 84
29 Enterobacterales, 53 *A. baumannii* and 27 *P. aeruginosa* isolates, were included in the study.
30 Whole-genome sequencing (WGS) was performed on all isolates with Illumina technology. The
31 MIC of apramycin was determined by broth microdilution with customized Sensititre plates
32 (Thermo Fisher Scientific, Dardilly, France).

33 **Results:** We found that 95% (156/164) of the 16S-RMTase-producing isolates were susceptible
34 to apramycin, with a MIC₅₀ of 4 mg/L and a MIC₉₀ of 16 mg/L, respectively. Resistance rates
35 were higher in *P. aeruginosa* (11%) than in *A. baumannii* (4%) or Enterobacterales (4%) ($p <$
36 0.0001 for each comparison). In Enterobacterales, the MIC of apramycin was higher in isolates
37 not producing carbapenemase than in carbapenemase producers ($p = 0.0001$). Eight isolates
38 were resistant to apramycin including, one isolate with a MIC > 64 mg/L due to acquisition of
39 the *aac(3)-IV* gene. The genetic environment of the *aac(3)-IV* gene was similar to that in the
40 pAH01-4 plasmid of an *E. coli* isolate from chicken in China.

41 **Conclusions:** Resistance to apramycin remains rare in 16S-RMTase-producing isolates.
42 Apramycin may, therefore, be an interesting alternative treatment for infections caused by 16S-
43 RMTase producers.

44

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

45 Introduction

46 Aminoglycosides (AGs) are broad-spectrum antibiotics used to treat severe infections caused
47 by Gram-positive and Gram-negative bacteria (GNB). The most common mechanism of
48 resistance to AGs involves AG-modifying enzymes (AMEs), which are very frequent in
49 invasive bacteria [1]. However, AME-encoding genes do not confer resistance to all clinically
50 relevant AGs (amikacin, gentamicin, tobramycin and plazomicin), even in the carbapenemase-
51 producing GNB of the ESKAPE group [2]. Indeed, plazomicin remains active in most GNB,
52 even carbapenem-resistant Enterobacterales [2].

53 Several studies have documented the worldwide emergence of 16S rRNA methyltransferase
54 (16S-RMTase)-producing isolates [3,4]. These enzymes methylate the 16S ribosomal RNA at
55 the G1405 or A1408 residue, thereby conferring a high level of resistance to all clinically
56 relevant AGs, and are mostly encoded by plasmids [3]. Since their first description in
57 Enterobacterales in the first decade of the 21st century, 11 different acquired 16S-RMTases
58 have been described [3,5]. ArmA and RmtB, the predominant 16S-RMTase enzymes, have
59 spread worldwide among Enterobacterales and *Acinetobacter baumannii*, whereas the
60 distribution of these genes in *Pseudomonas aeruginosa* is more heterogeneous. The prevalence
61 of these genes varies around the world, with a higher prevalence in Asia. However, recent
62 reports have suggested that isolates producing both 16S-RMTases and carbapenemases are
63 emerging in Europe and Asia, further limiting the options for antibiotic treatment [6–10].

64 Apramycin is an aminocyclitol aminoglycoside used in veterinary practice for the treatment of
65 colibacillosis, salmonellosis and enteritis in farm animals [11]. Its structure differs slightly from
66 that of classical AGs, as it has a monosubstituted deoxystreptamine (DOS) moiety compared to
67 the classical AGs (2,6-2-DOS) mentioned above [3]. This unique structure preserves the activity
68 of apramycin against GNB carrying genes encoding AMEs or 16S-RMTases, with the
69 exception of the *aac(3)-IV* gene, the AAC(2)-encoding gene *apmA*, and genes encoding the

1
2
3 70 rarely found 16S-RMTases methylating the A1408 residue of the 16S rRNA (*i.e.* *npmA* and
4
5 71 *npmB*) [3,12,13]. Apramycin and its derivatives may, therefore, constitute a promising subclass
6
7
8 72 of AGs that could be developed for use in humans. Indeed, EBL-1003 (Juvabis AG,
9
10 73 Switzerland), a crystalline free base of apramycin, is currently being developed for use in
11
12 74 humans, and a phase I clinical trial has already been launched to assess its potential for use in
13
14 75 human medicine (ClinicalTrial.gov NCT04105205).

16
17 76 Very few studies have evaluated the *in vitro* activity of apramycin against Enterobacterales, and
18
19 77 even fewer have considered its activity against *P. aeruginosa* and *A. baumannii* isolates [14–
20
21 78 16]. Enterobacterales are highly susceptible to apramycin, but increasing rates of resistance
22
23 79 have been reported in carbapenemase-producing isolates [17]. For *P. aeruginosa* and *A.*
24
25 80 *baumannii*, the MIC of apramycin seems to be higher, particularly in multidrug-resistant
26
27 81 (MDR) isolates [15,16,18].

28
29
30
31
32 82 In this study, we evaluated apramycin activity against 16S-RMTase-producing GNB isolates,
33
34 83 including isolates that also produced carbapenemase, by broth microdilution susceptibility
35
36 84 testing and whole-genome sequencing (WGS).

37
38
39 85

40 41 42 86 **Materials and methods**

43
44
45 87 **Isolates and 16S-RMTase.** We analyzed a collection of 164 clinical isolates of GNB
46
47 88 expressing a 16S-RMTase cultured from rectal swabs ($n=69$), urine ($n=29$), cutaneous samples
48
49 89 ($n=23$), blood ($n=21$), respiratory samples ($n=11$) and other samples ($n=11$). Each clinical
50
51 90 isolate (according to the bacterial species) came from a single patient. There were 84
52
53 91 Enterobacterales (49 *Escherichia coli*, 23 *Klebsiella* spp., 5 *Citrobacter freundii*, 2 *Proteus*
54
55 92 *mirabilis*, 3 *Enterobacter cloacae* and 2 *Providencia stuartii*), 53 *A. baumannii* and 27 *P.*
56
57 93 *aeruginosa* isolates. The sequences of the 16S-RMTase genes of 134 isolates from the Saint-

1
2
3 94 Louis-Lariboisière-Fernand Widal Hospital Group were obtained by WGS with Illumina
4
5 95 technology. Briefly, DNA was isolated with automated QIA Symphony extraction (QIAGEN,
6
7 96 Crawley, UK) using DSP DNA Mini Kit (QIAGEN) according to manufacturer's instructions.
8
9
10 97 The Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) was used to prepare
11
12 98 libraries for sequencing. Samples were sequenced on an Illumina NextSeq or MiSeq sequencer,
13
14 99 for 300 cycles (150 paired-end reads). All the WGS reads were assembled *de novo* with SPAdes
15
16
17 100 v3.14 [19]. The resistome was evaluated for each isolate with CARD and ResFinder databases
18
19 101 [20,21]. Multilocus sequence typing (MLST) were deduced as described by the protocols of the
20
21 102 PubMLST. Sequence data were already available for the other 30 isolates [22].
22
23
24 103 The 16S-RMTase genes present in the Enterobacterales isolates were *rmtB* in 35 isolates, *armA*
25
26 104 in 32, *rmtC* in 11, *rmtF* in five and *rmtB* plus *rmtF* in one isolate. All the *A. baumannii* isolates
27
28 105 producing 16S-RMTases carried *armA*. The 16S-RMTase genes present in *P. aeruginosa* were
29
30 106 *rmtF* in 20 isolates, *rmtB* in five, *rmtD* in one, and *armA* in one isolate. The genome of the *E.*
31
32 107 *coli* PT65 isolate, for which the MIC of apramycin was > 64 mg/L, was annotated with prokka
33
34 108 and contigs were screened for replicon plasmid content with PlasmidFinder [23,24]. Further
35
36 109 information about isolates is provided in Supplemental Table S1. The genome sequence of
37
38 110 isolate PT65 has been deposited in GenBank under BioSample no. SAMN29986909 and
39
40 111 BioProject no. PRJNA862645.
41
42
43
44
45
46 112 **Antimicrobial susceptibility testing.** The MIC of apramycin was determined by broth
47
48 113 microdilution with customized Sensititre plates (Thermo Fisher Scientific, Dardilly, France).
49
50 114 No EUCAST breakpoints are available for apramycin. We therefore used epidemiological
51
52 115 breakpoints from the European Food Safety Authority (EFSA) for *E. coli* for Enterobacterales
53
54 116 isolates (susceptible \leq 8 mg/L and resistant > 8 mg/L) and epidemiological cutoff values for *A.*
55
56 117 *baumannii* were applied for non-fermenting bacteria, including *P. aeruginosa* (susceptible \leq 16
57
58 118 mg/L and resistant > 16 mg/L) [16,25]. *E. coli* strain ATCC 25922 was used as a quality control
59
60

1
2
3 119 strain for susceptibility testing. For all 164 isolates, the MICs of gentamicin, amikacin and
4
5 120 tobramycin were determined with MIC gradient strips (Etest, bioMérieux, Marcy l'Etoile,
6
7 121 France) to confirm the 16S-RMTase phenotype [*i.e.* high levels of resistance (MIC \geq 256 mg/L)
8
9 122 to these three AG].
10
11
12

13 123 **Statistical analysis.** All statistical analyses were performed with Prism software (Graphpad,
14
15 124 San Diego, US). A non-parametric Wilcoxon rank sum was used for comparisons between
16
17 125 groups.
18
19
20

21 126

22 23 127 **Results**

24
25
26 128 The MIC of apramycin was determined for 164 16S-RMTase-producing isolates: 84
27
28 129 Enterobacterales, 53 *A. baumannii* and 27 *P. aeruginosa* isolates, including 38, 53 and 4,
29
30 130 respectively, producing carbapenemase. The distribution of the MIC of apramycin is
31
32 131 summarized in Table 1. Overall, the antimicrobial drug susceptibility testing results showed
33
34 132 that 95% (156/164) of the 16S-RMTase-producing isolates were susceptible to apramycin, with
35
36 133 a MIC₅₀ of 4 mg/L and a MIC₉₀ of 16 mg/L. The MIC of apramycin was significantly higher in
37
38 134 non-fermenting bacteria than in Enterobacterales ($p < 0.0001$, Figure S1). For Enterobacterales
39
40 135 isolates, the MIC₉₀ was 8 mg/L, with only three isolates having values above the susceptibility
41
42 136 breakpoint, including one isolate with a MIC > 64 mg/L (PT65) (Table 1). The MIC of
43
44 137 apramycin was higher in isolates that did not produce carbapenemase than in carbapenemase
45
46 138 producers ($p < 0.0001$), but was similar between isolates that did and did not produce ArmA (p
47
48 139 = 0.47) (Figure S2, Table S2). Apramycin susceptibility rates varied between species, with
49
50 140 values of 96% for *E. coli*, 100% for *Klebsiella* spp. and 92% for other species (including *C.*
51
52 141 *freundii*, *E. cloacae*, *P. mirabilis* and *P. stuartii*). In non-fermenting bacteria, the mean MIC₉₀
53
54 142 was 16 mg/L, and five isolates were considered resistant (two *A. baumannii* and three *P.*
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

143 *aeruginosa* isolates). MIC values were significantly higher in *P. aeruginosa* than in *A.*

144 *baumannii* ($p < 0.0001$) with MIC₉₀ values of 32 mg/L and 16 mg/L, respectively (Figure S1).

145 The eight apramycin-resistant isolates consisted of three *P. aeruginosa*, two *A. baumannii*, two

146 *E. coli* and one *C. freundii* isolate. In previous studies, plasmid-mediated apramycin resistance

147 was attributed principally to the presence of an AME-encoding gene, *aac(3)-IV*, conferring

148 high-level resistance [12]. Here, we found only one *E. coli* isolate (PT65) harboring the *aac(3)-*

149 *IV* gene, with a MIC of apramycin > 64 mg/L. For the other seven apramycin-resistant isolates

150 (MICs of 16 to 64 mg/L) we detected no *aac(3)-IV* gene or any other acquired apramycin

151 resistance determinant, including the 16S-RMTase genes *npmA* and *npmB* or the AAC(2) gene

152 *apmA*.

153 Genomic characterization of the PT65 isolate harboring the *aac(3)-IV* gene revealed that this

154 *E. coli* isolate belonged to ST156 and carried IncFIB (AP001918), IncFII and IncY replicon

155 plasmids. ST156 belongs to phylogroup B1, which contains both human and animal isolates

156 [22,26]. The *aac(3)-IV* gene was localized in a contig of 8.3 kb that also carried the resistance

157 determinants *aph(4)-I* and *sul*, and multiple mobile genetic elements. The sequence of this

158 contig was identical to sequences from the pAH01-4 plasmid (Accession no. CP055255) found

159 in *E. coli* ST602, also belonging to phylogroup B1, which was obtained from a chicken in

160 China. It differed from the recently reported environment of *aac(3)-IV* in p41968-R65 plasmid

161 (Accession no. CP068621), which was obtained from a carbapenem-resistant *K. pneumoniae*

162 ST258 isolate (Figure 1) [17]. In these genetic environments, the *aac(3)-IV* gene was embedded

163 in a region containing multiples copies of IS6 family elements (IS26, ISEc59 and IS1006).

164 Discussion

165 We found that apramycin remained active against various 16S-RMTase-producing isolates,

166 including carbapenemase-producing isolates. However, the MIC of apramycin was

1
2
3 167 significantly lower in Enterobacterales than in non-fermenting bacteria, particularly in *P.*
4
5 168 *aeruginosa*. Eight isolates (5%, 8/164) were considered resistant to apramycin, mostly non-
6
7 169 fermenting bacteria. We identified the *aac(3)-IV* apramycin resistance gene in a single
8
9 170 apramycin resistant isolate (PT65), which had the highest MIC (> 64 mg/L) observed in the
10
11 171 study. For the seven remaining isolates, genomic characterization failed to identify apramycin
12
13 172 resistance determinants previously identified. Few isolates with high MIC to apramycin but
14
15 173 without the identification of apramycin resistance determinant have been described in other
16
17 174 studies [17,25]. We suspect that the resistance mechanisms, such as active efflux and/or reduced
18
19 175 outer membrane permeability to AGs, probably contribute to apramycin resistance in these
20
21 176 isolates, but further studies are required to address this point.
22
23
24
25
26
27 177 Our results are consistent with those of previous studies evaluating apramycin on large
28
29 178 collections of Enterobacterales and *A. baumannii* isolates, including MDR isolates; however,
30
31 179 these previous studies included only a small number of 16S-RMTase producers [16]. The
32
33 180 resistance rate in *P. aeruginosa* (11%) was higher than that in other bacteria (3.6% in
34
35 181 Enterobacterales and 3.8% in *A. baumannii*), but we were unable to identify a species-specific
36
37 182 resistance determinant. Only two studies have reported MIC values for apramycin for MDR *P.*
38
39 183 *aeruginosa*, with susceptibility rates (for a susceptibility breakpoint at ≤ 16 mg/L) ranging from
40
41 184 64% (28/44) to 89% (8/9) of the isolates tested [15,27]. However, no apramycin resistant
42
43 185 determinant was identified to explain the resistance phenotype observed in these isolates.
44
45
46
47 186 Resistance to apramycin was rare in our collection, with the *aac(3)-IV* gene detected in only
48
49 187 one isolate, with an apramycin MIC > 64 mg/L. Consistent with our findings, Plattner *et al.*
50
51 188 identified apramycin resistance genes in only 0.7% of the clinical isolate genome sequences in
52
53 189 the NCBI National Database of Antibiotic Resistant Organisms, almost exclusively *aac(3)-IV*
54
55 190 genes. As a comparison, they identified 16S-RMTase genes in 2.7% of these genomes,
56
57 191 suggesting a low level of spread of apramycin resistance genes in bacteria [12].
58
59
60

1
2
3 192 The genetic environment surrounding *aac(3)-IV* in MLPA65 was identical to sequences from
4
5 193 the pAH01-4 plasmid found in *E. coli* ST602. Interestingly, the *aac(3)-IV* gene was flanked by
6
7 194 IS26 and *ISEc59*, which both belonged to IS6 family elements, suggesting possible
8
9 195 transposition mediated by these elements [28]. However, none of the IS6 family elements in
10
11 196 pAH01-4 contains the 8-bp target site duplications expected for recent transposition, suggesting
12
13 197 that this structure may result from homologous recombination.
14
15
16

17
18 198 Taken together, our results show that apramycin resistance in 16S-RMTase-producing isolates
19
20 199 remains rare, suggesting that apramycin could be an interesting alternative treatment for
21
22 200 infections caused by 16S-RMTase-producing bacteria.
23
24

25 201 **Author contributions**

26
27
28 202 FC and BB conceived and designed the study. FC, ML, IR and MM performed the research.
29
30 203 FC, ML, MM and BB analysed the data. ML and FC wrote the manuscript. All the authors
31
32 204 critically revised the manuscript.
33
34

35 205 **Acknowledgments**

36
37
38 206 We would like to thank the laboratory staff for carrying out Illumina sequencing of the
39
40 207 bacterial isolates. We also wish to thank Julie Sappa of Alex Edelman & Associates for
41
42 208 careful reading and English language editing of the manuscript.
43
44
45

46 209 **Transparency declaration**

47
48
49 210 All authors report no conflicts of interest relevant to this article. This work was supported by
50
51 211 internal funding.
52
53

54 212 **Appendix A. Supplementary data**

55
56
57 213 Supplementary data to this article can be found online.
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

214 **References**

- 215 [1] Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*
216 2010;13:151–71. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>.
- 217 [2] Castanheira M, Deshpande LM, Woosley LN, Serio AW, Krause KM, Flamm RK.
218 Activity of plazomicin compared with other aminoglycosides against isolates from
219 European and adjacent countries, including Enterobacteriaceae molecularly
220 characterized for aminoglycoside-modifying enzymes and other resistance
221 mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:3346–54.
222 <https://doi.org/10.1093/jac/dky344>.
- 223 [3] Wachino J-I, Doi Y, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on
224 Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am*
225 2020;34:887–902. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2020.06.002>.
- 226 [4] Yang W, Hu F. Research Updates of Plasmid-Mediated Aminoglycoside Resistance
227 16S rRNA Methyltransferase. *Antibiot (Basel, Switzerland)* 2022;11.
228 <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070906>.
- 229 [5] Kawai A, Suzuki M, Tsukamoto K, Minato Y, Doi Y. Functional and Structural
230 Characterization of Acquired 16S rRNA Methyltransferase NpmB1 Conferring Pan-
231 Aminoglycoside Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2021;65:e0100921.
232 <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-21>.
- 233 [6] Taylor E, Jauneikaite E, Sriskandan S, Woodford N, Hopkins KL. Detection and
234 characterisation of 16S rRNA methyltransferase-producing *Pseudomonas aeruginosa*
235 from the UK and Republic of Ireland from 2003-2015. *Int J Antimicrob Agents*
236 2022;59:106550. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106550>.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 237 [7] Taylor E, Jauneikaite E, Sriskandan S, Woodford N, Hopkins KL. Novel 16S rRNA
238 methyltransferase RmtE3 in *Acinetobacter baumannii* ST79. *J Med Microbiol*
239 2022;71:1–6. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001531>.
- 240 [8] Arca-Suárez J, Rodiño-Janeiro BK, Pérez A, Guijarro-Sánchez P, Vázquez-Ucha JC,
241 Cruz F, et al. Emergence of 16S rRNA methyltransferases among carbapenemase-
242 producing Enterobacterales in Spain studied by whole-genome sequencing. *Int J*
243 *Antimicrob Agents* 2022;59:106456.
244 <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106456>.
- 245 [9] Xia Q, Wang H, Zhang A, Wang T, Zhang Y. Prevalence of 16S rRNA methylase
246 conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* in China. *Int J*
247 *Antimicrob Agents* 2011;37:387–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.01.004>.
- 248 [10] Sacco F, Raponi G, Oliva A, Bibbolino G, Mauro V, Lella FM Di, et al. An outbreak
249 sustained by ST15 *Klebsiella pneumoniae* carrying 16S rRNA methyltransferases and
250 blaNDM: evaluation of the global dissemination of these resistance determinants. *Int J*
251 *Antimicrob Agents* 2022;106615. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106615>.
- 252 [11] Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang J-C, Maharjan S, Doumith M, et al.
253 Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant
254 Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:48–53.
255 <https://doi.org/10.1093/jac/dkq408>.
- 256 [12] Plattner M, Gysin M, Haldimann K, Becker K, Hobbie SN. Epidemiologic, Phenotypic,
257 and Structural Characterization of Aminoglycoside-Resistance Gene aac(3)-IV. *Int J*
258 *Mol Sci* 2020;21:6133. <https://doi.org/10.3390/ijms21176133>.
- 259 [13] Bordeleau E, Stogios PJ, Evdokimova E, Koteva K, Savchenko A, Wright GD. ApmA
260 Is a Unique Aminoglycoside Antibiotic Acetyltransferase That Inactivates Apramycin.

- 1
2
3 261 MBio 2021;12:1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.02705-20>.
4
5
6 262 [14] Fernández-Martínez M, Miró E, Ortega A, Bou G, González-López JJ, Oliver A, et al.
7
8 263 Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates of
9
10 264 *Escherichia coli* resistant to amoxicillin/clavulanic acid isolated in Spain. *Int J*
11
12 265 *Antimicrob Agents* 2015;46:157–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.008>.
13
14
15
16 266 [15] Kang AD, Smith KP, Eliopoulos GM, Berg AH, McCoy C, Kirby JE. In vitro
17
18 267 Apramycin Activity against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and
19
20 268 *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;88:188–91.
21
22 269 <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.03.006>.
23
24
25
26 270 [16] Juhas M, Widlake E, Teo J, Huseby DL, Tyrrell JM, Polikanov YS, et al. In vitro
27
28 271 activity of apramycin against multidrug-, carbapenem- And aminoglycoside-resistant
29
30 272 enterobacteriaceae and *acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*
31
32 273 2019;74:944–52. <https://doi.org/10.1093/jac/dky546>.
33
34
35
36 274 [17] Hao M, Schuyler J, Zhang H, Shashkina E, Du H, Fouts DE, et al. Apramycin
37
38 275 resistance in epidemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 strains. *J*
39
40 276 *Antimicrob Chemother* 2021;76:2017–23. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab131>.
41
42
43
44 277 [18] Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of
45
46 278 methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in
47
48 279 enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob*
49
50 280 *Agents Chemother* 2008;52:1843–5. <https://doi.org/10.1128/AAC.01477-07>.
51
52
53
54 281 [19] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich A a., Dvorkin M, Kulikov AS, et al.
55
56 282 SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell
57
58 283 Sequencing. *J Comput Biol* 2012;19:455–77. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 284 [20] Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Wagleichner N, Guo P, Tsang KK, et al. CARD 2017:
285 expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance
286 database. *Nucleic Acids Res* 2017;45:D566–73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004>.
- 287 [21] Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder
288 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*
289 2020;75:3491–500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
- 290 [22] Cam el ena F, Morel F, Merim eche M, Decousser J-W, Jacquier H, Clermont O, et al.
291 Genomic characterization of 16S rRNA methyltransferase-producing *Escherichia coli*
292 isolates from the Parisian area, France. *J Antimicrob Chemother* 2020:1–10.
293 <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa105>.
- 294 [23] Carattoli A, Zankari E, Garc a-Fern andez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al.
295 In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus
296 sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:3895–903.
297 <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>.
- 298 [24] Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*
299 2014;30:2068–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- 300 [25] Roch M, Sierra R, Sands K, Martins WMBS, Schrenzel J, Walsh TR, et al. Vertical and
301 horizontal dissemination of an IncC plasmid harbouring rmtB 16S rRNA methylase
302 gene, conferring resistance to plazomicin, among invasive ST258 and ST16 KPC-
303 producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist* 2021;24:183–9.
304 <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.12.006>.
- 305 [26] Pan Y, Zhang T, Yu L, Zong Z, Zhao S, Li R, et al. IS1294 Reorganizes Plasmids in a
306 Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strain. *Microbiol Spectr* 2021:e0050321.
307 <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00503-21>.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 308 [27] Becker K, Cao S, Nilsson A, Erlandsson M, Hotop S-K, Kuka J, et al. Antibacterial
309 activity of apramycin at acidic pH warrants wide therapeutic window in the treatment
310 of complicated urinary tract infections and acute pyelonephritis. *EBioMedicine*
311 2021;73:103652. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103652>.
- 312 [28] Varani A, He S, Siguier P, Ross K, Chandler M. The IS6 family, a clinically important
313 group of insertion sequences including IS26. *Mob DNA* 2021;12:11.
314 <https://doi.org/10.1186/s13100-021-00239-x>.

315

For Peer Review

Table

Table 1. MIC distributions for apramycin for the 164 non-duplicate 16S-RMTase-producing isolates

Isolates	No. of isolates	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Min.	Max.	Resistance ^a n (%)	MIC (mg/L) of apramycin							
							1	2	4	8	16	32	64	>64
All	164	4	16	1	>64	8 (4.9)	3	25	57	33	39	4	2	1
Enterobacteriales	84	4	8	1	>64	3 (3.6)	3	23	45	10	1*		1*	1*
ArmA	32	4	8	1	>64	2 (6.3)	2	10	14	4			1*	1*
RmtB	35	4	8	1	8	1 (2.9)	1	2	25	6	1*			
RmtC	11	2	4	2	4	0 (0)		6	5					
RmtF	5	2	4	2	4	0 (0)		4	1					
RmtB + RmtF	1	-	-	2	2	0 (0)		1						
Non-fermenting bacteria	80	16	16	2	64	5 (6.3)		2	12	23	38	4*	1*	
<i>A. baumannii</i>	53	8	16	2	64	2 (3.8)		1	12	21	17	1*	1*	
ArmA	53	8	16	2	64	2 (3.8)		1	12	21	17	1*	1*	
<i>P. aeruginosa</i>	27	16	32	2	32	3 (11.1)		1		2	21	3*		
RmtB	5	16	32	2	32	1 (20)					3	1*		
RmtF	20	16	32	8	32	2 (10)				1	17	2*		
RmtD	1	-	-	-	-	0 (0)					1			
ArmA	1	-	-	-	-	0 (0)				1				

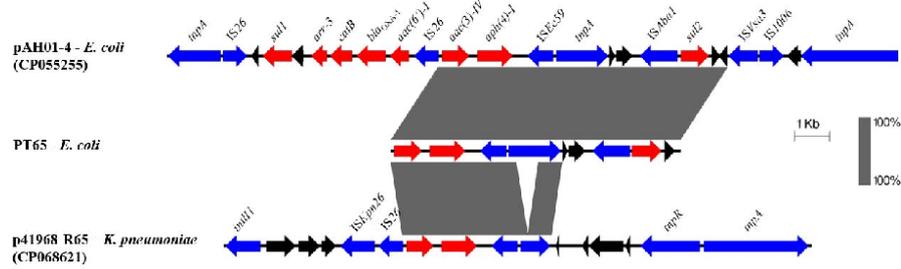
^aThe interpretation criteria for apramycin resistance were as follows: MIC > 8 mg/L for Enterobacteriales and > 16 mg/L for *A. baumannii* and *P. aeruginosa*.

*Isolates resistant to apramycin

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure

Figure 1. Genetic structures surrounding the *aac(3)-IV* gene in the *E.coli* PT65 isolate, and comparison with plasmids pAH01-4 and p41968-R65. Arrows indicate ORFs and their orientations. The resistance genes are shown in red, mobile genetic elements are shown in blue and other ORFs are shown in black. Gray shading indicates homologous regions and their degree of sequence identity. Graphical representations were generated with Easyfig v 2.2.2..



SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. Characteristics of 16S-RMTase-producing isolates.

Isolate	Species	Year of isolation	Specimen	ST	RMTase	Carbapenemase	AME	MIC to apramycin (mg/L)
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	-	-	73	-	-	-	2
BI01	<i>E. coli</i>	2014	Rectal swab	101	<i>armA</i>	-	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-II, ant(3'')-I, aph(3'')-I</i>	8
BI09	<i>E. coli</i>	2013	Rectal swab	58	<i>armA</i>	-	<i>aac(3)-II, ant(3'')-I, aph(3'')-I, aph(6)-I</i>	4
BI10	<i>E. coli</i>	2013	Rectal swab	617	<i>rmtB</i>	-	<i>aph(6)-I</i>	8
BI16	<i>E. coli</i>	2014	Rectal swab	224	<i>armA</i>	-	<i>ant(3'')-I</i>	4
BJ01	<i>E. coli</i>	2011	Rectal swab	2003	<i>rmtB</i>	-	<i>aac(3)-II, aph(3'')-II, aph(6)-I</i>	8
BJ05	<i>E. coli</i>	2013	Rectal swab	167	<i>rmtB</i>	-	<i>aac(3)-II</i>	8
BJ08	<i>E. coli</i>	2013	Rectal swab	345	<i>rmtB</i>	-	-	4
FC01	<i>E. coli</i>	2020	Rectal swab	405	<i>rmtB</i>	-	-	4
FC02	<i>E. coli</i>	2019	Rectal swab	167	<i>rmtB</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>aadA, aac(6')-Ib-cr</i>	4
FC04	<i>E. coli</i>	2020	Rectal swab	3201	<i>armA</i>	-	<i>aadA, aph(6)-I</i>	4
FC05	<i>E. coli</i>	2020	Rectal swab	405	<i>rmtB</i>	-	-	4
FC06	<i>E. coli</i>	2020	Rectal swab	155	<i>rmtC</i>	<i>bla_{NDM-1} + bla_{OXA-48}</i>	<i>aac(6')-I</i>	4
FC11	<i>E. coli</i>	2019	Urine	410	<i>rmtB</i>	-	<i>aph(6)-I, aac(3)-II, aph(3'')-I, aadA</i>	4
FC16	<i>E. coli</i>	2020	Urine	101	<i>rmtB</i>	-	<i>aadA, aac(3)-II, aph(6)-I, aph(3'')-I</i>	1
FC22	<i>E. coli</i>	2021	Rectal swab	349	<i>rmtB</i>	<i>bla_{NDM-5}</i>	<i>aadA</i>	4
FC26	<i>E. coli</i>	2017	Rectal swab	4450	<i>rmtB</i>	<i>bla_{NDM-5}</i>	<i>aadA</i>	4
HM05	<i>E. coli</i>	2014	Respiratory sample	405	<i>rmtB</i>	-	<i>aac(6')-I, aac(3)-II, ant(3'')-I</i>	4
HM06	<i>E. coli</i>	2014	Blood culture	405	<i>rmtB</i>	-	<i>aac(6')-I, aac(3)-II, ant(3'')-I, aph(6)-I</i>	8
HM15	<i>E. coli</i>	2012	Rectal swab	345	<i>rmtB</i>	-	-	16
HM21	<i>E. coli</i>	2014	Blood culture	38	<i>rmtB</i>	<i>bla_{VIM-4}</i>	<i>aac(3)-II, ant(3'')-I, aph(3'')-I, aph(6)-I</i>	4
LB01	<i>E. coli</i>	2013	Rectal swab	10	<i>rmtB</i>	-	<i>ant(3'')-I</i>	4
LB02	<i>E. coli</i>	2013	Rectal swab	354	<i>rmtB</i>	-	<i>aac(3)-II, aph(3'')-I, aph(3'')-I, aph(6)-I</i>	8
LB04	<i>E. coli</i>	2014	Rectal swab	162	<i>rmtC</i>	<i>bla_{NDM-1}</i>	<i>aac(6')-I, aph(3'')-I, aph(6)-I</i>	4
LB05	<i>E. coli</i>	2014	Rectal swab	3672	<i>armA</i>	-	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	4

1									
2									
3									
4	LB07	<i>E. coli</i>	2011	Respiratory sample	405	<i>rmtB</i>	-	<i>aph(3'')-I, aph(6)-I</i>	4
5	LM03	<i>E. coli</i>	2011	Rectal swab	131	<i>armA</i>	-	<i>aac(3)-II, ant(3'')-I</i>	8
6	LM12	<i>E. coli</i>	2008	Other sample	405	<i>rmtB</i>	-	<i>aac(3)-II, ant(3'')-I, ant(2'')-I</i>	4
7	LM14	<i>E. coli</i>	2008	Urine	351	<i>rmtB</i>	-	<i>aph(3'')-I</i>	4
8	LM15	<i>E. coli</i>	2008	Other sample	3631	<i>rmtB</i>	-	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-II, ant(3'')-I</i>	4
9	LM18	<i>E. coli</i>	2001	Urine	10	<i>armA</i>	-	<i>aac(3)-II, ant(3'')-I</i>	4
10	LM19	<i>E. coli</i>	2003	Rectal swab	121	<i>armA</i>	-	<i>aac(3)-II, ant(3'')-I</i>	4
11	MP113	<i>E. coli</i>	2018	Rectal swab	167	<i>rmtB</i>	<i>bla_{NDM-1}</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aph(6)-I, aph(3'')-I</i>	4
12	MP19	<i>E. coli</i>	2014	Rectal swab	90	<i>rmtB</i>	<i>bla_{NDM-5}</i>	<i>aadA</i>	4
13	MP34	<i>E. coli</i>	2015	Rectal swab	405	<i>rmtB</i>	<i>bla_{NDM-5}</i>	<i>aadA, aac(6')-Ib-cr</i>	4
14	MP60	<i>E. coli</i>	2017	Urine	167	<i>rmtB</i>	<i>bla_{NDM-5}</i>	<i>aadA, aac(6')-Ib-cr</i>	4
15	MP77	<i>E. coli</i>	2017	Rectal swab	648	<i>rmtB</i>	<i>bla_{NDM-5}</i>	<i>aadA</i>	4
16	PT08	<i>E. coli</i>	2015	Rectal swab	10	<i>rmtB</i>	-	<i>aph(3')-II, aadA, aph(3'')-I, aph(6)-I</i>	4
17	PT26	<i>E. coli</i>	2016	Rectal swab	617	<i>armA</i>	-	<i>aac(3)-II, aadA</i>	8
18	PT43	<i>E. coli</i>	2017	Urine	7358	<i>armA</i>	-	<i>aac(3)-II, aph(6)-I, aadA</i>	8
19	PT61	<i>E. coli</i>	2018	Rectal swab	167	<i>rmtB</i>	<i>bla_{NDM-5}</i>	<i>aph(4)-I, aadA</i>	4
20	PT65	<i>E. coli</i>	2019	Rectal swab	156	<i>armA</i>	-	<i>aph(4)-Ia, aadA, aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IV</i>	>64
21	RD04	<i>E. coli</i>	2012	Rectal swab	93	<i>armA</i>	-	<i>aac(3)-II, ant(3'')-I</i>	4
22	RD06	<i>E. coli</i>	2010	Rectal swab	141	<i>armA</i>	-	<i>aac(6')-Ib-cr, ant(3'')-I</i>	4
23	SL09	<i>E. coli</i>	2014	Urine	10	<i>rmtB</i>	-	<i>ant(3'')-I, aph(3')-II, aph(3'')-I, aph(6)-I</i>	4
24	SL10	<i>E. coli</i>	2013	Rectal swab	162	<i>armA</i>	-	<i>ant(3'')-I</i>	4
25	SL16	<i>E. coli</i>	2014	Rectal swab	90	<i>rmtB</i>	<i>bla_{NDM-5}</i>	<i>ant(3'')-I</i>	4
26	V02	<i>E. coli</i>	2009	Urine	156	<i>rmtB</i>	-	<i>aac(6')-I, ant(3'')-I, aph(3')-I</i>	4
27	V03	<i>E. coli</i>	2009	Urine	156	<i>rmtB</i>	-	<i>aac(6')-I, ant(3'')-I, aph(3')-I</i>	4
28	V16	<i>E. coli</i>	2010	Rectal swab	10	<i>armA</i>	-	<i>ant(3'')-I, aph(3')-I, aph(3'')-I, aph(6)-I</i>	2
29	FC21	<i>K. aerogenes</i>	2021	Other sample	New	<i>rmtB</i>	-	-	8
30	MP4	<i>K. oxytoca</i>	2013	Rectal swab	NA	<i>armA</i>	<i>bla_{NDM-1}</i>	<i>aac(6')-I</i>	2
31	FC07	<i>K. pneumoniae</i>	2020	Rectal swab	362	<i>rmtC</i>	<i>bla_{NDM-1}</i>	<i>aac(6')-I</i>	2
32	FC08	<i>K. pneumoniae</i>	2020	Rectal swab	NA	<i>rmtC</i>	<i>bla_{NDM-1} + bla_{OXA-48}</i>	<i>aac(6')-I</i>	4
33	FC13	<i>K. pneumoniae</i>	2021	Blood culture	147	<i>armA</i>	<i>bla_{NDM-1}</i>	<i>aph(3')-VI, aac(6')-I, aph(3')-I, aadA</i>	2
34	FC18	<i>K. pneumoniae</i>	2020	Rectal swab	147	<i>rmtB</i> + <i>rmtF</i>	<i>bla_{NDM-5} + bla_{OXA-181}</i>	<i>aph(6)-I, aac(6')-I, aadA</i>	2
35	FC28	<i>K. pneumoniae</i>	2017	Rectal swab	New	<i>armA</i>	-	<i>aac(3)-II, aadA</i>	2
36									
37									
38									
39									
40									
41									
42									
43									
44									
45									
46									

FC30	<i>K. pneumoniae</i>	2017	Rectal swab	147	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}	<i>aac(3)-II, aph(6)-I, aadA</i>	2
MP21	<i>K. pneumoniae</i>	2014	Cutaneous sample	147	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>aac(6')-I, aac(3)-II, aadA</i>	2
MP24	<i>K. pneumoniae</i>	2014	Rectal swab	231	<i>rmtF</i>	<i>bla</i> _{OXA-232}	<i>aac(6')-I, aadA</i>	2
MP25	<i>K. pneumoniae</i>	2014	Rectal swab	231	<i>rmtF</i>	<i>bla</i> _{OXA-232}	<i>aac(6')-I, aadA</i>	2
MP53	<i>K. pneumoniae</i>	2016	Rectal swab	231	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>aac(3)-II, aac(6')-Ib-cr, aph(6)-I, aph(3'')-I, aadA</i>	4
MP56	<i>K. pneumoniae</i>	2016	Rectal swab	383	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>aph(3')-I, aph(6)-I, aph(3'')-I</i>	1
MP59	<i>K. pneumoniae</i>	2016	Rectal swab	11	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>aac(3)-II, aph(3')-VI, aac(6')-I</i>	2
MP70	<i>K. pneumoniae</i>	2017	Rectal swab	147	<i>rmtF</i>	<i>bla</i> _{NDM-1} + <i>bla</i> _{OXA-48}	<i>aac(6')-I, aph(6)-I, aph(3'')-I, aph(3')-VI, aadA</i>	2
MP71	<i>K. pneumoniae</i>	2017	Rectal swab	147	<i>rmtF</i>	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>aac(6')-I, aph(6)-I, aph(3'')-I</i>	2
MP75	<i>K. pneumoniae</i>	2017	Rectal swab	231	<i>rmtF</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>aac(6')-I</i>	4
MP90	<i>K. pneumoniae</i>	2017	Rectal swab	14	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{NDM-1} + <i>bla</i> _{OXA-48}	<i>aac(6')-Ib-cr, aph(3')-VI, aph(6)-I, aph(3'')-I, aac(3)-II, aadA</i>	2
PT16	<i>K. pneumoniae</i>	2016	Urine	14	<i>armA</i>	-	<i>aac(3)-II, aadA</i>	2
PT35	<i>K. pneumoniae</i>	2017	Urine	3335	<i>armA</i>	-	<i>aac(3)-II, aadA</i>	2
PT51	<i>K. pneumoniae</i>	2018	Urine	340	<i>armA</i>	-	<i>aac(3)-II, aadA</i>	2
PT55	<i>K. pneumoniae</i>	2018	Urine	15	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1} + <i>bla</i> _{OXA-48}	<i>aac(6')-I</i>	2
PT67	<i>K. pneumoniae</i>	2019	Rectal swab	15	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{NDM-5} + <i>bla</i> _{OXA-181}	<i>aadA</i>	2
FC14	<i>C. freundii</i>	2021	Urine	11	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}	<i>aac(6')-I, aph(3')-I</i>	4
FC15	<i>C. freundii</i>	2020	Rectal swab	8	<i>armA</i>	-	<i>aac(6')-I, aph(3'')-I, aph(6)-I, aadA</i>	64
FC17	<i>C. freundii</i>	2020	Urine	8	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{VIM-4}	<i>aac(3)-II, aac(6')-I, aadA</i>	1
MP57	<i>C. freundii</i>	2016	Rectal swab	655	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>aac(6')-I, aph(3')-VI</i>	2
PT57	<i>C. freundii</i>	2018	Urine	169	<i>armA</i>	-	<i>aph(6)-Id, aadA</i>	4
FC03	<i>E. cloacae</i>	2020	Urine	78	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>aph(6)-I, aac(3)-II, aadA</i>	2
MP20	<i>E. cloacae</i>	2014	Blood culture	245	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>aph(3'')-I, aac(3)-I, aac(6')-I, aph(6)-I</i>	2
PT32	<i>E. cloacae</i>	2016	Cutaneous sample	51	<i>armA</i>	-	<i>aac(6')-I</i>	2
FC32	<i>P. mirabilis</i>	2017	Urine	NA	<i>armA</i>	-	<i>aac(6')-I, aac(3)-I, aadA</i>	4
PT17	<i>P. mirabilis</i>	2016	Urine	NA	<i>armA</i>	-	<i>aac(6')-I</i>	4
FC24	<i>P. stuartii</i>	2018	Other sample	NA	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>aph(3')-VI</i>	4
PT60	<i>P. stuartii</i>	2018	Blood culture	NA	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>aadA</i>	4
CL35	<i>P. aeruginosa</i>	2020	Cutaneous sample	308	<i>rmtD</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>aph(3')-II, aac(6')-I</i>	16

LIMAB48	<i>A. baumannii</i>	2019	Rectal swab	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	8
LIMAB50	<i>A. baumannii</i>	2015	Other sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aac(6')-I, aph(3')-I, aadA</i>	8
LIMAB54	<i>A. baumannii</i>	2014	Urine	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	16
LIMAB57	<i>A. baumannii</i>	2014	Respiratory sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	16
LIMAB63	<i>A. baumannii</i>	2015	Other sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aac(6')-I, aph(3')-I, aadA</i>	8
LIMAB64	<i>A. baumannii</i>	2017	Rectal swab	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(3')-VI, aph(6)-I</i>	4
LIMAB65	<i>A. baumannii</i>	2018	Rectal swab	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	8
LIMAB66	<i>A. baumannii</i>	2015	Rectal swab	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	16
LIMAB80	<i>A. baumannii</i>	2016	Rectal swab	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	16
LIMAB84	<i>A. baumannii</i>	2014	Blood culture	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	32
LIMAB86	<i>A. baumannii</i>	2021	Blood culture	78	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-72}	<i>aadA</i>	4
LIMAB87	<i>A. baumannii</i>	2021	Urine	78	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-72}	<i>aac(6')-I</i>	4
LIMAB88	<i>A. baumannii</i>	2021	Blood culture	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I</i>	8
LIMAB89	<i>A. baumannii</i>	2021	Rectal swab	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I</i>	2
LIMAB90	<i>A. baumannii</i>	2021	Rectal swab	78	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-72}	<i>aac(6')-I, aadA</i>	8
MLAB101	<i>A. baumannii</i>	2014	Cutaneous sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	8
MLAB102	<i>A. baumannii</i>	2014	Cutaneous sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I</i>	16
MLAB103	<i>A. baumannii</i>	2014	Cutaneous sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	8
MLAB105	<i>A. baumannii</i>	2014	Cutaneous sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I, aph(3'')-I</i>	64
MLAB106	<i>A. baumannii</i>	2014	Blood culture	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	16
MLAB108	<i>A. baumannii</i>	2013	Rectal swab	25	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aac(3)-II, aac(6')-I</i>	16
MLAB111	<i>A. baumannii</i>	2018	Urine	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-VI, aph(3')-I</i>	16
MLAB26	<i>A. baumannii</i>	2014	Rectal swab	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	8
MLAB30	<i>A. baumannii</i>	2014	Cutaneous sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	16
MLAB34	<i>A. baumannii</i>	2014	Blood culture	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	8
MLAB35	<i>A. baumannii</i>	2014	Respiratory sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	16
MLAB36	<i>A. baumannii</i>	2014	Blood culture	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	16
MLAB37	<i>A. baumannii</i>	2014	Cutaneous sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	8
MLAB38	<i>A. baumannii</i>	2014	Other sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	16
MLAB39	<i>A. baumannii</i>	2014	Other sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	16
MLAB40	<i>A. baumannii</i>	2014	Cutaneous sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	8
MLAB41	<i>A. baumannii</i>	2014	Urine	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	4
MLAB42	<i>A. baumannii</i>	2014	Cutaneous sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	8
MLAB43	<i>A. baumannii</i>	2014	Blood culture	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	8

1									
2									
3	MLAB45	<i>A. baumannii</i>	2014	Cutaneous sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	4
4	MLAB46	<i>A. baumannii</i>	2014	Cutaneous sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	4
5	MLAB48	<i>A. baumannii</i>	2014	Cutaneous sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	4
6	MLAB55	<i>A. baumannii</i>	2015	Cutaneous sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I, aac(6')-I, aadA</i>	16
7	MLAB79	<i>A. baumannii</i>	2018	Cutaneous sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I</i>	8
8	MLAB92	<i>A. baumannii</i>	2014	Blood culture	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	16
9	MLAB95	<i>A. baumannii</i>	2016	Other sample	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-I</i>	4
10	MLAB96	<i>A. baumannii</i>	2015	Rectal swab	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aph(3')-VI</i>	8
11	MLAB97	<i>A. baumannii</i>	2012	Cutaneous sample	25	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aac(3)-II, aac(6')-I</i>	4
12	MLAB98	<i>A. baumannii</i>	2011	Urine	2	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(3')-VI, aph(6)-I, aph(3')-I</i>	16
13	MLAB99	<i>A. baumannii</i>	2012	Cutaneous sample	25	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(6)-I, aac(3)-II, aac(6')-I</i>	16
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									
37									
38									
39									
40									
41									
42									
43									
44									
45									
46									

Table S2. MIC distributions of apramycin on the 164 non-duplicate 16S-RMTase producing isolates.

Isolates	No. of isolates	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Min.	Max.	Resistance ^a n (%)	MIC (mg/L) distribution of apramycin							
							1	2	4	8	16	32	64	>64
All isolates	164	4	16	1	>64	8 (4.9)	3	25	57	33	39	4	2	1
Enterobacterales	84	4	8	1	>64	3 (3.6)	3	23	45	10	1		1	1
Carbapenemase producers	38	2	4	1	4	0 (0)	2	17	19					
Non-carbapenemase producers	46	4	8	1	>64	3 (7.0)	1	6	26	10	1		1	1
<i>E. coli</i>	49	4	8	1	>64	2 (4.1)	1	1	36	9	1			1
Non-carbapenemase producers	36	4	8	1	>64	2 (5.6)	1	1	23	9	1			1
Carbapenemase producers	13	4	4	4	4	0 (0)			13					
<i>Klebsiella</i> spp.	23	2	4	1	8	0 (0)	1	18	3	1				
Non-carbapenemase producers	5	2	8	2	8	0 (0)		4		1				
Carbapenemase producers	18	2	4	1	4	0 (0)	1	14	3					
Others ^b	12	4	4	1	64	1 (8.3)	1	4	6					1
Non-carbapenemase producers	5	2	8	2	8	1 (20)		1	3					1
Carbapenemase producers	7	2	4	1	4	0 (0)	1	3	3					
Non-fermenting bacteria	80	16	16	2	64	5 (6.3)		2	12	23	38	4		1
Non-carbapenemase producers	27	16	16	2	32	2 (7.4)		1	4	2	18	2		
Carbapenemase producers	53	8	16	2	64	3 (5.7)		1	8	21	20	2		1
<i>A. baumannii</i>	53	8	16	2	64	2 (3.8)		1	12	21	17	1		1
Carbapenemase producers	53	8	16	2	64	2 (3.8)		1	12	21	17	1		1
<i>P. aeruginosa</i>	27	16	32	2	32	3 (11.1)		1		2	21	3		
Non-carbapenemase producers	23	16	16	2	32	2 (8.7)		1		2	18	2		
Carbapenemase producers	4	16	32	16	32	1 (25)					3	1		

^aThe interpretation criteria for apramycin resistance were as follows: MIC > 8 mg/L for Enterobacterales and > 16 mg/L for *A. baumannii* and *P. aeruginosa*.

^bFive *Citrobacter freundii*, two *Proteus mirabilis*, three *Enterobacter cloacae* and two *Providencia stuartii* isolates.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure S1. Cumulative distribution of MIC of apramycin for 16S-RMTase-producing clinical isolates according to the species. A non-parametric Wilcoxon rank sum was used to compare different groups. The figures and statistical analysis were performed using Prism software (Graphpad, San Diego, US).

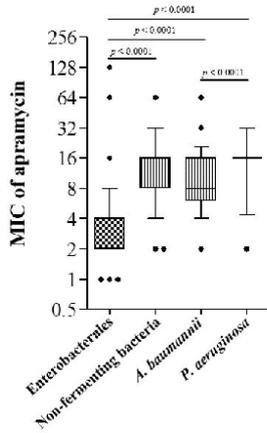
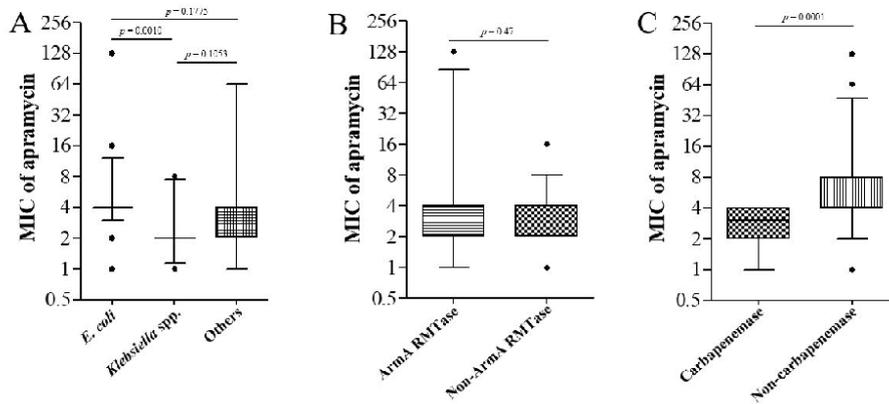


Figure S2. Cumulative distribution of MIC of apramycin for 16S-RMTase-producing Enterobacteriales isolates according to (A) the species, (B) the 16S-RMTase gene (C) the production of carbapenemase. A non-parametric Wilcoxon rank sum was used to compare different groups. The figures and statistical analysis were performed using Prism software (Graphpad, San Diego, US).



2.5.3 Commentaire de la publication n°4

Dans ce travail, nous avons évalué l'activité de l'apramycine sur une collection de 164 isolats de bacilles à Gram négatif produisant des RMTases. Nos résultats montrent que la résistance à l'apramycine chez des isolats producteurs de RMTase reste rare (<5%), suggérant que cet antibiotique pourrait être une alternative thérapeutique intéressante en cas d'infections causées par des bactéries présentant ce type de résistance.

L'apramycine est un antibiotique qui n'a pour le moment pas d'autorisation pour une utilisation chez l'Homme. Cependant, le premier essai clinique de Phase I chez l'Homme a été initié en 2019 en utilisant une base libre cristalline d'apramycine injectable en voie intra-veineuse développée par le laboratoire Juvabis AG (417). Ce premier essai chez l'Homme a apporté des résultats concernant la tolérance et la pharmacocinétique du médicament justifiant la réalisation d'essai de phase II. Dans leur étude, une posologie de 30 mg/kg permettait d'obtenir une probabilité d'atteinte de cible (PTA) supérieur à 95% pour une CMI maximale à l'apramycine de 8 mg/L avec un ratio aire sous courbe (ASC) sur CMI (f_{ASC}/CMI) de 40, chez un individu de 70 kg avec une fonction rénale normale (417).

Pour le moment il n'existe pas de seuils d'interprétation des valeurs de CMI ou de diamètre autour du disque (ni de charge du disque) pour l'apramycine à appliquer aux espèces bactériennes isolés chez l'Homme. Néanmoins, les recommandations vétérinaires 2021 du CA-SFM indiquent un seuil de ≤ 8 mg/L pour classer les entrobactéries sensibles à l'apramycine et résistant lorsque la CMI est > 8 mg/L. Différents seuils d'interprétation de la sensibilité à l'apramycine ont été utilisés dans la littérature. Dans une étude publiée en 1995, l'apramycine avait été testée sur 27 isolats de *K. pneumoniae* et de *E. coli* provenant d'urine et la bactérie était considéré comme résistante à l'apramycine si la CMI était > 16 mg/L sans justification (426). En 2006, Jensen *et al.* ont utilisé un seuil de sensibilité de ≤ 8 mg/L et de résistance de > 32 mg/L en se référant au comité européen des antibiogrammes (EUCAST) (427). Dans une étude parue en 2015, les auteurs ont identifié les AME responsables de la résistance aux AG dans une collection de *E. coli* et ils ont utilisé un seuil de > 8 mg/L pour classer les isolats comme résistants à l'apramycine, valeur issue de l'autorité européenne de sureté des aliments (EFSA) (428). Ce seuil a également été utilisé dans une étude sur 100 *K. pneumoniae* producteurs de KPC isolés dans un hôpital brésilien (421). En 2016, Smith *et al.*, ont évalué l'apramycine sur une collection d'entérobactéries en utilisant les seuils d'interprétation du « National Antimicrobial Resistance Monitoring System For Enteric Bacteria » du centre de

santé publique (CDC) américain (Sensible : ≤ 8 mg/L, Intermédiaire : 16 – 32 mg/L et Résistant : ≥ 64 mg/L) (420). En 2017 et en 2019, ces mêmes seuils ont été utilisés dans des études utilisant des isolats de Enterobacterales résistants aux carbapénèmes réalisées en Chine, en Grèce et aux Etats-Unis (273, 416, 424). En 2017, Kang *et al.* ont estimé le seuil épidémiologique de la distribution des valeurs de CMI à l'apramycine chez *P. aeruginosa* et *A. baumannii* à 64 mg/L sur des souches provenant de diverses collections (FDA-CDC Antimicrobial Resistance Isolate Bank and Multidrug Resistant Organism Repository and Surveillance Network) (340). Ce dernier seuil a également été utilisé pour interpréter l'apramycine dans une étude sur des *A. baumannii* producteurs de carbapénémase en Grèce (404). En 2019, dans l'étude de Juhas *et al.* les auteurs ont utilisé les seuils épidémiologiques basés sur la distribution de CMI qu'ils observèrent pour interpréter l'apramycine : 4mg/L pour *K. pneumoniae* et *Enterobacter spp.*, 8mg/L pour *E. coli* et 16 mg/L pour *A. baumannii* (116). Dans une étude menée en Chine en 2020, les auteurs ont évalué les seuils épidémiologiques de la CMI à l'apramycine sur une collection de 1230 *E. coli* provenant de porcs définissant ce seuil à 32 mg/L (429).

Dans notre étude, nous avons utilisé les seuils de ≤ 8 mg/L pour sensibles et > 8 mg/L pour résistant chez les Enterobacterales car ces seuils correspondaient à ceux indiqués dans les recommandations vétérinaires du CA-SFM, à ceux de l'EFSA ainsi qu'au seuil épidémiologique observé dans l'étude de Juhas *et al.* Pour les bactéries non-fermentantaires, peu d'études se sont intéressées à l'activité de l'apramycine. Deux seuils de sensibilité à l'apramycine existent dans la littérature, ≤ 16 mg/L et ≤ 64 mg/L. Nous avons utilisé le seuil de 16 mg/L précédemment défini dans l'étude de Juhas *et al.* car ce seuil se rapprochait plus de ceux utilisés pour les autres AG chez ces espèces (pour *A. baumannii*, sensible : ≤ 8 mg/L pour l'amikacine et ≤ 4 mg/L pour la gentamicine et la tobramycine ; pour *P. aeruginosa*, sensible : ≤ 16 mg/L pour l'amikacine et ≤ 2 mg/L pour la tobramycine) que le seuil ≤ 64 mg/L.

En 1978, Davies *et al.* ont décrit le premier mécanisme de résistance à l'apramycine comme étant une enzyme AAC(3) qui sera plus tard identifiée comme l'AAC(3)-IV (342). En 1989, une étude belge a identifié ce déterminant dans des isolats cliniques d'entérobactéries provenant d'hôpitaux belges (430). En 1993, une étude sur une collection anglaise de *E. coli* résistants à la gentamicine retrouvait un taux de résistance à l'apramycine de 26% (24/93). La résistance était expliquée chez 21 isolats par la présence du gène *aac(3)-IV*, il n'y avait pas d'explication apportée pour les trois autres isolats (431). Une autre étude, publiée en 2011, a évalué l'activité de la plazomicine et d'autres AG (incluant l'apramycine) sur une collection de 82 isolats

résistants aux carbapénèmes et retrouvait un taux de sensibilité de 98% (80/82) à l'apramycine et seulement un isolat porteur du gène *aac(3)-IV* (339). En 2015, Fernandez-Martinez *et al.* ont testé l'apramycine et identifié les AME présentes dans 257 isolats cliniques de *E. coli* résistants à l'association amoxicilline-clavulanate (428). Ils observèrent un taux de sensibilité à l'apramycine de 98% (252/256) sans identifier le gène *aac(3)-IV* dans les isolats résistants. En 2017, Kang *et al.* ont publié une étude sur l'activité de l'apramycine sur une collection de 44 *P. aeruginosa* et 104 *A. baumannii* multirésistant retrouvant une sensibilité à l'apramycine de respectivement 64% (28/44) et 82% (85/104) en utilisant un seuil de sensibilité ≤ 16 mg/L. En 2019, une autre étude sur une collection internationale d'isolats d'entérobactéries et de *A. baumannii* retrouvait un taux de sensibilité de respectivement 98% et 97% (116). A noter que toutes les isolats producteurs de RMTases étaient sensibles à l'apramycine dans cette étude. En 2021, deux autres études ont été publiées évaluant l'apramycine sur des collections de *K. pneumoniae* ST258 résistants aux carbapénèmes aux Etats-Unis et au Brésil (421, 424). Dans l'étude de Hao *et al.* réalisée aux Etats-Unis., le taux de sensibilité était de 85% (131/155) avec 22 isolats possédant le gène *aac(3)-IV* (424). A noter que ces souches n'étaient pas clonales car elles possédaient différents types capsulaires, la présence de RMTase n'avait pas été recherchée. Dans l'étude de Roch *et al.* le taux de sensibilité à l'apramycine était de 99% (99/100) incluant 30 isolats co-producteur de RmtB et de KPC (421).

Peu de mécanismes de résistance protègent les agents pathogènes bactériens vis-à-vis de l'action de l'apramycine. Des études précédentes ont montré que l'apramycine est rendue inefficace par modification de l'antibiotique suite à l'action de l'enzyme AAC(3)-IV, une enzyme qui présente une large gamme de substrats comprenant non seulement la gentamicine et la tobramycine, mais aussi l'apramycine (342). D'autres mécanismes décrits dans la littérature sont restés plus confidentiels et moins bien documentés pour le moment, notamment l'acétyltransférase codée par le gène *apmA*, un gène *aac(1)* putatif et deux méthyltransférases de l'ARNr 16S du résidu A1408, *npmA* et *npmB* (147, 165, 432, 433). A noter que l'alignement phylogénétique des séquences d'acides aminés a révélé une homologie de séquence très élevée entre les séquences de l'AAC(1) putatives avec celles de l'AAC(3)-I (116). L'existence de ce mécanisme décrit dans les années 80 doit cependant encore être confirmée de manière indépendante.

Le gène *apmA* a initialement été décrit sur un plasmide de 40 kb pAFS11 retrouvé dans une souche bovine de *S. aureus* résistant à la méthicilline appartenant au ST398 (432). Un gène similaire à *apmA* (262/274 identiques en acides aminés) a été décrit sur un plasmide de 5 kb

retrouvé également dans un *S. aureus* appartenant au ST398 provenant du sol d'une ferme au Portugal (434). L'étude enzymatique de ApmA a montré que cette enzyme acétylée l'apramycine au niveau 2'-NH₂ du cycle I avec une séquence protéique proche des séquences des acetyltransférases des streptogramines A (Vat) et du chloramphénicol (CatB) (419). Le gène *apmA* a également été retrouvé dans une souche de *Campylobacter* isolée chez le porc (435).

Plattner *et al.* ont recherché la présence de gènes conférant la résistance à l'apramycine dans la base de données nationale du NCBI sur les organismes résistants aux antibiotiques (NDARO) (418). Sur les 182 405 génomes de bactérie présents, seulement 1269 (0,7%) possèdent un gène de résistance à l'apramycine comparé au 4941 génomes (2,7%) possédant une RMTase. Parmi ces génomes, seul le gène *aac(3)-IV* a été retrouvé chez les bacille à Gram négatif à l'exception du gène *apmA* retrouvé dans 2 génomes de *Campylobacter jejuni* (436). De manière intéressante, le gène *aac(3)-IV* était majoritairement retrouvé chez *E. coli* (484/1265, 38%) suivi de *Salmonella enterica* (451/1265, 36%) et *K. pneumoniae* (298/1265, 24%). Les auteurs ont également regardé dans le groupe de génome possédant une carbapénémase (21195 génomes soit 11,6% de la base de données). Parmi ces génomes, 495 (2,3%) possédaient le gène *aac(3)-IV*, majoritairement des *K. pneumoniae* (433/494, 87%), comparé au 4551 possédant une RMTase, majoritairement des *A. baumannii* et *K. pneumoniae* (respectivement 2145/4551, 47% et 1992/4551, 44%). Ainsi ce gène *aac(3)-IV* semble être le déterminant de résistance à l'apramycine le plus fréquent et pourraient être également associé à des gènes codant des carbapénémases, particulièrement chez *K. pneumoniae*.

L'environnement génétique du gène *aac(3)-IV* est peu décrit dans la littérature. Hao *et al* ont décrit les structures génétiques de cinq plasmides possédant *aac(3)-IV*, à chaque fois sur des plasmides appartenant au groupe IncR (424). A chaque fois il était associé au gène *aph(4)-I*, très répandu chez les bacilles à Gram négatif, et entouré de deux IS, IS26 et ISEc59, appartenant au groupe IS26, orientées dans le même sens. Cette structure a également été retrouvée dans notre isolat *E. coli* PT65 et dans un plasmide pAH01-4, appartenant au groupe IncF de formule F18 :1- :B58, retrouvé dans une souche de *E. coli* de ST602 (phylogroupe B1) isolée chez un poulet en Chine. Ce dernier possédait également le locus *tra*. La présence de ces IS flanquantes pourraient avoir un rôle dans la mobilisation du gène *aac(3)-IV*. L'analyse des séquences n'a pas retrouvé de répétition directe de part et d'autre des IS suggérant plutôt un mécanisme de recombinaison plutôt que de transposition.

Dans notre étude nous avons identifié des isolats présentant des CMI élevées, catégorisée comme résistante à l'apramycine, mais dépourvus du gène *aac(3)-IV* ou d'autres gènes connus

conférant la résistance à l'apramycine. Ces isolats de CMI augmentées sans identification de déterminants de résistance ont déjà été rapportés chez les Enterobacterales, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (340, 420, 421, 424). D'autres mécanismes comme de l'imperméabilité ou de l'efflux ont été évoqués mais leurs rôles doivent encore être confirmés expérimentalement.

L'apramycine semble être un AG prometteur notamment car il maintient son activité sur les bactéries productrices de RMTases. Des études réalisées sur des modèles murins ont confirmé son activité *in vivo*. Kang *et al.* ont montré dans un modèle de pneumonie chez des souris neutropénique qu'une dose de 30 mg/kg est censée produire au moins une stase bactérienne pour des bactéries ayant une CMI ≤ 8 mg/L (422). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Sou *et al.* pour lesquels une dose de 30 mg/kg une fois par jour d'apramycine entraînait une probabilité d'atteinte de la cible >90 % contre les isolats de *E. coli* ayant des CMI ≤ 8 mg/L dans leur modèle PK/PD (437).

D'autres équipes travaillent sur le développement d'analogues de l'apramycine (apralogue) résistants notamment à l'action de l'enzyme AAC(3)-IV tout en gardant leur activité sur les bactéries productrices de RMTase et sa faible affinité pour les ribosomes eucaryotes. Notamment, Quirke *et al.* ont montré que deux séries de composés basées sur les motifs 5-O-(5-O-aminoalkyl-5-désoxy- β -D-ribofuranosyl)-apramycine et 5-O-(3-O-aminoalkyl- β -D-erythrofuranosyl)-apramycine avaient une excellente activité générale et gardaient des CMI basses même chez des bactéries produisant une AAC(3)-IV (438). Ces résultats combinés aux caractéristiques de l'apramycine (peu de résistance, faible toxicité) constituent un point de départ encourageant pour le développement d'AG de nouvelles générations pour le traitement des infections à bactéries MDR.

Discussion et Perspectives

3 Discussion et Perspectives

La méthylation de l'ARNr 16S par une RMTase acquise est un mécanisme de résistance aux AG émergent retrouvé presque exclusivement chez les bactéries à Gram négatif et qui confère une résistance de haut niveau (CMI >256 mg/L) à tous les AG cliniquement pertinents après l'acquisition d'un unique gène (128, 148, 171, 405). Deux gènes codant une RMTase, *armA* et *rmtF*, ont été découverts par l'équipe de Thierry Lambert de l'Unité des Agents Antibactériens à l'Institut Pasteur dirigé par Patrice Courvalin (143, 161). Depuis ces découvertes, des descriptions de cas sporadiques de bactéries productrices de RMTase avaient été réalisées en France (191, 245, 256, 265–268, 271, 281, 439). Avant notre étude, on savait que les bactéries productrices de RMTase étaient présentes en France, mais aucune étude de surveillance et de prévalence n'avait été réalisée en France.

Les objectifs de cette étude étaient de déterminer l'épidémiologie moléculaire des bactéries productrices de RMTase et d'étudier les mécanismes qui contribuent à la propagation de ces gènes, c'est-à-dire la structure de la population bactérienne les hébergeant, leurs localisations sur les supports génétiques et leurs associations avec d'autres gènes de résistance aux antibiotiques. Pour réaliser ce projet, nous avons utilisé une collection d'isolats cliniques de *E. coli* collectés dans le cadre d'une étude multicentrique en Ile de France ainsi que d'isolats cliniques provenant des hôpitaux universitaires Saint-Louis et Lariboisière – Fernand Widal localisés à Paris.

L'étude de la collection multicentrique de *E. coli* obtenue entre 2008 et 2014 a permis de mettre en évidence que 28% (30/107) des isolats pan-résistants aux AG et 100% (30/30) des résistants à haut niveau aux AG étaient porteurs de gènes codant une RMTase. Parmi ces producteurs de RMTase, 10% (3/30) co-produisaient une carbapénémase, un chiffre bien supérieur aux taux de *E. coli* producteurs de carbapénémase en France, suggérant une possible association entre ces résistances. Les gènes de RMTase identifiés parmi ces *E. coli* étaient *rmtB* (18/30) suivie de *armA* (11/30) et *rmtC* (1/30). L'analyse des génomes a permis de montrer une diversité élevée chez les producteurs d'ArmA, avec 10 ST différents identifiés, mais un environnement génétique similaire médié par le transposon Tn1548 porté par un plasmide étroitement apparenté au pCTX-M-3 dans 6/11 isolats. Inversement, les producteurs de RmtB appartenaient à 12 ST, les plus fréquents étant le ST405 et le complexe ST 10. Le gène *rmtB* était porté par des plasmides IncF dans 10 isolats et se trouvait dans différents environnements génétiques. Le gène *rmtC* était porté par le plasmide pNDM-US. Ces résultats nous suggéraient que ArmA et

RmtB étaient les RMTases prédominantes en France, avec des mécanismes de propagation différents : (i) les régions contenant *armA* se trouvaient sur des supports génétiques conservés impliquant majoritairement le Tn1548 et un plasmide IncM proche de pCTX-M-3 ; (ii) alors que les environnements génétiques entourant *rmtB* présentaient plus de diversités avec l'insertion d'une variété d'IS en amont et en aval du gène démontrant des phénomènes de mobilisation plus divers et retrouvés dans des clones à « haut risque ».

L'association entre carbapénémase et RMTase a ensuite été étudiée dans la collection de *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase du laboratoire. Cinq isolats possédant à la fois une carbapénémase (parfois deux) et une RMTase ont pu être identifiés et séquencés en méthodes « short read » et « long read ». De manière surprenante, toutes les isolats possédaient la RMTase RmtF1 associée aux carbapénémases OXA-232 (n=2), OXA-48 (n=1), NDM-1 (n=1) et OXA-48 + NDM-1 (n=1). Ces isolats appartenait aux ST147 et ST231 qui sont les ST les plus fréquemment identifiés dans les isolats de *K. pneumoniae* producteurs de *rmtF*. Les gènes *rmtF* étaient portés par trois types de plasmides différents : un plasmide IncFIB(pQil)-IncFII(K), un plasmide IncR et un plasmide IncFIA-IncFIB(AP001918)-IncFIB(pQil)-IncFII. Les gènes codant des carbapénémases étaient portés majoritairement par différents plasmides bien caractérisés. Les gènes *rmtF* étaient tous retrouvés sur une structure proche du transposon Tn6229 contenant notamment un élément ISCR21 en aval du gène *rmtF*. Ces observations suggèrent le gène *rmtF* a pu être initialement mobilisé par un processus de transposition en cercle roulant à partir d'un progéniteur bactérien encore inconnu. Ce fragment se serait réintégré et après formation du transposon Tn6229 aurait diffusé dans des clones de *K. pneumoniae* incluant les clones à « haut risque ».

Nous avons ensuite étudié les RMTases chez *P. aeruginosa*, espèce dans laquelle quelques cas avaient été décrits dans le monde. Les gènes de RMTase ont été trouvés dans 23% (27/119) des isolats hautement résistants aux AG. Le gène RMTase le plus fréquemment identifié était *rmtF2* (20/27), suivi de *rmtB4* (5/27), et un seul isolat hébergeait *armA* et *rmtD3*. Des gènes de carbapénémase ont été trouvés dans 15% (4/27) des isolats, exclusivement *bla*_{NDM-1}. Vingt-deux isolats étaient XDR et six ST différents ont été identifiés parmi les producteurs de RMTase, dont des clones à « haut risque » (ST235, ST308 et ST357). La comparaison avec des isolats de *P. aeruginosa* producteurs de RMTase identifiés au niveau international montre une diversité phylogénomique, avec 15 ST différents, notamment pour les producteurs de RmtB4 et RmtF2. Le gène *rmtF2* était associé au gène *bla*_{GES-9} et situé dans une structure similaire au

transposon Tn6229 inséré dans une région variable d'un élément intégratif et conjugatif (ICE). Les gènes *rmtB4* et *rmtD3* étaient flanqués d'éléments ISCR insérés dans une structure ICE apparentée à ICE6660. L'environnement génétique de *armA* était partiellement similaire à celui du transposon Tn1548 mais localisé sur le chromosome. Ces résultats suggèrent que les gènes de RMTase sont liés à des éléments génétiques mobiles efficaces, incluant des ISCR et des ICE, ayant diffusé dans des clones à « haut risque ».

Pour identifier la prévalence actuelle des Enterobacterales et des *A. baumannii* producteurs de RMTase, les collections des laboratoires de bactériologie des hôpitaux Saint-Louis et Lariboisière – Fernand Widal ont été étudiées. La prévalence sur la période 2015-2021 des Enterobacterales producteurs de RMTase était de 0,12%. La prévalence sur la période 2011-2021 des *A. baumannii* producteurs de RMTase était de 4,4%. Parmi les isolats présentant un haut niveau de résistance aux AG, 83% (53/64) et 87% (53/61) des Enterobacterales et des *A. baumannii*, respectivement, étaient des producteurs de RMTases. Le gène 16S RMTase le plus fréquemment détecté chez les Enterobacterales était *armA* (40%, 21/53), suivi de *rmtB* (34%, 18/53), *rmtC* (17%, 9/53), *rmtF* (6%, 3/53) et *rmtB* + *rmtF* (2%, 1/53) et *rmtC* + *rmtF* (2%, 1/53). Concernant les *A. baumannii*, seul le gène *armA* (100%, 53/53) a été détecté. Au total, 82% (87/106) des isolats producteurs de RMTase possédaient un ou plusieurs gènes de carbapénémase, incluant 100% des *A. baumannii* producteurs de RMTase. Cette étude confirme le lien étroit entre carbapénémase et RMTase ayant diffusées dans des clones à « haut risque » appartenant à diverses espèces.

La comparaison de ces études montrent des prévalences qui varient en fonction des espèces, plus élevés chez *A. baumannii* que chez *P. aeruginosa* ou les Enterobacterales (respectivement 4,4%, 0,26% et 0,12%). La distribution des gènes de RMTases était différente en fonction des espèces bactériennes : majoritairement *armA* et *rmtB* chez les Enterobacterales, exclusivement *armA* chez *A. baumannii* et *rmtF2* et *rmtB4* chez *P. aeruginosa*. La plupart de ces isolats étaient résistants aux β -lactamines incluant les carbapénèmes, aux fluoroquinolones et évidemment aux AG, mais ils demeuraient sensibles à la colistine et à la tigécycline (hors résistance naturelle). A noter que le céfidérol était efficace sur la majorité des isolats testés (*K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*). Ces producteurs de RMTase appartenaient massivement à des clones à « haut risque » : le ST2 appartenant au clone International II pour *A. baumannii*, le complexe clonal 10, ST167 et ST405 pour *E. coli*, les ST15, ST147 et ST231 pour *K. pneumoniae*, et pour *P. aeruginosa* les ST235, ST308 et ST357. L'analyse des supports génétiques a permis de mettre

en évidence des spécificités dépendantes à la fois de la RMTase et de l'espèce dans laquelle elle se trouvait. Le gène *armA* était associé au transposon Tn1548, les gènes *rmtF1* et *rmtF2* au transposon Tn6229 et les gènes *rmtD3* et *rmtB4* aux éléments ISCR14/24. Pour *rmtB1* les environnements génétiques montraient plus de diversités même si le transposon Tn2 était fréquemment retrouvé en amont du gène. Ces gènes sont majoritairement identifiés sur des plasmides chez les Enterobacterales alors qu'ils étaient plutôt identifiés sur des structures de type ICE chez *P. aeruginosa*. L'analyse des environnements génétiques de *armA* chez *A. baumannii* n'a pas été réalisé dans le cadre de cette thèse mais une récente étude suggère une acquisition de ce gène et de gènes codant des CTX-M par transformation naturelle (440). Des gènes codant une carbapénémase ont été fréquemment identifiés pour 100% (53/53) des *A. baumannii*, majoritairement *bla_{OXA-23}*, pour 47% (39/85) des Enterobacterales majoritairement *bla_{NDM}* et pour 15% (4/27) des *P. aeruginosa* exclusivement *bla_{NDM-1}*. D'autres gènes de résistance étaient associés aux RMTases conférant la résistance au co-trimoxazole, aux macrolides, à la rifampicine et au chloramphénicol, suggérant que l'utilisation de ces antibiotiques pourraient favoriser la propagation des RMTases.

Dans le but de trouver des alternatives antibiotiques de traitement en cas d'infections à bactéries productrices de RMTase, nous avons déterminé la sensibilité de l'apramycine sur la collection de RMTase obtenue dans ces différentes études. L'apramycine est un AG ayant une structure chimique particulière lui permettant de garder une activité antibactérienne en cas de méthylation du résidu G1405 de l'ARNr 16S par une RMTase. Nous avons observé que l'apramycine était sensible dans 95% (156/164) des cas, représentant une alternative thérapeutique en cas d'infection. Cette étude nous a également permis de décrire un isolat de *E. coli* producteur de AAC(3')-IV responsable de la résistance à haut niveau à l'apramycine.

L'ensemble de ces résultats confirment l'émergence de cette résistance en France chez plusieurs espèces de bacilles à Gram négatif ayant une importance majeure en santé publique. Les facteurs de diffusion de cette résistance semblent multifactoriels et sont spécifiques à chaque enzyme. Leurs présences dans des clones à « haut risques » dans plusieurs espèces font craindre leurs diffusions massives dans le monde dans les prochaines années, comme c'est le cas pour les bactéries productrices de carbapénémase. L'impossibilité d'utiliser un AG et la plupart des β -lactamines en cas d'infection sévère à bactérie à Gram négatif producteurs de RMTase représente une perte de chance pour le patient. L'apramycine pourrait être une alternative thérapeutique intéressante si son innocuité est confirmée chez l'humain permettant ainsi son utilisation.

Ces études possèdent plusieurs limites évoquées précédemment. Tout d'abord, les RMTases demeurent une résistance rare compliquant sa recherche à un niveau local. Malgré le fait que nous ayons sélectionné uniquement des isolats non-redondants, nous ne pouvons mesurer précisément l'impact de la transmission d'isolats entre patients dans l'épidémiologie observée. Plusieurs suspicions de cas de transmissions ont été évoquées dans les différentes études. Ces transmissions ont pu impacter la distribution des gènes de RMTase ainsi que des clones bactériens, mettant en avant certains clones spécifiquement. La diffusion des isolats de *P. aeruginosa* ST235 producteurs de RmtF2 en sont un exemple parmi d'autres. L'ensemble de ces études a été réalisé de manière retrospective introduisant plusieurs biais inhérents à ce type d'étude : la difficulté de réaliser une analyse complète d'isolats collectés sur une longue période et le manque d'informations cliniques notamment des voyages récents ou des hospitalisations antérieures dans d'autres pays, les infections et les traitements utilisés. Enfin, l'utilisation de technologie « long read » sur l'ensemble des isolats aurait permis de mieux caractériser les environnements et les supports génétiques de cette résistance, moyennant une augmentation significative des coûts.

Les résultats de ces études ouvrent de multiples perspectives de travaux futurs. Une étude de surveillance prospective impliquant toutes les régions de France pourrait être entreprise, idéalement avec une cohorte de patients importante où toutes les données relatives aux patients sont disponibles, afin d'identifier les facteurs de risque potentiels de manière plus fiable et de déterminer un taux de prévalence des gènes de RMTase qui soit plus représentatif de l'ensemble de la France.

De plus, les isolats négatifs en RMTase qui présentaient une résistance de haut niveau aux AG devraient faire l'objet d'une étude plus approfondie afin d'exclure la production de nouvelles RMTases ou d'identifier de nouveaux déterminants de résistance à haut niveau, particulièrement dans les isolats de *P. aeruginosa* et de Enterobacterales.

D'autre part, les plasmides extraits de cette étude devraient être soumis à un séquençage « long read », qui n'a pas pu être utilisé dans cette étude en raison de contraintes techniques, financières et de temps. Cette technique, comme utilisé précédemment, permettrait de caractériser l'ensemble des plasmides obtenus et potentiellement en identifier de nouveaux. Ce séquençage servirait également à définir précisément les environnements génétiques des gènes de RMTase, car les contigs fragmentés générés par le séquençage « short read » rendent leurs descriptions partielles. Le séquençage « long read » devrait également être utilisé pour identifier si les gènes

de RMTase se trouvent sur des plasmides ou des chromosomes, notamment dans les isolats de *P. aeruginosa* et *A. baumannii*.

L'étude de la mobilisation des supports génétique portant les RMTases permettraient de mieux comprendre la dynamique de diffusion de ces gènes, notamment le mécanisme de transposition des ISCR et de mobilisation des ICE. La mise en évidence des formes circulaires permettrait de confirmer leur capacité à se mobiliser.

Jusqu'à présent, le coût d'adaptation des gènes de la RMTase n'a été étudié que pour *arma*, *rmtB*, *rmtC* et *npmA*, testé par l'utilisation de courbes de croissance et d'essais de compétition de croissance, où les souches de *E. coli* portant les gènes de RMTase ont été comparées aux souches de type sauvage (441–443). La présence des gènes *arma*, *rmtB* et *npmA* ont eu un effet négatif sur la croissance bactérienne (bien que l'effet sur le taux de croissance a été faible pour *npmA*), ce qui serait dû au fait que les RMTases interfèrent avec la capacité des méthyltransférases endogènes (telles que RsmH et RsmI chez *E. coli*) à méthyler l'ARNr 16S notamment la position C1407 (441, 442). Aucun coût de fitness n'a été imposé par *rmtC* (443). Cependant, Lioy *et al.* évoquent que l'absence d'un coût de fitness pour *rmtC* par rapport à *arma* et *npmA* dans leur étude est due à des différences dans les conditions expérimentales (441). Gutierrez *et al.*, qui n'ont trouvé aucun coût de fitness pour *rmtC*, ont mesuré le taux de croissance toutes les heures pendant une période de 12 heures, et non toutes les trois minutes pendant le début de la phase exponentielle, de sorte que le cycle de croissance complet (phase de latence, phase exponentielle et phase stationnaire) n'a pas été analysé (443). De plus, Gutierrez *et al.* n'ont analysé que 100 colonies bactériennes pour trouver des souches résistantes dans les tests de compétition de croissance, contre 500 à 1000 colonies dans l'étude de Lioy *et al.*. Inversement, la différence de résultats peut être due au fait que le gène *rmtC* était inséré dans le chromosome, alors que les autres études rapportent des résultats lorsque ce sont des plasmides qui portent les gènes de RMTase, de sorte que les résultats ont pu être faussés en raison du nombre variable de copies de plasmides (441, 442). Des études futures devraient être menées pour identifier le coût d'adaptation pour la bactérie d'acquisition des gènes de RMTase. L'analyse des coûts d'adaptation des gènes *rmtA* et *rmtD-rmtH* pourrait permettre de comprendre pourquoi certains gènes, tels que *rmtE*, *rmtG* et *rmtH*, n'ont été identifiés que sporadiquement. L'utilisation de modèles autres que *E. coli* permettrait également de mieux comprendre pourquoi certains variants sont associés à des espèces spécifiquement.

Une autre question se pose concernant les plasmides et pourquoi certains plasmides porteurs de RMTase ont diffusé avec succès. Une voie pour répondre à cette question serait d'étudier les

système toxine-antitoxine (TA). Ces systèmes sont reconnus pour contribuer à la maintenance des plasmides dans des bactéries, car la perte d'un plasmide codant pour un système TA entraîne la mort cellulaire en raison de l'incapacité de la cellule bactérienne à exprimer l'antitoxine (444). Le passage continu des plasmides hébergeant les gènes de la RMTase en utilisant des milieux non sélectifs et sélectifs (par exemple, contenant 256 mg/L d'amikacine) pourrait être utilisé pour confirmer la stabilité des plasmides de cette étude. En outre, le coût d'adaptation des plasmides codant pour les gènes de la RMTase devrait être étudié car il pourrait expliquer pourquoi certains gènes de la RMTase ont été transférés avec plus de succès que d'autres sur des plasmides. De même, l'analyse des systèmes CRISPR-Cas semble constituer un élément de réponse à cette question. Notamment, Rodrigues *et al.* ont pu mettre en évidence au sein du complexe clonal 147 chez *K. pneumoniae* que l'absence de plasmide IncF pourrait être liée à la présence de spacer ciblant IncF sur le chromosome bactérien dans certains clusters d'isolats (445). Ceci souligne la nécessité d'approfondir les recherches sur les facteurs mécanistiques du flux d'éléments génétiques mobiles dans les clones bactériens présentant un intérêt pour la santé publique.

Les études futures devraient également examiner la présence des gènes de RMTase dans d'autres réservoirs tels que les animaux, la chaîne alimentaire et les eaux usées, afin de déterminer leurs parts dans l'émergence de cette résistance. La présence de gènes de RMTase dans des bactéries provenant d'animaux de compagnie et d'élevage a déjà été signalée en France, ainsi que dans d'autres pays (203, 270, 308, 328, 330, 333, 446). Des études ont examiné la présence de RMTases chez *Salmonella* spp., les mettant en évidence chez des salmonelles provenant de plusieurs continents et notamment dans des produits congelés (186–190, 217, 218, 271). Des études supplémentaires devraient être entreprises pour rechercher ces gènes dans des aliments ainsi que dans les abattoirs afin de comprendre s'ils se propagent dans la chaîne alimentaire qui constituerait une source d'acquisition. Aucune étude n'a été menée en France, pour identifier les gènes de RMTase 16S dans l'environnement, bien que des rapports provenant d'autres pays aient identifié *npmA* dans les eaux usées des toilettes des avions arrivant dans un aéroport international à Copenhague, au Danemark; *armA* et *rmtB* dans les eaux usées des hôpitaux ainsi que dans les influents et les effluents des stations d'épuration à Bâle en Suisse, et *rmtD* dans la rivière Tietê au Brésil (284, 335, 336, 447). Il serait intéressant de réaliser des dépistages dans les eaux usées afin de déterminer si des producteurs de RMTase sont présents dans ces réservoirs environnementaux.

Enfin, une recherche dans les bases de données de génomes permettrait d'identifier de nouvelles RMTases ainsi que des progéniteurs de ces gènes. Notamment le gène *npmB* a pu être mis en évidence suite à une recherche *in silico* dans la base de données de NCBI (147). Avec une technique de clonage dans *E. coli*, les auteurs ont pu montrer que ce gène induisait bien un phénotype compatible avec une RMTase méthylant le résidu A1408. Les auteurs ont également montré que les séquences en acides aminés de NpmB1 et NpmB2 étaient proches de séquences identifiées dans le phylum des Acidobacteria de la classe *Blastocatellia*, pouvant représenter un éventuel réservoir. Une autre source constitue les données de séquençage de microbiote digestif. Une équipe chinoise a récemment mis en évidence par métagénomique fonctionnelle un nouveau gène nommé *rmtI* possédant 32% d'identité avec le gène *armA* mais présentant une structure protéique proche de *rmtB* (448). Ce gène a été cloné dans *E. coli* montrant un phénotype compatible avec une RMTase du résidu G1405. Néanmoins, les auteurs n'ont pas mis en évidence directement la méthylation du résidu.

L'émergence des gènes de RMTase en France signifie-t-elle la fin des AG ? Actuellement, les RMTases ne semblent pas constituer une menace pour l'utilisation générale des AG en France. Le taux de prévalence des producteurs de RMTase semble être très faible (0,1 - 4,4 %), ce qui signifie que d'autres mécanismes de résistance aux AG, tels que les pompes d'efflux (par exemple MexXY-OprM chez *P. aeruginosa*) ou une combinaison d'AME (qui, en combinaison, se sont avérés suffisants pour entraîner une panrésistance de haut niveau aux AG dans nos études) jouent un rôle plus important dans la résistance aux AG. À l'heure actuelle, il ne semble pas nécessaire pour les laboratoires de procéder à un dépistage systématique des RMTases en raison de leur faible prévalence. Cependant, étant donné que les gènes de RMTase ont été identifiés dans des clones à « haut risque » et associés à des éléments génétiques mobiles efficaces, ainsi que dans des plasmides abritant d'autres gènes de résistance aux antibiotiques, la prévalence des gènes de RMTase va probablement augmenter avec le temps. Par conséquent, les cliniciens et les bactériologistes doivent être sensibilisés au fait que les RMTases sont une cause de résistance à tous les AG, en particulier chez les producteurs de carbapénémase. Actuellement, les patients hébergeant des isolats porteurs de gènes de carbapénémases sont isolés lors de leur séjour à l'hôpital. Les cliniciens devront être conscients que les patients colonisés ou infectés par des bactéries portant des gènes de RMTase devront peut-être à l'avenir être isolés de part leur caractère multirésistant car ces bactéries constitueraient un défi thérapeutique en cas d'infection.

L'association des gènes de RMTase avec les gènes de carbapénémase ainsi qu'avec d'autres gènes de résistance aux antibiotiques (tels que les gènes codant des BLSE) entraîne une diminution des options thérapeutiques pour les infections à bactéries à Gram négatif MDR. Pour éviter d'avoir recours à des antibiotiques potentiellement toxiques en dernière ligne, comme la colistine, de nouveaux agents ayant des cibles alternatives sont nécessaires. En attendant, une surveillance continue soutenue par des mesures appropriées de prévention et de contrôle des infections sont nécessaires pour limiter la propagation de ces organismes hautement résistants aux AG.

BIBLIOGRAPHIE

4 Références

1. Flemming A. 1929. ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM, WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE ISOLATION OF B. INFLUENZAE. *Br J Exp Pathol* 10:226–236.
2. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. 2019. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 51:72–80.
3. Ventola CL. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* 40:277–83.
4. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ, Piddock LJ V. 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet (London, England)* 387:176–87.
5. Woolhouse M, Ward M, van Bunnik B, Farrar J. 2015. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370:20140083.
6. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. 2017. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother* 72:2145–2155.
7. Uluseker C, Kaster KM, Thorsen K, Basiry D, Shobana S, Jain M, Kumar G, Kommedal R, Pala-Ozkok I. 2021. A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives. *Front Microbiol* 12:717809.
8. EUCAST. 2019. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 9.0.
9. 2021. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Société Française Microbiol* 1.0:181.
10. Findlay J, Hopkins KL, Meunier D, Woodford N. 2015. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* 70:1338–42.
11. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, Hrabák J. 2015. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol* 53:1731–5.
12. 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.
13. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, Rolain J-M. 2014. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 58:212–20.

14. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, Tyson GH, Zhao S, Hsu C-H, McDermott PF, Tadesse DA, Morales C, Simmons M, Tillman G, Wasilenko J, Folster JP, Klimke W. 2019. Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 63:1–19.
15. van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 14:547–60.
16. Eichel V, Klein S, Bootsveld C, Frank U, Heeg K, Boutin S, Nurjadi D. 2020. Challenges in interpretation of WGS and epidemiological data to investigate nosocomial transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an endemic region: incorporation of patient movement network and admission screening. *J Antimicrob Chemother*.
17. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* 28:565–591.
18. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3140–5.
19. 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.
20. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 186:1518–30.
21. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk JM, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW, ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* 18:20380.
22. Larsen M V., Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O. 2012. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 50:1355–61.
23. 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* 67:2640–4.
24. Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, Jin Q. 2005. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res* 33:D325-8.
25. Pightling AW, Pettengill JB, Luo Y, Baugher JD, Rand H, Strain E. 2018. Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations. *Front Microbiol* 9:1482.
26. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. 2018. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 31:1–61.

27. Rusconi B, Sanjar F, Koenig SSK, Mammel MK, Tarr PI, Eppinger M. 2016. Whole genome sequencing for genomics-guided investigations of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks. *Front Microbiol* 7:1–21.
28. Hendriksen RS, Bortolaia V, Tate H, Tyson GH, Aarestrup FM, McDermott PF. 2019. Using Genomics to Track Global Antimicrobial Resistance. *Front public Heal* 7:242.
29. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, Cantón R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) Working Group. 2017. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis* 17:153–163.
30. Brown D. 2015. Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? *Nat Rev Drug Discov* 14:821–32.
31. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walker MJ. 2020. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev* 33:1–49.
32. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outtersson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N, WHO Pathogens Priority List Working Group. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18:318–327.
33. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, S Gupta R. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the “Enterobacteriales”: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:5575–5599.
34. Woerther P-L, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. 2013. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev* 26:744–58.
35. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21:538–582.
36. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22:582–610.
37. Karakonstantis S, Kritsotakis EI, Gikas A. 2020. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: a systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. *J Antimicrob Chemother* 75:271–282.
38. Waksman SA, Reilly HC, Schatz A. 1945. Strain Specificity and Production of Antibiotic Substances: V. Strain Resistance of Bacteria to Antibiotic Substances, Especially to Streptomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 31:157–64.

39. Waksman SA, Lechevalier HA. 1949. Neomycin, a New Antibiotic Active against Streptomycin-Resistant Bacteria, including Tuberculosis Organisms. *Science* 109:305–7.
40. Hinshaw HC, Feldman WH. 1946. Streptomycin; a summary of clinical and experimental observations. *J Pediatr* 28:269–74.
41. Becker B, Cooper MA. 2013. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chem Biol* 8:105–15.
42. Pittenger RC, Wolfe RN, Hoehn MM, Marks PN, Daily WA, Mcguire JM. 1953. Hygromycin. I. Preliminary studies on the production and biologic activity of a new antibiotic. *Antibiot Chemother (Northfield, Ill)* 3:1268–1278.
43. Umezawa H. 1958. Kanamycin: its discovery. *Ann N Y Acad Sci* 76:20–6.
44. Coles HM, Macnamara B, Mutch L, Holt RJ, Stewart GT. 1960. Paromomycin in the treatment of Shigella and Salmonella infections in children. *Lancet (London, England)* 1:944–6.
45. Laird SM, Taylor G. 1962. Treatment of gonorrhoea with actinospectacin. *Br J Vener Dis* 38:60–3.
46. Weinstein MJ, Luedemann GM, Oden EM, Wagman GH, Rosselet JP, Marquez JA, Coniglio CT, Charney W, Herzog HL, Black J. 1963. GENTAMICIN, A NEW ANTIBIOTIC COMPLEX FROM MICROMONOSPORA. *J Med Chem* 6:463–4.
47. Higgins CE, Kastner RE. 1967. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. II. Description of *Streptomyces tenebrarius*. *Antimicrob Agents Chemother* 7:324–331.
48. Koch KF, Davis FA, Rhoades JA. 1973. Nebramycin: separation of the complex and identification of factors 4, 5, and 5'. *J Antibiot (Tokyo)* 26:745–51.
49. Akita E, Ito T, Tsuruoka T, Niida T. 1970. Synthesis of an aminocyclitol antibiotic, SF-733 (ribostamycin). *Antimicrob Agents Chemother* 10:33–37.
50. Kelemen GH, Cundliffe E, Financsek I. 1991. Cloning and characterization of gentamicin-resistance genes from *Micromonospora purpurea* and *Micromonospora rosea*. *Gene* 98:53–60.
51. Oda T, Mori T, Itō H, Kunieda T, Munakata K. 1971. Studies on new antibiotic lividomycins. I. Taxonomic studies on the lividomycin-producing strain *Streptomyces lividus* nov. sp. *J Antibiot (Tokyo)* 24:333–8.
52. Kawaguchi H, Naito T, Nakagawa S, Fujisawa KI. 1972. BB-K 8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* 25:695–708.
53. Kondo S, Iinuma K, Yamamoto H, Maeda K, Umezawa H. 1973. Letter: Syntheses of 1-n-(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl-kanamycin B and -3', 4'-dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant bacteria. *J Antibiot (Tokyo)* 26:412–5.
54. Kabins SA, Nathan C, Cohen S. 1976. In vitro comparison of netilmicin, a semisynthetic derivative of sisomicin, and four other aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 10:139–45.
55. Kondo S, Iinuma K, Yamamoto H, Ikeda Y, Maeda K. 1973. Letter: Synthesis of (S)-4-amino-2-hydroxybutyryl derivatives of 3',4'-dideoxykanamycin B and their

- antibacterial activities. *J Antibiot (Tokyo)* 26:705–7.
56. Sanders CC, Sanders WE, Goering R V. 1978. In vitro studies with Sch 21420 and Sch 22591: activity in comparison with six other aminoglycosides and synergy with penicillin against enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 14:178–84.
 57. Nara T, Yamamoto M, Kawamoto I, Takayama K, Okachi R, Takasawa S, Sato T, Sato S. 1977. Fortimicins A and B, new aminoglycoside antibiotics. I. Producing organism, fermentation and biological properties of fortimicins. *J Antibiot (Tokyo)* 30:533–40.
 58. Lin G, Ednie LM, Appelbaum PC. 2010. Antistaphylococcal activity of ACHN-490 tested alone and in combination with other agents by time-kill assay. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2258–61.
 59. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. 2016. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6:1–18.
 60. Durante-Mangoni E, Grammatikos A, Utili R, Falagas ME. 2009. Do we still need the aminoglycosides? *Int J Antimicrob Agents* 33:201–5.
 61. Jackson J, Chen C, Busing K. 2013. Aminoglycosides: how should we use them in the 21st century? *Curr Opin Infect Dis* 26:516–25.
 62. Lebeaux D, Bergeron E, Berthet J, Djadi-Prat J, Mounié D, Boiron P, Lortholary O, Rodriguez-Nava V. 2018. Antibiotic susceptibility testing and species identification of *Nocardia* isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory, 2010–2015. *Clin Microbiol Infect* 2010–2015.
 63. Butler MM, Waidyarachchi SL, Connolly KL, Jerse AE, Chai W, Lee RE, Kohlhoff SA, Shinabarger DL, Bowlin TL. 2018. Aminomethyl spectinomycins as therapeutics for drug-resistant gonorrhea and chlamydial co-infections. *Antimicrob Agents Chemother AAC.00325-18*.
 64. Shen G-H, Wu B-D, Wu K-M, Chen J-H. 2007. In Vitro activities of isepamicin, other aminoglycosides, and capreomycin against clinical isolates of rapidly growing mycobacteria in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1849–51.
 65. Lounis N, Ji B, Truffot-Pernot C, Grosset J. 1997. Which aminoglycoside or fluoroquinolone is more active against *Mycobacterium tuberculosis* in mice? *Antimicrob Agents Chemother* 41:607–10.
 66. Rosenberg CR, Fang X, Allison KR. 2020. Potentiating aminoglycoside antibiotics to reduce their toxic side effects. *PLoS One* 15:e0237948.
 67. Jospe-Kaufman M, Siomin L, Fridman M. 2020. The relationship between the structure and toxicity of aminoglycoside antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett* 30:127218.
 68. Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. 1999. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1003–12.
 69. Igumnova V, Veidemane L, Vīksna A, Capligina V, Zole E, Ranka R. 2019. The prevalence of mitochondrial mutations associated with aminoglycoside-induced deafness in ethnic Latvian population: the appraisal of the evidence. *J Hum Genet* 64:199–206.
 70. Ramirez MS, Tolmasky ME. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 13:151–71.

71. Wilson DN. 2014. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol* 12:35–48.
72. Hancock REW, Farmer SW, Li ZS, Poole K. 1991. Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 35:1309–14.
73. Bryan LE, Kwan S. 1983. Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 23:835–45.
74. Arenz S, Wilson DN. 2016. Blast from the Past: Reassessing Forgotten Translation Inhibitors, Antibiotic Selectivity, and Resistance Mechanisms to Aid Drug Development. *Mol Cell* 61:3–14.
75. Wilson BA, Ho M. 2013. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. *Clin Microbiol Rev* 26:631–55.
76. Robinson A, van Oijen AM. 2013. Bacterial replication, transcription and translation: mechanistic insights from single-molecule biochemical studies. *Nat Rev Microbiol* 11:303–15.
77. Davies J, Jones DS, Khorana HG. 1966. A further study of misreading of codons induced by streptomycin and neomycin using ribopolynucleotides containing two nucleotides in alternating sequence as templates. *J Mol Biol* 18:48–57.
78. Borovinskaya MA, Pai RD, Zhang W, Schuwirth BS, Holton JM, Hirokawa G, Kaji H, Kaji A, Cate JHD. 2007. Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. *Nat Struct Mol Biol* 14:727–32.
79. Davies J, Gorini L, Davis BD. 1965. Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol Pharmacol* 1:93–106.
80. Cabañas MJ, Vázquez D, Modolell J. 1978. Inhibition of ribosomal translocation by aminoglycoside antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun* 83:991–7.
81. Fourmy D, Recht MI, Blanchard SC, Puglisi JD. 1996. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* (80-) 274:1367–1371.
82. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407:340–8.
83. Wang L, Pulk A, Wasserman MR, Feldman MB, Altman RB, Cate JHD, Blanchard SC. 2012. Allosteric control of the ribosome by small-molecule antibiotics. *Nat Struct Mol Biol* 19:957–63.
84. Davis BD. 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol Rev* 51:341–50.
85. Leviton IM, Fraimow HS, Carrasco N, Dougherty TJ, Miller MH. 1995. Tobramycin uptake in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Antimicrob Agents Chemother* 39:467–75.
86. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130:797–810.

87. Farr SB, Kogoma T. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* 55:561–585.
88. Vakulenko SB, Mobashery S. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 16:430–450.
89. Stubbings W, Bostock J, Ingham E, Chopra I. 2006. Mechanisms of the post-antibiotic effects induced by rifampicin and gentamicin in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 58:444–8.
90. Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, Lomovskaya O, Plésiat P. 2003. MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1371–5.
91. Doi Y, Wachino J-I, Arakawa Y. 2016. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 30:523–537.
92. Cox AD, Wilkinson SG. 1991. Ionizing groups in lipopolysaccharides of *Pseudomonas cepacia* in relation to antibiotic resistance. *Mol Microbiol* 5:641–6.
93. Schurek KN, Marr AK, Taylor PK, Wiegand I, Semenec L, Khaira BK, Hancock REW. 2008. Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4213–9.
94. Damper PD, Epstein W. 1981. Role of the membrane potential in bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 20:803–8.
95. Taber HW, Mueller JP, Miller PF, Arrow AS. 1987. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev* 51:439–57.
96. Bayer AS, Norman DC, Kim KS. 1987. Characterization of impermeability variants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated during unsuccessful therapy of experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 31:70–5.
97. Kashiwagi K, Tshako MH, Sakata K, Saisho T, Igarashi A, da Costa SO, Igarashi K. 1998. Relationship between spontaneous aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and a decrease in oligopeptide binding protein. *J Bacteriol* 180:5484–8.
98. Rosenberg EY, Ma D, Nikaido H. 2000. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J Bacteriol* 182:1754–6.
99. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3375–80.
100. 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.
101. Serio AW, Keepers T, Andrews L, Krause KM. 2018. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus* 8.
102. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev* 20:79–114.

103. Chuanchuen R, Narasaki CT, Schweizer HP. 2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J Bacteriol* 184:5036–44.
104. Novick RP, Clowes RC, Cohen SN, Curtiss R, Datta N, Falkow S. 1976. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol Rev* 40:168–89.
105. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57:138–63.
106. Vanhoof R, Hannecart-Pokorni E, Content J. 1998. Nomenclature of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 42:483.
107. Hanau-Berçot B, Podglajen I, Casin I, Collatz E. 2002. An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. *Mol Microbiol* 44:119–130.
108. Casin I, Hanau-Berçot B, Podglajen I, Vahaboglu H, Collatz E. 2003. Salmonella enterica serovar Typhimurium bla(PER-1)-carrying plasmid pSTII encodes an extended-spectrum aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of type Ib. *Antimicrob Agents Chemother* 47:697–703.
109. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12:83–8.
110. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 22:664–89.
111. Robin F, Beyrouthy R, Bonacorsi S, Aissa N, Bret L, Brieu N, Cattoir V, Chapuis A, Chardon H, Degand N, Doucet-Populaire F, Dubois V, Fortineau N, Grillon A, Lanotte P, Leysse D, Patry I, Podglajen I, Recule C, Ros A, Colomb-Cotin M, Ponties V, Ploy MC, Bonnet R. 2017. Inventory of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in France as assessed by a multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 61:1–13.
112. Guillard T, Bertrand X, de Champs C, Cholley P, Bajolet O, Gbaguidi-Haore H. 2014. aac(6')-Ib-cr is the major plasmid-mediated quinolone resistance determinant in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in eastern France. *J Glob Antimicrob Resist* 2:111–113.
113. Fihman V, Lartigue MF, Jacquier H, Meunier F, Schnepf N, Raskine L, Riahi J, Sansonle Pors MJ, Berçot B. 2008. Appearance of aac(6')-Ib-cr gene among extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a French hospital. *J Infect* 56:454–459.
114. Ferretti JJ, Gilmore KS, Courvalin P. 1986. Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2"-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *J Bacteriol* 167:631–8.
115. Rather PN, Munayyer H, Mann PA, Hare RS, Miller GH, Shaw KJ. 1992. Genetic analysis of bacterial acetyltransferases: Identification of amino acids determining the specificities of the aminoglycoside 6'-N- acetyltransferase Ib and IIa proteins. *J Bacteriol* 174:3196–3203.
116. Juhas M, Widlake E, Teo J, Huseby DL, Tyrrell JM, Polikanov YS, Ercan O, Petersson

- A, Cao S, Aboklaish AF, Rominski A, Crich D, Böttger EC, Walsh TR, Hughes D, Hobbie SN. 2019. In vitro activity of apramycin against multidrug-, carbapenem- And aminoglycoside-resistant enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 74:944–952.
117. Cox G, Ejim L, Stogios PJ, Koteva K, Bordeleau E, Evdokimova E, Sieron AO, Savchenko A, Serio AW, Krause KM, Wright GD. 2018. Plazomicin Retains Antibiotic Activity against Most Aminoglycoside Modifying Enzymes. *ACS Infect Dis* 4:980–987.
 118. Aghazadeh M, Rezaee MA, Nahaei MR, Mahdian R, Pajand O, Saffari F, Hassan M, Hojabri Z. 2013. Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microb Drug Resist* 19:282–8.
 119. Lambert T, Gerbaud G, Courvalin P. 1994. Characterization of the chromosomal aac(6')-Ij gene of *Acinetobacter* sp. 13 and the aac(6')-Ih plasmid gene of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 38:1883–1889.
 120. Rudant E, Courvalin P, Lambert T. 1997. Loss of intrinsic aminoglycoside resistance in *Acinetobacter haemolyticus* as a result of three distinct types of alterations in the aac(6')-Ij gene, including insertion of IS17. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2646–51.
 121. Shaw KJ, Rather PN, Sabatelli FJ, Mann P, Munayyer H, Mierzwa R, Petrikos GL, Hare RS, Miller GH, Bennett P, Downey P. 1992. Characterization of the chromosomal aac(6')-Ic gene from *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1447–55.
 122. Větrovský T, Baldrian P. 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One* 8:e57923.
 123. Springer B, Kidan YG, Prammananan T, Ellrott K, Böttger EC, Sander P. 2001. Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2877–84.
 124. Salles C, Créancier L, Claverys J pierre, Méjean V. 1992. The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 20:6103.
 125. Cooksey RC, Morlock GP, McQueen A, Glickman SE, Crawford JT. 1996. Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1186–8.
 126. Stuy JH, Walter RB. 1992. Cloning, characterization, and DNA base sequence of the high-level streptomycin resistance gene strA1 of *Haemophilus influenzae* Rd. *J Bacteriol* 174:5604–8.
 127. Kühberger R, Piepersberg W, Petzet A, Buckel P, Böck A. 1979. Alteration of ribosomal protein L6 in gentamicin-resistant strains of *Escherichia coli*. Effects on fidelity of protein synthesis. *Biochemistry* 18:187–93.
 128. Wachino J, Arakawa Y. 2012. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat* 15:133–48.
 129. Liou GF, Yoshizawa S, Courvalin P, Galimand M. 2006. Aminoglycoside resistance by ArmA-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens. *J Mol Biol*

359:358–64.

130. Savic M, Lovric J, Tomic TI, Vasiljevic B, Conn GL. 2009. Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res* 37:5420–31.
131. Cundliffe E. 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu Rev Microbiol* 43:207–33.
132. Kanazawa H, Baba F, Koganei M, Kondo J. 2017. A structural basis for the antibiotic resistance conferred by an N1-methylation of A1408 in 16S rRNA. *Nucleic Acids Res* 45:12529–12535.
133. Thompson J, Skeggs PA, Cundliffe E. 1985. Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to the aminoglycoside antibiotics gentamicin and kanamycin determined by DNA from the gentamicin-producer, *Micromonospora purpurea*. *Mol Gen Genet* 201:168–73.
134. Beauclerk AAD, Cundliffe E. 1987. Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides. *J Mol Biol* 193:661–71.
135. Skeggs PA, Thompson J, Cundliffe E. 1985. Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to aminoglycoside antibiotics in clones of *Streptomyces lividans* carrying DNA from *Streptomyces tenjimariensis*. *Mol Gen Genet* 200:415–21.
136. Nakano MM, Mashiko H, Ogawara H. 1984. Cloning of the kanamycin resistance gene from a kanamycin-producing *Streptomyces* species. *J Bacteriol* 157:79–83.
137. Ohta T, Hasegawa M. 1993. Analysis of the self-defense gene (*fmrO*) of a fortimicin A (astromycin) producer, *Micromonospora olivasterospora*: comparison with other aminoglycoside-resistance-encoding genes. *Gene* 127:63–9.
138. Reimann H, Cooper DJ, Mallams AK, Jaret RS, Yehaskel A, Kugelman M, Vernay HF, Schumacher D. 1974. The structure of sisomicin, a novel unsaturated aminocyclitol antibiotic from *Micromonospora inyoensis*. *J Org Chem* 39:1451–1457.
139. Okami Y, Hotta K, Yoshida M, Ikeda D, Kondo S, Umezawa H. 1979. New aminoglycoside antibiotics, istamycins A and B. *J Antibiot (Tokyo)* 32:964–6.
140. Skeggs PA, Holmes DJ, Cundliffe E. 1987. Cloning of aminoglycoside-resistance determinants from *Streptomyces tenebrarius* and comparison with related genes from other actinomycetes. *J Gen Microbiol* 133:915–23.
141. Deushi T, Iwasaki A, Kamiya K, Kunieda T, Mizoguchi T, Nakayama M, Itoh H, Mori T, Oda T. 1979. A new broad-spectrum aminoglycoside antibiotic complex, sporaricin. I. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 32:173–9.
142. Holmes DJ, Drocourt D, Tiraby G, Cundliffe E. 1991. Cloning of an aminoglycoside-resistance-encoding gene, *kamC*, from *Saccharopolyspora hirsuta*: comparison with *kamB* from *Streptomyces tenebrarius*. *Gene* 102:19–26.
143. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. 2003. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2565–71.
144. Gołębiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adamczyk M, Zylinska J, Baraniak

- A, Gniadkowski M, Bardowski J, Cegłowski P. 2007. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum beta-lactamase gene blaCTX-M-3. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3789–95.
145. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet (London, England)* 362:1888–93.
 146. Arakawa Y. 2020. Systematic research to overcome newly emerged multidrug-resistant bacteria. *Microbiol Immunol* 64:231–251.
 147. Kawai A, Suzuki M, Tsukamoto K, Minato Y, Doi Y. 2021. Functional and Structural Characterization of Acquired 16S rRNA Methyltransferase NpmB1 Conferring Pan-Aminoglycoside Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 65:e0100921.
 148. Marsh JW, Pacey MP, Ezeonwuka C, Ohm SL, Snyder D, Cooper VS, Harrison LH, Doi Y, Mustapha MM. 2019. *Clostridioides difficile*: a potential source of NpmA in the clinical environment. *J Antimicrob Chemother* 74:521–523.
 149. Wachino JI, Shibayama K, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Arakawa Y. 2010. RmtC introduces G1405 methylation in 16S rRNA and confers high-level aminoglycoside resistance on Gram-positive microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 311:56–60.
 150. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE, Dubberke ER, Garey KW, Gould C V, Kelly C, Loo V, Shaklee Sammons J, Sandora TJ, Wilcox MH. 2018. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis* 31:431–455.
 151. Tada T, Uchida H, Hishinuma T, Watanabe S, Tohya M, Kuwahara-Arai K, Mya S, Zan KN, Kirikae T, Tin HH. 2020. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from hospitals in Myanmar. *J Glob Antimicrob Resist* 127065.
 152. Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. 2004. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 48:491–6.
 153. Costello SE, Deshpande LM, Davis AP, Mendes RE, Castanheira M. 2019. Aminoglycoside-modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methyltransferase genes among a global collection of Gram-negative isolates. *J Glob Antimicrob Resist* 16:278–285.
 154. Wachino J-I, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, Doi Y, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. 2006. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 50:178–84.
 155. Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. 2007. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 51:852–6.
 156. Tijet N, Andres P, Chung C, Lucero C, WHONET-Argentina Group, Low DE, Galas M, Corso A, Petroni A, Melano RG. 2011. *rmtD2*, a new allele of a 16S rRNA methylase

- gene, has been present in Enterobacteriaceae isolates from Argentina for more than a decade. *Antimicrob Agents Chemother* 55:904–9.
157. Tada T, Shimada K, Mya S, Zan KN, Kuwahara K, Kirikae T, Tin HH. 2018. A New Variant of 16S rRNA Methylase, RmtD3, in a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
 158. Davis MA, Baker KNK, Orfe LH, Shah DH, Besser TE, Call DR. 2010. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2666–9.
 159. Xia J, Sun J, Li L, Fang LX, Deng H, Yang RS, Li XP, Liao XP, Liu YH. 2015. First report of the IncI1/ST898 conjugative plasmid carrying *rmtE2* 16S rRNA methyltransferase gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7921–7922.
 160. Taylor E, Jauneikaite E, Sriskandan S, Woodford N, Hopkins KL. 2022. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtE3 in *Acinetobacter baumannii* ST79. *J Med Microbiol* 71:1–6.
 161. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. 2012. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrob Agents Chemother* 56:3960–2.
 162. Tada T, Shimada K, Satou K, Hirano T, Pokhrel BM, Sherchand JB, Kirikae T. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in Nepal Coproducing Metallo- β -Lactamases and 16S rRNA Methyltransferases. *Antimicrob Agents Chemother* 61:1–7.
 163. Bueno MFC, Francisco GR, O’Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. 2013. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:2397–400.
 164. O’Hara JA, McGann P, Snesrud EC, Clifford RJ, Waterman PE, Lesho EP, Doi Y. 2013. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. *Antimicrob Agents Chemother* 57:2413–6.
 165. Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Shibata N, Ike Y, Arakawa Y. 2007. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4401–9.
 166. Letunic I, Bork P. 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 44:W242–5.
 167. Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O. 2005. PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33:W557–9.
 168. Wangkheimayum J, Bhattacharjee M, Das BJ, Singha KM, Chanda DD, Bhattacharjee A. 2020. Expansion of acquired 16S rRNA methyltransferases along with CTX-M-15, NDM and OXA-48 within three sequence types of *Escherichia coli* from northeast India. *BMC Infect Dis* 20:544.
 169. Zhao Z, Lan F, Liu M, Chen W, Huang L, Lin Q, Li B. 2017. Evaluation of automated systems for aminoglycosides and fluoroquinolones susceptibility testing for Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Resist Infect Control* 6:77.

170. Al Sheikh YA, Marie MAM, John J, Krishnappa LG, Dabwab KHM. 2014. Prevalence of 16S rRNA methylase genes among β -lactamase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in Saudi Arabia. *Libyan J Med* 9:24432.
171. Wachino J-I, Doi Y, Arakawa Y. 2020. Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 34:887–902.
172. Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, Arakawa Y, Chong Y. 2006. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56:305–312.
173. Strateva T, Markova B, Marteva-Proevska Y, Ivanova D, Mitov I. 2012. Widespread dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemase and ArmA 16S ribosomal RNA methylase in a Bulgarian university hospital. *Braz J Infect Dis* 16:307–10.
174. Bakour S, Touati A, Bachiri T, Sahli F, Tiouit D, Naim M, Azouaou M, Rolain JM. 2014. First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J Infect Chemother* 20:696–701.
175. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Nga TTT, Thu LTA, Son NT, Ohmagari N, Kirikae T. 2015. Dissemination of clonal complex 2 *Acinetobacter baumannii* strains co-producing carbapenemases and 16S rRNA methylase ArmA in Vietnam. *BMC Infect Dis* 15:4–10.
176. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, Ohmagari N, Takeshita N, Hung NV, Phuong DM, Thu TA, Binh NG, Anh NQ, Nga TTT, Truong PH, Xuan PT, Thu LTA, Son NT, Kirikae T. 2013. Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. *BMC Infect Dis* 13:251.
177. Kang HY, Kim KY, Kim J, Lee JC, Lee YC, Cho DT, Seol SY. 2008. Distribution of conjugative-plasmid-mediated 16S rRNA methylase genes among amikacin-resistant Enterobacteriaceae isolates collected in 1995 to 1998 and 2001 to 2006 at a university hospital in South Korea and identification of conjugative plasmids mediat. *J Clin Microbiol* 46:700–6.
178. Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R, Rodriguez-Villalobos H, Struelens M, Glupczynski Y. 2007. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 59:459–64.
179. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. 2008. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1843–5.
180. Taylor E, Sriskandan S, Woodford N, Hopkins KL. 2018. High prevalence of 16S rRNA methyltransferases among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the UK and Ireland. *Int J Antimicrob Agents* 52:278–282.
181. Taylor E, Bal AM, Balakrishnan I, Brown NM, Burns P, Clark M, Diggle M, Donaldson

- H, Eltringham I, Folb J, Gadsby N, Macleod M, Ratnaraja NVD V, Williams C, Wootton M, Sriskandan S, Woodford N, Hopkins KL. 2021. A prospective surveillance study to determine the prevalence of 16S rRNA methyltransferase-producing Gram-negative bacteria in the UK. *J Antimicrob Chemother* 0:1–9.
182. Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X, Wu S, Guo Y, Wang M. 2010. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29:1349–53.
183. Yuan M, Chen H, Zhu X, Feng J, Zhan Z, Zhang D, Chen X, Zhao X, Lu J, Xu J, Zhou D, Li J. 2017. pSY153-MDR, a p12969-DIM-related mega plasmid carrying blaIMP-45 and armA, from clinical *Pseudomonas putida*. *Oncotarget* 8:68439–68447.
184. Fang Y, Baloch Z, Zhang W, Hu Y, Zheng R, Song Y, Tai W, Xia X. 2022. Emergence of Carbapenem-Resistant ST244, ST292, and ST2446 *Pseudomonas aeruginosa* Clones in Burn Patients in Yunnan Province. *Infect Drug Resist* 15:1103–1114.
185. Gurung M, Moon DC, Tamang MD, Kim J, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC. 2010. Emergence of 16S rRNA methylase gene *armA* and cocarriage of *bla*_{IMP-1} in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 68:468–470.
186. Naas T, Bentchouala C, Cuzon G, Yaou S, Lezzar A, Smati F, Nordmann P. 2011. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 38:135–9.
187. Du XD, Li DX, Hu GZ, Wang Y, Shang YH, Wu CM, Liu HB, Li XS. 2012. Tn1548-associated armA is co-located with qnrB2, aac(6')-Ib-cr and blaCTX-M-3 on an IncFII plasmid in a salmonella enterica subsp. enterica serovar paratyphi B strain isolated from chickens in China. *J Antimicrob Chemother* 67:246–248.
188. Folster JP, Rickert R, Barzilay EJ, Whichard JM. 2009. Identification of the aminoglycoside resistance determinants armA and rmtC among non-typhi *Salmonella* isolates from humans in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4563–4564.
189. Moissenet D, Weill FX, Arlet G, Harrois D, Girardet JP, Vu-Thien H. 2011. *Salmonella enterica* serotype gambia with CTX-M-3 and armA resistance markers: Nosocomial infections with a fatal outcome. *J Clin Microbiol* 49:1676–1678.
190. Hidalgo L, Hopkins KL, Wareham DW, Gutierrez B, González-Zorn B. 2012. Association of extended-spectrum β -lactamase VEB-5 and 16S rRNA methyltransferase ArmA in *Salmonella enterica* from the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 56:4985–4987.
191. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. 2005. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2949–53.
192. Nagasawa M, Kaku M, Kamachi K, Shibayama K, Arakawa Y, Yamaguchi K, Ishii Y. 2014. Loop-mediated isothermal amplification assay for 16S rRNA methylase genes in Gram-negative bacteria. *J Infect Chemother* 20:635–8.
193. Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y. 2005. Global spread of multiple

- aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis* 11:951–3.
194. Yamane K, Wachino JI, Suzuki S, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Kimura K, Kai K, Ishikawa S, Ozawa Y, Konda T, Arakawa Y. 2007. 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis* 13:642–646.
 195. Shin SY, Kwon KC, Park JW, Song JH, Ko YH, Sung JY, Shin HW, Koo SH. 2009. Characteristics of *aac(6′)-Ib-cr* gene in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Chungnam area. *Korean J Lab Med* 29:541–50.
 196. Jin JS, Kwon KT, Moon DC, Lee JC. 2009. Emergence of 16S rRNA methylase *rmtA* in colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea. *Int J Antimicrob Agents* 33:490–1.
 197. Upadhyay S, Khyriem AB, Bhattacharya P, Bhattacharjee A, Joshi SR. 2018. High-level aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* recovered from Intensive Care Unit patients in Northeastern India. *Indian J Med Microbiol* 36:43–48.
 198. Wangkheimayum J, Paul D, Dhar D, Nepram R, Chetri S, Bhowmik D, Chakravarty A, Bhattacharjee A. 2017. Occurrence of acquired 16S rRNA methyltransferase-mediated aminoglycoside resistance in clinical isolates of enterobacteriaceae within a tertiary referral hospital of northeast India. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
 199. Poirel L, Schrenzel J, Cherkaoui A, Bernabeu S, Renzi G, Nordmann P. 2011. Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. *J Antimicrob Chemother* 66:1730–3.
 200. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. 2011. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4224–4229.
 201. Cassu-Corsi D, Martins WM, Nicoletti AG, Almeida LG, Vasconcelos AT, Gales AC. 2018. Characterisation of plasmid-mediated *rmtB-1* in Enterobacteriaceae clinical isolates from São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 113:e180392.
 202. Yang Q-E, Sun J, Li L, Deng H, Liu B-T, Fang L-X, Liao X-P, Liu Y-H. 2015. IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. *Front Microbiol* 6:964.
 203. Hou J, Huang X, Deng Y, He L, Yang T, Zeng Z, Chen Z, Liu JH. 2012. Dissemination of the fosfomycin resistance gene *fosA3* with CTX-M β -lactamase genes and *rmtB* carried on IncFII plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2135–2138.
 204. Yu F, Wang L, Pan J, Yao D, Chen C, Zhu T, Lou Q, Hu J, Wu Y, Zhang X, Chen Z, Qu D. 2009. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese teaching hospital: coexistence of *rmtB* and *armA* genes in the same isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64:57–63.
 205. Taylor E, Jauneikaite E, Sriskandan S, Woodford N, Hopkins KL. 2022. Detection and characterisation of 16S rRNA methyltransferase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from the UK and Republic of Ireland from 2003-2015. *Int J Antimicrob Agents* 59:106550.
 206. Tada T, Hishinuma T, Watanabe S, Uchida H, Tohya M, Kuwahara-Arai K, Mya S, Zan

- KN, Kirikae T, Tin HH. 2019. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Hospitals in Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother* 63:1–6.
207. Sidjabat HE, Townell N, Nimmo GR, George NM, Robson J, Vohra R, Davis L, Heney C, Paterson DL. 2015. Dominance of IMP-4-producing *Enterobacter cloacae* among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4059–4066.
208. Sartor AL, Raza MW, Abbasi SA, Day KM, Perry JD, Paterson DL, Sidjabat HE. 2014. Molecular epidemiology of NDM-1-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* isolates from Pakistan. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5589–93.
209. Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen O, Norwegian Study Group on Aminoglycoside Resistance. 2014. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6′)-Ib. *Diagn Microbiol Infect Dis* 78:66–9.
210. Carattoli A, Villa L, Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. 2012. Evolution of IncA/C *bla*_{CMY-2}-carrying plasmids by acquisition of the *bla*_{NDM-1} carbapenemase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 56:783–6.
211. Tijet N, Richardson D, MacMullin G, Patel SN, Melano RG. 2015. Characterization of multiple NDM-1-producing Enterobacteriaceae isolates from the same patient. *Antimicrob Agents Chemother* 59:3648–51.
212. Ferdous M, Friedrich AW, Grundmann H, de Boer RF, Croughs PD, Islam MA, Kluytmans-van den Bergh MFQ, Kooistra-Smid AMD, Rossen JWA. 2016. Molecular characterization and phylogeny of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) isolates obtained from two Dutch regions using whole genome sequencing. *Clin Microbiol Infect* 22:1–9.
213. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Mishra SK, Ohara H, Shimada K, Kirikae T, Pokhrel BM. 2013. Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (ArmA, RmtC and RmtF) in Nepal. *Int J Antimicrob Agents* 42:372–374.
214. Guo X, Dillon BB, Ginn AN, Wiklendt AM, Partridge SR, Iredell JR. 2014. Simple multiplex real-time PCR for rapid detection of common 16S rRNA methyltransferase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 80:29–31.
215. Li J, Munoz-Price LS, Spychala CN, DePascale D, Doi Y. 2016. New Delhi Metallo-β-Lactamase-1-Producing *Klebsiella pneumoniae*, Florida, USA(1). *Emerg Infect Dis* 22:744–6.
216. Wang Y, Zhang A, Yang Y, Lei C, Jiang W, Liu B, Shi H, Kong L, Cheng G, Zhang X, Yang X, Wang H. 2017. Emergence of *Salmonella enterica* serovar Indiana and California isolates with concurrent resistance to cefotaxime, amikacin and ciprofloxacin from chickens in China. *Int J Food Microbiol* 262:23–30.
217. Hopkins KL, Escudero JA, Hidalgo L, Gonzalez-Zorn B. 2010. 16S rRNA methyltransferase RmtC in *Salmonella enterica* serovar Virchow. *Emerg Infect Dis* 16:712–5.

218. Wang Y, Zhang A, Yang Y, Lei C, Jiang W, Liu B, Shi H, Kong L, Cheng G, Zhang X, Yang X, Wang H. 2017. Emergence of *Salmonella enterica* serovar Indiana and California isolates with concurrent resistance to cefotaxime, amikacin and ciprofloxacin from chickens in China. *Int J Food Microbiol* 262:23–30.
219. Saranathan R, Kumari R, Kalaivani R, Suresh S, Rani A, Purty S, Prashanth K. 2017. Detection of ISAbal in association with a novel allelic variant of the β -lactamase ADC-82 and class D β -lactamase genes mediating carbapenem resistance among the clinical isolates of MDR *A. baumannii*. *J Med Microbiol* 66:103–111.
220. Bado I, Papa-Ezdra R, Delgado-Blas JF, Gaudio M, Gutiérrez C, Cordeiro NF, García-Fulgueiras V, Araújo Pirez L, Seija V, Medina JC, Rieppi G, Gonzalez-Zorn B, Vignoli R. 2018. Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in the Intensive Care Unit of Uruguay's University Hospital Identifies the First rmtC Gene in the Species. *Microb Drug Resist* 24:1012–1019.
221. Rahman M, Prasad KN, Pathak A, Pati BK, Singh A, Ovejero CM, Ahmad S, Gonzalez-Zorn B. 2015. RmtC and RmtF 16S rRNA Methyltransferase in NDM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Emerg Infect Dis* 21:2059–62.
222. Dortet L, Flonta M, Boudehen Y-M, Creton E, Bernabeu S, Vogel A, Naas T. 2015. Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* in Romania. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7100–3.
223. Doi Y, Ghilardi ACR, Adams J, de Oliveira Garcia D, Paterson DL. 2007. High prevalence of metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3388–90.
224. Silveira MC, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef APDA. 2016. Description of genomic islands associated to the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone ST277. *Infect Genet Evol* 42:60–65.
225. Urbanowicz P, Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D, Ziółkowski G, Hryniewicz W, Gniadkowski M. 2019. *Pseudomonas aeruginosa* with NDM-1, DIM-1 and PME-1 β -lactamases, and RmtD3 16S rRNA methylase, encoded by new genomic islands. *J Antimicrob Chemother* 74:3117–3119.
226. Lee CS, Hu F, Rivera JI, Doi Y. 2014. *Escherichia coli* sequence type 354 coproducing CMY-2 cephalosporinase and RmtE 16S rRNA methyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 58:4246–4247.
227. Li B, Pacey MP, Doi Y. 2017. Chromosomal 16S Ribosomal RNA Methyltransferase RmtE1 in *Escherichia coli* Sequence Type 448. *Emerg Infect Dis* 23:876–878.
228. Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, Prasad KN, Woodford N, Gonzalez-Zorn B. 2013. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother* 68:1543–50.
229. Filgona J, Banerjee T, Anupurba S. 2015. Incidence of the novel rmtF and rmtG methyltransferases in carbapenem-resistant enterobacteriaceae from a hospital in India. *J Infect Dev Ctries* 9:1036–1039.
230. Shankar C, Muthurulandi Sethuvel DP, Neeravi AR, Venkatesan M, Devanga

- Ragupathi NK, Anandan S, Veeraraghavan B. 2020. Identification of plasmids by PCR based replicon typing in bacteremic *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Pathog* 148:104429.
231. Sherchan JB, Tada T, Shrestha S, Uchida H, Hishinuma T, Morioka S, Shahi RK, Bhandari S, Twi RT, Kirikae T, Sherchand JB. 2020. Emergence of clinical isolates of highly carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-harboring blaNDM-5 and blaOXA-181 or -232 in Nepal. *Int J Infect Dis* 92:247–252.
 232. Nahid F, Zahra R, Sandegren L. 2017. A blaOXA-181-harboursing multi-resistant ST147 *Klebsiella pneumoniae* isolate from Pakistan that represent an intermediate stage towards pan-drug resistance. *PLoS One* 12:e0189438.
 233. Huang T-W, Chen T-L, Chen Y-T, Lauderdale T-L, Liao T-L, Lee Y-T, Chen C-P, Liu Y-M, Lin A-C, Chang Y-H, Wu K-M, Kirby R, Lai J-F, Tan M-C, Siu L-K, Chang C-M, Fung C-P, Tsai S-F. 2013. Copy Number Change of the NDM-1 sequence in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. *PLoS One* 8:e62774.
 234. Shi Q, Han R, Guo Y, Zheng Y, Yang Y, Yin D, Zhang R, Hu F. 2020. Emergence of ST15 *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Producing Plasmids-Mediated RmtF and OXA-232 in China. *Infect Drug Resist* 13:3125–3129.
 235. Khong WX, Marimuthu K, Teo J, Ding Y, Xia E, Lee JJ, Ong RT-H, Venkatachalam I, Cheng B, Pada SK, Choong WL, Smitasin N, Ooi ST, Deepak RN, Kurup A, Fong R, Van La M, Tan TY, Koh TH, Lin RTP, Tan EL, Krishnan PU, Singh S, Pitout JD, Teo Y-Y, Yang L, Ng OT, Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Singapore (CaPES) Study Group. 2016. Tracking inter-institutional spread of NDM and identification of a novel NDM-positive plasmid, pSg1-NDM, using next-generation sequencing approaches. *J Antimicrob Chemother* 71:3081–3089.
 236. Zowawi HM, Forde BM, Alfaresi M, Alzarouni A, Farahat Y, Chong T-M, Yin W-F, Chan K-G, Li J, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL. 2015. Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep* 5:15082.
 237. Sonnevend Á, Ghazawi A, Hashmey R, Haidermota A, Girgis S, Alfaresi M, Omar M, Paterson DL, Zowawi HM, Pál T. 2017. Multihospital Occurrence of Pan-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 147 with an ISEcpI-Directed bla_{OXA-181} Insertion in the *mgrB* Gene in the United Arab Emirates. *Antimicrob Agents Chemother* 61:1–9.
 238. Gamal D, Fernández-Martínez M, Salem D, El-Defrawy I, Montes LÁ, Ocampo-Sosa AA, Martínez-Martínez L. 2016. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Egypt containing blaNDM-1 on IncR plasmids and its association with rmtF. *Int J Infect Dis* 43:17–20.
 239. Rubin JE, Peirano G, Peer AK, Govind CN, Pitout JDD. 2014. NDM-1-producing Enterobacteriaceae from South Africa: Moving towards endemicity? *Diagn Microbiol Infect Dis* 79:378–380.
 240. Mancini S, Poirel L, Tritten M-L, Lienhard R, Bassi C, Nordmann P. 2017. Emergence of an MDR *Klebsiella pneumoniae* ST231 producing OXA-232 and RmtF in Switzerland. *J Antimicrob Chemother* 73:821–823.
 241. Mataseje LF, Boyd DA, Lefebvre B, Bryce E, Embree J, Gravel D, Katz K, Kibsey P, Kuhn M, Langley J, Mitchell R, Roscoe D, Simor A, Taylor G, Thomas E, Turgeon N, Mulvey MR, Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. 2014. Complete sequences of a novel blaNDM-1-harboursing plasmid from *Providencia rettgeri* and an

- FII-type plasmid from *Klebsiella pneumoniae* identified in Canada. J Antimicrob Chemother 69:637–42.
242. Lee CS, Vasoo S, Hu F, Patel R, Doi Y. 2014. *Klebsiella pneumoniae* ST147 coproducing NDM-7 carbapenemase and RmtF 16S rRNA methyltransferase in Minnesota. J Clin Microbiol 52:4109–4110.
243. Yang S, Hemarajata P, Hindler J, Li F, Adisetiyo H, Aldrovandi G, Sebra R, Kasarskis A, MacCannell D, Didelot X, Russell D, Rubin Z, Humphries R. 2017. Evolution and Transmission of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Expressing the bla_{OXA-232} Gene During an Institutional Outbreak Associated With Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography. Clin Infect Dis 64:894–901.
244. Rojas LJ, Hujer AM, Rudin SD, Wright MS, Domitrovic TN, Marshall SH, Hujer KM, Richter SS, Cober E, Perez F, Adams MD, van Duin D, Bonomo RA. 2017. NDM-5 and OXA-181 Beta-Lactamases, a Significant Threat Continues To Spread in the Americas. Antimicrob Agents Chemother 61:128–33.
245. Bour M, Fournier D, Jové T, Pouzol A, Miltgen G, Janvier F, Jeannot K, Plésiat P. 2019. Acquisition of class C β -lactamase PAC-1 by ST664 strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 63:12–15.
246. Ramos PIP, Picão RC, Almeida LGP de, Lima NCB, Girardello R, Vivian ACP, Xavier DE, Barcellos FG, Pelisson M, Vespero EC, Médigue C, Vasconcelos ATR de, Gales AC, Nicolás MF. 2014. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. BMC Genomics 15:54.
247. Cerdeira L, Fernandes MR, Francisco GR, Bueno MFC, Ienne S, Souza TA, de Oliveira Garcia D, Lincopan N. 2016. Draft Genome Sequence of a Hospital-Associated Clone of *Klebsiella pneumoniae* ST340/CC258 Coproducing RmtG and KPC-2 Isolated from a Pediatric Patient. Genome Announc 4:2013–2014.
248. Poirel L, Labarca J, Bello H, Rioseco ML, Bernabeu S, Nordmann P. 2014. Emergence of the 16S rRNA methylase RmtG in an extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing and colistin-Resistant *klebsiella pneumoniae* isolate in Chile. Antimicrob Agents Chemother 58:618–619.
249. Bueno MFC, Francisco GR, Cerdeira L, Ienne S, Souza TA, Lincopan N, de Oliveira Garcia D. 2017. Draft genome sequence of an aminoglycoside-resistant RmtG-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST235 isolated from a cystic fibrosis patient. J Glob Antimicrob Resist 8:106–107.
250. Bueno MFC, Francisco GR, Cerdeira L, Ienne S, Souza TA, Lincopan N, de Oliveira Garcia D. 2017. Draft genome sequence of an aminoglycoside-resistant RmtG-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST235 isolated from a cystic fibrosis patient. J Glob Antimicrob Resist 8:106–107.
251. Hu F, Munoz-Price LS, DePascale D, Rivera JI, Doi Y. 2014. *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 isolate producing RmtG 16S rRNA methyltransferase from a patient in Miami, Florida. Antimicrob Agents Chemother 58:4980–4981.
252. Mancini S, Poirel L, Corthesy M, Greub G, Nordmann P. 2018. *Klebsiella pneumoniae* co-producing KPC and RmtG, finally targeting Switzerland. Diagn Microbiol Infect Dis 90:151–152.

253. Beyrouthy R, Robin F, Hamze M, Bonnet R. 2017. IncFIIk plasmid harbouring an amplification of 16S rRNA methyltransferase-encoding gene *rmtH* associated with mobile element ISCR2. *J Antimicrob Chemother* 72:402–406.
254. Usui M, Kajino A, Kon M, Fukuda A, Sato T, Shirakawa T, Kawanishi M, Harada K, Nakajima C, Suzuki Y, Tamura Y. 2019. Prevalence of 16S rRNA methylases in Gram-negative bacteria derived from companion animals and livestock in Japan. *J Vet Med Sci* 81:874–878.
255. Galani I, Souli M, Panagea T, Poulakou G, Kanellakopoulou K, Giamarellou H. 2012. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in Enterobacteriaceae isolates from a Greek university hospital. *Clin Microbiol Infect* 18:E52-4.
256. Berçot B, Poirel L, Nordmann P. 2008. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4526–7.
257. Berçot B, Poirel L, Ozdamar M, Hakko E, Türkoglu S, Nordmann P. 2010. Low prevalence of 16S methylases among extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from a Turkish hospital. *J Antimicrob Chemother* 65:797–8.
258. Arca-Suárez J, Rodiño-Janeiro BK, Pérez A, Guijarro-Sánchez P, Vázquez-Ucha JC, Cruz F, Gómez-Garrido J, Alioto TS, Álvarez-Tejado M, Gut M, Gut I, Oviaño M, Beceiro A, Bou G, GEMARA-SEIMC/REIPI Enterobacterales Study Group. 2022. Emergence of 16S rRNA methyltransferases among carbapenemase-producing Enterobacterales in Spain studied by whole-genome sequencing. *Int J Antimicrob Agents* 59:106456.
259. Wangkheimayum J, Paul D, Dhar D, Nepram R, Chetri S, Bhowmik D, Chakravarty A, Bhattacharjee A. 2017. Occurrence of acquired 16S rRNA methyltransferase-mediated aminoglycoside resistance in clinical isolates of enterobacteriaceae within a tertiary referral hospital of northeast India. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
260. Nasiri G, Peymani A, Farivar TN, Hosseini P. 2018. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* collected from Qazvin and Tehran provinces, Iran. *Infect Genet Evol* 64:219–224.
261. Sabtcheva S, Saga T, Kantardjiev T, Ivanova M, Ishii Y, Kaku M. 2008. Nosocomial spread of armA-mediated high-level aminoglycoside resistance in Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-3 beta-lactamase in a cancer hospital in Bulgaria. *J Chemother* 20:593–9.
262. Taitt CR, Leski TA, Erwin DP, Odundo EA, Kipkemoi NC, Ndonge JN, Kirera RK, Ombogo AN, Walson JL, Pavlinac PB, Hulseberg C, Vora GJ. 2017. Antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* stool isolates circulating in Kenya. *PLoS One* 12:1–19.
263. Liu Z, Ling B, Zhou L. 2015. Prevalence of 16S rRNA methylase, modifying enzyme, and extended-spectrum beta-lactamase genes among *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Chemother* 27:207–212.
264. Kim JW, Heo ST, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Jeong YG, Kim S-J, Lee JC. 2008. Characterization of *Acinetobacter baumannii* carrying bla(OXA-23), bla(PER-1) and armA in a Korean hospital. *Clin Microbiol Infect* 14:716–8.

265. Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, Coulange L, André C, Scientific Committee of ONERBA. 2009. Nationwide survey of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. *J Antimicrob Chemother* 63:1205–14.
266. Bonnin RA, Potron A, Poirel L, Lecuyer H, Neri R, Nordmann P. 2011. PER-7, an extended-spectrum β -lactamase with increased activity toward broad-spectrum cephalosporins in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:2424–2427.
267. Morel F, Decousser J-W, Kumanski S, Cambau E, Denamur E, Berçot B. 2017. Association of the 16S rRNA methylase gene *rmtB* with a novel insertion sequence element belonging to the ISL3 family. *Int J Antimicrob Agents* 49:117–118.
268. Baron SA, Cassir N, Mékidèche T, Mlaga KD, Brouqui P, Rolain J-M. 2019. Successful treatment and digestive decolonization of a patient with osteitis caused by a Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate harboring both NDM-1 and OXA-48 enzymes. *J Glob Antimicrob Resist*.
269. Janvier F, Otto M-P, Jové T, Mille A, Contargyris C, Meaudre E, Brisou P, Plésiat P, Jeannot K. 2017. A case of multiple contamination with methylase ArmA-producing pathogens. *J Antimicrob Chemother* 72:618–620.
270. Lupo A, Saras E, Madec J-Y, Haenni M. 2018. Emergence of *bla*_{CTX-M-55} associated with *fosA*, *rmtB* and *mcr* gene variants in *Escherichia coli* from various animal species in France. *J Antimicrob Chemother* 73:867–872.
271. Granier SA, Hidalgo L, San Millan A, Escudero JA, Gutierrez B, Brisabois A, Gonzalez-Zorn B. 2011. ArmA methyltransferase in a monophasic *Salmonella enterica* isolate from food. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5262–6.
272. Castanheira M, Deshpande LM, Woosley LN, Serio AW, Krause KM, Flamm RK. 2018. Activity of plazomicin compared with other aminoglycosides against isolates from European and adjacent countries, including Enterobacteriaceae molecularly characterized for aminoglycoside-modifying enzymes and other resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 73:3346–3354.
273. Galani I, Nafplioti K, Adamou P, Karaiskos I, Giamarellou H, Souli M, Study Collaborators. 2019. Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance. *BMC Infect Dis* 19:167.
274. Pitout JDD, Laupland KB. 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 8:159–66.
275. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. 2012. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol* 3:110.
276. Wachino J, Yamane K, Kimura K, Shibata N, Suzuki S, Ike Y, Arakawa Y. 2006. Mode of transposition and expression of 16S rRNA methyltransferase gene *rmtC* accompanied by ISEcp1. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3212–5.
277. Ayad A, Drissi M, de Curraize C, Dupont C, Hartmann A, Solanas S, Siebor E, Amoureux L, Neuwirth C. 2016. Occurrence of ArmA and RmtB Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methylases in Extended-Spectrum β -Lactamases Producing

- Escherichia coli* in Algerian Hospitals. Front Microbiol 7:1409.
278. El-Sayed-Ahmed MAE-G, Amin MA, Tawakol WM, Loucif L, Bakour S, Rolain J-M. 2015. High prevalence of *bla*_{NDM-1} carbapenemase-encoding gene and 16S rRNA *armA* methyltransferase gene among *Acinetobacter baumannii* clinical Isolates in Egypt. Antimicrob Agents Chemother 59:3602–5.
 279. Dolejska M, Villa L, Poirel L, Nordmann P, Carattoli A. 2013. Complete sequencing of an IncHII plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump. J Antimicrob Chemother 68:34–9.
 280. Solé M, Pitart C, Roca I, Fàbrega A, Salvador P, Muñoz L, Oliveira I, Gascón J, Marco F, Vila J. 2011. First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. Antimicrob Agents Chemother 55:4402–4.
 281. Berçot B, Poirel L, Nordmann P. 2011. Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers. Diagn Microbiol Infect Dis 71:442–5.
 282. Fiett J, Baraniak A, Izdebski R, Sitkiewicz I, Zabicka D, Meler A, Filczak K, Hryniewicz W, Gniadkowski M. 2014. The first NDM metallo- β -lactamase-producing enterobacteriaceae isolate in Poland: Evolution of IncFII-type plasmids carrying the *bla*_{NDM-1} gene. Antimicrob Agents Chemother 58:1203–1207.
 283. Poirel L, Savov E, Nazli A, Trifonova A, Todorova I, Gergova I, Nordmann P. 2014. Outbreak caused by NDM-1- and RmtB-producing *Escherichia coli* in Bulgaria. Antimicrob Agents Chemother 58:2472–2474.
 284. Fontes LC, Neves PR, Oliveira S, Silva KC, Hachich EM, Sato MIZ, Lincopan N. 2011. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo- β -lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. Antimicrob Agents Chemother 55:3063–4.
 285. Kois AK, Nicolau DP, Asempa TE. 2022. In vivo exposure-response relationship of meropenem against metallo- β -lactamase-harboring *Pseudomonas aeruginosa*: an assessment using MICs from conventional and zinc-limited broth. J Antimicrob Chemother.
 286. Hopkins KL, Meunier D, Findlay J, Mustafa N, Parsons H, Pike R, Wright L, Woodford N. 2016. SPM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. J Med Microbiol 65:696–697.
 287. Li DX, Zhang SM, Hu GZ, Wang Y, Liu HB, Wu CM, Shang YH, Chen YX, Du XD. 2012. Tn3-associated *rmtB* together with *qnrS1*, *aac(6')-Ib-cr* and *bla*_{CTX-M-15} are co-located on an F49:A-:B- plasmid in an *Escherichia coli* ST10 strain in China. J Antimicrob Chemother 67:236–238.
 288. Zenati K, Sahli F, Garcia V, Bakour S, Belhadi D, Rolain JM, Touati A. 2017. Occurrence and clonal diversity of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* recovered from inanimate surfaces in Algerian hospital environment: First report of *armA*, *qnrB* and *aac(6')-Ib-cr* genes. J Glob Antimicrob Resist 10:148–153.
 289. Jiang Y, Yu D, Wei Z, Shen P, Zhou Z, Yu N. 2010. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying *bla*_{KPC-2}, *bla*_{DHA-1}, *qnrB4*, and *armA*. Antimicrob Agents Chemother 54:3967–3969.

290. Seiffert SN, Marschall J, Perreten V, Carattoli A, Furrer H, Endimiani A. 2014. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents* 44:260–2.
291. Périchon B, Courvalin P, Galimand M. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2464–9.
292. Chen X, He L, Li Y, Zeng Z, Deng Y, Liu Y, Liu J-H. 2014. Complete sequence of a F2:A-B- plasmid pHN3A11 carrying rmtB and qepA, and its dissemination in China. *Vet Microbiol* 174:267–71.
293. Deng Y-T, Zeng Z-L, Tian W, Yang T, Liu J-H. 2013. Prevalence and characteristics of rmtB and qepA in *Escherichia coli* isolated from diseased animals in China. *Front Microbiol* 4:198.
294. Tian G-B, Rivera JI, Park YS, Johnson LE, Hingwe A, Adams-Haduch JM, Doi Y. 2011. Sequence type ST405 *Escherichia coli* isolate producing QepA1, CTX-M-15, and RmtB from Detroit, Michigan. *Antimicrob Agents Chemother* 55:3966–7.
295. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. 2012. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 25:450–470.
296. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3:722–32.
297. Furuya EY, Lowy FD. 2006. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol* 4:36–45.
298. Lederberg J. 1998. Plasmid (1952-1997). *Plasmid* 39:1–9.
299. Mazel D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 4:608–20.
300. Mahillon J, Chandler M. 1998. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:725–74.
301. Hall RM. 2012. Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. *Ann N Y Acad Sci* 1267:71–8.
302. Bellanger X, Payot S, Leblond-Bourget N, Guédon G. 2014. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: Evolution and diversity. *FEMS Microbiol Rev* 38:720–760.
303. Thomas CM, Nielsen KM. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3:711–21.
304. Siguier P, Gourgouy E, Chandler M. 2014. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev* 38:865–91.
305. Toleman MA, Walsh TR. 2011. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 35:912–35.
306. Partridge SR. 2011. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 35:820–55.
307. Szuplewska M, Ludwiczak M, Lyzwa K, Czarnecki J, Bartosik D. 2014. Mobility and generation of mosaic non-autonomous transposons by Tn3-derived inverted-repeat miniature elements (TIMES). *PLoS One* 9:e105010.

308. Chen L, Chen Z-L, Liu J-H, Zeng Z-L, Ma J-Y, Jiang H-X. 2007. Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. *J Antimicrob Chemother* 59:880–5.
309. Deng Y, Zeng Z, Chen S, He L, Liu Y, Wu C, Chen Z, Yao Q, Hou J, Yang T, Liu J-H. 2011. Dissemination of IncFII plasmids carrying *rmtB* and *qepA* in *Escherichia coli* from pigs, farm workers and the environment. *Clin Microbiol Infect* 17:1740–5.
310. Martins WMBS, Gales AC. 2017. Frequent Tn2 misannotation in the genetic background of *rmtB*. *Antimicrob Agents Chemother* 61:1–9.
311. Darmon E, Leach DRF. 2014. Bacterial Genome Instability. *Microbiol Mol Biol Rev* 78:1–39.
312. Johnson CM, Grossman AD. 2015. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annu Rev Genet* 49:577–601.
313. Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, Faruque SM, Woodgate R, Waldor MK. 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in vibrio cholerae O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2991–3000.
314. Hall RM, Vockler C. 1987. The region of the IncN plasmid R46 coding for resistance to beta-lactam antibiotics, streptomycin/spectinomycin and sulphonamides is closely related to antibiotic resistance segments found in IncW plasmids and in Tn21-like transposons. *Nucleic Acids Res* 15:7491–501.
315. de la Cruz F, Grinsted J. 1982. Genetic and molecular characterization of Tn21, a multiple resistance transposon from R100.1. *J Bacteriol* 151:222–28.
316. Cameron FH, Groot Obbink DJ, Ackerman VP, Hall RM. 1986. Nucleotide sequence of the AAD(2'') aminoglycoside adenylyltransferase determinant *aadB*. Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfrII* in R388. *Nucleic Acids Res* 14:8625–35.
317. Stokes HW, Hall RM. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 3:1669–83.
318. Collis CM, Hall RM. 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 39:155–162.
319. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev* 70:296–316.
320. Tavakoli N, Comanducci A, Dodd HM, Lett MC, Albiger B, Bennett P. 2000. IS1294, a DNA element that transposes by RC transposition. *Plasmid* 44:66–84.
321. Doi Y, Adams-Haduch JM, Paterson DL. 2008. Genetic environment of 16S rRNA methylase gene *rmtD*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2270–2.
322. Zong Z, Partridge SR, Iredell JR. 2008. RmtC 16S rRNA methyltransferase in Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 52:794–5.
323. Carattoli A. 2009. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2227–38.
324. Datta N, Hedges RW, Shaw EJ, Sykes RB, Richmond MH. 1971. Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 108:1244–9.

325. Marshall I, Weinstock M. 1971. Quantitative method for assessing one symptom of the withdrawal syndrome in mice after chronic morphine administration. *Nature* 234:223–4.
326. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63:219–28.
327. Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, Nolan LK. 2007. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* 73:1976–83.
328. Du X-D, Wu C-M, Liu H-B, Li X-S, Beier RC, Xiao F, Qin S-S, Huang S-Y, Shen J-Z. 2009. Plasmid-mediated ArmA and RmtB 16S rRNA methylases in *Escherichia coli* isolated from chickens. *J Antimicrob Chemother* 64:1328–30.
329. Yang Y-X, Yang Y-Q, Lei C-W, Liu B-H, Jiang W, Wang H-N, Gazitúa MC, Zhang A-Y. 2017. Characterization of pHeBE7, an IncFII-type virulence-resistance plasmid carrying *bla*_{CTX-M-98b}, *bla*_{TEM-1}, and *rmtB* genes, detected in *Escherichia coli* from a chicken isolate in China. *Plasmid* 92:37–42.
330. Fu T, Du XD, Cheng PP, Li XR, Zhao XF, Pan YS. 2016. Characterization of an *rmtB*-carrying *incI1* ST136 plasmid in avian *Escherichia coli* isolates from chickens. *J Med Microbiol* 65:387–391.
331. Liao X-P, Liu B-T, Yang Q-E, Sun J, Li L, Fang L-X, Liu Y-H. 2013. Comparison of plasmids coharboring 16s rna methylase and extended-spectrum β -lactamase genes among *Escherichia coli* isolates from pets and poultry. *J Food Prot* 76:2018–23.
332. Yao Q, Zeng Z, Hou J, Deng Y, He L, Tian W, Zheng H, Chen Z, Liu J-H. 2011. Dissemination of the *rmtB* gene carried on IncF and IncN plasmids among Enterobacteriaceae in a pig farm and its environment. *J Antimicrob Chemother* 66:2475–9.
333. He T, Wei R, Zhang L, Sun L, Pang M, Wang R, Wang Y. 2017. Characterization of NDM-5-positive extensively resistant *Escherichia coli* isolates from dairy cows. *Vet Microbiol* 207:153–158.
334. Xia J, Fang L-X, Cheng K, Xu G-H, Wang X-R, Liao X-P, Liu Y-H, Sun J. 2017. Clonal Spread of 16S rRNA Methyltransferase-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST37 with High Prevalence of ESBLs from Companion Animals in China. *Front Microbiol* 8:529.
335. Nordahl Petersen T, Rasmussen S, Hasman H, Carøe C, Bælum J, Schultz AC, Bergmark L, Svendsen CA, Lund O, Sicheritz-Pontén T, Aarestrup FM. 2015. Meta-genomic analysis of toilet waste from long distance flights; a step towards global surveillance of infectious diseases and antimicrobial resistance. *Sci Rep* 5:11444.
336. Zurfluh K, Bagutti C, Brodmann P, Alt M, Schulze J, Fanning S, Stephan R, Nüesch-Inderbinen M. 2017. Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase- and 16s rRNA methylase-producing Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 50:436–440.
337. Theuretzbacher U, Paul M. 2018. Developing a new antibiotic for extensively drug-resistant pathogens: the case of plazomicin. *Clin Microbiol Infect* 24:1231–1233.
338. Armstrong ES, Miller GH. 2010. Combating evolution with intelligent design: the neoglycoside ACHN-490. *Curr Opin Microbiol* 13:565–73.

339. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang J-C, Maharjan S, Doumith M, Woodford N. 2011. Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother* 66:48–53.
340. Kang AD, Smith KP, Eliopoulos GM, Berg AH, McCoy C, Kirby JE. 2017. In vitro Apramycin Activity against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 88:188–191.
341. González-Zorn B, Catalan A, Escudero JA, Domínguez L, Teshager T, Porrero C, Moreno MA. 2005. Genetic basis for dissemination of *armA*. *J Antimicrob Chemother* 56:583–5.
342. Davies J, O'Connor S. 1978. Enzymatic modification of aminoglycoside antibiotics: 3-N-acetyltransferase with broad specificity that determines resistance to the novel aminoglycoside apramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 14:69–72.
343. Chopra I, Schofield C, Everett M, O'Neill A, Miller K, Wilcox M, Frère J-M, Dawson M, Czaplewski L, Urleb U, Courvalin P. 2008. Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement. *Lancet Infect Dis* 8:133–9.
344. Peleg AY, Hooper DC. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 362:1804–13.
345. Hudson CM, Bent ZW, Meagher RJ, Williams KP. 2014. Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. *PLoS One* 9:e99209.
346. Fournier C, Poirel L, Despont S, Kessler J, Nordmann P. 2022. Increasing Trends of Association of 16S rRNA Methylases and Carbapenemases in Enterobacteriales Clinical Isolates from Switzerland, 2017–2020. *Microorganisms* 10:2017–2020.
347. Takei S, Lu YJ, Tohya M, Watanabe S, Misawa S, Tabe Y, Miida T, Mya S, Tin HH, Tada T, Kirikae T. 2022. Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Producing NDM-Type Metallo- β -Lactamase in Myanmar. *Microbiol Spectr* e0067322.
348. Poirel L, Goutines J, Aires-de-Sousa M, Nordmann P. 2018. High Rate of Association of 16S rRNA Methylases and Carbapenemases in Enterobacteriaceae Recovered from Hospitalized Children in Angola. *Antimicrob Agents Chemother* 62:AAC.00021-18.
349. Li D-X, Zhang S-M, Hu G-Z, Wang Y, Liu H-B, Wu C-M, Shang Y-H, Chen Y-X, Du X-D. 2012. Tn3-associated *rmtB* together with *qnrS1*, *aac(6')*-Ib-cr and *bla* CTX-M-15 are co-located on an F49:A-B- plasmid in an *Escherichia coli* ST10 strain in China. *J Antimicrob Chemother* 67:236–8.
350. Bitar I, Piazza A, Gaiarsa S, Villa L, Pedroni P, Oliva E, Nucleo E, Pagani L, Carattoli A, Migliavacca R. 2017. ST405 NDM-5 producing *Escherichia coli* in Northern Italy: the first two clinical cases. *Clin Microbiol Infect* 23:489–490.
351. Mushtaq S, Irfan S, Sarma JB, Doumith M, Pike R, Pitout J, Livermore DM, Woodford N. 2011. Phylogenetic diversity of *Escherichia coli* strains producing NDM-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 66:2002–5.
352. Bachiri T, Lalaoui R, Bakour S, Allouache M, Belkebla N, Rolain JM, Touati A. 2018. First Report of the Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-1* in *Escherichia coli*

- ST405 Isolated from Wildlife in Bejaia, Algeria. *Microb Drug Resist* 24:890–895.
353. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. 2014. *Escherichia coli* st131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* 27:543–574.
354. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, Mevius DJ, Hordijk J. 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 73:1121–1137.
355. Carattoli A, Seiffert SN, Schwendener S, Perreten V, Endimiani A. 2015. Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance. *PLoS One* 10:e0123063.
356. Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, Arakawa Y, Kuroda M. 2011. Complete sequencing of the bla NDM-1-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PLoS One* 6.
357. Galani I, Anagnostoulis G, Chatzikonstantinou M, Petrikkos G, Souli M. 2016. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing OXA-48, CTX-M-15, and ArmA in Greece. *Clin Microbiol Infect* 22:898–899.
358. González-Zorn B, Teshager T, Casas M, Porrero MC, Moreno MA, Courvalin P, Domínguez L. 2005. armA and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 11:954–6.
359. Harmer CJ, Hall RM. 2016. IS26-Mediated Formation of Transposons Carrying Antibiotic Resistance Genes. *mSphere* 1:1–8.
360. Périchon B, Bogaerts P, Lambert T, Frangeul L, Courvalin P, Galimand M. 2008. Sequence of conjugative plasmid pIP1206 mediating resistance to aminoglycosides by 16S rRNA methylation and to hydrophilic fluoroquinolones by efflux. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2581–92.
361. Yuan L, Liu JH, Du XD, Zong ZY, Chen M, Hu GZ, Pan YS. 2018. Comparative genomics of rmtB-carrying IncI1 ST136 plasmids in avian *Escherichia coli* isolates from chickens in China. *Int J Antimicrob Agents* 51:659–662.
362. Nafplioti K, Souli M, Adamou P, Moraitou E, Giannopoulou P, Chra P, Damala M, Vogiatzakis E, Triikka-Graphakos E, Baka V, Prifti E, Antoniadou A, Galani I. 2021. Characterization of 16S rRNA methylase genes in Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* in Athens Metropolitan area, 2015–2016. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 40:111–121.
363. Oikonomou O, Liakopoulos A, Phee LM, Betts J, Mevius D, Wareham DW. 2016. *Providencia stuartii* Isolates from Greece: Co-Carriage of Cephalosporin (blaSHV-5, blaVEB-1), Carbapenem (blaVIM-1), and Aminoglycoside (rmtB) Resistance Determinants by a Multidrug-Resistant Outbreak Clone. *Microb Drug Resist* 22:379–86.
364. Bonnin RA, Jousset AB, Chiarelli A, Emeraud C, Glaser P, Naas T, Dortet L. 2020. Emergence of New Non-Clonal Group 258 High-Risk Clones among *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing K. pneumoniae Isolates, France. *Emerg Infect Dis* 26:1212–1220.
365. Dortet L, Cuzon G, Ponties V, Nordmann P. 2017. Trends in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, France, 2012 to 2014. *Euro Surveill* 22:30461.

366. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. 2017. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev* 30:557–596.
367. Stein GE, Babinchak T. 2013. Tigecycline: an update. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75:331–6.
368. Sun Y, Cai Y, Liu X, Bai N, Liang B, Wang R. 2013. The emergence of clinical resistance to tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 41:110–116.
369. Tuon FF, Rocha JL, Formigoni-Pinto MR. 2018. Pharmacological aspects and spectrum of action of ceftazidime–avibactam: a systematic review. *Infection* 46:165–181.
370. Jacobs MR, Abdelhamed AM, Good CE, Rhoads DD, Hujer KM, Hujer AM, Domitrovic TN, Rudin SD, Richter SS, van Duin D, Kreiswirth BN, Greco C, Fouts DE, Bonomo RA. 2019. ARGONAUT-I: Activity of Cefiderocol (S-649266), a Siderophore Cephalosporin, against Gram-Negative Bacteria, Including Carbapenem-Resistant Nonfermenters and Enterobacteriaceae with Defined Extended-Spectrum β -Lactamases and Carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 63:1–9.
371. Yao J, Wang J, Chen M, Cai Y. 2021. Cefiderocol: An Overview of Its in-vitro and in-vivo Activity and Underlying Resistant Mechanisms. *Front Med* 8:741940.
372. McElheny CL, Fowler EL, Iovleva A, Shields RK, Doi Y. 2021. In Vitro Evolution of Cefiderocol Resistance in an NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* Due to Functional Loss of CirA. *Microbiol Spectr* 9:e0177921.
373. Takahashi T, Tada T, Shrestha S, Hishinuma T, Sherchan JB, Tohya M, Kirikae T, Sherchand JB. 2021. Molecular characterisation of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Nepal. *J Glob Antimicrob Resist* 26:279–284.
374. Shu L, Dong N, Lu J, Zheng Z, Hu J, Zeng W, Sun Q, Chan EWC, Zhou H, Hu F, Chen S, Zhang R. 2019. Emergence of OXA-232 Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* That Carries a pLVPK-Like Virulence Plasmid among Elderly Patients in China. *Antimicrob Agents Chemother* 63:1–6.
375. Park K-H, Lee MS, Lee S-O, Choi S-H, Sung H, Kim M-N, Kim YS, Woo JH, Kim S-H. 2014. Diagnostic usefulness of differential time to positivity for catheter-related candidemia. *J Clin Microbiol* 52:2566–72.
376. Arca-Suárez J, Rodiño-Janeiro BK, Pérez A, Guijarro-Sánchez P, Vázquez-Ucha JC, Cruz F, Gómez-Garrido J, Alioto TS, Álvarez-Tejado M, Gut M, Gut I, Oviaño M, Beceiro A, Bou G, GEMARA-SEIMC/REIPI Enterobacterales Study Group. 2021. Emergence of 16S rRNA methyltransferases among carbapenemase-producing Enterobacterales in Spain studied by whole-genome sequencing. *Int J Antimicrob Agents* 106456.
377. Chudejova K, Kraftova L, Mattioni Marchetti V, Hrabak J, Papagiannitsis CC, Bitar I. 2021. Genetic Plurality of OXA/NDM-Encoding Features Characterized From Enterobacterales Recovered From Czech Hospitals. *Front Microbiol* 12:641415.
378. Poirel L, Bonnin RA, Boulanger A, Schrenzel J, Kaase M, Nordmann P. 2012. Tn125-related acquisition of *bla*_{NDM}-like genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1087–9.
379. Potron A, Rondinaud E, Poirel L, Belmonte O, Boyer S, Camiade S, Nordmann P. 2013.

- Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 41:325–9.
380. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. 2012. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* 56:559–62.
381. Van Duin D, Perez F, Rudin SD, Cober E, Hanrahan J, Ziegler J, Webber R, Fox J, Mason P, Richter SS, Cline M, Hall GS, Kaye KS, Jacobs MR, Kalayjian RC, Salata RA, Segre JA, Conlan S, Evans S, Fowler VG, Bonomo RA. 2014. Surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Tracking molecular epidemiology and outcomes through a regional network. *Antimicrob Agents Chemother* 58:4035–4041.
382. Acman M, Wang R, van Dorp L, Shaw LP, Wang Q, Luhmann N, Yin Y, Sun S, Chen H, Wang H, Balloux F. 2022. Role of mobile genetic elements in the global dissemination of the carbapenem resistance gene *bla_{NDM}*. *Nat Commun* 13:1131.
383. Honda NH, Aoki K, Kamisasanuki T, Matsuda N, To M, Matsushima H, Ishii Y, Haruki K. 2019. Isolation of three distinct carbapenemase-producing Gram-negative bacteria from a Vietnamese medical tourist. *J Infect Chemother* 25:811–815.
384. Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. 2004. Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2069–74.
385. Yamane K, Wachino J-I, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3354–60.
386. Liss MA, Taylor SA, Batura D, Steensels D, Chayakulkeeree M, Soenens C, Rao GG, Dash A, Park S, Patel N, Woo J, McDonald M, Nseyo U, Banapour P, Unterberg S, Ahlering TE, Van Poppel H, Sakamoto K, Fierer J, Black PC. 2014. Fluoroquinolone resistant rectal colonization predicts risk of infectious complications after transrectal prostate biopsy. *J Urol* 192:1673–8.
387. Cavalcanti FL de S, Mirones CR, Paucar ER, Montes LÁ, Leal-Balbino TC, Morais MMC de, Martínez-Martínez L, Ocampo-Sosa AA. 2015. Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110:1003–9.
388. Galetti R, Andrade LN, Varani AM, Darini ALC. 2019. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 carries a chromosomal pack of acquired resistance genes: An example of high-risk clone associated with “intrinsic resistome”. *J Glob Antimicrob Resist* 16:183–186.
389. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18:268–81.
390. Kadri SS, Adjemian J, Lai YL, Spaulding AB, Ricotta E, Rebecca Prevots D, Palmore TN, Rhee C, Klompas M, Dekker JP, Powers JH, Suffredini AF, Hooper DC, Fridkin S, Danner RL. 2018. Difficult-to-treat resistance in gram-negative bacteremia at 173 US hospitals: Retrospective cohort analysis of prevalence, predictors, and outcome of

- resistance to all first-line agents. *Clin Infect Dis* 67:1803–1814.
391. Khan A, Shropshire WC, Hanson B, Dinh AQ, Wanger A, Ostrosky-Zeichner L, Arias CA, Miller WR. 2020. Simultaneous Infection with Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Harboring Multiple Carbapenemases in a Returning Traveler Colonized with *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother* 64:1–6.
 392. Corrêa LL, Montezzi LF, Bonelli RR, Moreira BM, Picão RC. 2014. Revised and updated multiplex PCR targeting acquired 16S rRNA methyltransferases. *Int J Antimicrob Agents* 43:479–481.
 393. Torrens G, van der Schalk TE, Cortes-Lara S, Timbermont L, Del Barrio-Tofiño E, Xavier BB, Zamorano L, Lammens C, Ali O, Ruzin A, Goossens H, Kumar-Singh S, Kluytmans J, Paling F, MacLean RC, Köhler T, López-Causapé C, Malhotra-Kumar S, Oliver A, ASPIRE-ICU study team. 2022. Susceptibility profiles and resistance genomics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from European ICUs participating in the ASPIRE-ICU trial. *J Antimicrob Chemother* 1–11.
 394. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35:736–55.
 395. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. 2015. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 21–22:41–59.
 396. Toleman MA, Walsh TR. 2008. Evolution of the ISCR3 group of ISCR elements. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3789–91.
 397. Botelho J, Roberts AP, León-Sampedro R, Grosso F, Peixe L. 2018. Carbapenemases on the move: it's good to be on ICEs. *Mob DNA* 9:37.
 398. Varani A, He S, Siguier P, Ross K, Chandler M. 2021. The IS6 family, a clinically important group of insertion sequences including IS26. *Mob DNA* 12:11.
 399. Wu Q, Zhang Y, Han L, Sun J, Ni Y. 2009. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases in aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae isolates in Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 53:271–2.
 400. Cheng L, Cao X-L, Zhang Z-F, Ning M-Z, Xu X-J, Zhou W, Chen J-H, Zhang J-H, Shen H, Zhang K. 2016. Clonal dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone with high prevalence of *oqxAB* and *rmtB* in a tertiary hospital in China: results from a 3-year period. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 15:1.
 401. Tada T, Tsuchiya M, Shimada K, Nga TTT, Thu LTA, Phu TT, Ohmagari N, Kirikae T. 2017. Dissemination of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of Carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA Methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. *BMC Infect Dis* 17:1–7.
 402. Wright MS, Haft DH, Harkins DM, Perez F, Hujer KM, Bajaksouzian S, Benard MF, Jacobs MR, Bonomo RA, Adams MD. 2014. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *MBio* 5:e00963-13.
 403. Yan J-J, Wu J-J, Ko W-C, Tsai S-H, Chuang C-L, Wu H-M, Lu Y-J, Li J-D. 2004. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese

- hospitals. *J Antimicrob Chemother* 54:1007–12.
404. Nafplioti K, Galani I, Angelidis E, Adamou P, Moraitou E, Giannopoulou P, Chra P, Damala M, Vogiatzakis E, Triikka-Graphakos E, Baka V, Prifti E, Antoniadou A, Souli M. 2020. Dissemination of International Clone II *Acinetobacter baumannii* Strains Coproducing OXA-23 Carbapenemase and 16S rRNA Methylase ArmA in Athens, Greece. *Microb Drug Resist* 26:9–13.
 405. Doi Y, Arakawa Y. 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 45:88–94.
 406. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich A a., Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin A V., Sirotkin A V., Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev M a., Pevzner P a. 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477.
 407. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, Lago BA, Dave BM, Pereira S, Sharma AN, Doshi S, Courtot M, Lo R, Williams LE, Frye JG, Elsayegh T, Sardar D, Westman EL, Pawlowski AC, Johnson TA, Brinkman FSL, Wright GD, McArthur AG. 2017. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 45:D566–D573.
 408. Evans BA, Amyes SGB. 2014. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 27:241–263.
 409. Wang Y, Shen M, Yang J, Dai M, Chang Y, Zhang C, Luan G, Ling B, Jia X. 2016. Prevalence of carbapenemases among high-level aminoglycoside-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a university hospital in China. *Exp Ther Med* 12:3642–3652.
 410. Palmieri M, D’Andrea MM, Pelegrin AC, Perrot N, Mirande C, Blanc B, Legakis N, Goossens H, Rossolini GM, van Belkum A. 2020. Abundance of Colistin-Resistant, OXA-23- and ArmA-Producing *Acinetobacter baumannii* Belonging to International Clone 2 in Greece. *Front Microbiol* 11:668.
 411. Giufrè M, Errico G, Accogli M, Monaco M, Villa L, Distasi MA, Del Gaudio T, Pantosti A, Carattoli A, Cerquetti M. 2018. Emergence of NDM-5-producing *Escherichia coli* sequence type 167 clone in Italy. *Int J Antimicrob Agents* 52:76–81.
 412. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. 2015. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5873–84.
 413. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JDD. 2013. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 57:130–6.
 414. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. 2010. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 65:233–8.
 415. Cherubini S, Perilli M, Segatore B, Fazii P, Parruti G, Frattari A, Amicosante G, Piccirilli A. 2022. Whole-Genome Sequencing of ST2 A. baumannii Causing Bloodstream Infections in COVID-19 Patients. *Antibiot (Basel, Switzerland)* 11:1–10.
 416. Hu Y, Liu L, Zhang X, Feng Y, Zong Z. 2017. In Vitro Activity of Neomycin, Streptomycin, Paromomycin and Apramycin against Carbapenem-Resistant

Enterobacteriaceae Clinical Strains. *Front Microbiol* 8:2275.

417. Zhao C, Chirkova A, Rosenborg S, Palma Villar R, Lindberg J, Hobbie SN, Friberg LE. 2022. Population pharmacokinetics of apramycin from first-in-human plasma and urine data to support prediction of efficacious dose. *J Antimicrob Chemother* 1–11.
418. Plattner M, Gysin M, Haldimann K, Becker K, Hobbie SN. 2020. Epidemiologic, Phenotypic, and Structural Characterization of Aminoglycoside-Resistance Gene *aac(3)-IV*. *Int J Mol Sci* 21:6133.
419. Bordeleau E, Stogios PJ, Evdokimova E, Koteva K, Savchenko A, Wright GD. 2021. ApmA Is a Unique Aminoglycoside Antibiotic Acetyltransferase That Inactivates Apramycin. *MBio* 12:1–11.
420. Smith KP, Kirby JE. 2016. Evaluation of apramycin activity against carbapenem-resistant and -susceptible strains of Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 86:439–441.
421. Roch M, Sierra R, Sands K, Martins WMBS, Schrenzel J, Walsh TR, Gales AC, Andrey DO. 2021. Vertical and horizontal dissemination of an IncC plasmid harbouring *rmtB* 16S rRNA methylase gene, conferring resistance to plazomicin, among invasive ST258 and ST16 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist* 24:183–189.
422. Kang AD, Smith KP, Berg AH, Truelson KA, Eliopoulos GM, McCoy C, Kirby JE. 2018. Efficacy of Apramycin against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in the Murine Neutropenic Thigh Model. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
423. Riedel S, Vijayakumar D, Berg G, Kang AD, Smith KP, Kirby JE. 2019. Evaluation of apramycin against spectinomycin-resistant and -susceptible strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother* 74:1311–1316.
424. Hao M, Schuyler J, Zhang H, Shashkina E, Du H, Fouts DE, Satlin M, Kreiswirth BN, Chen L. 2021. Apramycin resistance in epidemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 strains. *J Antimicrob Chemother* 76:2017–2023.
425. Galani I, Souli M, Daikos GL, Chrysouli Z, Poulakou G, Psychogiou M, Panagea T, Argyropoulou A, Stefanou I, Plakias G, Giamarellou H, Petrikos G. 2012. Activity of plazomicin (ACHN-490) against MDR clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and Enterobacter spp. from Athens, Greece. *J Chemother* 24:191–4.
426. Johnson AP, Malde M, Woodford N, Cunney RJ, Smyth EG. 1995. Urinary isolates of apramycin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Dublin. *Epidemiol Infect* 114:105–112.
427. Jensen VF, Jakobsen L, Emborg H-D, Seyfarth AM, Hammerum AM. 2006. Correlation between apramycin and gentamicin use in pigs and an increasing reservoir of gentamicin-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 58:101–7.
428. Fernández-Martínez M, Miró E, Ortega A, Bou G, González-López JJ, Oliver A, Pascual A, Cercenado E, Oteo J, Martínez-Martínez L, Navarro F. 2015. Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to amoxicillin/clavulanic acid isolated in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 46:157–163.
429. Yang Y, Xiao T, Li J, Cheng P, Li F, Yu H, Liu R, Muhammad I, Zhang X. 2020. Wild-type cutoff for Apramycin against *Escherichia coli*. *BMC Vet Res* 16:309.

430. Chaslus-Dancla E, Glupczynski Y, Gerbaud G, Lagorce M, Lafont JP, Courvalin P. 1989. Detection of apramycin resistant enterobacteriaceae in hospital isolates. *FEMS Microbiol Lett* 61:261–265.
431. Hunter JEB, Hart CA, Shelley JC, Walton JR, Bennett M. 1993. Human isolates of apramycin-resistant *Escherichia coli* which contain the genes for the AAC(3)IV enzyme. *Epidemiol Infect* 110:253–9.
432. Fessler AT, Kadlec K, Schwarz S. 2011. Novel apramycin resistance gene *apmA* in bovine and porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 55:373–5.
433. Lovering AM, White LO, Reeves DS. 1987. AAC(1): a new aminoglycoside-acetylating enzyme modifying the C1 aminogroup of apramycin. *J Antimicrob Chemother* 20:803–13.
434. Kadlec K, Fessler AT, Hauschild T, Schwarz S. 2012. Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 18:745–55.
435. Fabre A, Oleastro M, Nunes A, Santos A, Sifré E, Ducournau A, Bénéjat L, Buissonnière A, Floch P, Mégraud F, Dubois V, Lehours P. 2018. Whole-Genome Sequence Analysis of Multidrug-Resistant *Campylobacter* Isolates: a Focus on Aminoglycoside Resistance Determinants. *J Clin Microbiol* 56:1–12.
436. Fabre A, Oleastro M, Nunes A, Santos A, Sifré E, Ducournau A, Bénéjat L, Buissonnière A, Floch P, Mégraud F, Dubois V, Lehours P. 2018. Whole-genome sequence analysis of multidrug-resistant *campylobacter* isolates: A focus on aminoglycoside resistance determinants *Journal of Clinical Microbiology*.
437. Sou T, Hansen J, Liepinsh E, Backlund M, Ercan O, Grinberga S, Cao S, Giachou P, Petersson A, Tomczak M, Urbas M, Zabicka D, Vingsbo Lundberg C, Hughes D, Hobbie SN, Friberg LE. 2021. Model-Informed Drug Development for Antimicrobials: Translational PK and PK/PD Modeling to Predict an Efficacious Human Dose for Apramycin. *Clin Pharmacol Ther* 109:1063–1073.
438. Quirke JCK, Rajasekaran P, Sarpe VA, Sonousi A, Osinnii I, Gysin M, Haldimann K, Fang Q-J, Shcherbakov D, Hobbie SN, Sha S-H, Schacht J, Vasella A, Böttger EC, Crich D. 2020. Apralogs: Apramycin 5-O-Glycosides and Ethers with Improved Antibacterial Activity and Ribosomal Selectivity and Reduced Susceptibility to the Aminoacyltransferase (3)-IV Resistance Determinant. *J Am Chem Soc* 142:530–544.
439. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. 2011. Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5403–5407.
440. Vuilleminot J, Bour M, Beyrouthy R, Bonnet R, Laaberki M, Charpentier X, Ruimy R, Plésiat P, Potron A. 2022. Genomic analysis of CTX-M-115 and OXA-23/-72 co-producing *Acinetobacter baumannii*, and their potential to spread resistance genes by natural transformation. *J Antimicrob Chemother* 1–11.
441. Liroy VS, Goussard S, Guerineau V, Yoon E-J, Courvalin P, Galimand M, Grillot-Courvalin C. 2014. Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host. *RNA* 20:382–91.

442. Ou B, Chen L, Song Y, Yang Y, Zhang Q, Yang Y, Li L, Tham WL, Francis DH, Zhu G. 2016. Impact of acquisition of 16S rRNA methylase RmtB on the fitness of *Escherichia coli*. *J Glob Antimicrob Resist* 6:32–38.
443. Gutierrez B, Escudero JA, San Millan A, Hidalgo L, Carrilero L, Ovejero CM, Santos-Lopez A, Thomas-Lopez D, Gonzalez-Zorn B. 2012. Fitness cost and interference of Arm/Rmt aminoglycoside resistance with the RsmF housekeeping methyltransferases. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2335–41.
444. Jurėnas D, Fraikin N, Goormaghtigh F, Van Melderen L. 2022. Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems. *Nat Rev Microbiol* 20:335–350.
445. Rodrigues C, Desai S, Passet V, Gajjar D, Brisse S. 2022. Genomic evolution of the globally disseminated multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal group 147. *Microb genomics* 8:1–13.
446. Yang Y, Zhang A, Lei C, Wang H, Guan Z, Xu C, Liu B, Zhang D, Li Q, Jiang W, Pan Y, Yang C. 2015. Characteristics of Plasmids Coharboring 16S rRNA Methylases, CTX-M, and Virulence Factors in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Chickens in China. *Foodborne Pathog Dis* 12:873–880.
447. Esposito F, Cardoso B, Fontana H, Fuga B, Cardenas-Arias A, Moura Q, Fuentes-Castillo D, Lincopan N. 2021. Genomic Analysis of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Urban Rivers Confirms Spread of Clone Sequence Type 277 Carrying Broad Resistome and Virulome Beyond the Hospital. *Front Microbiol* 12:701921.
448. Wang S, Wei L, Gao Y, Rong Y, Zha Z, Lyu Y, Feng Z. 2022. Novel amikacin resistance genes identified from human gut microbiota by functional metagenomics. *J Appl Microbiol* 1–10.

ANNEXES



Rapid Detection and Characterization of Carbapenemases in *Enterobacteriales* with a New Modified Carbapenem Inactivation Method, mCIMplus

Morgane Petit,^a François Caméléna,^{a,b} Aurélie Cointe,^{b,c} Thibaut Poncin,^{a,b} Manel Merimèche,^{a,b} Stéphane Bonacorsi,^{b,c} André Birgy,^{b,c} Béatrice Berçot^{a,b}

^aAP-HP, Service de Microbiologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

^bUniversité de Paris, UMR 1137 INSERM, IAME, Paris, France

^cAP-HP, Service de Microbiologie, Hôpital Robert Debré, Paris, France

Morgane Petit and François Caméléna contributed equally to this article. Author order was determined in order of increasing seniority.

ABSTRACT The worldwide emergence and spread of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria are severely limiting therapeutic options and thus constitute a major public health threat. The timely accurate detection of carbapenemase producers and the determination of carbapenemase class according to the Ambler classification can guide antimicrobial therapy and facilitate infection control measures. A modified version of the carbapenemase inactivation method (CIM), mCIM, was described and approved by the CLSI in 2017. We evaluated the performance of a faster new mCIM-based assay, mCIMplus, which can detect carbapenemase activity within 8 h and characterize the carbapenemase according to the Ambler classification in 20 h. A panel of 137 isolates producing carbapenemases (GES, IMP, KPC, NDM, OXA-48, OXA-48-like, and VIM enzymes) and 22 non-carbapenemase-producing isolates was used to evaluate the performance of mCIMplus. We evaluated the detection of carbapenemase activity at 8 and 20 h. Carbapenemase class was determined, with specific inhibitors, at 20 h. The sensitivities of mCIMplus were 99.3% at 8 h and 98.5% at 20 h. Its specificity was 100% regardless of culture time. Based on a decision algorithm, this test successfully identified the carbapenemase class for 98.4% of the tested isolates (127/129). Characterization was correct for 100, 95, and 100% of Ambler class A, B, and D isolates, respectively. This test can, therefore, be used to detect carbapenemase activity within 8 h and to determine carbapenemase class within 20 h. It constitutes a very affordable (<€1 per isolate) and reliable technique requiring only basic laboratory equipment.

KEYWORDS Ambler classification, carbapenemase, carbapenemase inactivation method, EDTA, *Enterobacteriales*, NDM, OXA-48, phenotypic detection, mCIM, phenylboronic acid

The worldwide emergence and spread of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria are severely limiting therapeutic options, posing a major threat to the public (1). In *Enterobacteriales*, carbapenem resistance is conferred principally by carbapenemase production, AmpC β -lactamase overproduction, or the production of an extended-spectrum β -lactamase (ESBL) combined with changes in membrane permeability. It is important to be able to differentiate between these resistance mechanisms for the implementation of control measures, especially for plasmid-mediated carbapenem resistance usually observed for carbapenemase-producing *Enterobacteriales* requiring more drastic measures (contact precaution), and for epidemiological purposes. Carbapenemases can be grouped into three different classes according to the Ambler

Citation Petit M, Caméléna F, Cointe A, Poncin T, Merimèche M, Bonacorsi S, Birgy A, Berçot B. 2020. Rapid detection and characterization of carbapenemases in *Enterobacteriales* with a new modified carbapenem inactivation method, mCIMplus. *J Clin Microbiol* 58:e01370-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01370-20>.

Editor Nathan A. Ledebor, Medical College of Wisconsin

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

Address correspondence to Béatrice Berçot, beatrice.bercot@aphp.fr.

Received 4 June 2020

Returned for modification 6 July 2020

Accepted 31 August 2020

Accepted manuscript posted online 2

September 2020

Published 21 October 2020

classification: KPC and GES belong to class A, NDM, VIM, and IMP belong to class B, and OXA-48-like belong to class D (2). Carbapenemase class determination can guide antimicrobial therapy, as most isolates producing class A or class D carbapenemase are susceptible to new combinations of β -lactams and β -lactamase inhibitors (e.g., ceftazidime-avibactam or meropenem-vaborbactam) (3).

Nucleic acid amplification testing (NAAT) remains the gold standard for detecting and identifying carbapenemase genes (4). However, NAAT is more expensive than phenotypic tests and targets only specific carbapenemase genes. This technique cannot, therefore, detect new emerging carbapenemases. Several phenotypic assays have been developed, including biochemical tests, growth-based assays, immunochromatographic assays, and the detection of carbapenem hydrolysis by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (5–10). However, only a few of these tests can determine the class of carbapenemase present (6, 7, 10).

A modified version of the carbapenemase inactivation method (CIM), mCIM, has been described (11). The sensitivity and specificity of mCIM were shown to be excellent in a multicenter study (12), and this method was approved by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) in 2017 for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE). However, this test does not differentiate between the carbapenemase classes of the Ambler classification. In 2019, Sfeir et al. described a variant of the mCIM method called eCIM, in which EDTA inhibition was used to differentiate class B enzymes from the enzymes of the other two classes. This method was also adopted by the CLSI (13).

The mCIM test and its variant (11, 13) can detect carbapenemases, but their performance is optimal after between 18 and 24 h, which may represent a clinically significant delay. We previously described another variant of the CIM test, CIMplus, which readily detects carbapenemase activity in CPE within 8 h and can determine the carbapenemase class within 20 h (14).

We describe here a new mCIM-based assay, called mCIMplus, that can be used with a 1- μ l loopful of bacteria, detects carbapenemase activity more rapidly, and can differentiate between carbapenemase classes, through inhibitor addition. We evaluated the mCIMplus test, and we found that the performance was similar to that of the original mCIM test, with carbapenemase detection within 8 h and carbapenemase class identification within 20 h.

MATERIALS AND METHODS

Isolates tested. We analyzed a total of 159 isolates, including 137 carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) and 22 *Enterobacterales* without carbapenemase production (non-CPE). The CPE isolates comprised 59 isolates of *Klebsiella* spp., 57 of *Escherichia coli*, 9 of *Enterobacter* spp., 8 of *Citrobacter* spp., 2 of *Morganella morganii*, and 2 of *Proteus* spp., carrying the following carbapenemase genes: 72 carried *bla*_{OXA-48-like}, 33 *bla*_{NDM}, 17 *bla*_{KPC}, 7 *bla*_{VIM}, 1 *bla*_{GES-5'}, and 1 *bla*_{IMP-3'}, and 6 isolates carried both *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA-48}-like enzyme genes (see Table S1 in the supplemental material). The non-CPE isolates were selected on the basis of their decreased susceptibility to at least one carbapenem (ertapenem, imipenem, or meropenem) on the antimicrobial susceptibility testing. Then the carbapenems' MICs were determined by Etest (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) or by broth microdilution (Sensititre; Thermo Fisher Scientific, Dardilly, France) and were interpreted according to EUCAST recommendations (2019 V9.0). The 22 non-CPE isolates comprised 13 isolates of *Enterobacter* spp., 4 of *Klebsiella pneumoniae*, 3 of *Escherichia coli*, 1 of *Citrobacter* spp., and 1 of *Hafnia alvei*. The whole genomes of 123 isolates from Saint-Louis Hospital were sequenced with Illumina technology. The resistome was evaluated for these isolates with ResFinder (15). For the others, the resistance genotype had already been characterized (14). Further information about carbapenem MICs and β -lactamase genes is provided in the supplemental material (Table S1).

mCIMplus testing. The mCIMplus tests were performed at two sites (Robert Debré Hospital and Saint-Louis Hospital). One site was responsible for testing 123 isolates, with the remaining 36 isolates tested at the other site. The mCIMplus protocol used here was similar to the previously described mCIM protocol (11). Briefly, isolates stored as frozen stock suspensions were subcultured on blood agar plates. For CPE detection, a 10- μ g meropenem (MEM) disk (Bio-Rad, Marne La Coquette, France) was added to 2 ml of tryptic soy broth (TSB) (Bio-Rad, Marne La Coquette, France) inoculated with a 1- μ l loopful of bacterial isolate (about one colony), and the tube was incubated for 4 h at 35°C. Simultaneously, a Mueller-Hinton agar (MHA) plate (Bio-Rad, Marne La Coquette, France) was streaked with the

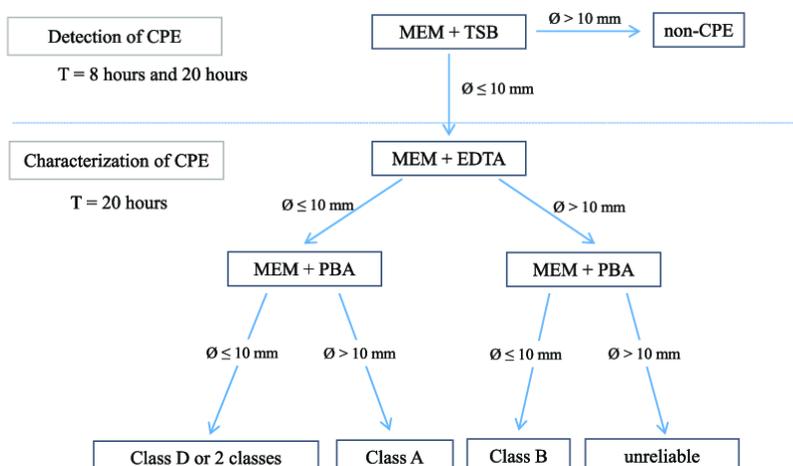


FIG 1 Decision algorithm of the mCIMplus test for detecting the carbapenemase produced by a test isolate and determining the class of enzyme to which it belongs. A 10- μ g meropenem disk (MEM) was used, in the presence or absence of a specific carbapenemase inhibitor. CPE, carbapenemase-producing *Enterobacteriales*; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid (a class B carbapenemase inhibitor); PBA, phenylboronic acid (a class A carbapenemase inhibitor); TSB, tryptic soy broth; \emptyset , inhibition zone diameter.

carbapenem-susceptible *E. coli* ATCC 25922 reference strain from a 0.5 McFarland standard inoculum and incubated at 35°C. This early incubation promoted the start of *E. coli* growth.

For carbapenemase class determination, another two suspensions of TSB (final volume, 2 ml) were simultaneously prepared according to the same protocol used for CPE detection, to which inhibitors were added. The concentrations of inhibitors used were equal to that previously used for the CIMplus test (14). Briefly, in one suspension, 200 μ l of EDTA (Euromedex, Souffelweyersheim, France) at 0.5 M (final concentration, 0.05 M) was added to 1.8 ml of TSB. In the second suspension, 40 mg of phenylboronic acid (PBA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (final concentration of PBA, 20 mg/ml), previously dissolved in 70 μ l of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Euromedex, Souffelweyersheim, France) (final concentration of DMSO, 3.5%), was added to 1.93 ml of TSB.

The MEM disks were removed from each bacterial suspension (TSB, EDTA, or PBA) and placed on the preincubated MHA plates, which were then incubated again at 35°C. The inhibition zone was measured after 4 h for the detection of carbapenemase activity and after 16 h for characterization of the carbapenemase class.

In this test, if the tested isolate produces a carbapenemase, the meropenem is hydrolyzed and the susceptible strain (*E. coli* ATCC 25922) grows close to the MEM disk. In contrast, non-CPE isolates cannot hydrolyze meropenem, so the susceptible strain grows further away from the MEM disk. Applying the same approach in the characterization test, if the carbapenemase activity is inhibited by one of the inhibitors, meropenem remains active and a zone of inhibition is observed around the MEM disk.

Based on preliminary results, the result of the mCIMplus test was considered positive (carbapenemase detected) if the inhibition zone was ≤ 10 mm in diameter or negative (no carbapenemase detected) if the inhibition zone was > 10 mm.

In cases of positive carbapenemase detection (inhibition zone of ≤ 10 mm around the MEM disk), the characterization of the carbapenemase class was interpreted as follows: (i) if an inhibition zone of > 10 mm was observed around the disk incubated in the presence of EDTA and an inhibition zone of ≤ 10 mm was observed around the disk incubated in the presence of PBA, the test isolate was classified as a class B CPE; (ii) if an inhibition zone of > 10 mm was observed around the disk incubated with PBA and an inhibition zone of ≤ 10 mm was observed around the disk incubated with EDTA, the test isolate was classified as a class A CPE; (iii) if an inhibition zone of ≤ 10 mm was observed around both the disks incubated with inhibitors (EDTA and PBA), the test isolate was either a class D CPE or harbored two different classes of carbapenemases; (iv) if an inhibition zone of > 10 mm was observed around both the disks incubated with inhibitors (EDTA and PBA), then the results of the mCIMplus test were considered unreliable. The decision algorithm is presented in Fig. 1. Examples of carbapenemase detection and carbapenemase characterization are presented in Fig. 2.

RESULTS

The mCIMplus test was performed on 137 CPE and 22 non-CPE isolates. The detection of carbapenemase activity after 8 and 20 h was assessed, and the carbapenemase class

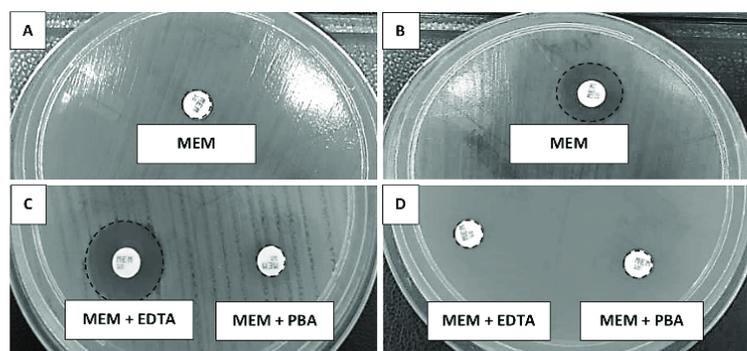


FIG 2 Example of the carbapenemase detection test with reading at 8 h and of carbapenemase characterization with reading at 20 h for the mCIMplus test. Black dotted lines represent the inhibition zone circumferences. (A) Presence of carbapenemase (SL75, NDM positive) at 8 h. The culture of *E. coli* ATCC 25922 grows with an inhibition zone diameter of ≤ 10 mm around the meropenem disk (MEM). (B) Absence of carbapenemase (T3, absence of carbapenemase) at 8 h. An inhibition zone diameter of >10 mm is observed. (C) Identification of a class B carbapenemase (SL77, NDM positive) at 20 h. The culture of *E. coli* ATCC 25922 grows in contact with the meropenem disk incubated with phenylboronic acid (PBA), and an inhibition zone diameter of >10 mm is observed around the meropenem disk incubated with EDTA. (D) Identification of a class D carbapenemase (SL3, OXA-48 positive) at 20 h. The culture of *E. coli* ATCC 25922 grows in contact with meropenem disks incubated with either PBA or EDTA.

according to the Ambler classification was determined at 20 h. We found that 136/137 (99.3%) CPE isolates gave positive results in the mCIMplus test at 8 h and 135/137 (98.5%) were mCIMplus-positive at 20 h. The two isolates giving false-negative results in the mCIMplus test were (i) a hypemucoviscous *K. pneumoniae* isolate, harboring a *bla_{VIM-4}* gene, that was barely soluble in suspension (negative results obtained at both 8 and 20 h) and (ii) an *Enterobacter* isolate harboring a *bla_{GES}* gene (positive after 8 h but negative after 20 h). All non-CPE isolates (22/22 [100%]) were mCIMplus negative at 8 and 20 h. Based on these results, the mCIMplus test had a sensitivity of 99.3% and a specificity of 100% for carbapenemase detection for readings at 8 h and a sensitivity of 98.5% and a specificity of 100% for readings at 20 h.

For carbapenemase class determination, we excluded six isolates producing two carbapenemases each from the 135 CPE isolates giving positive detection results at 20 h. The carbapenemase type was well characterized for 127 (98.4%) of the 129 detected CPE isolates, 2/129 (1.6%) gave unreliable results, and none were mischaracterized. Two class B isolates gave unreliable results, with a diameter of >10 mm with both the disks incubated with inhibitors (EDTA and PBA), whereas the diameter of the inhibition zone around the disk incubated with PBA should have been ≤ 10 mm. Based on these results, the mCIMplus test had a global sensitivity of 98.5% and a specificity of 100% for the identification of classes A, B, and D for the isolates tested with only one carbapenemase gene each. Sensitivities were 100% for class A (17/17), 95.0% for class B (38/40), and 100% for class D (72/72) enzymes. The performance of the mCIMplus test is summarized in Table 1.

DISCUSSION

In this study, we evaluated the diagnostic performance of a new CIM test, mCIMplus, which can detect carbapenemase activity in 8 h and classify the carbapenemase to a particular type within 20 h; this test is based on the previously described CIMplus and mCIM tests (11, 14). Our results show that it is possible to decrease the reading time for mCIMplus by increasing the duration of culture for the susceptible *E. coli* strain during the preincubation step, as previously reported for CIMplus (14). This test performed similarly well for carbapenemase detection at 8 and 20 h, except that the GES-5-producing isolate was not detected in 20 h. The mCIMplus test is, therefore, a sensitive

TABLE 1 Performance of the mCIMplus test for detection and characterization of carbapenemases produced by carbapenemase-producing *Enterobacteriales* (CPE)^a

Carbapenemase parameter	Detection of carbapenemase activity at:						Characterization of carbapenemase activity at 20 h		
	8 h			20 h			No. of isolates	No. well characterized	% categorical agreement (95% CI)
	No. of isolates	No. positive	% Se (95% CI)	No. of isolates	No. positive	% Se (95% CI)			
Class A	18	18	100 (81–100)	18	17	94.4 (73–100)	17	17	100 (80–100)
GES-5	1	1	100 (3–100)	1	0	0			
KPC	17	17	100 (80–100)	17	17	100 (80–100)	17	17	100 (80–100)
Class B	41	40	97.6 (91–100)	41	40	97.6 (91–100)	40	38	95.0 (83–99)
NDM	33	33	100 (89–100)	33	33	100 (89–100)	33	33	100 (89–100)
VIM	7	6	85.7 (47–100)	7	6	85.7 (47–100)	6	4	66.7 (22–96)
IMP	1	1	100 (3–100)	1	1	100 (3–100)	1	1	100 (3–100)
Class D	72	72	100 (95–100)	72	72	100 (95–100)	72	72	100 (95–100)
OXA-48	59	59	100 (94–100)	59	59	100 (94–100)	59	59	100 (94–100)
OXA-48-like	13	13	100 (75–100)	13	13	100 (75–100)	13	13	100 (75–100)
Class B + D	6	6	100 (54–100)	6	6	100 (54–100)			
NDM + OXA-48	5	5	100 (48–100)	5	5	100 (48–100)			
NDM + OXA-48-like	1	1	100 (3–100)	1	1	100 (3–100)			
All carbapenemases	137	136	99.3 (96–100)	137	135	98.5 (95–100)	129	127	98.4 (95–100)
Absence of carbapenemase	22	0		22	0				

^aSe, sensitivity; CI, confidence interval.

method for the screening of CPE isolates producing OXA-48, OXA-48-like, NDM, KPC, VIM, and IMP enzymes. However, this result is tempered by the lack of detection of one VIM-producing hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolate exhibiting a low MIC to carbapenems that was barely soluble and one GES-producing *Enterobacter cloacae* isolate for which enzyme activity was not detected with the mCIMplus test at 20 h despite a high MIC to carbapenems. This lack of sensitivity for the hypermucoviscous strain and the GES-producing isolate had already been reported for CIM and derivatives of this test, as well as for phenotypic methods (14, 16–20). However, the sensitivity and specificity of mCIMplus observed here show the performance of this test to be similar to that previously reported for mCIM (11, 12).

For carbapenemase characterization, mCIMplus efficiently identified the class of carbapenemase within 20 h. Indeed, a global sensitivity of 98.5% and specificity of 100% were obtained, a performance similar to that reported for CIMplus. We obtained sensitivities of 100% for class A, 95.0% for class B, and 100% for class D. For class B carbapenemases, the mCIMplus test failed to characterize two VIM-producing isolates, for which an inhibition zone was unexpectedly observed around the MEM disk incubated with PBA. Of note, these two isolates were previously detected and well characterized by the CIMplus test. Conversely, one isolate (RD34) showing CIMplus-negative results was detected and well characterized by the mCIMplus test. Furthermore, for isolates producing two types of carbapenemase, the mCIMplus test was limited by its inability to differentiate between class D carbapenemases and production of two enzymes of different classes. This is a limitation of many phenotypic detection assays (7, 13, 14). However, the prevalence of isolates producing two different classes of carbapenemase is low. Castanheira et al. found that only 1% ($n = 2/202$) of CPE isolates from the United States, Europe, Latin America, and Asia Pacific carried genes that encoded two different classes of carbapenemase (21).

In addition to its good performance for both the detection of carbapenemases and determination of the class to which they belong, mCIMplus has several other advantages: it can be performed with a 1- μ l loopful of bacteria and with basic laboratory materials and affordable reagents. It also has an objective judgment criterion: the measurement of the diameter of a zone of inhibition. Conversely, some of the com-

mercially available phenotypic tests, such as RAPIDEC Carba NP (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), β -CARBA (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France), and Neo-Rapid CARB Screen (Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark), are colorimetric assays. These commercialized phenotypic tests have short turnaround time and are ready-to-use. However, the interpretation of the results, based on changes in color, is therefore subjective and may be difficult in some cases. Furthermore, these tests are more expensive and provide no information about the class of the carbapenemase. Other tests based on matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the detection of CPE isolates require expensive equipment, several adjustments, and a trained operator (20).

The mCIMplus test is more appropriate than other CIM tests and their derivatives for the epidemiological situation in France and Europe, in which OXA-48-like carbapenemases are one of the enzymes most frequently detected (22, 23). Indeed, mCIMplus is derived from mCIM (12), which has been shown to outperform CIM, particularly for the detection of OXA-48-like enzymes (8, 24). This trend was confirmed in our study, with a sensitivity of 100% for the detection of class D carbapenemases, regardless of the meropenem MIC (range, 0.25 to \geq 16 mg/liter). For carbapenemase characterization, the mCIMplus test was superior to the eCIM test adopted by the CLSI (13) in that it was able to characterize all carbapenemase classes. Sfeir et al. described a sensitive and a specific method, called the eCIM, for differentiating class B and non-class B carbapenemases (13). The eCIM test had a sensitivity of 100% and a specificity of 90% for the detection of class B carbapenemases in the presence of 5 mM EDTA. For the mCIMplus test, we chose to use 50 mM EDTA, as previously described for CIMplus.

However, this test has several limitations. It detected carbapenemase activity in 8 h, a period longer than those reported for some other phenotypic assays (7, 25, 26). Furthermore, six isolates producing both class A and D carbapenemases were classified as class D by mCIMplus. An inability to identify multiple classes of carbapenemase in the same isolate has been reported for other phenotypic tests (7, 14). Finally, given the local epidemiological conditions, we tested only the major carbapenemase types and a limited number of non-CPE isolates. Further studies with more isolates, notably GES, VIM, and IMP producers, are required to confirm the good performance of this test.

In conclusion, the mCIMplus test can detect and characterize the carbapenemases produced by CPE isolates with excellent sensitivity and specificity. This test is highly affordable (<€1 per isolate) and reliable and requires only basic laboratory equipment. It could therefore be performed in many laboratories throughout the world.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.4 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed with internal funds.

We have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

- World Health Organization. 2017. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) report. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20:440–458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>.
- Doi Y. 2019. Treatment options for carbapenem-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 69:5565–5575. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz830>.
- Hrabák J, Chudáková E, Papagiannitsis CC. 2014. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect* 20:839–853. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12678>.
- Carvalhoes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. 2010. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother* 65:249–251. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp431>.
- Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, Bingen E. 2012. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 50:1295–1302. <https://doi.org/10.1128/JCM.06131-11>.
- Dortet L, Poirel L, Nordmann P. 2012. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother* 56:6437–6440. <https://doi.org/10.1128/AAC.01395-12>.
- van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. 2015. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple

- and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One* 10:e0123690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123690>.
9. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, Hrabák J. 2015. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol* 53:1731–1735. <https://doi.org/10.1128/JCM.03094-14>.
 10. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang T-D, Leclipteux T, Bogaerts P. 2016. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* 71:1217–1222. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv472>.
 11. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, Bobenchik AM, Lockett ZC, Charnot-Katsikas A, Ferraro MJ, Thomson RB, Jenkins SG, Limbago BM, Das S. 2017. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 55:2321–2333. <https://doi.org/10.1128/JCM.00193-17>.
 12. Simner PJ, Johnson JK, Brasso WB, Anderson K, Lonsway DR, Pierce VM, Bobenchik AM, Lockett ZC, Charnot-Katsikas A, Westblade LF, Yoo BB, Jenkins SG, Limbago BM, Das S, Roe-Carpenter DE. 2017. Multicenter evaluation of the modified carbapenem inactivation method and the Carba NP for detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 56:e01369-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01369-17>.
 13. Sfeir MM, Hayden JA, Fauntleroy KA, Mazur C, Johnson JK, Simner PJ, Das S, Satlin MJ, Jenkins SG, Westblade LF. 2019. EDTA-modified carbapenem inactivation method: a phenotypic method for detecting metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 57:e01757-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01757-18>.
 14. Camélena F, Cointe A, Mathy V, Hobson C, Doit C, Bercot B, Decré D, Podglajen I, Dortet L, Monjault A, Bidet P, Bonacorsi S, Birgy A. 2018. Within-a-day detection and rapid characterization of carbapenemase by use of a new carbapenem inactivation method-based test. *J Clin Microbiol* 56:e00137-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00137-18>.
 15. Camélena F, Morel F, Merimèche M, Decousser J-W, Jacquier H, Clermont O, Darty M, Mainardis M, Cambau E, Tenaillon O, Denamur E, Bercot B, IAME Resistance Group. 2020. Genomic characterization of 16S rRNA methyltransferase-producing *Escherichia coli* isolates from the Parisian area, France. *J Antimicrob Chemother* 75:1726–1735. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa105>.
 16. Osterblad M, Hakanen AJ, Jalava J. 2014. Evaluation of the Carba NP test for carbapenemase detection. *Antimicrob Agents Chemother* 58:7553–7556. <https://doi.org/10.1128/AAC.02761-13>.
 17. Yamada K, Kashiwa M, Arai K, Nagano N, Saito R. 2017. Evaluation of the modified carbapenem inactivation method and sodium mercaptoacetate-combination method for the detection of metallo- β -lactamase production by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods* 132:112–115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.11.013>.
 18. Akhi MT, Khalili Y, Ghotaslou R, Kafil HS, Yousefi S, Nagili B, Goli HR. 2017. Carbapenem inactivation: a very affordable and highly specific method for phenotypic detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates compared with other methods. *J Chemother* 29:144–149. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2016.1199506>.
 19. Aguirre-Quiñero A, Cano ME, Gamal D, Calvo J, Martínez-Martínez L. 2017. Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM) for detecting carbapenemase activity in enterobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 88:214–218. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.03.009>.
 20. Tamma PD, Simner PJ. 2018. Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. *J Clin Microbiol* 56:e01140-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01140-18>.
 21. Castanheira M, Huband MD, Mendes RE, Flamm RK. 2017. Meropenem-vaborbactam tested against contemporary Gram-negative isolates collected worldwide during 2014, including carbapenem-resistant, KPC-producing, multidrug-resistant, and extensively drug-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00567-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00567-17>.
 22. Dortet L, Cuzon G, Ponties V, Nordmann P. 2017. Trends in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, France, 2012 to 2014. *Euro Surveill* 22:30461. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.6.30461>.
 23. Grundmann H, Glasner C, Albigier B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, Cantón R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirer L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) Working Group. 2017. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis* 17:153–163. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30257-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30257-2).
 24. Beresford RW, Maley M. 2019. Reduced incubation time of the modified carbapenem inactivation test and performance of carbapenem inactivation in a set of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with a high proportion of blaIMP isolates. *J Clin Microbiol* 57:e01852-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01852-18>.
 25. Compain F, Gallah S, Eckert C, Arlet G, Ramahefasolo A, Decré D, Lavollay M, Podglajen I. 2016. Assessment of carbapenem resistance in Enterobacteriaceae with the rapid and easy-to-use chromogenic β Carba test. *J Clin Microbiol* 54:3065–3068. <https://doi.org/10.1128/JCM.01912-16>.
 26. Muntean M-M, Muntean A-A, Gauthier L, Creton E, Cotellon G, Popa MI, Bonnin RA, Naas T. 2018. Evaluation of the rapid carbapenem inactivation method (rCIM): a phenotypic screening test for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 73:900–908. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx519>.