

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2018

THESE 2018/TOU3/2090

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

par

Camille Mass

**ETUDE DE LA RESISTANCE A LA COLISTINE CHEZ *ESCHERICHIA COLI*,
A PARTIR D'UNE COLLECTION DE SOUCHES CLINIQUES ISOLEES AU
CHU DE BORDEAUX**

le 9 novembre 2018

Directeur de thèse : Madame le Professeur Véronique Dubois

JURY

Madame le Professeur Marie-Edith Lafon

Présidente

Madame le Professeur Véronique Dubois

Assesseur

Monsieur le Professeur Charles Cazanave

Assesseur

Madame le Docteur Sabine Pereyre

Assesseur

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 08 janvier 2018

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitolo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie – Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires	Universitaires
M. CESTAC P. Pharmacie Clinique	Mme ARELLANO C. (*) Chimie Thérapeutique
Mme DE MAS MANSAT V. (*) Hématologie	Mme AUTHIER H. Parasitologie
Mme JULLIARD-CONDAT B. Droit Pharmaceutique	M. BERGE M. (*) Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F. Pharmacie Clinique	Mme BON C. Biophysique
Mme ROUZAUD-LABORDE C. Pharmacie Clinique	M. BOUJILA J. (*) Chimie analytique
Mme SERONIE-VIVIEN S. Biochimie	Mme BOUTET E. (*) Toxicologie - Sémiologie
Mme THOMAS F. (*) Pharmacologie	M. BROUILLET F. Pharmacie Galénique
	Mme CABOU C. Physiologie
	Mme CAZALBOU S. (*) Pharmacie Galénique
	Mme CHAPUY-REGAUD S. Bactériologie - Virologie
	Mme COLACIOS-VIATGE C. Immunologie
	Mme COSTE A. (*) Parasitologie
	M. DELCOURT N. Biochimie
	Mme DERAEEVE C. Chimie Thérapeutique
	Mme ECHINARD-DOUIN V. Physiologie
	Mme EL GARAH F. Chimie Pharmaceutique
	Mme EL HAGE S. Chimie Pharmaceutique
	Mme FALLONE F. Toxicologie
	Mme FERNANDEZ-VIDAL A. Toxicologie
	Mme HALOVA-LAJOIE B. Chimie Pharmaceutique
	Mme JOUANJUS E. Pharmacologie
	Mme LAJOIE-MAZENC I. Biochimie
	Mme LEFEVRE L. Physiologie
	Mme LE LAMER A-C. Pharmacognosie
	M. LEMARIE A. Biochimie
	M. MARTI G. Pharmacognosie
	Mme MIREY G. (*) Toxicologie
	Mme MONFERRAN S. Biochimie
	M. OLICHON A. Biochimie
	Mme REYBIER-VUATToux K. (*) Chimie Analytique
	M. SAINTE-MARIE Y. Physiologie
	M. STIGLIANI J-L. Chimie Pharmaceutique
	M. SUDOR J. (*) Chimie Analytique
	Mme TERRISSE A-D. Hématologie
	Mme TOURRETTE-DIALO A. Pharmacie Galénique
	Mme VANSTEELANDT M. Pharmacognosie
	Mme WHITE-KONING M. (*) Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme COOL C.	Physiologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. METSU D.	Pharmacologie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
M. PERES M.	Immunologie
Mme SALABERT A.S	Biophysique

REMERCIEMENTS

Au Professeur Marie-Edith Lafon

Professeur des Universités, Praticien hospitalier

Laboratoire de Virologie, CHU Pellegrin, Bordeaux

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. J'aimerais aussi vous dire à quel point j'ai apprécié votre gentillesse, votre douceur et votre bienveillance ; elles ont accompagné mes semestres d'internat.

Au Professeur Charles Cazanave

Professeur des Universités, Praticien hospitalier

Service des Maladies infectieuses et tropicales, CHU Pellegrin, Bordeaux

Vous me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse. Je vous adresse mes remerciements respectueux et ma profonde reconnaissance.

Au Docteur Sabine Pereyre

Maitre de Conférence des Universités, Praticien hospitalier

Laboratoire de Bactériologie, CHU Pellegrin, Bordeaux

Je te remercie infiniment d'avoir accepté de juger ce travail. Merci de partager ton savoir avec patience et gentillesse aux internes. Je te suis très reconnaissante pour la confiance que tu m'as accordée à la paillasse N°3 et au SIR et au cours mes semestres au laboratoire de bactériologie.

Au Professeur Véronique Dubois

Professeur des Universités, Praticien hospitalier

Laboratoire de Bactériologie, CHU Pellegrin, Bordeaux

Je te remercie vivement de m'avoir accueilli dans ton unité de recherche et de m'avoir permis de travailler sur un sujet que j'apprécie particulièrement, la résistance aux antibiotiques. Je ne saurais comment te remercier assez pour tes multiples conseils et pour toutes les heures que tu as consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également te dire à quel point j'ai apprécié ta grande disponibilité et tes encouragements quand souvent j'ai eu envie de baisser les bras. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à tes qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail et également lors de mes semestres d'internat en bactériologie.

A Aurélie Jayol

Je te remercie de m'avoir transmis tout ton savoir et ton expérience sur la colistine, ce travail est aussi le tien. Merci pour le soutien que tu m'as apporté autant sur le plan professionnel (tous ces échecs de clonage...) mais aussi sur le plan personnel...Ta motivation, ta bonne humeur et ton enthousiasme quotidien font de toi une partenaire idéale et j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler à tes côtés.

A Isabelle Accoceberry et Frédéric Gabriel

Je vous remercie sincèrement pour votre accueil chaleureux au laboratoire de mycologie-parasitologie mais aussi pour votre soutien tout au long de mon internat. J'ai énormément appris à vos côtés, dans une ambiance de travail très agréable. Merci de votre disponibilité pour les internes.

A l'ensemble des biologistes que j'ai rencontré au cours de mes différents stages, en particulier les biologistes du laboratoire de bactériologie (Bertille de Barbeyrac, Cécile Bébéar, Emilie Bessède, Philippe Lehours, Olivia Peuchant, Sylvie Vacher, Julien Goret, Pauline Floch), je vous remercie pour votre intérêt, votre soutien et votre formation, tout au long de ce parcours d'internat.

A l'ensemble de l'équipe du laboratoire d'Arcachon : Michèle, Stéphanie M, Stéphanie B, Anne, Christine, Rosa, Julie, Maëva, Jessica, Anita, Sandrine, Marie-Claude, Fabienne x2, Isabelle, Corinne, Delphine, Marie-No, Josie, Valérie... Merci pour votre accueil, votre gentillesse, votre bienveillance pour ce dernier stage ! On se sent tellement bien chez vous...comme à la maison !

A toute l'équipe de parasito-myco, merci pour votre générosité, votre accueil, votre bonne humeur ! La meilleure ambiance et les meilleures pauses café, pas de doutes c'est avec vous !

Au techniciens de bactériologie, merci de m'avoir formé en paillasse, de m'être venu en aide au SIR, merci pour votre disponibilité, vos astuces et votre sens pratique.

A tous les membres de l'équipe de l'UMR-5234, pour leurs idées, leurs conseils, leur soutien apportés avec beaucoup de gentillesse et de disponibilité.

A JG, toujours de bonne humeur, toujours partant, travailler avec toi est un plaisir... Si un jour, le soleil te manque, viens travailler dans l'Aveyron... Comme ça, il n'y aura qu'à Bordeaux que je manquerais !

A Camille, toujours enthousiaste, une vraie pile électrique, tu donnes tout en amitié et je suis contente de pouvoir te compter parmi mes amies.

A Cindy, très généreuse et très entière, tu es une belle personne et une merveilleuse rencontre de cet internat. Tu es la bienvenue en vacances de l'Aveyron avec ta jolie famille.

A Xavier, j'avoue, je n'ai pas compris toutes tes blagues...merci pour la bonne ambiance de travail !

Au Professeur Girard, mon modèle dans la vie...tant de compétences, d'intelligence, d'humour et de gentillesse dans une seule personne...

A Gégé et Gülçin, mes coups de cœur ! quel plaisir de travailler avec vous deux !

A Edona, ma première co-interne et la plus adorable !

A Réda et Adrien qui ont ensoleillé mon stage de mycologie-parasitologie !

A mes petits choucho du dernier stage de bactériologie : Elvina, Séverine, Anne-Sophie, Laure, Elodie, Jessica (tu étais à toutes nos soirées, donc c'est tout comme), Clémentine, Benjamin, Charly, Jordi, Julian...vous êtes des fous ! J'ai beaucoup apprécié ce semestre à vos côtés...

A Cécile J, Thibault, Marine, Léa, Julie L, Julie B, Lucie, Chloé, Antoine, Coralie, Nitesh... toutes ces gentilles personnes qui ont rythmé mon internat, et que je croiserais toujours avec plaisir !

A Mathilde, la plus gentille et enthousiaste ! Merci d'avoir été là pour moi cette année alors que ce n'était pas la plus facile pour toi non plus... Je nous souhaite encore plus de soirées et de weekend ensemble et surtout plein de débrief au téléphone ! Bref, merci pour ce moment...

A Julie, la plus douce de mes amies ! A tous ces moments partagés depuis la maternelle, à toutes ces photos de classe et ces galas de danse ! J'espère que les 30 prochaines années d'amitié seront plus magiques encore ! Merci énormément pour ton soutien cette année.

A Cécile, la plus joyeuse et pétillante d'entre toutes ! Je reste inconsolable de nos déjeuner à l'internat et surtout de nos soirées à Bordeaux. Tu es ma plus belle rencontre ici, mon internat, c'est toi !

A la team Aveyron : Marianne et Anthony, il me tarde les After Work à Onet-L'église !

A Lucie et Gaë, les plus adorables, c'est toujours un plaisir de passer des moments avec vous !

A Pauline, Jérémy et Margaux, toujours le cœur sur la main, la plus jolie et attachante des familles !

A Tony, le pro de l'impro, j'espère que tu viendras dans l'Aveyron, même si l'on y surf pas !

A tous les clermontois que j'ai plaisir à retrouver pour des weekends de folie !

A la Team de Bordeaux : Audrey, Caroline, Mathilde, Alex, Fabio, Gauthier, Thibaut.

Amateurs de vin et fin gastronomes, je ne connais pas de palais aussi pointus et exigeants ! Pour vous, j'apprendrais à cuisiner l'aligot...! Vous n'imaginez pas à quel point vous allez me manquer ! Heureusement qu'on a une pendaïson de crémaillère prévue en février !

A ma belle-famille : Françoise, Marine et Adrien, merci de nous avoir accompagné dans cette année pleine de projets pour Paul et moi !

Au Toulousains, toujours le mot pour rire : Papy Clotaire, Philippe, Florence, Jean-Luc, Bernadette, Nadège, Vincent, Ally, Cédric, Romain, Guillaume... A ma Breedou d'amour, je vais enfin avoir le temps de t'appeler !

A ceux que j'aimerais voir plus souvent : Maryline, Agnès, Eric, Mathilde, Donal, Benjamin, Michèle, Elisa, Matthias, les Noëls avec vous me manque...

A Mamie Lydie, merci d'avoir fait tous ces voyages pour me voir cette année !

A Madou, qui m'a regardé écrire cette thèse pendant des heures...

A Maman et Papa

A vous que j'aime tant...

Vous qui me poussez à toujours montrer le meilleur de moi-même, vous êtes mes exemples au quotidien. Je ne saurais jamais comment vous remercier pour tout ce que vous faites pour moi.

Merci pour votre soutien durant cet été très stressant, et d'avoir pris soin de moi au mois d'août...

A Paul

A cette belle année très remplie et aux nombreuses à venir, à tes coté.

Merci pour ton amour et ton soutien quotidien.

Sache que je suis fière de toi chaque jour...

L'incidence croissante de la résistance aux antibiotiques, notamment chez *Escherichia coli* est très préoccupante et conduit à des impasses thérapeutiques. Il est nécessaire de conserver des molécules actives, utilisables en dernier recours dans le traitement des infections dues à ces germes multirésistants, comme la colistine. Le mécanisme prépondérant responsable de résistance à la colistine chez les entérobactéries est l'ajout de groupements cationiques à la surface du lipopolysaccharide (LPS) qui augmentent sa charge positive et diminuent l'affinité des polymyxines. Des mutations dans les gènes régulant l'ajout des groupements cationiques (*pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ* et *mgrB*) et des gènes plasmidiques *mcr* récemment décrits, peuvent être responsables de l'acquisition de cette résistance. L'objectif de cette étude était de déterminer les mécanismes de résistance à la colistine de vingt-huit souches cliniques d'*E. coli* isolées au CHU de Bordeaux.

Différents mécanismes chromosomiques et plasmidiques responsables de résistance à la colistine ont été identifiés dans les souches de la collection. Deux d'entre elles possédaient le gène de résistance plasmidique *mcr-1* déjà décrit. Par complémentation avec un plasmide portant les gènes *pmrA* et *pmrB* sauvage, nous avons également identifié deux nouvelles mutations responsables de la résistance à la colistine. Une mutation dans le gène *pmrB* générant la substitution d'un unique acide aminé (P94L) dans la protéine PmrB et une mutation du gène *pmrA* générant la substitution L11P dans la protéine PmrA sont responsables de la résistance à la colistine.

Une diversité importante d'évènements génétiques peut donc générer une résistance à la colistine chez *E. coli* montrant ses capacités d'adaptation et son rôle clé dans la résistance aux antibiotiques.

LISTE DES ABBREVIATIONS

AMM Autorisation de Mise sur le Marché	MDR Multirésistant
AMP peptides antimicrobiens	MH Mueller-Hinton
ANSM Agence Nationale de Sécurité du Médicament	NMEC <i>E. coli</i> Méningite Néonatale
APEC <i>E. coli</i> Pathogène Aviaire	ORF Open Reading Frame
BGN Bacilles Gram négatif	Pb Paire de bases
CAMP peptides antimicrobiens cationiques	PAI Ilôt de pathogénicité
CASFM Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie	PCR Polymerase Chain Reaction
CBA Activité Colistine Base	PEtN Phosphoéthanolamine
CLSI Clinical Laboratory and Standards Institute	R Résistant
CMI Concentration Minimale Inhibitrice	S Sensible
CMS Colistiméthate de Sodium	SHU Syndrome hémolytique et urémique
CR Résistant aux carbapénèmes	ST Séquence-type
CS Colistine	UI Unité internationale
CSR Résistant(e) à la colistine	UPEC <i>E. coli</i> UroPathogène
DAEC <i>E. coli</i> Diffusif adhérent	UTI infection du tractus urinaire
DO Densité optique	
EPEC <i>E. coli</i> EnteroPathogène	
EHEC <i>E. coli</i> EnteroHémorragique	
ETEC <i>E. coli</i> EnteroToxigénique	
EAEC <i>E. coli</i> EnteroAggrégatif	
EIEC <i>E. coli</i> EntéroInvasif	
EUCAST European Comity of Antimicrobial Suceptibility Testing	
GO Gélose ordinaire	
LAra4N 4-amino-4-deoxy-L-arabinose	
LEE locus d'effacement des entérocytes	
LPS Lipopolysaccharide	
McF Mac Farland	

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX.....	14
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
Introduction	15
I. <i>Escherichia coli</i>	16
1. Taxonomie	16
2. Caractères bactériologiques	16
3. Classification	16
a. Classification selon les sérotypes.....	16
b. Classification selon les pathotypes.....	17
c. Classification selon les phylogroupes.....	18
4. <i>E. coli</i> commensal	19
5. <i>E. coli</i> pathogènes	20
a. <i>E. coli</i> pathogènes intestinaux.....	20
b. <i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux.....	27
6. Organisation et dynamique du génome	28
7. Sensibilité naturelle aux antibiotiques et mécanismes de résistance acquis	28
A. Sensibilité naturelle aux différents antibiotiques	28
B. Traitement des infections à <i>E. coli</i>	29
C. Mécanismes de résistance acquis	30
a. Diminution de la perméabilité.....	30
b. Efflux.....	30
c. Modification de la cible.....	31
d. Enzymes inactivatrices ou modificatrices.....	31
D. <i>E. coli</i> multirésistants	33
II. Colistine	35
1. Structure	35
2. Mécanisme d'action	35
3. Spectre d'action	36
4. Utilisation thérapeutique	36
a. Formulation.....	36
b. Indications thérapeutiques.....	37
c. Pharmacocinétique.....	37

d.	Posologie.....	38
e.	Toxicité.....	39
f.	Utilisation en médecine vétérinaire	39
5.	Etude de la sensibilité aux polymyxines	40
a.	Microdilution en milieu liquide	40
b.	Méthodes utilisées en routine	40
c.	Critères d'interprétation.....	43
d.	Complexité de l'étude de la résistance à la colistine.....	44
6.	Mécanismes de résistance à la colistine	45
a.	Résistance naturelle	45
b.	Mécanismes de résistances chromosomiques acquises à la colistine.....	45
c.	Résistances plasmidiques à la colistine	47
d.	Epidémiologie de la résistance à la colistine.....	52
e.	Autres mécanismes de résistance à la colistine.....	54
7.	Mécanismes de résistance à la colistine chez <i>E. coli</i> et épidémiologie.....	55
III.	Objectifs	58
IV.	Matériel et méthodes.....	59
1.	Techniques de bactériologie	59
a.	Collection de souches	59
b.	Plasmides vecteurs utilisés	59
c.	Milieus de culture.....	60
d.	Antibiogrammes et détermination de la résistance à la colistine.....	60
2.	Techniques de biologie moléculaire et de génétique.....	61
a.	Extraction d'ADN génomique.....	61
b.	Extraction d'ADN plasmidique	61
c.	Amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR).....	62
d.	Séquençage et analyse des séquences	63
e.	Conjugaison.....	63
f.	Transformation.....	63
g.	Complémentation des gènes mutés.....	64
h.	Remplacement du gène <i>pmrA</i> avec contre-sélection avec de la kanamycine.....	66
i.	Remplacement du gène <i>pmrB</i> avec sélection avec de l'ampicilline.....	68
j.	Complémentation d'une souche sensible avec le gène muté	69
3.	Analyse in silico	69
V.	Résultats.....	70
1.	Caractérisation de la collection de souches	70

2. Confirmation de la résistance à la colistine	71
3. Recherche des gènes de résistance à la colistine connus : <i>mcr</i>	71
4. Recherche de plasmides porteurs de nouveaux gènes résistance à la colistine	71
a. Conjugaison.....	72
b. Transformation.....	73
5. Recherche de résistances chromosomiques	74
A. Etude des mutations de la protéine PmrA	74
a. Identifications de mutations au sein de la protéine PmrA	74
b. Remplacements du gène <i>pmrA</i> d' <i>E. coli</i> TOP10 par le gène <i>pmrA</i> muté d'une souche CSR .	74
B. Etude des mutations de la protéine PmrB.....	76
a. Identifications de mutations au sein de la protéine PmrB	76
b. Complémentation des gènes mutés par le gène <i>pmrB</i> sauvage	76
c. Complémentation par les gènes mutés chez <i>E. coli</i> TOP10 et <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	78
d. Remplacement du gène <i>pmrB</i> d' <i>E. coli</i> TOP10 par les gènes <i>pmrB</i> mutés de nos souches ..	80
e. Complémentation des gènes mutés par l'opéron <i>pmrAB</i> sauvage	82
VI. Discussion	86
VII. Conclusion et perspectives	91
ANNEXES	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	100

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse simultanée de six gènes chromosomiques de ménage (<i>trpA</i> , <i>trpB</i> , <i>pabB</i> , <i>putP</i> , <i>icd</i> et <i>polB</i>) utilisant la méthode de parcimonie (méthode statistique non-paramétrique) sur une collection de 98 souches commensales et pathogènes de <i>E. coli/Shigella</i> , enraciné avec une souche <i>E. fergusonii</i> d'après (8).	19
Figure 2 : Réservoirs potentiels et mode de transmission d' <i>E. coli</i> entéropathogènes d'après (10). ...	21
Figure 3 : Facteurs d'adhérence des <i>E. coli</i> pathogènes entériques et types d'invasion de la muqueuse intestinale d'après (10).	22
Figure 4 : Représentation de la composition du génome moyen d' <i>E. coli</i> d'après (21).	28
Figure 5 : Structure de la colistine, d'après Poirel et al. (3).	35
Figure 6 : Pharmacocinétique du CMS et de la colistine	38
Figure 7 : Rapid Polymyxin NP (ELITechGroup) permet la détection de la résistance des entérobactéries à la colistine en 2h.....	42
Figure 8 : Exemple d'identification de BGN résistants à la colistine grâce au milieu Superpolymyxin .	43
Figure 9 : Régulation des modifications du LPS chez <i>E. coli</i> d'après (3).	46
Figure 10 : Environnement génétique du gène <i>mcr-1</i> d'après (83).....	48
Figure 11 : Observation d'entérobactéries portant <i>mcr-1</i> décrit chez l'homme et/ou l'animal d'après (32).....	52
Figure 12 : Construction du plasmide <i>pmrAB</i> -pGEM-T.....	65
Figure 13 : Construction du plasmide <i>pmrAB-mdh</i> -pTOPO à partir du plasmide <i>pmrAB</i> -pGEM-T.	65
Figure 14 : Construction du produit de PCR <i>rpsL-neo-pmrA</i>	66
Figure 15 : Remplacement de gène avec contre-sélection sur la kanamycine (1).	67
Figure 16 : Remplacement de gène avec contre-sélection sur la kanamycine (2).	67
Figure 17 : Remplacement de gène avec sélection sur l'ampicilline (1).....	68
Figure 18 : Remplacement de gène avec sélection sur l'ampicilline (2).....	69
Figure 19 : Electrophorèse des extraits plasmidiques	73
Figure 20 : Remplacement du gène <i>pmrA</i> d' <i>E. coli</i> TOP10 par le gène <i>pmrA</i> muté d'une souche CSR. 74	
Figure 21 : Complémentation fonctionnelle des isolats d' <i>E. coli</i> CSR possédant une mutation de <i>pmrB</i> , avec un plasmide portant le gène <i>pmrB</i> sauvage.....	77
Figure 22 : Complémentation par les gènes <i>pmrB</i> mutés chez <i>E. coli</i> TOP10.....	79
Figure 23 : Remplacement du gène <i>pmrB</i> sauvage d' <i>E. coli</i> TOP10 par les gènes <i>pmrB</i> mutés de nos souches.	81
Figure 24 : Complémentation de nos gènes <i>pmrB</i> mutés par l'opéron <i>pmrAB</i> sauvage.....	83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Types pathogéniques d' <i>E. coli</i> d'après (5).....	17
Tableau 2 - Concentrations critiques pour la colistine et la polymyxine B selon l'EUCAST et le CLSI en 2018.	43
Tableau 3 - Caractéristiques des gènes de résistance plasmidiques <i>mcr</i> décrits.....	50
Tableau 4 - Mutations chromosomiques et délétions d'acides aminés responsables de l'acquisition de résistance à la colistine chez <i>E. coli</i>	57
Tableau 5 - Résultats des CMI de la colistine pour les mutants <i>pmrA</i> d' <i>E. coli</i> TOP10.	75
Tableau 6 - Résultats des CMI de la colistine pour les souches CSR complémentées par le gène <i>pmrB</i> sauvage apporté en trans dans le plasmide pTOPO.	78
Tableau 7 - Résultats des CMI de la colistine pour les souches sensibles à la colistine complémentées par les gènes <i>pmrB</i> mutés apportés en trans dans le plasmide <i>pmrB*</i> -pBR322.....	80
Tableau 8 - Résultats des CMI de la colistine pour les mutants <i>pmrB</i> d' <i>E. coli</i> TOP10.....	82
Tableau 9 - Complémentation des souches d' <i>E. coli</i> CSR avec le plasmide <i>pmrAB-mdh</i> -pTOPO.	84

Introduction

Escherichia coli est le bacille à Gram négatif (BGN) pathogène le plus souvent rencontré en médecine humaine. Bien que cette bactérie soit un des composants majeurs du microbiote intestinal humain, elle est la principale cause d'entérites, d'infections urinaires, de septicémies, et plus rarement de méningites néonatales. Les infections dues à *E. coli* seraient responsables de plus de 2 millions de morts chaque année. Ces dernières années, le traitement de ces infections est menacé par l'émergence de résistances aux antibiotiques chez cette bactérie.

La multirésistance aux antibiotiques est un des enjeux majeurs de santé publique au niveau international. En 2014, le premier rapport OMS sur la résistance aux antimicrobiens, prédit pour le 21^{ème} siècle une ère post-antibiotique, dans laquelle les infections courantes pourront tuer (1). Depuis les années 2000, l'émergence et la diffusion rapide de résistances chez les BGN ont compromis l'utilisation de classes d'antibiotiques majeures : β -lactamines, aminosides, fluoroquinolones. La pénurie actuelle d'antibiotiques innovants a amené les cliniciens à réintroduire comme traitement de dernier recours, de vieilles drogues telle que la colistine, qui avait été abandonnée face à des antibiotiques à spectre plus large.

Découverte en 1947, la colistine a largement été utilisée dans les années 50 dans le traitement d'infections à BGN, telles que *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli*. Elle a été abandonnée dans les années 80 en raison de ses effets indésirables (néphrotoxicité et neurotoxicité), et son utilisation a été restreinte au traitement des infections à germes multirésistants chez les patients atteints de mucoviscidose et pour le traitement et la prophylaxie des animaux en médecine vétérinaire.

Sa réintroduction depuis environ une décennie comme alternative thérapeutique de dernier recours pour le traitement des infections à BGN multirésistants, a mis en évidence l'émergence de la résistance à cet antibiotique. La surveillance et la compréhension des mécanismes de résistance à cet antibiotique sont un prérequis indispensable au contrôle de la diffusion de ces résistances ainsi qu'au développement de molécules alternatives ou adjuvantes.

I. *Escherichia coli*

1. Taxonomie

E. coli est un BGN aérobie-anaérobie facultatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, faisant partie des protéobactéries. Il doit son nom au pédiatre allemand Theodor Escherich qui a caractérisé en 1885 un court BGN aux extrémités arrondies présent dans les selles d'enfants : *Bacterium coli commune* (2). Ce n'est que 70 ans plus tard que le nom *E. coli* a été retenu (3). Ce genre bactérien est largement répandu puisqu'il est un composant majeur de la flore aérobie intestinale humaine et animale. L'espèce *E. coli* a longtemps été la seule du genre, à laquelle sont venues s'ajouter les espèces *E. blattae* (1973 ; intestin des blattes), *E. hermanii* (1982 ; fèces, blessures et bactériémies chez l'homme), *E. vulneris* (1982 ; fèces et blessures chez l'homme), *E. fergusonii* (1985 ; fèces, infections urinaires et bactériémies chez l'homme) et *E. marmotae* (2015 ; fèces humaines). Chaque espèce présente des caractéristiques biochimiques spécifiques qui permettent de les différencier.

2. Caractères bactériologiques

E. coli mesure de 2 à 4 µm de long, possède une nitrate réductase et une catalase ; il est dépourvu d'oxydase, peut-être immobile ou mobile par un flagelle péritriche. Bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires à une température optimale de 37°C. Sa capacité à fermenter les sucres notamment le lactose est utilisée pour permettre sa sélection sur les milieux de cultures ; les colonies d'*E. coli* lactose positives apparaissent ainsi jaune sur gélose BCP ou rose sur gélose MacConkey ou Hektoën. *E. coli* produit de l'indole à partir du tryptophane, possède différentes enzymes telles que la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC). De plus, la β -galactosidase d'*E. coli* permet son identification rapide sur milieux chromogènes de types URI-4 (BioRad®) ou CPS (Biomérieux®) (colonies rose). La plupart des caractéristiques biochimiques sont partagées par l'ensemble des *E. coli* en dehors du sérotype O157:H7 qui ne fermente pas le sorbitol et ne possède pas de β -glucuronidase.

Enfin, l'espèce *E. coli* est une bactérie versatile comprenant des bactéries commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement.

3. Classification

a. Classification selon les sérotypes

La première classification des souches d'*E. coli* est celle de Kauffmann en 1947, basée sur l'identification des antigènes de surface : l'antigène somatique O qui entre dans la composition du lipopolysaccharide (LPS), et l'antigène flagellaire H qui est un constituant du flagelle permettant la

mobilité de la bactérie (4). Certaines souches possèdent également un antigène capsulaire de surface : l'antigène K. Actuellement, il existerait 174 sérogroupes O, 80 sérogroupes K et 57 sérogroupes H, mais seulement un petit pourcentage de combinaisons O:H sont pathogènes. Certains sérotypes peuvent être associés à certains syndromes cliniques, les *E. coli* de sérotypes O104:H4 et O157:H7, par exemple sont responsables d'épidémies de syndromes hémolytiques et urémiques (SHU).

b. Classification selon les pathotypes

En 1965, Neter différencie les souches pathogènes d'*E. coli* sur leur tropisme clinique, séparant ainsi les souches à tropisme intestinal de celles à tropisme extra-intestinal. Par la suite, cette classification a été améliorée par la détermination du type de facteur de virulence de la souche et des symptômes cliniques de l'hôte permettant de classer les souches d'*E. coli* en pathotypes. Sept pathotypes majeurs ont été définis pour les souches entériques d'*E. coli* et trois pour les souches extra-intestinales (**Tableau 1**).

Tableau 1 - Types pathogéniques d'*E. coli* d'après (5).

Pathotypes	Maladie	Symptômes	Facteurs de virulence
SOUCHES ENTERIQUES			
<i>E. coli</i> Entero-pathogène EPEC	Diarrhée chez l'enfant	Diarrhée liquide et vomissements	LEE ^a , EAF ^b
<i>E. coli</i> Entero-hémorragique EHEC	Colite hémorragique SHU ^c	Diarrhées sanglantes	Shiga-Toxine, LEE
<i>E. coli</i> Entero-toxigénique ETEC	Diarrhée du voyageur	Diarrhée liquide et vomissements	ST et LT ^d , CFs ^e
<i>E. coli</i> Entero-agrégatif EAEC	Diarrhée chez l'enfant	Diarrhée avec du mucus et vomissements	AggR ^f , cytotoxines
<i>E. coli</i> Adhésion diffuse DAEC	Diarrhée aigüe chez l'enfant	Diarrhée liquide, UTI récurrentes	Daa ^g
<i>E. coli</i> Adhérent invasif AIEC	Maladie de Crohn	Inflammation chronique de l'intestin	Pili de type I, Fimbriae
<i>E. coli</i> Entéro-invasif EIEC	Shigellose-like	dysenterie	Shiga-toxine, SSTIII ^h
SOUCHES EXTRA-INTESTINALES			
<i>E. coli</i> UroPathogène UPEC	Infections urinaires basses et sepsis	Cystite, pyélonéphrite	Fimbriae, hémolysine
<i>E. coli</i> Méningite Néonatale NMEC	Méningite néonatale	Méningite aigüe, sepsis	Fimbriae S, capsule K1
<i>E. coli</i> Pathogène Aviaire APEC	Infection alimentaire	-	Fimbriae I, capsule K1

^a Locus d'effacement des entérocytes ; ^b Plasmide facteur d'adhérence d'EPEC ; ^c Syndrome hémolytique et urémique ;

^d Toxines thermostable et thermolabiles, ^e Facteurs de colonisation ; ^f Activateur transcriptionnel ;

^g Adhésine permettant la diffusion ; ^h Système de sécrétion type III associé à différents effecteurs.

c. Classification selon les phylogroupes

D'autres méthodes ont été développées pour typer les isolats pathogènes d'*E. coli* et ainsi améliorer la détection des clones épidémiques, notamment l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE) qui est la méthode de référence.

La MLST (Multilocus sequence typing) est une méthode plus largement utilisée. Elle permet de classer les isolats en phylogroupes sur l'identification de critères moléculaires communs et ainsi d'établir les relations entre les souches au moyen d'arbres phylogénétiques. En 1984, les travaux d'Ochman et Selander avaient déjà permis de répartir les souches de *E. coli* en quatre grands groupes phylogénétiques (A, B1, B2 et D) par l'analyse du polymorphisme de 11 enzymes métaboliques (6). La MLST a permis de confirmer cette classification et de l'enrichir de trois groupes mineurs nommés C, E et F (7,8). Selon Escobar Paramo et al (8), les *E. coli* commensaux semblent faire partie préférentiellement du phylogroupe A alors que les souches pathogènes d'*E. coli* responsables d'infections extra-intestinales (ExPEC) semblent majoritairement associées au phylogroupe B2 et en minorité au phylogroupe D. Les isolats animaux et environnementaux d'*E. coli* appartiennent principalement aux phylogroupes A et B1.

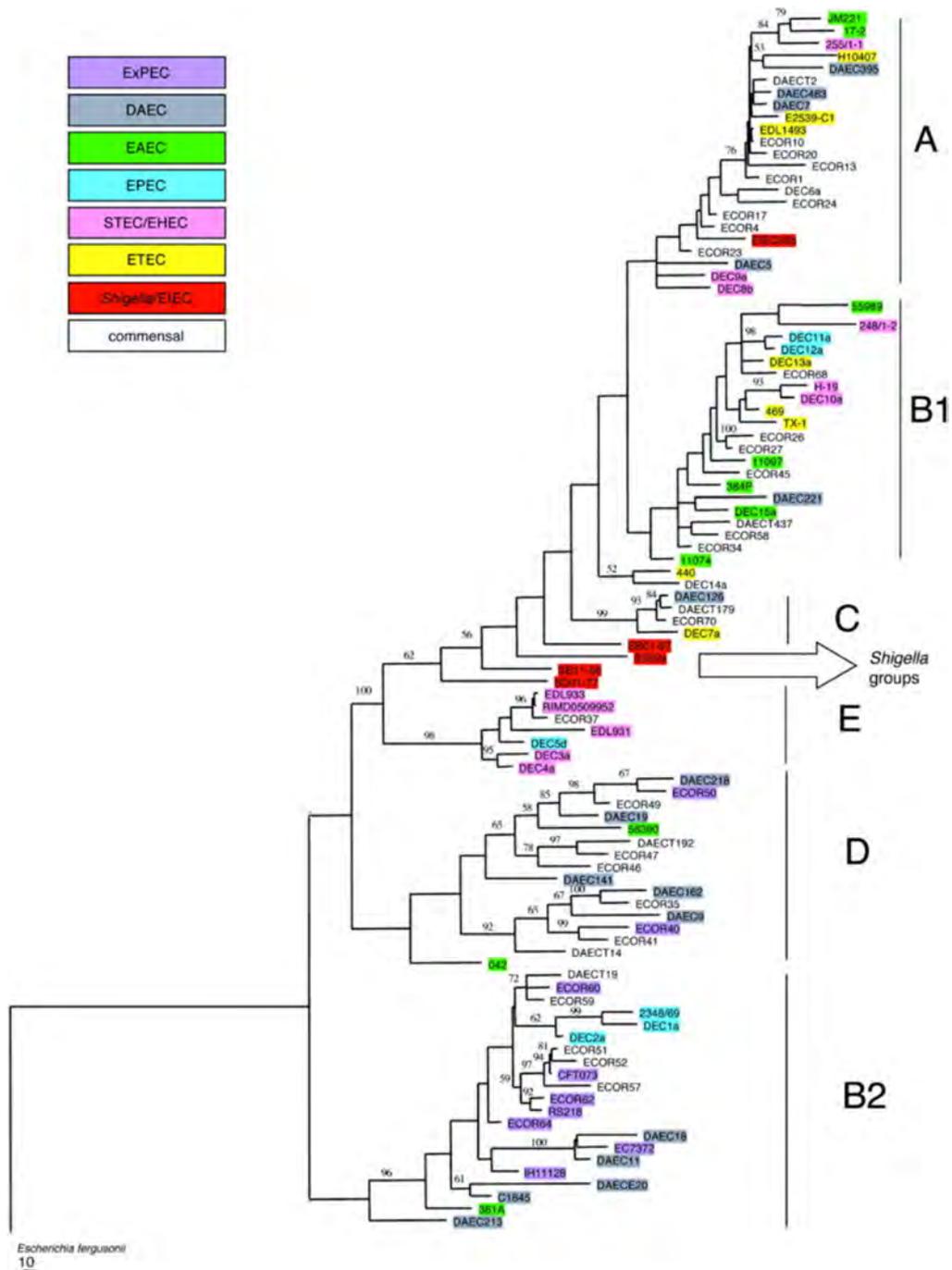


Figure 1 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse simultanée de six gènes chromosomiques de ménage (*trpA*, *trpB*, *pabB*, *putP*, *icd* et *polB*) utilisant la méthode de parcimonie (méthode statistique non-paramétrique) sur une collection de 98 souches commensales et pathogènes de *E. coli*/*Shigella*, enraciné avec une souche *E. fergusonii* d'après (8).

4. *E. coli* commensal

E. coli appartient à la microflore intestinale de l'homme, des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux) mais aussi des reptiles (9). Chez l'homme, *E. coli* colonise habituellement le tractus gastro-intestinal quelques heures seulement après la naissance. *E. coli* et son hôte humain

peuvent coexister de façon saine, dans une association aux bénéfiques mutuels pendant des décennies. Ces souches commensales d'*E. coli* sont rarement responsables d'infections excepté chez l'immunodéprimé ou lors d'effraction de la barrière gastro-intestinale (péritonite).

5. *E. coli* pathogènes

Les souches d'*E. coli* pathogènes sont capables de se multiplier et de persister dans le tractus digestif de l'hôte en contournant les défenses immunitaires, et d'induire des dommages cellulaires. L'étude des différents modes d'interactions entre l'hôte et la bactérie lors des infections permet de classer les souches d'*E. coli* pathogènes en deux principaux pathotypes regroupant les pathogènes extra-intestinaux (ExPEC), responsables d'infections urinaires, de méningites chez les nouveau-nés ou de septicémies et les pathogènes intestinaux (InPEC) responsables de maladies entériques (5) (**Tableau 1**) (10).

a. *E. coli* pathogènes intestinaux

Les *E. coli* intestinaux sont classés en plusieurs variants pathogènes appelés « pathovars » (**Tableau 1**), et bien qu'ils soient responsables de diarrhées infectieuses, les manifestations cliniques, les sites et les mécanismes de colonisation de l'épithélium intestinal ainsi que l'issue de la maladie sont très différents (10).

De façon similaire aux souches commensales, les souches d'*E. coli* entéropathogènes sont ubiquitaires et les réservoirs sont multiples (**Figure 2**) : l'homme, les animaux, l'alimentation, les eaux d'irrigation, les eaux récréatives ou destinées à la consommation. La contamination de l'homme se fait par ingestion de ces aliments ou eaux contaminés. Secondairement, une transmission interhumaine peut avoir lieu par voie féco-orale à travers les surfaces contaminées, les fluides corporels et une mauvaise hygiène des mains des malades et des porteurs sains (**Figure 2**).

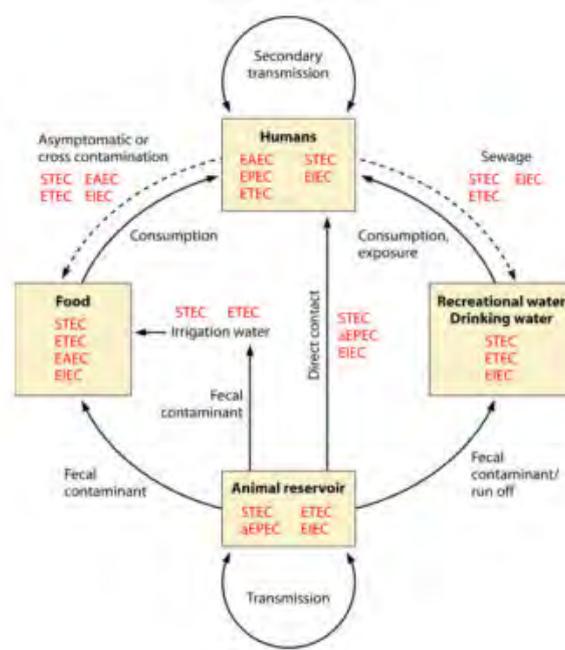


Figure 2 : Réservoirs potentiels et mode de transmission d'*E. coli* entéropathogènes d'après (10).

➤ ***E. coli* entéropathogènes (EPEC)**

EPEC est le premier pathotype d'*E. coli* à avoir été décrit en 1945, lors d'une épidémie de diarrhées chez des enfants au Royaume-Uni (11). Les épidémies dues aux souches EPEC sont actuellement limitées aux pays en développement et touchent surtout les enfants de moins de 2 ans.

L'infection à EPEC est associée à des lésions caractéristiques d'attachement/ effacement (A/E). Après attachement aux cellules épithéliales intestinales, la bactérie provoque des réarrangements du cytosquelette, notamment une accumulation de filaments d'actine polymérisée sous la zone d'adhésion de la bactérie. Les microvillosités intestinales sont effacées et une structure en « piédestal » est formée au site d'adhésion de la bactérie (**Figure 3, en jaune**). L'induction de ces lésions d'A/E est codée par un îlot de pathogénicité (PAI) appelé locus d'effacement des entérocytes (LEE). Il permet notamment la synthèse d'intimine (gène *eae*), une protéine responsable de l'attachement « intime » de la bactérie aux cellules épithéliales. D'autres facteurs de virulences ont été décrits comme le plasmide EAF (facteur d'adhérence d'EPEC).

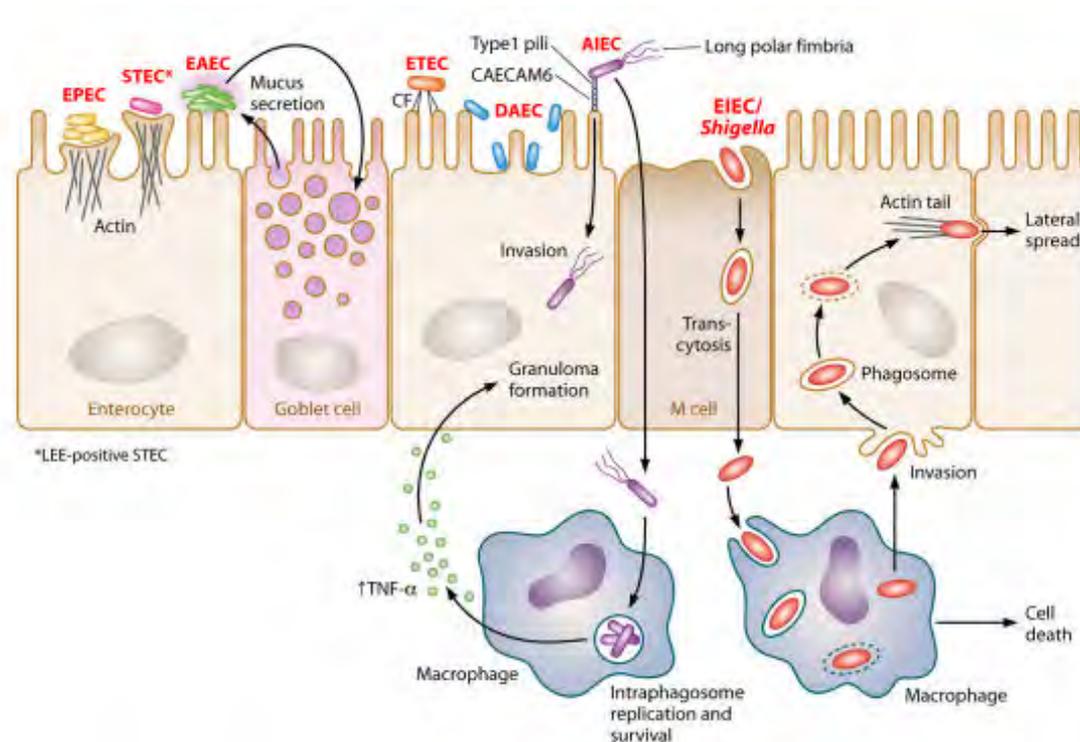


Figure 3 : Facteurs d'adhérence des *E. coli* pathogènes entériques et types d'invasion de la muqueuse intestinale d'après (10).

E. coli Entérotoxigène (EPEC) (jaune) et *E. coli* producteur de LEE et Shiga toxine (STEC) (rose) sont des pathogènes extracellulaires qui effacent les microvillosités formant les lésions d'attachement/effacement. *E. coli* Entérotoxigène (ETEC) (orange) utilise les facteurs de colonisation (CFs) pour se lier aux cellules intestinales hôtes. *E. coli* Entéroaggrégatif (EAEC) (vert) forme des biofilms sur la muqueuse intestinale, les bactéries adhèrent entre elles et à la surface cellulaire, et envahissent la muqueuse sur le modèle adhérent aggrégatif (AA). *E. coli* Diffusant adhérent (DAEC) (bleu) est dispersé sur la surface des cellules intestinales, c'est le modèle adhérence diffuse (DA). *E. coli* Adhérent Invasif (AIEC) (violet) est capable d'envahir les cellules épithéliales ainsi que de se multiplier dans les macrophages. *E. coli*/Shigella Entéroinvasif (EIEC) (rouge) sont des pathogènes intracellulaires qui pénètrent l'épithélium intestinal à travers les cellules M et accèdent à la sous-muqueuse. *EIEC/Shigella* s'échappent des macrophages sous-muqueux par induction de leur apoptose puis ils envahissent les entérocytes par leur pôle basal et diffusent entre les cellules intestinales de façon latérale.

➤ *E. coli* entéroinvasifs (EIEC)

Les souches entéroinvasives sont génétiquement et pathologiquement très proches de *Shigella spp*, mais moins virulentes. EIEC peut être responsable de colites inflammatoires, occasionnellement de dysenteries mais la plupart des infections à EIEC sont des diarrhées aqueuses non différenciables de celles causées par d'autres *E. coli* pathogènes (10). L'épidémiologie est peu documentée car les diarrhées à EIEC sont peu sévères donc insuffisamment investiguées contrairement aux shigelloses.

EIEC est un pathogène intracellulaire facultatif qui après pénétration dans la cellule épithéliale, lyse sa vacuole d'endocytose, se multiplie au sein de la cellule épithéliale puis envahit les cellules adjacentes (**Figure 3, en rouge**). Son déplacement intracellulaire se fait par croissance de microfilament d'actine à une extrémité de la bactérie. Les facteurs de virulence permettant ce cycle complexe sont

portés par un plasmide mosaïque codant notamment pour un système de sécrétion type III et des protéines effectrices induisant des réarrangements du cytosquelette, la lyse de la vacuole d'endocytose, l'apoptose des macrophages, le relargage d'IL-1, etc (10).

➤ **les *E. coli* entéroagrégatifs (EAEC)**

Les isolats d'EAEC sont associés à des épidémies de diarrhées persistantes chez l'adulte et l'enfant dans les pays industrialisés et en développement. Ce sont habituellement des diarrhées aqueuses avec du mucus et pouvant être accompagnées d'une fièvre discrète, de nausées, de vomissements, de douleurs abdominales et rarement de selles sanglantes. Le portage asymptomatique d'EAEC est fréquent, bien que la souche soit la deuxième étiologie de diarrhée du voyageur après l'ETEC. EAEC est fréquemment responsable de diarrhées persistantes chez l'individu séropositif (infecté par le virus de l'immunodéficience humaine VIH) (10).

Les isolats d'*E. coli* entéroagrégatifs sont décrits comme non producteurs d'entérotoxine thermolabile ou thermostable, mais adhérant aux cellules Hep-2 selon le modèle entéroagréгатif. Autrement dit, les bactéries adhèrent entre elles en créant un « empilement de briques » (**Figure 3, en vert**), entraînant des altérations significatives de la muqueuse intestinale (11). La présence des gènes codant pour de multiples adhésines, des toxines et des protéines associées à la virulence des souches est très variable au sein des souches d'EAEC. Même le site d'infection peut varier selon les isolats qui présentent des affinités différentes pour les muqueuses iléales, jéjunales et coliques. Un modèle d'infection en trois étapes a été établi : adhérence à la muqueuse intestinale, production d'entérotoxines et de cytotoxine (IL-8, IL-1) entraînant une importante inflammation de la muqueuse intestinale. Bien que plusieurs toxines aient été décrites chez EAEC, aucun facteur de virulence n'est associé de façon irréfutable à sa virulence. C'est l'activateur transcriptionnel AggR, régulant la majorité des facteurs de virulence décrits chez ces souches d'EAEC qui semble être leur caractéristique commune.

➤ **les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC)**

L'ETEC est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les diarrhées du voyageur (approximativement 30% des cas). Elle peut entraîner des diarrhées allant de formes bénignes à de très sévères diarrhées aqueuses conduisant à une déshydratation rapide. L'incubation peut-être très courte (5h) mais est généralement estimée à 1 à 2 jours après ingestion. Les épidémies à ETEC en pays développés sont sporadiques et souvent non détectées. Cependant il est estimé que 840 millions de cas annuels de diarrhées à ETEC surviennent dans les pays en développement dont 240 millions chez l'enfant, chez qui le taux de mortalité associé est élevé (10). Dans ces pays, la bactérie est endémique,

mais quelques épidémies ont été observées lors d'inondations au Bangladesh ou dans des unités de néonatale soins intensifs à cause de lait contaminé par un porteur asymptomatique (10). Les eaux de surfaces dans les pays en développement peuvent être une source importante de contamination directe à ETEC qui est capable de former des biofilms et de survivre 3 mois en eau froide (10) (**Figure 2**).

ETEC colonise la surface de la muqueuse intestinale grêle grâce à plusieurs facteurs de colonisation (CFs) puis sécrète des entérotoxines responsables des sécrétions intestinales importantes (**Figure 3, en orange**). Contrairement à la plupart des autres pathotypes d'*E. coli*, les facteurs de virulence d'ETEC sont tous codés par des plasmides (10). Les entérotoxines de l'ETEC peuvent être de deux types : les entérotoxines thermostables (ST) ou les entérotoxines thermolabiles (LT). Globalement, entre 80 et 75% des souches d'ETEC possèdent une ST : 45% présentent une ST seule et pour 33% des isolats elle est associée à une LT (10). Les LT sont de structure et de fonction semblables à la toxine cholérique de *Vibrio cholerae*. La sous-unité A de l'entérotoxine thermolabile active par fixation une adénylate cyclase ; et de façon analogue, les ST sont des petits peptides qui activent les guanylates cyclases. Des kinases cellulaires AMPc ou GMPc dépendantes sont alors activées et phosphorylent les canaux chlorures des cellules sécrétoires intestinales, provoquant une sécrétion d'ions Cl⁻ dans la lumière intestinale (11).

➤ **les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)**

DAEC est responsable de diarrhées aqueuses persistantes chez l'enfant de plus de 12 mois avec une sévérité accrue des symptômes de 18 mois à 5 ans. Le portage semble asymptomatique chez l'adulte ou serait responsable d'inflammations coliques chroniques comme dans la maladie de Crohn. Sa pathogénicité est caractérisée par une capacité de diffusion et d'adhérence à la monocouche de cellules Hep-2. L'adhésion de ces bactéries au DAF, un récepteur cellulaire de la muqueuse intestinale, active une cascade de signalisation intracellulaire et provoque le développement d'extensions membranaires qui vont envelopper la bactérie adhérente et l'internaliser dans une vacuole. La réorganisation du cytosquelette nécessaire aux extensions abouti à des lésions de la bordure en brosse et à la perte de microvillosités intestinales (**Figure 3, en bleu**). Ces souches ont aussi un effet pro-inflammatoire sur la muqueuse intestinale : après adhésion au DAF, la stimulation du TLR-5 par le flagelle induit la sécrétion d'IL-8 et la migration de PNN à travers la barrière épithéliale, ce qui stimule la production de TNF- α et d'IL-1 et augmente la synthèse de DAF (10).

➤ les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC)

Décrit pour la première fois en 1982, EHEC peut être à l'origine de colites hémorragiques et du SHU. Le premier symptôme de l'infection à EHEC est la diarrhée non sanglante, qui peut être accompagnée de fièvres et de vomissements. Dans la majorité des cas, les diarrhées deviennent sanglantes entre un et cinq jours suivant la première diarrhée. Les complications observées peuvent se manifester sous la forme d'un SHU dans environ 15 % des cas surtout chez l'enfant. Le SHU est défini par l'association d'une anémie hémolytique microangiopathique avec présence de schizocytes (hématies fragmentées), d'une thrombopénie et d'une insuffisance rénale aiguë.

Le principal réservoir d'EHEC est l'intestin des bovins et la source de contamination principale est la viande de bœuf insuffisamment cuite. D'autres aliments ont toutefois été incriminés : lait non pasteurisé, légumes souillés, autre viande insuffisamment cuite, cette bactérie étant capable de survivre et se multiplier pendant de longues périodes sur les aliments. La part de contamination par exposition environnementale (54% en Ecosse) ou par contact avec l'animal ou ses selles (8% pour les infections à O157:H7) est également importante et la transmission interhumaine lors d'épidémie est possible. Favorisé par une dose de bactérie très faible nécessaire à la survenue de l'infection, EHEC est responsable de nombreuses épidémies diffusant rapidement dans la population. Plusieurs sérotypes sont impliqués : O26, O104 et O111 mais le sérotype le plus fréquemment incriminé dans les infections à EHEC est O157:H7. En Europe, en 2016, il a été responsable de 38 % des cas d'infections à EHEC (ECDC 2016).

Le facteur clé de la virulence d'EHEC est la Shiga-toxine Stx, similaire à la toxine produite par *Shigella dysenteriae* ; faisant de l'EHEC le plus virulent des pathovars intestinaux. Les protéines Stx sont divisées en deux sous-groupes Stx1 et Stx2, présentant une homologie de 55%. Les souches d'EHEC peuvent posséder un seul variant de la toxine Stx ou les deux toxines, Stx2 étant associée à des symptômes plus sévères. Stx est produite au niveau colique ou elle a une action directe sur la muqueuse par apoptose des cellules intestinales conduisant à une diarrhée sanglante, voire à une colite hémorragique, une nécrose ou une perforation intestinale (11). La toxine Stx peut aussi disséminer par voie hématogène jusqu'au rein ou elle altère les cellules rénales endothéliales et bloque le microsysteme vasculaire par une toxicité directe mais aussi par activation de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Cette toxicité peut conduire aux manifestations clinico-biologiques caractéristiques du SHU (11).

En plus de la Stx, les EHEC possèdent également le LEE décrit précédemment chez les EPEC (Figure 3, en rose). Plus de 200 sérotypes d'*E. coli* peuvent produire la Shiga toxine, ils sont appelés *E.*

coli producteurs de Shiga toxine (STEC), mais tous ne sont pas responsable de diarrhées hémorragique. La présence de l'îlot de pathogénicité LEE ainsi que de la toxine Stx sont nécessaires pour entraîner les diarrhées sanglantes et classer la souche dans le pathovar EHEC.

➤ ***E. coli* adhérent invasif (AIEC)**

AIEC est un pathovar récemment décrit, il est l'un des agent incriminé dans les lésions de la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire de l'intestin. Environ 30% des patients atteints de la maladie de Crohn sont porteurs d'AIEC alors qu'il est retrouvé chez seulement 6% des individus sains (10). La prévalence de cette maladie est en augmentation croissance dans les pays développés (Amérique du Nord et Royaume Uni) .

Grâce à un pili de type I, AIEC adhère au récepteur CAECAM6 des cellules épithéliales et envahi l'épithélium intestinal (**Figure 3, en violet**). AIEC est également capable de transloquer à travers l'épithélium pour avoir accès au tissu lymphoïde sous-jacent : la lamina propria grâce à un fimbriae polaire interagissant avec les cellules M des plaques de Peyer. AIEC peut ensuite se multiplier dans les phagolysosomes des macrophages sans induire leur apoptose, entraînant la sécrétion continue de TNF- α causant l'inflammation intestinale et la formation de granulomes (**Figure 3, en violet**) (10). Les études actuelles soutiennent que chez les individus génétiquement prédisposés, l'effraction de la barrière intestinale par la bactérie serait suivie d'une réponse inflammatoire insuffisante et d'une faible clairance d'AIEC conduisant à une inflammation chronique et au développement des lésions de la maladie de Crohn (10).

➤ **Pathovars hybrides**

E. coli est une espèce bactérienne avec un génome présentant une forte plasticité conduisant à l'apparition de nouveaux pathovars. Récemment, une souche hybride EAEC et STEC a été isolée chez des patients en 2011, en Allemagne et en France (12). L'importante épidémie en Allemagne a touché presque 3000 personnes dont 855 patients qui ont développé un SHU et a causé plus de 50 décès . Cette souche a été identifiée comme étant un *E. coli* de sérotype O104:H4, possédant les gènes caractéristiques des EAEC (notamment *aggR*) et celui codant pour la Shiga-toxine de type 2 typique des STEC (gène *stx2*), faisant apparaître un nouveau pathovar dénommé *E. coli* entéroaggrégant-hémorragique, EAHEC (13). D'autres souches de *E. coli* hybrides EAHEC ont également été décrites lors d'autres épidémies comme *E. coli* de sérotype O111:H2 en France (14). Récemment, trois nouvelles souches d'*E. coli* hybrides STEC/EPEC de sérotypes O101:H33, O2:H25 et O2:H27, ont été recensées possédant les gènes codant pour la Shigatoxine des STEC et une toxine ST caractéristique des EPEC

(15). Un autre hybride EPEC/EPEC possédant le LEE des EPEC et le gène codant la toxine LT caractéristique des EPEC a également été décrit (16).

b. E. coli pathogènes extra-intestinaux

Trois pathovars responsables d'infections extra-intestinales sont décrits à l'heure actuelle, les *E. coli* uropathogènes (UPEC), les *E. coli* responsables de méningites néonatales (MNEC) et les APEC qui est un pathotype strictement animal.

➤ **les *E. coli* uropathogènes (UPEC)**

Distincts des *E. coli* commensaux par leurs facteurs de virulence et leur pathogénèse, UPEC sont les agents le plus fréquemment incriminés dans les infections du tractus urinaire (UTIs) puisque 80% d'entre elles sont dues à UPEC. Des adhésines spécifiques de ces souches sont nécessaires à la colonisation des voies urinaires : fimbriae de type P (Pap) et de type I principalement. Plusieurs toxines peuvent aussi être produites par des pourcentages variables de ces souches : hémolysine, facteur nécrotique cytotoxique et la protéase Sat. Les UPEC présentent des îlots de pathogénicité de taille variée et non retrouvés dans le chromosome des souches d'*E. coli* fécaux.

➤ **les *E. coli* responsables de méningites néonatales (MNEC)**

Pathovar d'importance croissante les MNEC peuvent coloniser la filière génitale maternelle et entraîner des méningites et des sepsis néonataux. Le sepsis néonatal est un problème sous-estimé dont l'incidence est de 1 à 4/1000 naissances et qui est une des causes les plus importantes de mortalité et morbidité chez les nouveau-nés dans les pays développés et en développement (17). MNEC est la principale cause de méningite néonatale dans les pays industrialisés avec un taux de létalité entre 15 et 40% et des séquelles neurologiques importantes chez les survivants (11).

Les souches MNEC représentent un petit nombre de sérotypes et 80% d'entre elles portent l'antigène capsulaire K1 (O18:K1 et O7:K1 les plus fréquents) (18) qui permet à la bactérie d'échapper au système immunitaire de l'hôte (11). Comme pour les autres pathotypes, les souches MNEC possèdent des gènes additionnels non retrouvés chez les souches d'*E. coli* commensales (11). Le fimbriae S est utilisé pour adhérer à l'endothélium microvasculaire cérébral et plusieurs protéines membranaires sont utilisées pour l'invasion du système nerveux.

6. Organisation et dynamique du génome

Le génome d'*E. coli* est le génome bactérien le plus étudié à ce jour. C'est pour cette espèce qu'il existe le plus de génomes entièrement séquencés et annotés : environ 12 000 génomes d'*E. coli* sont disponibles dans GenBank, en août 2018. *E. coli* K12 MG1655, dont le génome a été totalement séquencé en 1997 est la souche bactérienne la plus étudiée et la plus utilisée en laboratoire (19).

La taille du génome des *E. coli* peut varier d'un million de paires de bases entre les espèces commensales et pathogènes (4,5 et 5,9 Mb), et ce matériel génétique supplémentaire est souvent constitué de gènes de virulence ou améliorant le fitness de la bactérie. Des analyses comparatives des génomes d'*E. coli* ont montré que ce génome est divisé entre un pool de gènes conservés, communs à toutes les espèces appelé le core-génome et un pool de gènes flexibles. Une comparaison récente de 186 génomes d'*E. coli* a décrit 1700 gènes homologues partagés par tous les génomes et un pangénome de 16 400 gènes (20) (Figure 4). Le génome d'une souche d'*E. coli* est composé en moyenne de 5000 gènes.

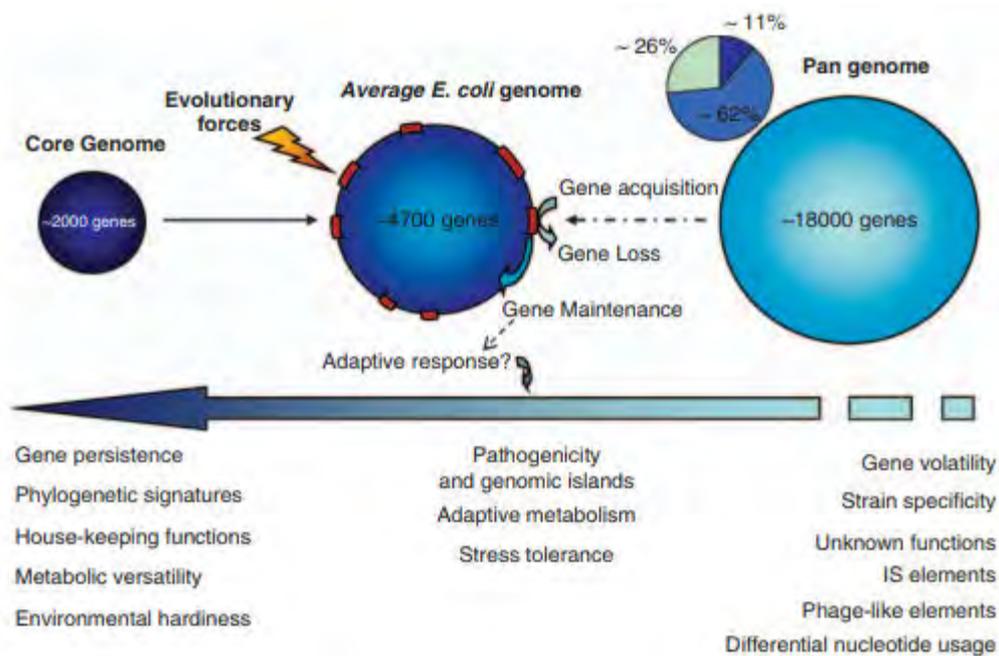


Figure 4 : Représentation de la composition du génome moyen d'*E. coli* d'après (21).

7. Sensibilité naturelle aux antibiotiques et mécanismes de résistance acquis

A. Sensibilité naturelle aux différents antibiotiques

Les β -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus utilisée en médecine humaine et notamment dans le traitement des infections à BGN. Ce sont des inhibiteurs de synthèse de la paroi

bactérienne, elles agissent par inactivation des principales enzymes impliqués dans cette construction et regroupés sous le terme de protéines liant les pénicillines (PLP). *E. coli* est une entérobactérie de groupe I c'est-à-dire qu'elle est naturellement sensible à toutes les β -lactamines, sauf la pénicilline G, mais elle possède une céphalosporinase qui ne s'exprime pas. Elle peut cependant acquérir un ou plusieurs mécanismes des résistance aux β -lactamines.

Découverts dans les années 40, les aminosides sont des antibiotiques à large spectre largement utilisés en médecine humaine en particulier dans le traitement des infections sévères à BGN. Ils pénètrent dans la bactérie par diffusion passive à travers le peptidoglycane et par transport actif à travers la membrane cytoplasmique puis se lient principalement à la sous-unité ribosomique 30s et altèrent la synthèse protéique. Leur intérêt clinique est tempéré par une toxicité rénale et cochléo-vestibulaires. Malgré cela, les aminosides n'ont jamais disparu de l'arsenal thérapeutique et l'association synergique d'un aminoside avec une β -lactamine reste le gold standard pour les traitement probabiliste des bactériémies à *E. coli*.

E. coli est naturellement sensible aux quinolones et aux fluoroquinolones. Ces molécules inhibent l'activité de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV, deux enzymes impliquées dans le surenroulement et la décaténation de la molécule d'ADN donc ayant un rôle important dans la réplication et la transcription (17).

E. coli est également sensible au triméthoprime, aux sulfamides, aux furanes et à la fosfomycine, molécules principalement utilisées dans le traitement des UTIs à *E. coli*.

B. Traitement des infections à *E. coli*

Lors d'infections à *E. coli* entéropathogènes, le traitement antibiotique est limité et généralement non recommandé. Dans la plupart des cas, la réhydratation par voie orale ou par voie IV dans les cas de déshydratation sévère et le maintien de la balance hydroélectrolytique suffisent. Dans les infections sévères, les antibiotiques comme les fluoroquinolones, l'azithromycine ou les β -lactamines sont utilisés pour réduire la durée de l'infection. Leur utilisation devrait être cependant évitée autant que possible pour prévenir le développement de résistances et la prédisposition à développer d'autres infections gastro-intestinales en raison de leur effet drastique sur le microbiote intestinal (10).

Contrairement aux infections digestives à *E. coli*, le traitement des infections à ExPEC est nécessaire. La nitrofurantoïne, l'association sulfaméthoxazole-triméthoprime, la fosfomycine, les fluoroquinolones ou les β -lactamines (pivmécillinam, amoxicilline avec ou sans acide clavulanique,

céphalosporines) sont généralement utilisées dans le traitement par voie orale des cystites simples ou à risque de complication. Le traitement par voie parentérale sera privilégié lors d'infections profondes et/ou sévères (pyélonéphrites à UPEC, méningites à MNEC, bactériémies,...) : céphalosporines de 3^{ème} génération, aminosides, fluoroquinolones ou carbapénèmes (17).

En Europe cependant, la résistance aux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à *E. coli* ne cesse de croître, et l'adaptation du traitement secondairement à l'antibiogramme est nécessaire.

C. Mécanismes de résistance acquis

Plusieurs mécanismes de résistance acquis ont été observés chez *E. coli*. Ils peuvent être chromosomiques (mutations de la cible, hyperexpression de systèmes d'efflux ou inactivation de porines) ou plasmidiques (production d'enzymes inactivatrices, protection de la cible).

a. Diminution de la perméabilité

Ce mécanisme est lié aux propriétés physico-chimiques de l'antibiotiques ainsi qu'à la structure de la paroi bactérienne. Chez les BGN, la barrière constituée par le lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe s'oppose à la pénétration des antibiotiques hydrophobes ou de haut poids moléculaire. Les porines sont des protéines membranaires formant des canaux, permettent le passage de molécules hydrophiles comme les pénicillines à large spectre, les céphalosporines, les aminosides, certaines quinolones comme la ciprofloxacine, les phénicolés ou les tétracyclines. Une mutation ou une diminution de l'expression des porines peut entraîner la résistance à certains antibiotiques. Chez *E. coli*, la perte de la porine OmpC réduit la sensibilité aux carbapénèmes et aux céphalosporines de 4^{ème} génération (22). Des mutants d'*E. coli* avec une diminution de l'expression de la porine OmprF présente une sensibilité 2 à 4 fois moins importante aux quinolones (17).

b. Efflux

L'efflux est un mécanismes de transport actif par lequel les cellules rejettent à l'extérieur les composés toxiques comme les antibiotiques. *E. coli* possède plusieurs pompes à efflux de natures différentes. La plus importante est le système AcrAB/TolC composé du transporteur membranaire AcrB, de la protéine de fusion AcrA et d'une troisième protéine de la membrane externe TolC. Il a été montré que l'hyperexpression de cette pompe à efflux conduit à un phénotype de multirésistance aux antibiotiques notamment aux β -lactamines et aux quinolones chez *E. coli* (23,24). Deux pompes à efflux

plasmidiques OqxAB et QepA ont également été décrites comme responsables de la résistance aux quinolones chez *E. coli* (17).

c. Modification de la cible

Les mutations de *gyrA* et *parC* sont les mutations de résistance aux quinolones les plus fréquemment observées chez *E. coli*. Elles sont localisées dans une région appelée « quinolone resistance determining region » (QRDR). Les mutations les plus souvent retrouvées de GyrA sont celles concernant les amino-acides Ser-83 et Asp-87 et les codons Ser-80 et Glu-84 pour ParC (17). Les mutations de *gyrB* et *parE* ont un rôle mineur dans l'acquisition de résistance aux quinolones chez *E. coli*. Par ailleurs, une famille de gènes plasmidiques *qnr* a été décrite comme entraînant la résistance aux quinolones chez les entérobactéries. Ces gènes codent pour des peptides protecteurs de l'ADN gyrase ou du complexe ADN-topoisomérase empêchant la fixation des quinolones et inhibant ainsi leur activité.

Récemment, un nouveau mécanisme de résistance aux aminosides d'importance croissante a été décrit : la méthylation de l'ARN ribosomique 16S par une enzyme la méthyltransférase. Plusieurs gènes de méthylases de l'ARNr 16S comme *armA*, *rmtB*, *rmtC* et *npmA* ont été observés chez les entérobactéries dans différentes zones géographiques (25). Ces gènes entraînent une résistance pan-aminosides avec des niveaux de résistance élevés (concentrations minimales inhibitrice ≥ 128 mg/L) (25).

d. Enzymes inactivatrices ou modificatrices

La présence d'enzymes inactivatrices ou modificatrices plasmidiques est le mécanisme de résistance aux aminosides et aux β -lactamines le plus fréquemment rencontré chez *E. coli*.

Les enzymes modificatrices d'aminosides sont de trois types selon la modification apportée à la structure de l'antibiotique : les acétyltransférases (AAC), phosphotransférases (APH) et nucléotidyltransférases (ANT). Les enzymes modificatrices prédominantes sont codées par *aac(3')-II*, *ant(2'')-Ia* et *aac(6')-Ib* (25). Ces gènes sont le plus souvent retrouvés sur des plasmides ou des transposons, associés à d'autres gènes de résistance aux antibiotiques, augmentant leur sélection et leur dissémination. Il est connu qu'une seule de ces enzymes peut inactiver un ou plusieurs aminosides, mais plusieurs de ces enzymes peuvent être associées dans un isolat. Par ailleurs, l'expression de certains variants de l'aminoside acétyltransférase AAC-6' (*aac(6')-Ib-cr*) chez *E. coli* entraîne la résistance à ciprofloxacine.

La production de β -lactamases est le principal mécanisme de résistance des entérobactéries aux β -lactamines. Ce sont des enzymes inactivatrices synthétisées par la bactérie, capables de se lier aux β -lactamines sur leur site de fixation aux PLP puis de les hydrolyser. Elles sont acquises de façon horizontale grâce à un support génétique mobile (plasmide ou transposon) et peuvent être de plusieurs type : pénicillinases de haut et bas niveau, pénicillinases résistantes aux inhibiteurs (TRI), oxacillinases, céphalosporinases de haut niveau acquises ou hyperproduites, β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et carbapénémases.

➤ **B-lactamases à spectre étendu**

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes conférant une résistance (ou une diminution de l'activité) à une vaste gamme de β -lactamines (les pénicillines G, pénicillines M, les carboxy et uréido-pénicillines, les céphalosporines ainsi que l'aztréonam). Elles ne confèrent pas de résistance aux céphamycines et aux carbapénèmes et sont sensibles à l'action des inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique ou le tazobactam. Plus de 500 types de BLSE sont décrites et 3 types majeurs d'enzymes ont été observés : les enzymes de type TEM (160 enzymes), de type SHV (110 enzymes) et les CTX-M largement répandues (172 enzymes différentes) (26). En Europe occidentale, les bêta-lactamases CTX-M, décrites principalement chez les *E. coli* représentent le groupe le plus répandu dans les infections communautaires.

➤ **Céphalosporinases plasmidiques de type AmpC**

Ces enzymes sont dérivées du chromosome de certaines espèces d'entérobactéries mais ont été mobilisées sur des plasmides permettant leur transfert horizontal. Leur prévalence diffère selon les populations mais est estimée bien inférieure à celle des BLSE chez *E. coli*. Les AmpC confèrent une résistance aux pénicillines, aux céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération, aux céphamycines et à l'aztréonam et aucune récupération n'est observée avec les inhibiteurs de β -lactamases (10).

➤ **Carbapénémases**

Les carbapénémases sont des β -lactamases conférant une résistance aux carbapénèmes et ayant émergé au cours de la dernière décennie. Plusieurs types de carbapénémases ont été observés chez *E. coli*, et ces enzymes sont classées selon la classification d'Ambler (27). Ces enzymes peuvent être des β -lactamases de classe A comme KPC et GES, hydrolysant les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes et restant faiblement sensibles à l'effet des inhibiteurs de β -lactamases. Les enzymes KPC sont les plus répandues en Amérique, en Grèce, en Italie et en Israël et en Chine. On observe aussi des métallo-enzymes de classe B comme IMP, VIM et NDM-1 résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases et hydrolysant toutes les β -lactamines sauf l'aztréonam. Les métallo-enzymes de type

IMP sont localisées en Asie et sont très rares en Europe chez les entérobactéries, et celles de type VIM sont identifiées partout dans le monde et responsables de larges épidémies. On observe aussi des enzymes de classe D, un groupe d'enzymes très hétérogène dont l'OXA-48 est la principale représentante, puisqu'elle est retrouvée chez 85% des *E. coli* producteurs de carbapénémase en France (27).

D. *E. coli* multirésistants

Les BGN et notamment *E. coli* sont des acteurs importants dans la résistance aux antibiotiques avec l'émergence et la diffusion de souches multirésistantes (MDR) maintenant devenue relativement communes. La résistance aux antimicrobiens conduit à une efficacité réduite des antibiotiques rendant le traitement des patients infectés coûteux et difficile et parfois même impossible. Exceptionnellement, la résistance peut s'étendre à l'ensemble du répertoire des thérapeutiques disponibles ; ces souches sont dites pan-résistantes. Cette émergence et cette dissémination des souches MDR est une source d'inquiétude, devant l'absence de nouveaux traitements antibiotiques innovants actifs contre les BGN MDR. En raison de son écologie particulière et de sa plasticité génétique, *E. coli* devrait être considéré comme un « détecteur » de résistances aux antibiotiques. Cette bactérie a permis de confirmer la diffusion des mécanismes de résistances apparus plusieurs années auparavant comme les β -lactamases de type TEM-1 ou plus récemment les BLSE, les carbapénémases ou la résistance plasmidique aux quinolones. Certains de ces mécanismes de résistance ont fait émerger des clones dit à « risque élevé », facilitant la persistance et la dissémination de ces mécanismes de résistance à travers le monde. C'est le cas du clone B2 O25:H4 ST131 portant un plasmide IncFII, responsable de la dissémination de la BLSE de type CTX-M-15 (17). Ce clone est caractérisé par sa résistance aux fluoroquinolones, et aux céphalosporines à large spectre. Ce clone est aussi capable de recruter des gènes codant pour des carbapénémases puisque les enzymes OXA-48, NDM-1 et KPC ont été déjà rapportées chez *E. coli* ST131. Bien que la prévalence d'*E. coli* producteur de carbapénémases soit encore presque nulle en France en 2017, elle atteint déjà des taux supérieurs à 1% dans certains pays européens comme la Grèce, la Roumanie, la Bulgarie (données de l'ECDC <https://ecdc.europa.eu/>).

Dans un rapport récent de l'OMS, *E. coli* a été inclus dans une liste de 9 micro-organismes d'inquiétude internationale responsables d'une majorité d'infections communes en différents paramètres : communautaire, associées aux soins, transmises par la chaîne alimentaire (1). Ce rapport met en évidence que la résistance aux C3G et/ou aux fluoroquinolones dans les infections urinaires ou les bactériémies, limite les possibilités de traitement empirique. Selon le dernier rapport du centre européen de contrôle des maladies (ECDC) sur la résistance aux antibiotiques de 2016, en Europe, la

résistance aux C3G dans les isolats d'*E. coli* impliqués dans les infections invasives atteint 12,6%, et s'étend de 5% en Islande à presque 40% en Bulgarie. La plupart de ces isolats sont aussi résistants aux aminosides et aux fluoroquinolones et le pourcentage total d'isolats résistants aux 3 classes d'antibiotiques est proche de 5% en moyenne en Europe mais atteint 12,9% en Italie, 15% en Slovaquie et 22% en Bulgarie selon l'ECDC (<https://ecdc.europa.eu>).

Dans d'autres régions du monde, comme en Chine, en Inde ou au Moyen Orient, la résistance d'*E. coli* semble être plus importante encore. Une étude récente dans un hôpital chinois rapporte la présence d'isolats d'*E. coli* possédant de multiples gènes de résistance dont une carbapénémase (KPC-2), des BLSE (CTX-M-3, CTX-M-14, CTX-M-55), des enzymes modificatrices des aminosides et des gènes de résistances aux quinolones (28).

Ces données illustrent la prévalence croissante d'*E. coli* MDR à travers le monde et l'acquisition et l'accumulation de mécanismes de résistance dans des isolats déjà résistant à un antibiotique. Comme l'a souligné le dernier rapport de L'OMS en 2014 (1), la résistance aux antibiotiques a atteint une situation très préoccupante menaçant les « progrès de la médecine moderne ». La même année, le rapport de la commission O'Neill estime que dans 40 ans, le nombre de décès attribuable à la résistance aux antimicrobiens serait d'environ 10 millions par an, soit une cause plus importante que le cancer (29). Alors que l'innovation dans le développement de nouveaux antibiotiques semble restreinte, la prévention de la diffusion des entérobactéries productrices de carbapénémases est nécessaire (27).

II. Colistine

La colistine est un peptide antimicrobien cationique appartenant à la famille des polymyxines qui est une des premières classes d'antibiotiques ayant une activité sur la majorité des BGN. Également connue sous le nom de polymyxine E, elle a été isolée en 1947 d'une bactérie de l'environnement *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus* (30).

1. Structure

Les polymyxines sont constitués d'un heptapeptide cyclique lié à une tripeptide et une queue d'acides gras hydrophobes. Leur structure est comparable à celle des peptides antimicrobiens cationiques (CAMPs) qui représentent la première ligne de défense des cellules eucaryotes contre la colonisation bactérienne (31).

Deux molécules sont utilisées en pratique clinique la polymyxine B et la colistine (mélange de polymyxines E1 et E2). Elles diffèrent seulement par un acide aminé en position 6 (leucine pour la colistine et phénylalanine pour la polymyxine B) (Figure 5).

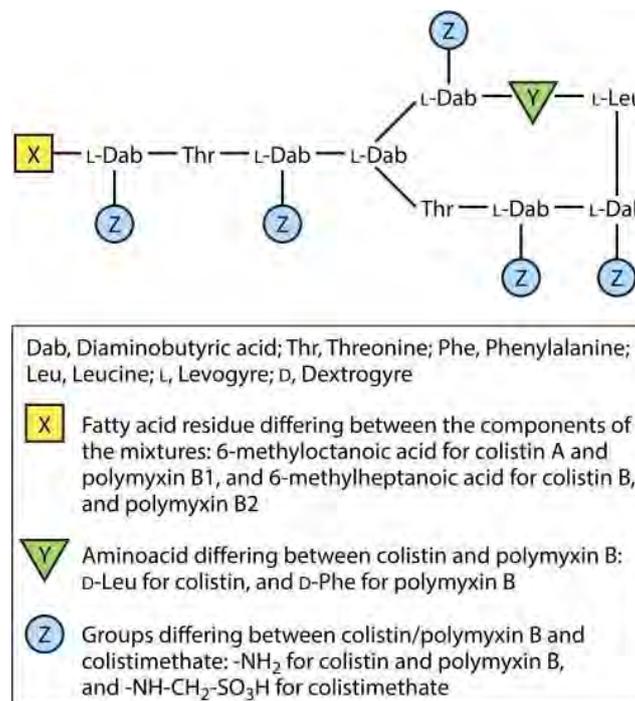


Figure 5 : Structure de la colistine, d'après Poirel et al. (3).

2. Mécanisme d'action

Les BGN possèdent une membrane externe composée, sur sa face externe, de lipopolysaccharide (LPS), dont un des constituants majeurs est le lipide A. A l'état physiologique, le LPS

chargé négativement est entouré de cations Mg^{2+} et Ca^{2+} . Une interaction entre les résidus α,γ -diaminobutyrique de la colistine chargés positivement et le lipide A du LPS chargé négativement, va déstabiliser ce dernier par déplacement des cations Mg^{2+} et Ca^{2+} . Les polymyxines peuvent alors s'insérer dans la membrane externe, entraînant une augmentation de la perméabilité membranaire, une fuite du matériel cellulaire et ainsi la lyse de la bactérie (32).

Par ailleurs, le LPS est séquestré par les polymyxines lors de la lyse bactérienne, ce qui lui confère une activité anti-endotoxinique (33). Enfin, un autre mécanisme d'action de la colistine est l'inhibition de la NADH-quinone oxydoréductase, une enzyme de la chaîne respiratoire aérobie (34).

3. Spectre d'action

La colistine est un antibiotique bactéricide concentration dépendant, présentant un spectre d'activité étroit. Il est actif sur la plupart des entérobactéries (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella spp.*, etc.), et certains BGN non fermentant (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*) (35).

La colistine n'a pas d'activité sur les cocci Gram-négatif, les bactéries à Gram-positif, et les anaérobies. Certaines entérobactéries telles que *Proteus spp*, *Providencia spp*, *Serratia marcescens* (35) et *Hafnia spp* (36) sont naturellement résistantes à la colistine. Certains autres espèces de BGN n'y sont pas sensible : *Pseudomonas mallei*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Brucella spp.*, *Legionella spp.*, *Campylobacter spp.*, et *Vibrio cholerae* (35).

4. Utilisation thérapeutique

a. Formulation

La colistine est la polymyxine la plus utilisée en pratique clinique. Elle est administrée sous forme de colistiméthate de sodium (CMS), une prodrogue inactive et moins toxique qui est partiellement hydrolysée *in vivo* en colistine. Le CMS est commercialisé sous la forme de poudre et solvant pour préparation injectable. L'administration peut se faire par voie intraveineuse ou intramusculaire (rarement utilisée car douloureuse) mais également par voie intrathécale ou intraventriculaire. En France la spécialité utilisée est Colimycine (Sanofi, France). Au niveau mondial, les deux formes commerciales les plus employées sont Colomycin (Forest Laboratories UK Limited, Dartford, United Kingdom) en Europe, et Coly-mycin M Parenteral (Monarch Pharmaceuticals, Inc., Bristol, TN) aux Etats-Unis (37). D'autres formulations permettent l'administration du CMS par nébulisation.

Dans l'Union Européenne, la dose de colistiméthate sodique (CMS) est prescrite et administrée en unités internationales (UI). Aux Etats-Unis, et dans d'autres parties du monde, la dose est exprimée en milligrammes d'activité de colistine base (CBA). La conversion est telle que 1 million d'UI CMS = 80 mg CMS = 30 mg CBA (37). Ces différentes expressions de la dose de colistine ont rendu la comparaison des données scientifiques peu aisée et ont entraîné des confusions et des erreurs médicamenteuses (38).

b. Indications thérapeutiques

Selon les recommandations de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) parues en 2014 (39) et l'avis de la commission de transparence de l'HAS rendu le 6 décembre 2017 (38), l'utilisation de la colistine par voie parentérale est restreinte au traitement d'infections sévères à bactéries aérobies à Gram négatif sensibles à la colistine en l'absence d'autre antibiotique actif in vitro; chez l'adulte, l'enfant et le nouveau-né. Son association à un autre antibiotique est recommandée afin de préserver son efficacité et d'éviter l'émergence d'isolats résistants (38).

La colistine a été commercialisée sous forme de sirops ou de comprimés utilisés en décontamination digestive des patients porteurs d'entérobactéries BLSE (non absorbé) mais cette utilisation n'est plus recommandée et les formes ont été retirées du marché. Elle reste utilisée par nébulisation pour les infections pulmonaires chroniques à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose (38).

La polymyxine B quant à elle, est commercialisée sous forme collyre et pommade ophtalmique pour le traitement des conjonctivites, kératites, ulcères cornéens à germes sensibles. Elle est aussi utilisée en solutions d'instillation auriculaire dans le traitement d'otites externes ou de suppurations auriculaires. Elle entre également dans la composition de capsules vaginales prescrites lors de vaginites.

c. Pharmacocinétique

L'activité antimicrobienne du CMS résulte de l'activité de la colistine métabolisée in vivo à partir du CMS. Après administration parentérale une grande partie du CMS est éliminée au niveau rénal, par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire et seulement 20-25 % de la dose de CMS administrée est hydrolysée en colistine. L'élimination de la colistine est majoritairement non rénale car elle subit une réabsorption tubulaire, mais les taux élevés de colistine urinaire s'expliquent par la conversion du CMS en colistine au niveau du tractus urinaire (40) (Figure 6).

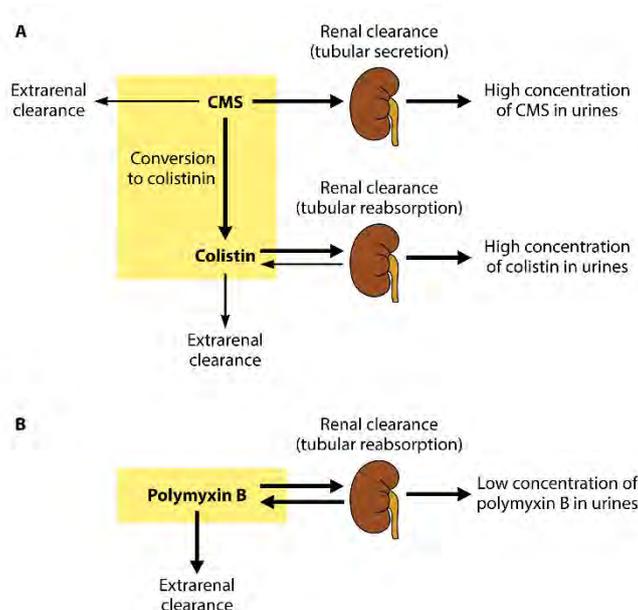


Figure 6 : Pharmacocinétique du CMS et de la colistine (A) et de la polymyxine B (B) d'après Poirel et al (32). L'épaisseur des flèches représente l'importance relative des voies d'élimination et de métabolisation dans le cas d'une fonction rénale normale.

La polymyxine B est administrée directement sous sa forme active, elle subit une réabsorption tubulaire et son élimination est majoritairement non rénale (40) (Figure 6).

d. Posologie

L'efficacité et la toxicité de la colistine sont dose dépendante, l'adaptation des posologies est donc particulièrement importante pour conserver l'effet antibiotique maximal afin d'éviter le développement de résistances et la survenue d'effets indésirables. Il n'existe pas encore de réel consensus sur les doses recommandées de colistine (41), même si les dernières données scientifiques semblent largement acceptées. Chez les patients présentant une fonction rénale normale, l'EMA recommande une administrations de 9 MUI par jour, répartie en 2 ou 3 prises en perfusion IV lente. Une dose de charge de 9 MUI peut-être réalisée lors d'infections particulièrement sévères (39). L'association à un autre antibiotique est conseillée lorsqu'elle est possible, en particulier lorsque la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la colistine pour la bactérie est $> 1\text{mg/L}$, que l'inoculum est fort ou que le site d'infection est profond (42). Par exemple, chez *A. baumannii*, *K.pneumoniae* et *P. aeruginosa*, l'association de la colistine aux carbapénèmes est synergique, et diminue le développement de résistances à la colistine en comparaison à la monothérapie par colistine (43).

Chez les insuffisants rénaux, l'élimination rénale de la colistine et du CMS est réduite. En conséquence, la quantité de CMS converti en colistine augmente et le risque de néphrotoxicité est

accru. Pour ces patients, *Dalfino et al* recommandent une dose de charge identique mais une dose de maintien de 4,5 MU par 24h lorsque la clairance de la créatinine est comprise entre 20 et 50 ml/min, et seulement 4,5 MUI toutes les 48h en dessous de 20 ml/min (32,44).

e. Toxicité

La toxicité actuelle du CMS après administration parentérale est plus faible que ce qui a été observé au début de son utilisation. Ceci s'explique car d'une part le CMS produit est plus pur qu'auparavant, et d'autre part le suivi de la fonction rénale dans les unités d'hospitalisation est meilleur (45). Cependant, la colistine est un médicament à marge thérapeutique étroite, et ses effets indésirables sont dose dépendants.

La neurotoxicité est réversible, et ses manifestations les plus fréquentes sont les paresthésies faciales et périphériques retrouvées chez 27% des patients. Des vertiges, ataxies, troubles visuels, confusion et très rarement des détresses respiratoires et apnées, ont également été rapportés (45).

La néphrotoxicité est l'effet indésirable le plus fréquent (6 à 55% des patients), sa survenue est rapide (dès la 1^{ère} semaine de traitement) et réversible dans la plupart des cas (46). Son risque de survenue est augmenté par la co-administration d'autres médicaments néphrotoxiques (vancomycine et aminosides en particulier) et par des facteurs liés au patient (âge avancé, pathologie rénale préexistante, hypoalbuminémie...).

Il a également été constaté des manifestations allergiques chez 2% des patients (eczéma, érythèmes...)(45).

f. Utilisation en médecine vétérinaire

La colistine a été largement utilisée en médecine vétérinaire, en traitement et prévention des infections gastro-intestinales à *E. coli* mais également en tant que facteur de croissance dans l'industrie agro-alimentaire. En 2011, la colistine était le 5^{ème} antibiotique le plus utilisé par l'industrie agro-alimentaire (7%) (47). Cette utilisation extensive a entraîné une augmentation des taux de résistances à la colistine chez les entérobactéries, notamment dans les élevages de porcs et de volailles. Malgré l'utilisation répandue de la colistine, le taux de résistances des souches d'*E. coli* isolées chez les animaux sains reste <1% en Europe (48). Il faut toutefois noter que des taux proches de 10% d'*E. coli* résistant à la colistine ont été retrouvés chez des porcs malades en Belgique. Des taux de résistances supérieurs ont été constatés sur des souches d'*E. coli* pathogènes isolées de porcs au Japon (12%) et en Chine (33%) (48).

Devant la nécessité de conserver l'efficacité de la colistine pour le traitement des infections à BGN multirésistants, l'augmentation des résistances dans les élevages porcins, et la possibilité de transmission horizontale de la résistance à la colistine (gène de résistance plasmidique) entre bactéries ou entre l'homme et l'animal, l'EMA a émis de nouvelles recommandations en 2016 (49) pour réduire l'utilisation de la colistine en médecine vétérinaire.

5. Etude de la sensibilité aux polymyxines

Bien que les polymyxines soient une ancienne famille d'antibiotiques, la méthode optimale de détermination de la sensibilité à la colistine n'a été identifiée que récemment. En raison de leurs propriétés cationiques, de leur mauvaise diffusion en milieu gélosé et de l'hétérorésistance de certaines souches (présence d'une sous population résistante au sein d'une population sensible), l'étude de la sensibilité aux polymyxines est difficile (32).

a. Microdilution en milieu liquide

La méthode de microdilution en milieu liquide (broth microdilution BMD) est la méthode de référence, recommandée par le Clinic and Laboratory Standards Institute (CLSI) et l'European Comity on Antimicrobial Suceptibility Testing (EUCAST) en mars 2016 (50) . Elle est reproductible, fiable et mais difficilement automatisable. Selon les recommandations du CLSI une gamme de concentration de colistine (0,12 à 512 mg/L) est réalisée dans un milieu Mueller Hinton ajusté en cation (CA-MHB), et un inoculum bactérien de 5.10^5 CFU/ml est ajouté à chaque puits. Après 16 à 24h d'incubation à $35 \pm 2^\circ\text{C}$, la CMI de la colistine pour la bactérie est lue. Elle correspond à la plus petite concentration en colistine inhibant toute croissance visible de la bactérie. Cette méthode est réalisée en plaque de micro-titration (volume final de 100 μL). Sur le même principe, la méthode de macrodilution en milieu liquide est réalisée en tubes standards (volume final de 2mL). Ces deux techniques sont malheureusement peu adaptées à l'activité des laboratoires de biologie médicale (LBM) car elles sont longues et nécessitent une solution de colistine préparée extemporanément.

La méthode de dilution en milieu gélosé n'est plus recommandée par le CLSI et l'EUCAST (50).

b. Méthodes utilisées en routine

La mauvaise diffusion de la colistine en milieu gélosé rend les méthodes de diffusion en milieu gélosé et les E-test peu reproductibles et peu sensibles. Le CLSI et l'EUCAST ont donc conseillé leur abandon en 2016 et préconisent en routine l'utilisation de dispositifs commerciaux de BMD ou de systèmes automatisés pour la détermination des CMI (50).

➤ Dispositifs commerciaux de BMD

Plusieurs systèmes de BMD ont été développés récemment pour améliorer et faciliter la détection de la résistance à la colistine en LBM : SEMPA1 (custom Sensititre plate, Thermo Fisher Scientific, East Grinstead, UK), MICRONAUT-S and MICRONAUT MIC-Strip (MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim, Allemagne), SensiTest (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italie) and UMIC (Biocentric, Bandol, France). Ces dispositifs sont constitués de cupules contenant des gammes de dilution de colistine lyophilisée, il suffit d'ajouter une suspension bactérienne d'inoculum défini à chaque puits (51). La lecture est réalisée après une nuit d'incubation à 37°C. Selon les fournisseurs, le test peut être unique, ou plusieurs souches peuvent-être testées en même temps (8 pour MICRONAUT-S et 4 pour SensiTest). Dans le système sensititre un panel complet d'antibiotiques est testé (51). Les corrélations de ces tests à la méthode de référence sont très satisfaisants, en particulier pour la plaque Sensititre (96%) et les deux tests de MICRONAUT (96 et 99%) (51).

➤ Systèmes automatisés

Quatre automates permettent de déterminer la sensibilité à la colistine : Vitek 2 system (bioMérieux, Marcy-L'étoile, France), BD Phoenix automated microbiology system (BD Diagnostics, New Jersey, US) qui peuvent rendre des résultats rapides (4 à 16h de pousse) ; MicroScan system (Beckman Coulter Diagnostics, Fullerton, US) et Sensititre system (Thermo Fisher Scientific). Ce sont tous des automates d'incubation et de lecture : des suspensions bactériennes sontensemencées dans des cartes contenant des panels de dilutions d'antibiotiques, les cartes sont incubées dans l'automate et la croissance bactérienne dans les puits est déterminée par lecture optique.

Les concentrations testées par le Vitek 2 vont de 0,5 à 16 µg/ml, ce système est moins sensible que la méthode de référence pour détecter la résistance à la colistine pour les BGN et ne permet pas la détection des sous populations hétéro-résistantes.

Le Phoenix teste les concentrations de 0,5 à 4 µg/ml. Sur les isolats résistants à la colistine, le système présente un taux élevé de faux sensibles (12%) et il est notamment peu performant pour la détection d'hétérorésistances chez *E. cloacae* et *K. pneumoniae* mais détecte efficacement la résistance plasmidique à la colistine (52).

Comparée à la BMD, le système MicroScan peut catégoriser de façon correcte la sensibilité des isolats d'*Acinetobacter* et de *K.pneumoniae* (87 et 88%) (32).

L'automate de Sensititre présente une large gamme de dilution (0.12 to 128 µg/ml) et présente une très bonne corrélation avec la BMD (96%) avec aucune fausse sensibilité retrouvée, mais une seule étude a été réalisée (32).

Quel que soit l'automate, il semble qu'en cas d'utilisation thérapeutique, la CMI de la colistine doit être confirmée par la méthode de référence comme le préconise les recommandations du CLSI et de l'EUCAST en 2017 (50,51).

➤ Méthodes qualitatives de dépistage

Un test rapide, le Rapid Polymyxin test (ELITechGroup, Puteaux, France) permet la détection en 2h de la résistance à la colistine chez les entérobactéries (Rapid Polymyxin™ NP (Figure 7)), *P. aeruginosa* (Rapid Polymyxin™ Pseudomonas), et *A. baumannii* (Rapid Polymyxin™ Acinetobacter). Il est basé sur la détection de la croissance bactérienne dans un milieu de culture contenant de la colistine 3,75 µg/ml. Un indicateur de pH (rouge de phénol) permet le virage du milieu orange au jaune s'il y a croissance bactérienne (métabolisation du glucose contenu dans le milieu et production d'acide). La bactérie est résistante à la colistine si le milieu est jaune, et sensible à la colistine s'il n'y a pas de changement de couleurs. La spécificité et la sensibilité de ce test ont été respectivement évaluées à 99,3% et 95,4% par rapport à la méthode de BMD (53). Il détecte également la présence de sous-populations hétéro-résistante et peut être utilisé directement sur les hémocultures pour détecter la résistance à la colistine des entérobactéries (détection en 4h) (54).

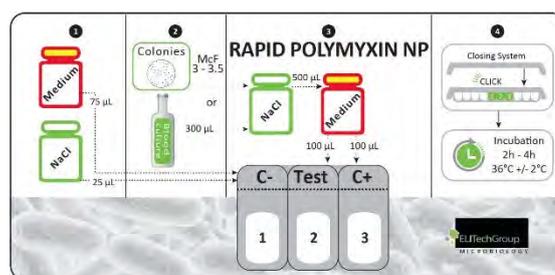


Figure 7 : Rapid Polymyxin NP (ELITechGroup) permet la détection de la résistance des entérobactéries à la colistine en 2h.

Le milieu de culture sélectif SuperPolymyxin (ELITechGroup) permet la détection des BGN résistants à la colistine (Figure 8). Il s'agit d'une gélose d'éosine méthylène bleu additionnée de daptomycine, d'amphotéricine B (inhibition de la croissance des Gram positifs et des champignons) et de 3,5 µg/ml de colistine. Sur le milieu, les colonies de BGN fermentant le lactose (entérobactéries) sont noires alors que les BGN non fermentant donnent des colonies incolores ou lavandes. La

sensibilité et la spécificité de ce milieu de culture ont été évaluées à 100% (55). Il est particulièrement adapté au dépistage de BGN résistants à la colistine à partir d'échantillons rectaux et permet notamment une bonne détection des souches portant une résistance plasmidique à la colistine (55,56).



Figure 8 : Exemple d'identification de BGN résistants à la colistine grâce au milieu SuperPolymyxin (ELITechGroup).

c. Critères d'interprétation

Il n'existe pas encore de réel consensus entre les deux organisations définissant les critères d'interprétations de la sensibilité à la colistine, l'EUCAST et le CLSI (**Tableau 2**). Cependant, les deux ont récemment retiré les diamètres critiques pour la colistine et déconseillent l'utilisation des méthodes de diffusion en milieu gélosé pour l'étude de la sensibilité à la colistine (**Tableau 2**). Par ailleurs, les concentrations critiques de la colistine pour *P. aeruginosa* ont été abaissées depuis les recommandations 2017 de l'EUCAST.

Tableau 2 - Concentrations critiques pour la colistine et la polymyxine B selon l'EUCAST et le CLSI en 2018.

Critères d'interprétation	Charge du disque	Colistine				Polymyxine B			
		Diamètre (mm)		CMI (ug/ml)		Diamètre (mm)		CMI (ug/ml)	
		S	R	S	R	S	R	S	R
Entérobactéries	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLSI	<i>Acinetobacter sp</i>	-	-	$\leq 2^{a, b}$	$\geq 4^{a, b}$	-	-	$\leq 2^{a, b}$	$\geq 4^{a, b}$
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	$\leq 2^a$	$\geq 4^a$	-	-	$\leq 2^a$	$\geq 8^a$
EUCAST	Entérobactéries	-	-	≤ 2	≥ 2	-	-	≤ 2	≥ 2
	<i>Acinetobacter sp</i>	-	-	≤ 2	≥ 2	-	-	≤ 2	≥ 2
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	≤ 2	≥ 2	-	-	-	-

Seule la méthode de BMD est approuvée pour la détermination des CMI pour la colistine. Les méthodes de diffusion en milieu gélosé ne doivent plus être pratiquées car elles ne permettent pas de détecter toutes les résistances acquises.

^a CMS devrait être administré avec une dose de charge à la posologie maximale, en association avec d'autres antibiotiques

^b Applicables pour le complexe *A.baumannii* seulement

d. Complexité de l'étude de la résistance à la colistine

➤ **Concentration en cations**

Le matériel employé dans les méthodes de détermination de la résistance à la colistine a beaucoup d'impact sur les résultats obtenus. La résistance à la polymyxine est médiée par un système à deux composantes qui répond à la concentration en cations du milieu et aux variations de pH. Les deux paramètres varient selon les différents milieux MH commercialisés, et il a été observé une sous-détection des résistances à la colistine ou des populations hétérorésistantes d'*E. cloacae* sur MH. Le CLSI recommandent donc des milieux dit « ajustés en cations » (CA-MHB). Cependant, une étude récente a révélé que les CMI de la colistine pouvaient être mal estimées si elles étaient réalisées sur milieu ajusté en cation (surestimées pour *P. aeruginosa* et *A. baumannii* et sous-estimées pour *E. coli*) (32).

➤ **Adhérence aux plastiques**

En raison de leurs propriétés cationiques, les polymyxines adhèrent au polypropylène, polystyrène (chargés négativement) des plaques de titration utilisées pour la méthode BMD. Ce phénomène est plus marqué pour des concentrations faibles de colistine, et entraîne des variations significatives inter-laboratoire pour les résultats de CMI obtenus par BMD (57). Le polysorbate 80 (ou Tween 80) a longtemps été utilisé dans la préparation des plaques de BMD pour déterminer la sensibilité à la colistine. Ce surfactant était recommandé par le CLSI pour limiter l'adhérence des polymyxines au plastique. Cependant, il a été révélé que son ajout diminuait les CMI de la colistine de 4 à 8 fois. Par ailleurs, son effet sur la viabilité des bactéries n'a pas été évalué, mais il pourrait avoir une action synergique avec la colistine, ce qui expliquerait les CMI plus faibles obtenues. En janvier 2014, le CLSI a donc déconseillé son utilisation dans la détermination de la sensibilité à la colistine par BMD (57). La solution pour diminuer l'adhérence de la colistine aux plastiques serait l'utilisation de plaques en verre, mais elles sont fragiles et couteuses.

➤ **Subcultures et conservation**

Une perte de la résistance à la colistine chez *K. pneumoniae*, *A. baumannii* et *P. aeruginosa* a été observée après 6 à 8 mois de conservation à -70°C (58). Une étude de Li et al a également mis en évidence une perte de la résistance à la colistine après des cultures successives sans pression de sélection chez *A. baumannii* (59).

6. Mécanismes de résistance à la colistine

a. Résistance naturelle

Chez *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens* la résistance à la colistine est liée à l'expression constitutive de l'opéron *arnBCADTEF* (*pmrHFIJKLM*) et/ou du gène *eptB*, entraînant l'addition de groupements cationiques sur le LPS : phosphoethanolamine (pEtN) et/ou de 4-amino-4deoxy-L-arabinose (L-Ara4N). En diminuant la charge négative du LPS, ces modifications diminuent la fixation des polymyxines sur celui-ci.

b. Mécanismes de résistances chromosomiques acquises à la colistine

La réintroduction de la colistine en thérapeutique et son utilisation croissante ont conduit à l'émergence de résistances chez plusieurs espèces d'entérobactéries : *E. coli*, *K.pneumoniae*, *S. enterica*.... Le principal mécanisme de résistance à la colistine est la modification du LPS bactérien par ajout de groupements cationiques. De façon similaire à ce qui est observé dans la résistance intrinsèque à la colistine, les altérations du LPS sont obtenues principalement par l'addition sur le lipide A, de pEtN ou de L-Ara4N. Ces substitutions cationiques augmentent la charge positive du lipide A, ce qui empêche la liaison aux polymyxines et conduit à l'apparition de résistance (32).

➤ **Gènes impliqués dans la modification du LPS**

La biosynthèse de L-Ara4N et de pEtN est régulée par plusieurs gènes. Le gène *pmrC*, code pour une phosphotransférase qui ajoute le pEtN sur le LPS (60). L'opéron *pmrHFIJKLM-pmrE* (aussi connu comme opéron *arnBCADTEF*) code pour 7 protéines permettant la synthèse du groupement arabinose (L-Ara4N) à partir d'UDP-glucose et sa fixation sur le lipide A (**Figure 9**)(61).

La synthèse de ces groupements cationiques est contrôlée par des systèmes de régulation à deux composants : PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ (**Figure 9**). Ces systèmes sont habituellement activés lorsque la bactérie est phagocytée par les macrophages, ce sont donc ses systèmes de défense. La cascade d'activation et de régulation de ces gènes amenant à la synthèse de pEtN et de L-Ara4N a d'abord été étudiée chez *E. coli* et *Salmonella enterica* mais des voies similaires existent chez les autres BGN (32).

➤ **Système PmrAB**

PmrB est une protéine à activité tyrosine kinase qui sous l'influence de plusieurs facteurs environnementaux (concentration périplasmique en Fe^{3+} , Al^{3+} ou acidité du milieu) s'autophosphoryle

et phosphoryle PmrA. PmrA ainsi activée, active la transcription des opérons *pmrCAB*, *pmrHFIJKLM* et de *pmrE*, impliqués dans les modifications du LPS (Figure 9) (60).

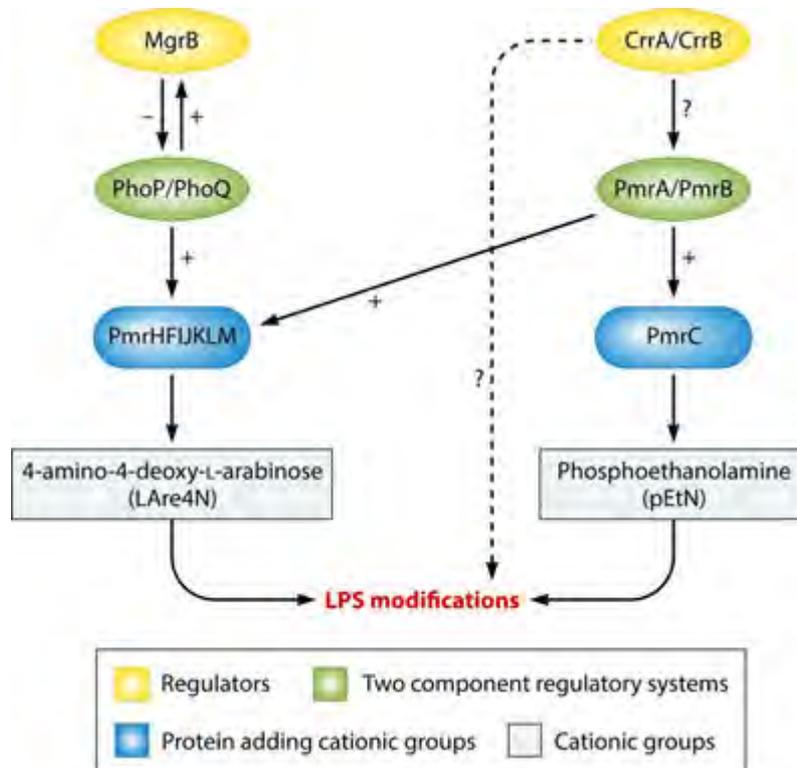


Figure 9 : Régulation des modifications du LPS chez *E. coli* d'après (3).

Des mutations spécifiques de *pmrA* et *pmrB* sont décrites comme responsables de la résistance acquise à la colistine chez *K. pneumoniae* (32,62–65), *E. aerogenes* (66) et *S. enterica* (32,67). Ces modifications entraînent l'activation constitutive de PmrA/PmrB ce qui amplifie la transcription des gènes régulés par ce système et conduit au transfert des groupements cationiques sur le lipide A (pEtN et L-Ara4N) (Figure 9).

➤ Système PhoPQ

De la même manière, pour le système PhoP/PhoQ : sous l'influence du milieu périplasmique (faible concentration en Mg^{2+} et acidité du milieu), la kinase PhoQ s'active et phosphoryle la protéine régulatrice PhoP, qui à son tour active l'opéron *pmrHFIJKLM* (61). En conséquence, le groupement cationique L-Ara4N est synthétisé et fixé au lipide A.

Plusieurs mutations de *phoP* (63,65,68) et *phoQ* (63,65) sont responsables de la résistance acquise aux polymyxines chez *K. pneumoniae*. Elles provoquent l'activation constitutive de ces gènes, donc la synthèse permanente de L-Ara4N et son transfert sur le lipide A (**Figure 9**).

➤ **Régulateurs des systèmes à deux composantes PmrAB et PhoPQ**

Le gène régulateur *mgrB* agit aussi sur ces systèmes à deux composantes en exerçant un rétrocontrôle négatif sur le système PhoP/PhoQ (**Figure 9**). L'interruption du gène *mgrB* par des séquences d'insertion entraîne son inactivation et augmente ainsi la transcription de l'opéron *phoPQ*. Ce mécanisme a été décrit chez *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* (65,69–71), il semble être le principal mécanisme de résistance acquise à la colistine chez *K. pneumoniae*. Des substitutions, des mutations non-sens et des délétions dans ce gène, ont également été rapportées comme responsables de l'acquisition de résistance à la colistine chez *K. pneumoniae* (63,65,70).

L'opéron *CrrAB* code pour la protéine régulatrice CrrA et la protéine senseur kinase CrrB. Leur rôle physiologique est encore inconnu cependant l'inactivation de CrrB conduit à l'hyper-expression de l'opéron *pmrAB* et donc aurait un rôle dans la résistance à la colistine. L'inactivation de CrrB modifie également le lipide A par activation d'une glycosyltransférase. Plusieurs substitutions dans la protéine ont été identifiées comme responsables de la résistance acquise à la colistine chez *K. pneumoniae* (72–74).

c. Résistances plasmidiques à la colistine

En novembre 2015, un gène plasmidique transférable conférant une résistance à la colistine a été décrit chez *E. coli* et *K. pneumoniae* en Chine (75). Il s'agit du gène *mcr-1*, codant pour une phosphoethanolamine transférase, qui ajoute un groupement pEtN sur le lipide A comme ce qui a été observé pour les mutations chromosomiques. L'acquisition de ce gène *mcr-1* confère un bas niveau de résistance à la colistine, difficilement détectable par les méthodes de diffusion en milieu gélosé utilisées en routine au laboratoire à l'époque. Sa présence est cependant suffisante pour entraîner la résistance à la colistine chez les entérobactéries puisque l'augmentation des CMI de la colistine est de 4 à 8 fois. Ce gène *mcr-1* a ensuite été décrit dans des entérobactéries d'espèces variées (*Enterobacter spp*, *Salmonella spp*, *Shigella...*) isolées chez l'homme, l'animal, dans l'alimentation et dans l'environnement (32).

La découverte d'un autre gène plasmidique de résistance *mcr-2* chez *E. coli* a suivi en juin 2016 en Belgique (76). Puis 6 autres gènes mobilisables entraînant la résistance à la colistine ont été observés entre 2017 et 2018 : *mcr-3* chez un isolat animal d'*E. coli* en Chine (77), *mcr-4* chez *Salmonella*

et *E. coli* chez le porc en Italie, en Espagne et en Belgique (78), *mcr-5* chez *Salmonella paratyphi B* en Allemagne (79), *mcr-6* chez *Moraxella spp* au Royaume-Uni (80), *mcr-7* chez *Aeromonas spp* en Chine (81) et très récemment *mcr-8* chez *K.pneumoniae* NDM en Chine (82). Des variants de ces gènes ont également été décrits depuis 2016 (Tableau 3). Ces résistances plasmidiques suggèrent la possibilité d'acquisition et de diffusion rapide de cette résistance, à l'instar de ce qui est connu pour d'autres mécanismes plasmidiques de résistance.

➤ Environnement génétique

L'environnement génétique et l'acquisition de *mcr-1* ont été très étudiés, puisqu'il est le premier gène de ce genre décrit. Ce gène et ses variants ont été retrouvés sur des plasmides conjugatifs, c'est-à-dire des plasmides codant pour le matériel génétique nécessaire à la synthèse de pili sexuels type IV et au transfert d'ADN horizontal entre bactéries d'espèces identiques ou non. Les plasmides sur lesquels ont été retrouvés *mcr-1* sont de nature différente (IncI2, IncHI2, IncP, IncX4, IncFI, and IncFIB) et de taille variée (58 to 251 kb) (83).

Le gène *mcr-1* et son promoteur P₁-*mcr-1* sont inclus dans la cassette *mcr-1* qui peut être mobilisée par transposition (83). La séquence d'insertion ISApI1 est souvent retrouvée en amont de la cassette *mcr-1* et parfois en aval de celle-ci, elle code pour une enzyme responsable de la transposition du gène (transposase) et une protéine régulatrice (Figure 10). La cassette *mcr-1* de 2,6 kb, entourée des deux séquences d'insertion forme le transposon Tn6330 responsable de la mobilisation de ce gène de résistance à la colistine (83). Le gène *mcr-1* a également été retrouvé sur le chromosome d'un isolat d'*E. coli* en Suisse, ce gène peut donc être intégré de façon permanente au génome (84).

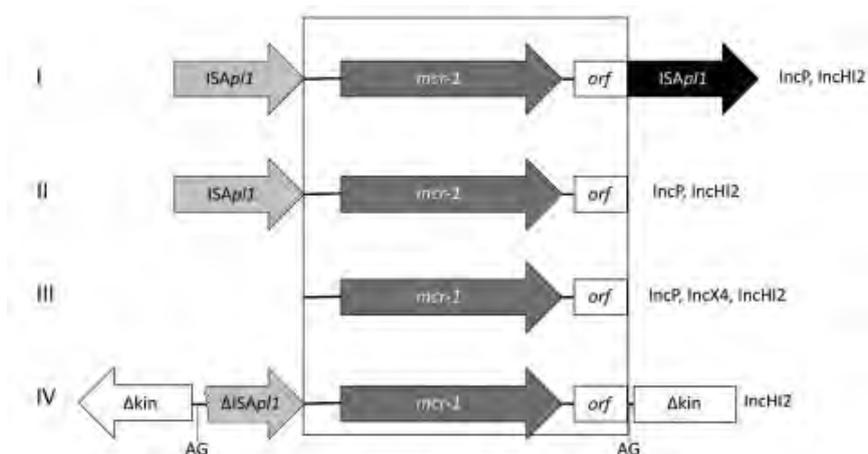


Figure 10 : Environnement génétique du gène *mcr-1* d'après (83)

I) ISApI1 associée à *mcr-1* en région 5' ; II) 2 copies d'ISApI1 encadrant *mcr-1* en 5' et 3' ; III) *mcr-1* non associé à ISApI1 ; IV) copie tronquée de ISApI1 associée à *mcr-1* en région 5' et insérés dans un gène de kinase. IS séquence d'insertion ; *orf* cadre de lecture.

A l'instar de *mcr-1* et de ses variants, la majorité des autres gènes *mcr* (*mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-7*, *mcr-8*) ont été observés sur des plasmides conjugatifs. De la même façon, de part et d'autre du gène plasmidique *mcr-2* la séquences d'insertion IS1595 a été observée (76); *mcr-8* est encadré par la séquence d'insertion IS903B (82) et plusieurs séquences d'insertion différentes existent autour de *mcr-3* (77). Autour du gène plasmidique *mcr-7*, il n'a cependant pas été retrouvé d'élément mobilisables. Il est possible que le gène ait été immobilisé sur le plasmide, par la perte des séquences d'insertions l'entourant (81).

A l'inverse les gènes *mcr-4* et *mcr-5* ont été décrits sur des plasmides non conjugatifs c'est-à-dire que leur mobilisation nécessite la présence d'un plasmide conjugatif dont ils vont utiliser les propriétés de transfert. Ces gènes sont aussi transposables : la séquence d'insertion IS5 est retrouvée en aval du gène *mcr-4* (85) et le gène *mcr-5* est localisé dans le transposon Tn6452 chez *Salmonella paratyphi B* (79).

mcr-1.10 et *mcr-6* ont été décrits sur le chromosome d'isolats porcins de *Moraxella*, ils sont associés au gène *pap-2* en aval. Cette association est similaire à celle qui a été observée chez *Kluyvera* et qui a permis la mobilisation des gènes *bla_{CTX-M}* de *Kluyvera* à d'autres entérobactéries. La conservation de l'unité *mcr-pap2* au sein d'isolats de *Moraxella* suggère que cette bactérie est probablement un réservoir naturel de *mcr*, à partir duquel il peut être mobilisé via des séquences d'insertion (80). Le gène plasmidique *mcr-2* retrouvé chez un isolat d'*E. coli* porcine est aussi associé au gène *pap-2*, suggérant que son origine probable serait aussi la bactérie *Moraxella* (76).

La plupart des plasmides portant le gène *mcr-1* comportent également d'autres gènes de résistance aux antibiotiques : β -lactamines, aminosides, quinolones, fosfomycine, sulfamides et tétracyclines. La localisation de ce plasmide *mcr-1* sur des plasmides MDR est une source d'inquiétude : en effet l'utilisation d'autres antibiotiques que les polymyxines peut aboutir à la sélection d'isolats contenant *mcr-1* et à leur diffusion. Par ailleurs, le gène *mcr-1* a été décrit chez des entérobactéries contenant des plasmides codant pour des carbapénémases (*bla_{NDM-1}*, *bla_{NDM-5}*, *bla_{NDM-9}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{KPC-2}*, et *bla_{VIM-1}*) (32).

Tableau 3 - Caractéristiques des gènes de résistance plasmidiques *mcr* décrits.

Gène et variants	Taille(bp ^a)	Localisation	CMI ^b	Origine	Hôte	Source	Pays	Référence
<i>mcr-1</i>	1626	Plasmide conjugatif	4 à 8 mg/L	<i>Paenibacillus</i>	<i>E. coli</i>	Porc	Chine	(75)
<i>mcr-1.2 (Q3L)</i>		Plasmide conjugatif	8 mg/L	<i>spp</i>	<i>K. pneumoniae</i> KPC	Enfant leucémique	Italie	(86)
<i>mcr-1.3 (F16L/ I38V)</i>		Plasmide conjugatif			<i>E. coli</i>	Poulet	Chine	(87)
<i>mcr-1.4 (D439N)</i>		Plasmide conjugatif			<i>E. coli</i>	Eaux usées hospitalières	Chine	(88)
<i>mcr-1.5 (H452Y)</i>		Plasmide conjugatif			<i>E. coli</i>	IU humaine	Argentine	(89)
<i>mcr-1.6 (T215A, R536H)</i>		Plasmide conjugatif			<i>S. enterica</i>	Portage sain humain	Chine	(90)
<i>mcr-1.7 (A215T)</i>		Plasmide conjugatif			<i>E. coli</i>	Eaux usées hospitalières	Chine	(88)
<i>mcr-1.8 (Q3R)</i>		Plasmide conjugatif	-		-	-	Brunei	-
<i>mcr-1.9 (D346N)</i>		Plasmide conjugatif	4 mg/L		<i>E. coli</i> ETEC	Diarrhée chez un enfant	Chine	(91)
<i>mcr-1.10 (7 substitutions)</i>		Chromosomique	2 mg/L	<i>Moraxella spp</i>	<i>M. porci</i>	Porc	Royaume-Uni	(80)
<i>mcr-2</i>	1617	Plasmide conjugatif	4 à 8 mg/L	<i>Moraxella spp</i>	<i>E. coli</i>	Porc et bovin	Belgique	(76)
<i>mcr-2.1 (8 substitutions)</i>		Chromosomique	1 à 2 mg/L	-	<i>M. pluranimalium</i>	Porc	Royaume-Uni	(80)
<i>mcr-3</i>	1626	Plasmide conjugatif	4 mg/L	<i>Aeromonas spp</i>	<i>E. coli</i>	Porc	Chine	(77)
<i>mcr-3.2 (T488I)</i>		Plasmide conjugatif	4 mg/L		<i>E. coli</i> BLSE	Bactériémie humaine	Danemark	(92)
<i>mcr-3.3 (22 substitutions)</i>		Chromosomique	2 mg/L		<i>Aeromonas veronii</i>	Poulet	Chine	(93)
<i>mcr-3.4 (G373V)</i>		Plasmide conjugatif			<i>K. pneumoniae</i>	Pus humain	Thaïlande	-
<i>mcr-3.5 (M23V, A456E, T488I)</i>		Plasmide conjugatif	4 mg/L		<i>E. coli</i>	Abcès humain	Chine	(94)
<i>mcr-4</i>	1629	Plasmide non conjugatif	2 à 4 mg/L	<i>Shewanella spp</i>	<i>S. enterica</i> serovar <i>typhimurium</i>	Porc et GEA humaine	Italie	(78)
<i>mcr-4.2 (Q331R)</i>		Plasmide non conjugatif	2 à 4 mg/L		<i>E. coli</i>	Porc	Espagne et Belgique	(85)
<i>mcr-4.3 (V236F)</i>		Plasmide non conjugatif	4 mg/L		<i>S. enterica</i>	Porc	Europe	(95)
<i>mcr-5</i>	1644	Plasmide non conjugatif	4 à 8 mg/L	Inconnue	<i>S. enterica</i>	Volaille et aliments	Allemagne	(79)
<i>mcr-5.2 (E234*)</i>		Plasmide non conjugatif	4 mg/L	Inconnue	<i>E. coli</i>	Porc	Allemagne	(96)
<i>mcr-6 (= mcr-2.2)</i>	1617	Chromosomique	1 à 2 mg/L	<i>Moraxella spp</i>	<i>M. pluranimalium</i>	Porc	Royaume-Uni	(80)
<i>mcr-7</i>	1620	Plasmide conjugatif	4 mg/L	<i>Aeromonas spp</i>	<i>K. pneumoniae</i> BLSE	poulet	Chine	(81)
<i>mcr-8</i>	1698	Plasmide conjugatif	4 à 8 mg/L	Inconnue	<i>K. pneumoniae</i> NDM	Porc	Chine	(82)

^a Taille du gène *mcr* en paire de base ^b Concentration Minimale Inhibitrice pour la colistine induite par la présence du plasmide chez une bactérie sensible.

➤ Structure protéique

Les protéines MCR sont constituées de deux domaines. Le 1^{er} domaine transmembranaire comporte 5 hélices α et possède les sites de liaison au lipide A et au substrat pEtN. Le 2^{ème} domaine est périplasmique et constitue l'unité catalytique. La modélisation du domaine 2 de la protéine MCR la rapproche de la structure 4KAV décrite pour la phosphoethanolamine transférase LptA de *Neisseria meningitidis*. Chez MCR-1 la thréonine en position 285 est responsable de l'activité de la protéine après sa phosphorylation. Cette protéine est une métalloenzyme, 4 ions zinc sont associés au site actif de MCR-1 (32).

➤ Epidémiologie des gènes *mcr*

La présence du gène *mcr-1* a été constatée dans plus de 32 pays sur les 5 continents. En Europe, la présence de *mcr-1* a d'abord été décrite dans de la viande de volaille et chez l'homme au Danemark (97) (**Figure 11A**). Puis ce gène a été retrouvé chez des entérobactéries d'origines différentes dans presque tous les pays d'Europe (**Figure 11B**). On peut noter aussi l'observation du gène *mcr-1* chez *E. coli* en Suisse provenant de légumes importés d'Asie, et d'échantillons d'eau environnementale en Suisse et en Malaisie (98).

L'émergence de *mcr-1* semble ne pas être récente, une étude rétrospective en Chine a identifié des souches d'*E. coli* isolées de poulets datant des années 1980 et portant ce gène de résistance plasmidique (99). En France, les souches les plus anciennes présentant le gène *mcr-1* datent de 2005, chez un *E. coli* d'origine ovine (100). L'absence d'utilisation de la colistine en médecine humaine, et l'absence de méthode fiable de détermination de la sensibilité des souches à la colistine a probablement permis la dissémination de ce mécanisme de résistance silencieusement au cours des dernières décennies.

Comme le gène *mcr-1*, *mcr-3* semblent être largement répandu, il a été observé chez de nombreuses entérobactéries (principalement *E. coli*) et *Aeromonas spp.* en Asie, en Europe et en Amérique du Nord. *mcr-4* et *mcr-5* décrit initialement chez *Salmonelle* et *E. coli* en Europe ont été ensuite observé chez *Enterobacter cloacae*, et des isolats asiatiques d'*E. coli*. Le gène *mcr-2* semble actuellement être le moins répandu car observé seulement en Europe (82). *mcr-7* et *mcr-8* ont été décrits en juin et juillet 2018, les données sur leur répartition ne sont pas encore disponibles.

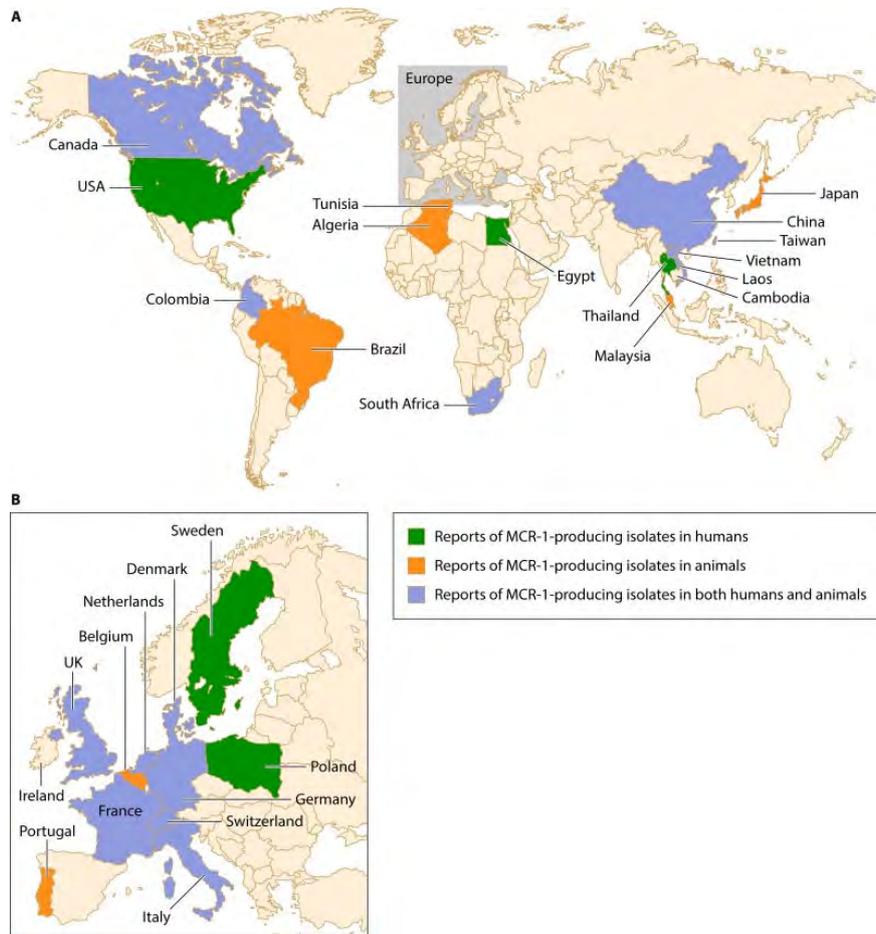


Figure 11 : Observation d'entérobactéries portant *mcr-1* décrit chez l'homme et/ou l'animal d'après (32).

d. Epidémiologie de la résistance à la colistine

Il a été démontré que l'utilisation de la colistine est un facteur de risque de la survenue de la résistance à la colistine chez les BGN (101,102). Une augmentation importante des taux de résistance à la colistine chez *K. pneumoniae* BLSE a été rapporté dans deux services de soins intensif après l'introduction de traitement de décontamination digestive (0 à 71% et 11.1 à 75%) (103,104). Cette utilisation de la colistine est par ailleurs inefficace et devrait être abandonnée. Un usage inapproprié de la colistine (dose inefficace ou monothérapie prolongée) entraîne également la sélection de populations résistantes à la colistine (101).

L'hypothèse que l'animal, en particulier les ovins et les porcins seraient une source de diffusion importante des gènes *mcr* est très répandue. Ces suppositions sont basées sur le fait que ces gènes ont été identifiés dans plusieurs isolats d'animaux et de produits alimentaires : porc, volaille, dinde, veau, etc. (**Figure 11**). L'utilisation intensive de la colistine en médecine vétérinaire et dans l'industrie agro-alimentaire pendant des décennies a entraîné une pression de sélection chez les entérobactéries et peut expliquer la prévalence élevée de ces résistances chez l'animal (10% d'*E. coli* résistants à la

colistine chez le porc en Belgique (105)). Par ailleurs, le gène *mcr-1* est souvent associé à la séquence d'insertion ISAp11 identifiée chez *Pasteurella multilocida* un pathogène animal (100). De plus, une souche d'*E. coli* résistantes à la colistine isolée dans un échantillon d'urine humaine en Suisse portait aussi un gène de résistance au florfenicol, un antibiotique utilisé seulement en médecine vétérinaire (100). La transmission de souches animales à l'homme pourrait expliquer la présence d'isolats résistants à la colistine chez l'homme alors que l'utilisation de la colistine en médecine humaine est très restreinte.

Bien que la plupart des entérobactéries porteuses de gènes *mcr* de résistance à la colistine a été décrite chez des porteurs sains humains ou animaux, quelques-unes sont à l'origine d'infections chez l'homme.

Une cause d'inquiétude est la survenue d'épidémies dues à des souches résistantes à la fois aux carbapénèmes et à la colistine par des gènes de résistances portés sur le même plasmide. La prévalence de la résistances à la colistine est en effet supérieure chez les isolats producteurs de carbapénémases. Des épidémies de *K. pneumoniae* productrice de KPC et résistantes à la colistine appartenant au clone ST258 ont été observées aux USA en 2010 (106), 2009 (107). Plusieurs épidémies dues à ce même clone ont été rapportés en Europe : aux Pays-Bas (108), en Hongrie (109), en Grèce (110,111) et en Italie (112,113). Une autre épidémie importante due au clone ST512 de *K. pneumoniae* producteur de KPC et résistantes à la colistine a été observée en Italie (114). Par ailleurs, dans ce pays, le taux de résistance à la colistine chez les entérobactéries productrices de carbapénémases en unité de soins intensifs atteint des taux extrêmement élevés (>20%) (115,116) et la prévalence est même encore plus élevée dans les hôpitaux romains (36,1%) (117).

La résistance à la colistine dans deux hôpitaux en Grèce a augmenté rapidement en quelques années (< 3,5% avant 2010 à > 20% après 2010)(118,119). Sur une période de deux ans en Espagne, une étude a montré l'augmentation de la prévalence de la résistance à la colistine dans les isolats de *K. pneumoniae* (de 13,5% à 31,7%) et une épidémie de *K. pneumoniae* productrice de VIM-1 et résistante à la colistine a été rapportée à Madrid (120). En France, la surveillance nationale rapporte des taux de résistances à la colistine plus faibles chez les *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases (6,2%), néanmoins, une épidémie de *K. pneumoniae* productrice d'OXA-48 résistante à la colistine a été rapportée (121).

Les résultats du programme de surveillance des antimicrobiens SENTRY montre un taux moyen de résistance à la colistine en Amérique Latine en 2009 (3% des isolats de *K. pneumoniae* et 2% des

isolats d'*A. baumannii*) (122). L'émergence d'isolats de *K. pneumoniae* résistant à la colistine a également été rapportée en Argentine (123), en Colombie (64) et au Brésil (124).

Au Moyen Orient des taux faibles de résistance à la colistine ont été observés parmi les isolats de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases (2,7% en Turquie et 4,5% en Israël). Cependant, plusieurs épidémies de *K. pneumoniae* multi clonales productrice d'OXA-48 et/ou de NDM ont lieu actuellement en Turquie (32).

Les données épidémiologiques sont peu nombreuses en ce qui concerne l'Afrique. Néanmoins un taux très faible de résistance à la colistine a été observé parmi les isolats de *K. pneumoniae* en Tunisie (1,2%). Ce taux est très certainement sous-estimé à cause de la méthode de détermination de la sensibilité à la colistine utilisée (disque diffusion). Au Nigeria (65) et en Afrique du Sud (64,68), l'émergence de *K. pneumoniae* résistantes à la colistine a été observée.

En Asie, des taux modéré de résistance à la colistine ont été observés parmi les isolats de *K. pneumoniae* en Corée du Sud (6 à 11%) (125), des taux similaires ont été retrouvés chez les *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases en Chine et à Taiwan (4,4% à 12,1%) (63,126). Au Laos et en Thaïlande, des isolats de *K. pneumoniae* résistants à la colistine ont été rapportés (65).

e. Autres mécanismes de résistance à la colistine

D'autres rares mécanismes de résistances ont été décrits chez certaines entérobactéries autres qu'*E. coli*.

➤ **Pompes d'efflux**

Le rôle des pompes d'efflux permettant d'expulser l'antibiotique hors de la bactérie est encore peu connu dans la résistance à la colistine. Cependant, l'addition au milieu de culture d'inhibiteurs de ces pompes comme le carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) restaure l'activité de la colistine chez certaines entérobactéries comme *K. pneumoniae* et *E. coli* (127,128). Cependant, le rôle non spécifique du CCCP sur les systèmes d'efflux et sa possible interaction avec la colistine font que ces observations sont à nuancer. Des mutations des systèmes d'efflux *acrAB* et *kpnEF* chez *K. pneumoniae* diminuent les CMI des souches résistantes à la colistine (32). Chez *Yersinia spp.* l'activation du système RosAB permettrait la résistance aux peptides antimicrobiens cationiques (129).

➤ Réduction du nombre de porines

Chez *Salmonella enterica*, la protéine périplasmique Ydel, activée par les systèmes à deux composantes PmrAB et PhoPQ, interagit avec la porine OmpD, protégeant ainsi la bactérie des peptides antimicrobiens cationiques (130).

➤ Hyperproduction de capsule polysaccharidique

Chez *K. pneumoniae*, l'hyperproduction de la capsule polysaccharidique diminue les interactions avec le LPS et agit comme une barrière protectrice contre les polymyxines (131). De plus, la libération de peptides polysaccharidiques capsulaires de la surface de *K. pneumoniae* permet à cette bactérie de se protéger contre les peptides antimicrobiens cationiques (comme la colistine). En effet, la capsule bactérienne est reliée à la bactérie par des liaisons ioniques avec le LPS, stabilisées par des cations divalents. En présence de polymyxines ces ponts ioniques sont déstabilisés, et les peptides capsulaires libérés vont capturer les polymyxines et protéger la bactérie de leur effet antibiotique (132).

7. Mécanismes de résistance à la colistine chez *E. coli* et épidémiologie

La prévalence des souches contenant les gènes *mcr-1* et *mcr-2* parmi les souches résistantes à la colistine varie selon les études, mais *E. coli* est l'espèce majoritairement associée à cette résistance plasmidique. Sur 59 souches d'*E. coli* résistantes à la colistine isolées dans 15 pays entre 2014 et 2015, 32% portaient le gène *mcr-1* (20). *E. coli* semble être le réservoir principal de cette résistance chez l'homme, l'animal et dans l'environnement. L'échange facile des isolats d'*E. coli* entre l'animal et l'homme, et les capacités d'échange de matériel génétique entre les isolats d'*E. coli* et avec les autres entérobactéries est une source d'inquiétude.

Contrairement à ce qui existe pour la résistance plasmidique, les données sur la résistance chromosomique chez *E. coli* sont peu nombreuses. Comme pour les autres espèces bactériennes, les modifications du lipide A semblent importantes dans la résistance à la colistine chez *E. coli*. Plusieurs mutations des gènes *pmrA* et *pmrB* obtenues in vitro (**Tableau 4**) ont rendu des souches d'*E. coli* initialement sensibles à la colistine, résistantes (CMI \geq 4 mg/L). Cependant seulement quelques mutations dans les gènes *pmrA*, *pmrB*, *phoQ* ont été identifiées chez des souches cliniques. De plus, rares sont ces mutations formellement identifiées comme responsables du phénotype de résistance, par complémentation, remplacement de gènes ou analyse de la structure du lipide A (PmrA-L105P et PmrB- Δ 27-45, PmrB-V88del, PmrB-R89P, PmrB-L110* et PmrB-G206D (133,134)) (**Tableau 4**).

Bien que la résistance à la colistine chez *E. coli* soit encore rare (0,4% des souches isolées chez l'homme en 2015, programme SENTRY (135)), il est nécessaire de la surveiller afin de prévenir l'émergence et la diffusion de clones résistants en pathologie humaine. En mai 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classé la colistine sur la liste des Antibiotique Critique à Priorité Elevée pour la médecine humaine (136). C'est-à-dire qu'elle répond à trois critères : un antibiotique pouvant rester actif dans des infections dues à des entérobactéries multi-résistantes, une fréquence d'utilisation élevée dans certains pays, la possibilité de transfert de résistance entre bactéries à partir d'une souche humaine ou non . Parmi cette liste figurent aussi les carbapénèmes, les céphalosporines de 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} génération, les quinolones, les macrolides et les glycopeptides.

Tableau 4 - Mutations chromosomiques et délétions d'acides aminés responsables de l'acquisition de résistance à la colistine chez *E. coli*.

Protéine	Domaine impliqué	Modification	Souche	Implication	Références
PmrA (222 AA ^a)	REC (1-112)	S39I A42T G53E G53V R81S L105P	Animal (porc) Mutation in vitro Mutation in vitro Mutation in vitro Animal (porc) Isolats cliniques	Analyses in silico Lipide A plus hydrophile Lipide A plus hydrophile Activation constitutive de PmrA Analyses in silico Altérations du lipide A (SM ^b) et remplacement de gène	(137) (134,137) (138) (139) (133)
	Trans_reg (145-216)				
PmrB (363 AA ^a)		Δ7-12 L10P	Isolat clinique Isolat clinique	Analyses in silico Remplacement de gène	(140) (141)
	TM1 (15-37)	Δ27-45	Isolats cliniques	Altération du lipide A (SM ^b) et remplacement de gène	(133) (142)
		41-Tn5	Mutation in vitro	Augmentation des CMI ^c	
	TM2 (69-91)	C84Y	Mutation in vitro	Augmentation des CMI ^c	(142)
		Δ86-90	Mutation in vitro	Augmentation des CMI ^c	(142)
		V88del	Mutation in vitro	Remplacement de gène	(134)
		R89P	Mutation in vitro	Remplacement de gène	(134)
HAMP (92-144)	T92-ins-I	Isolat clinique	Analyses in silico	(140)	
	P94L	Mutation in vitro	Analyses in silico	(143)	
	L110*	Mutation in vitro	Remplacement de gène	(134)	
	E123D V125E	Isolat clinique Isolat clinique	Analyses in silico Analyses in silico	(144) (143)	
HisKA (145-205)	D149Y	Mutation in vitro	Augmentation des CMI ^c	(142)	
	T156K	Isolat clinique	Analyses in silico	(140)	
	A159V	Isolat clinique	Analyses in silico	(140,143)	
	V161G	Animal (porc)	Analyses in silico	(139)	
HATPase_c (252-360)	G206D	Isolats cliniques	Altérations du lipide A (SM ^b) et remplacement de gène	(133)	
	Y315F	Isolat clinique	Analyses in silico	(144)	
PhoP (223 AA ^a)	REC (1-112)				
	Trans_reg_C (145-220)				
PhoQ (486 AA ^a)	PhoQ_sensor (10-189)	K24*	Isolat clinique	Analyses in silico	(144)
	HAMP (195-263)				
	HisKA (267-330)				
	HATPase_c (374-480)	N346K	Isolats cliniques	Analyses in silico	(144)
E375K		Isolat clinique	Analyses in silico	(145)	
MgrB	Aucune altération de MgrB n'a été rapportée chez <i>E. coli</i> résistant à la colistine				

^a acides aminés ^b observée par spectrométrie de masse ^c concentration minimale inhibitrice pour la colistine * codon stop

Description des domaines des protéines selon SMART :

Protéine PmrA et PhoP: REC : domaine receveur homologue à CheY, Trans_reg_C : domaine C-terminal, régulateur transcriptionnel.

Protéine PmrB et PhoQ: TM1 : 1^{er} domaine transmembranaire, PD : domaine périplasmique, TM2 : 2nd domaine transmembranaire, HAMP : histidine kinase, adénylyl cyclase, methyl-binding protéine, phosphatase, HisKA : domaine phosphoaccepteur histidine kinase A, HATPase_c : ATPases Histidine kinase-like.

III. Objectifs

La résistance aux antibiotiques est un problème de Santé Publique de niveau international comme l'ont souligné les rapports de l'OMS et de la commission O'Neill en 2014. A l'heure de l'émergence et de la diffusion de bactéries multirésistantes, la sauvegarde de molécules actives dans le traitement des infections à BHRé est plus que nécessaire en l'absence de nouvelles classes d'antibiotiques sur le marché.

La colistine est l'une d'entre elles, mais des résistances vis-à-vis de cette molécule émergent et les mécanismes de ces résistances ne sont pas encore totalement élucidés. Ainsi, une meilleure compréhension de ces mécanismes est un prérequis indispensable pour une détection efficace des souches résistantes et pour la mise en place de moyens de lutte vis-à-vis de cette résistance et de sa diffusion. Par ailleurs, la résistance plasmidique entraîne de bas niveaux de résistances avec une augmentation faible des CMI, de 2 à 4 dilutions, nécessitant également un dépistage performant des souches résistantes.

E. coli est un protagoniste important dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques chez les BGN. Cette bactérie est une virtuose de l'acquisition de gènes de résistance, comme de facteurs de virulence, par plusieurs mécanismes moléculaires : conjugaison, transposition, transduction... Sa répartition large dans l'environnement et sa place en tant que bactérie de la flore commensale humaine et animale, ont permis l'émergence de résistances aux antibiotiques dans cette espèce puis leur diffusion par l'intermédiaires de clones multirésistants ou par échange de gènes de résistance de façon horizontale entre isolats d'*E. coli*. Par ailleurs, bien que commensal de la flore digestive humaine, *E. coli* reste le premier pathogène en médecine humaine. Ces observations posent la question du traitement futur des infections sévères à *E. coli* hautement résistant...

Cependant, la résistance à la colistine chez cette bactérie reste encore à explorer. Chez *K. pneumoniae* de nombreux mécanismes de résistance ont été mis en évidence et confirmés par des techniques moléculaires. En comparaison, bien que des mutations des gènes *pmrA* et *pmrB* aient été retrouvées chez *E. coli*, leur implication dans la résistance à la colistine semble plus difficile à prouver.

A partir d'une collection d'isolats d'*E. coli* résistants à la colistine (CSR) collectés à l'hôpital Pellegrin de Bordeaux, nous avons recherché les mécanismes de résistance plasmidiques et chromosomiques de ces souches en séquençant les gènes susceptibles d'entraîner cette résistance. Puis nous avons essayé de confirmer ces mécanismes en mettant au point des méthodes de complémentation et de remplacement de gènes.

IV. Matériel et méthodes

1. Techniques de bactériologie

a. Collection de souches

Nous disposons de 28 souches d'*E. coli* CSR provenant de prélèvements cliniques collectés entre 2012 et 2017 (26 au CHU de Bordeaux, 1 en Suisse, 1 en Afrique du Sud). La majorité des souches a été isolée de prélèvements urinaires et seules 2 souches provenaient d'écouvillonnages rectaux. Les souches urinaires ont été détectées résistantes à la colistine grâce aux antibiogrammes réalisés selon les protocoles habituels du Laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux. Les 2 souches digestives ont été recueillies lors d'une étude sur la détection du portage fécal de BGN résistants à la colistine à l'hôpital de Bordeaux, grâce au milieu sélectif Superpolymyxin (55,146).

L'identification d'espèce des souches a été réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker). Nous avons utilisé la souche *E. coli* ATCC 25922 comme souche de référence lors de la détermination des CMI et comme source des gènes sauvages *pmrA* et *pmrB*. La souche *E. coli* TOP10 (Invitrogen) résistante à la streptomycine a été utilisée pour les expériences de clonage et de remplacement de gènes. La souche *E. coli* DH5 α (ThermoFisher) a également été utilisée pour les expériences de clonage. La souche *E. coli* C600 a, quant à elle, été utilisée comme souche réceptrice au cours de la technique de conjugaison.

La souche *E. coli* DA39554 (134), aimablement donné par l'équipe suédoise de K. Hjort et H. Nicoloff (Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University) nous a servi de témoin lors des expériences de complémentation. Elle est issue d'une souche d'*E. coli* MG1655 ayant subi un remplacement de gène et possédant la mutation L110* sur le gène *pmrB*, ce qui l'a rendu résistante à la colistine (CMI 4 mg/L).

b. Plasmides vecteurs utilisés

Nous avons utilisé, pour la complémentation des gènes mutés, le plasmide pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) qui possède un gène de résistance à la kanamycine. Il s'agit d'un plasmide non conjugatif (3,5 kb), à nombre élevé de copies, qui permet le clonage direct de produits de PCR présentant des bouts francs.

Le plasmide pRed/ET (Gene bridges), thermosensible, a été utilisé pour les expériences de remplacement de gènes. pRed/ET est un plasmide de 9,3 kb conférant une résistance à la tétracycline et portant les gènes *red γ β α* et *recA* qui catalysent la recombinaison homologue d'une molécule d'ADN

avec l'ADN chromosomique bactérien (147). L'expression des protéines permettant la recombinaison est sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'arabinose à 37°C.

Le plasmide pBR322 (New England Biolabs) qui est un plasmide à faible nombre de copies de 4,4kb a été utilisé pour les expériences de remplacements de gènes et de complémentation. Il porte un gène de résistance à l'ampicilline et un gène de résistance à la tétracycline.

Le plasmide pGEM-T Easy Vector System (Promega) a été utilisé pour construire le plasmide permettant la complémentation des gènes mutés. Ce vecteur linéaire de 3 kb, est capable de lier des produits de PCR ; il possède un gène de résistance à l'ampicilline et le gène de la β -galactosidase qui est interrompu par le site de clonage, permettant ainsi un screening blanc/bleu des clones positifs sur milieu de culture spécifique.

c. Milieus de culture

Le milieu Mueller-Hinton (MH, Biorad) a été utilisé pour la réalisation des antibiogrammes et des ré-isolements. Ce milieu additionné de colistine a aussi été utilisé pour la sélection de transconjugants. Les CMI en milieu liquide ont été réalisées avec le milieu liquide MH ajusté en cations (CA-MHB, Biorad).

Les cellules électrocompétentes ont été préparées dans le milieu riche Brain-Heart Infusion (BHI). Le milieu Luria Bertani (LB) additionné d'antibiotiques a été utilisé pour la sélection des transformants.

Enfin, le milieu chromogène URI4 (Bio-Rad) a été utilisé pour les isolements car il permet la détection des activités enzymatiques de diverses espèces bactériennes. Les colonies d'*E. coli* sont roses car elles possèdent une activité β -galactosidase, les colonies d'*E. coli* TOP10 sont blanc-bleuté car elles n'en possèdent pas.

d. Antibiogrammes et détermination de la résistance à la colistine

La détection de la résistance à la colistine chez les souches de notre collection a été réalisée grâce aux antibiogrammes effectués par l'automate BD-PhoenixTM (Becton-Dickinson), ou par croissance sur milieu sélectif SuperPolymyxin (ElitechGroup) contenant de la colistine (3,5 mg/l). Ce milieu sélectif est utilisé au laboratoire de bactériologie pour dépister la résistance à la colistine chez les entérobactéries productrices de carbapénémase, ainsi que chez les isolats de *P. aeruginosa* et de *S. maltophilia* recueillis dans les expectorations de patients mucoviscidosiques. Lors d'une étude, le milieu SuperPolymyxin a été utilisé sur tous les écouvillonnages rectaux réalisés dans le cadre de la

surveillance des BMR, nous permettant ainsi de recueillir deux *E. coli* CSR. Les isolats d'*E. coli* détectés résistants à la colistine ont alors été congelés, à -80°C, en bouillons BHI additionné de 10% de glycérol, à -80°C.

Les antibiogrammes des souches cliniques ont été réalisés sur le système BD-Phoenix™ (Becton-Dickinson), et l'interprétation des phénotypes de résistance a été réalisée selon les recommandations du CASFM 2018 (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie). Les antibiogrammes des transformants et des transconjugants obtenus au cours de cette étude ont été réalisés par diffusion en milieu gélosé MH à partir d'un inoculum à 0,5 McFarland.

La résistance à la colistine a ensuite été confirmée par détermination des CMI de la colistine par microdilution en milieu liquide ajusté en cations (CA-MHB) selon les recommandations du CLSI. La gamme de concentrations testées s'étendait de 0,03 à 32 mg/l. Les CMI ont également été déterminées sur les clones obtenus et nous avons considéré comme significative une différence d'au moins 2 dilutions des CMI par rapport à la souche parentale, après 3 déterminations. Les CMI de la colistine ont été interprétées selon les recommandations du CASFM 2018 (122), c'est-à-dire qu'une souche a été considérée comme sensible si la CMI \leq 2 mg/l et résistante si la CMI $>$ 2 mg/l.

2. Techniques de biologie moléculaire et de génétique

a. Extraction d'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique a été réalisée par « boiling extract », une technique d'extraction rapide d'ADN total par chauffage à 100° d'une suspension de colonies bactériennes dans 100 μ l d'eau stérile. Après centrifugation, l'ADN contenu dans le surnageant a pu être utilisé directement.

b. Extraction d'ADN plasmidique

Pour les clonages et la complémentation, l'ADN plasmidique a été extrait selon les recommandations du kit d'extraction Zyppy Plasmid Miniprep (ZymoResearch) reposant sur la lyse alcaline suivie d'une fixation de l'ADN plasmidique sur une résine échangeuse d'anions. Une autre technique de lyse alcaline (Miniscreen) a été utilisée pour extraire les plasmides des souches cliniques CSR. A partir d'une culture de nos souches en milieu MH, le culot de centrifugation a été repris dans du Tris-Glucose EDTA. Puis une solution de lyse (soude et SDS, préparée extemporanément) a été ajoutée pour dénaturer l'ADN génomique et plasmidique. L'ADN génomique a ensuite été précipité par de l'acétate de potassium (pH=5). Après centrifugation, du PCIH (phénol, chloroforme, alcool

isoamylique et hydroxyquinoléine) a été ajouté au surnageant puis l'ADN plasmidique a été précipité par de l'éthanol à 95° en 3h à -80°C. Le culot obtenu après centrifugation a été lavé par de l'éthanol à 70° froid, et après une nouvelle centrifugation, le culot a été séché et repris dans de l'eau milliQ stérile. La qualité de l'extraction plasmidique a été contrôlée par électrophorèse des extraits sur gel d'agarose à 0,8%. Le gel a ensuite été plongé dans un bain de bromure d'éthidium (BET) et révélé sous UV.

c. Amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les PCR réalisées pour l'amplification des gènes *pmrA*, *pmrB*, *mgrB*, *phoP* et *phoQ* ainsi que les PCR de vérification des clones ont été effectuées à l'aide du GoTaq® Green Master Mix (Promega) qui est un mix prêt à l'emploi contenant de la Taq DNA polymérase, des dNTPs, du MgCl₂ et un tampon de réaction. Les amplifications ont été réalisées dans un volume réactionnel final de 25µl, comprenant 9,5µl d'eau milliQ, 1µl de chaque amorce à 10mM, 12,5µl de GoTaq Mix et 1µl d'ADN. Le programme d'amplification utilisé était le suivant : dénaturation initiale à 95° pendant 4min, suivie de 30 cycles comprenant une dénaturation à 95° 30s, une hybridation à 55° 30s et une élongation à 72° 1min/kb ; et enfin un cycle final de terminaison de la synthèse des brins à 72° pendant 7min.

Les amplifications pour les clonages ou les remplacements de gènes ont été réalisées avec la Phusion® Hot Start Flex DNA Polymerase (NewEngland BioLabs) qui est une polymérase hautement fidèle offrant des performances robustes de réaction de PCR. Le mélange réactionnel utilisé contenait 29,5µL d'eau, 10µL de Tampon Phusion HF 5x, 3,5µl de DMSO 100%, 1,5µl de MgCl₂ 50mM, 1µl de dNTPs, 1µl de chaque amorce à 10mM et 0,5µl de Taq Phusion, pour un volume final de 50µl. La réaction de PCR a été réalisée selon le programme suivant : dénaturation initiale à 98° pendant 30s, suivie de 30 cycles comprenant une dénaturation à 98° 30s, une hybridation à 60° 30s et une élongation à 72° 1min/kb ; et enfin un cycle final de terminaison de la synthèse des brins à 72° pendant 7min.

Dans les deux cas, les réactions de PCR ont été effectuées à l'aide du MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad). Les produits de PCR ont ensuite été déposés sur gel d'agarose 1% contenant du SYBR Safe (ThermoFisher) au 1/20000^{ème}. La migration par électrophorèse a été réalisée dans du tampon Tris-Acétate-EDTA et la révélation du gel a été faite sous UV.

La purification des produits d'amplification a été réalisée avec les colonnes Illustra Microspin™ S-400 HR columns (GE Healthcare) selon les recommandations du fournisseur. Le principe de ce kit repose sur une technique de filtration sur gel. L'ADN dont la taille est supérieure à celle des pores de la résine de la colonne, est exclu du gel et élué en premier. Les nucléotides, les enzymes et le tampon de réaction sont retenus dans la résine.

d. Séquençage et analyse des séquences

Le séquençage a été réalisé par la méthode de Sanger par la société Eurofins Genomics. Les séquences nucléotidiques ont été comparées avec les séquences des gènes *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*, *mgrB*, *mcr-1* disponibles dans la base de données du site NCBI (National Center for Biotechnology Information) grâce au programme d'alignement BLAST.

e. Conjugaison

Les expériences de conjugaison ont été effectuées avec la souche réceptrice C600 sensible à la colistine et résistante à l'azide de sodium. La conjugaison a été réalisée par une co-culture en milieu liquide MH, de 0,5 ml de culture d'une souche clinique résistante à la colistine (donneuse) avec 1 ml de culture de la souche réceptrice C600. Après centrifugation, le culot a été déposé sur un filtre de conjugaison déposé sur une gélose MH et incubé à 37° toute la nuit. Les bactéries présentes sur le filtre ont ensuite été récupérées dans 1 ml de milieu MH. Une dilution au dixième de cette préparation a ensuite été ensemencée sur un milieu MH contenant 2 mg/l de colistine et 300 mg/l d'azide de sodium, puis incubée à 37° toute la nuit. En parallèle, nous avons sélectionné sur un milieu contenant 100 mg/l de ticarcilline et 300 mg/l d'azide de sodium, les souches produisant des β -lactamases plasmidiques, en cas de résistances associées à la colistine et aux β -lactamines sur le même plasmide. L'absence de résistance à l'azide de sodium des souches cliniques, ainsi que l'absence de résistance à la colistine de la souche C600 ont été contrôlées. Une souche porteuse du gène de résistance plasmidique *mcr-1* a été utilisée comme témoin positif pour ces expériences de conjugaison.

f. Transformation

➤ **Préparation de cellules électrocompétentes :**

Une culture bactérienne d'*E. coli* TOP10 a été incubée à 37° sous agitation, jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,6 à 600nm, puis la suspension bactérienne a été immédiatement refroidie. Des aliquots de cette culture ont été centrifugés à trois reprises à froid, avec mise en suspension du culot dans de l'eau MilliQ froide contenant 10 % de glycérol après chaque centrifugation.

➤ **Transformation :**

Par la suite, les extraits d'ADN plasmidique obtenus par lyse alcaline à partir des souches cliniques ont été transformés dans les souches d'*E. coli* TOP10 électrocompétentes à l'aide du Gene Pulser II (Bio-Rad) (200 Ohms, 25 μ F, 2500V). Les transformants ont été sélectionnés sur gélose MH contenant

2 mg/l de colistine, après incubation 24h à 37°C. Une souche porteuse du gène plasmidique *mcr-1* a été utilisée comme témoin positif.

g. Complémentation des gènes mutés

Le gène *pmrB* de la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 a été amplifié par PCR à l'aide des amorces *pmrBF* (20nt) et *pmrBR* (20nt) (**Annexe 4**) et de la Taq Phusion qui permet d'obtenir un produit de PCR à bouts francs, sans addition d'adénosines terminales. Un fragment d'ADN non codant, *mdh*, a également été amplifié à l'aide des amorces *mdhF* et *mdhR*. Après purification sur colonnes Illustra Microspin™ S-400 HR, 0,5 à 4µL des produits de PCR ont été ajoutés au mélange de ligation constitué d'1µL de plasmide pCR-Blunt II-TOPO, 1µL de solution salée, et d'eau en quantité suffisante pour 6µL. La ligation dans le vecteur pCR-Blunt II-TOPO a été réalisée pendant 30min à température ambiante (22-23°C). Les plasmides recombinants ainsi obtenus (*pmrB*-pTOPO et *mdh*-pTOPO) ont été transformés par électroporation dans *E. coli* TOP10. Les transformants ont été sélectionnés par incubation une nuit à 37°C sur milieu LB contenant 50 mg/l de kanamycine. L'insertion correcte du gène dans le plasmide a été vérifiée par PCR et séquençage du gène avec les amorces M13F et M13R (**Annexe 5**). Les plasmides *pmrB*-pTOPO et *mdh*-pTOPO ont ensuite été extraits, puis transformés dans chacune des souches cliniques d'*E. coli* CSR, préalablement rendues électrocompétentes comme décrit précédemment. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu LB contenant 50 mg/l de kanamycine. Les clones ont ensuite été vérifiés par PCR et séquençage des plasmides avec les amorces M13F et M13R (**Annexe 5**).

L'opéron *pmrAB* de la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 a été amplifié par PCR à l'aide de la GoTaq et des amorces *pmrAF*-BamHI et *pmrBR*-HindIII (**Annexe 5**) qui ont permis de créer des sites de restriction de part et d'autre de la séquence *pmrAB* amplifiée. La GoTaq fixe des bases adénosine de chaque côté de la séquence amplifiée, complémentaires des bases thymidines présentes aux extrémités du plasmide ouvert pGEM-T Easy. Les produits de PCR purifiés ont ensuite été ligués dans le vecteur pGEM-T Easy (**Figure 12**), après addition de T4 DNA Ligase (Promega) et incubation 24h à température ambiante, puis les plasmides recombinants obtenus (*pmrAB*-pGEM-T) ont été transformés dans *E. coli* DH5α. Les transformants ont été sélectionnés par incubation une nuit à 37°C sur milieu LB contenant 100 mg/L d'ampicilline, de l'isopropylthio-β-galactoside (IPTG) qui induit la β-galactosidase plasmidique et du substrat Xgal de la β-galactosidase. L'insertion correcte du gène dans le plasmide a été vérifiée par PCR et séquençage des clones, à l'aide des amorces M13F et R (**Annexe 5**).

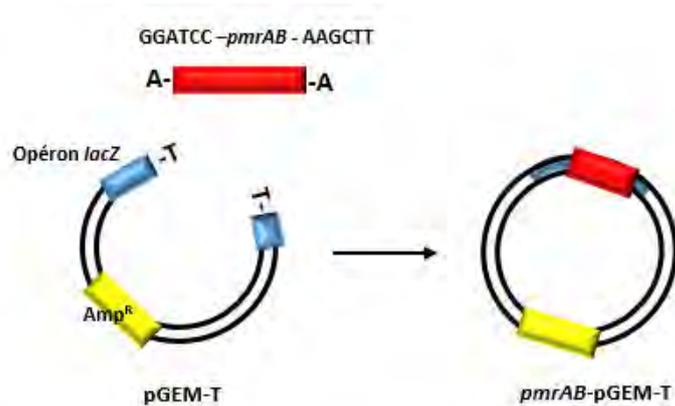


Figure 12 : Construction du plasmide *pmrAB*-pGEM-T.

Le plasmide pGEM-T est un plasmide ouvert possédant un gène de résistance à l'ampicilline Amp^R et l'opéron *lacZ* interrompu par le site d'insertion, permettant la sélection des transformants. Le clone de DH5- α , possédant le plasmide *pmrAB*-pGEM-T est de couleur blanche et résistant à l'ampicilline. Les colonies de couleur bleu possèdent le plasmide recircularisé, n'ayant pas intégré l'opéron *pmrAB*. GGATCC : site de restriction BamHI, AAGCTT : site de restriction HindIII.

Les plasmides *pmrAB*-pGEM-T et *mdh*-pTOPO ont ensuite été extraits et ont été digérés par les enzymes BamHI et HindIII (Promega). Une électrophorèse des produits de digestion a été réalisée et les fragments d'intérêt ont été sélectionnés et extraits du gel grâce au kit QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen). Le fragment contenant l'opéron *pmrAB* a alors été ligué dans le vecteur *mdh*-pTOPO en présence de T4 DNA ligase (Promega) tout la nuit à 16°C (**Figure 13**). Le produit de ligation a ensuite été électroporé dans 50 μ L de cellules électrocompétentes d'*E. coli* TOP10 et les transformants ont été sélectionnés sur un milieu LB contenant 50 mg/l de kanamycine. Les clones obtenus contenant le plasmide *pmrAB*-*mdh*-pTOPO ont ensuite été vérifiés par PCR avec les amorces *pmrAF* et M13R (**Annexe 4 et 5**), puis extraits et transformés dans chacune des souches cliniques d'*E. coli* CSR rendues électrocompétentes. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu LB contenant 50 mg/l de kanamycine et vérifiés par amplification avec les amorces *pmrAF* et M13R (**Annexe 4 et 5**).

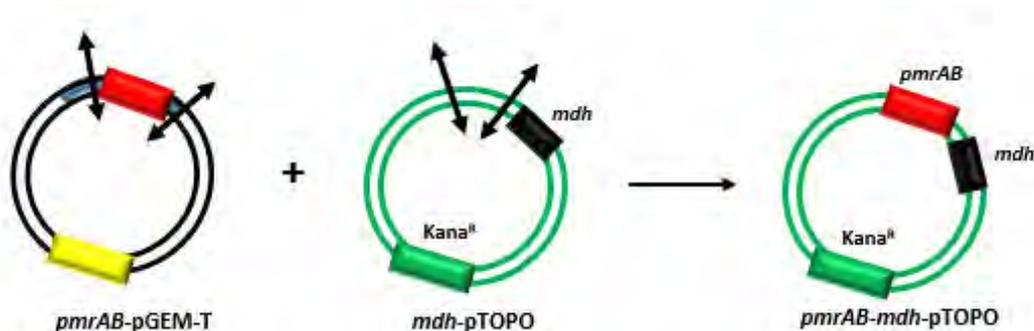


Figure 13 : Construction du plasmide *pmrAB*-*mdh*-pTOPO à partir du plasmide *pmrAB*-pGEM-T.

Les flèches noires indiquent les coupures par les enzymes de restriction, en jaune : gène de résistance à l'ampicilline, en bleu : opéron *lacZ* interrompu ; en rouge : opéron *pmrAB* ; *mdh* : séquence non codante

h. Remplacement du gène *pmrA* avec contre-sélection avec de la kanamycine

Le remplacement du gène *pmrA* sauvage d'*E. coli* TOP10 par les gènes *pmrA* mutés des souches résistantes de notre collection a été réalisé à l'aide du kit Counter-Selection BAC Modification Kit (Gene bridges) (147). Il s'agit d'une technique de recombinaison via le plasmide pRed/ET couplé à une contre sélection basée sur la cassette *rpsL-neo* qui confère une résistance à la kanamycine et restaure la sensibilité à la streptomycine de la souche *E. coli* TOP10.

➤ **Transformation du plasmide pRed/ET dans *E. coli* TOP10**

Le plasmide thermosensible pRed/ET a d'abord été transformé dans les cellules d'*E. coli* TOP10 électrocompétentes. Les transformants (pRed/ET-TOP10) ont ensuite été sélectionnés par incubation à 30° sur milieu MH contenant 3 mg/l de tétracycline. La présence du plasmide dans les clones a été contrôlée par PCR avec les amorces repAF et R spécifiques du plasmide (Annexe 5).

➤ **Construction de la cassette *rpsL-neo-pmrA* et amplification des gènes mutés**

La cassette *rpsL-neo* entourée de bras de 50nt homologues au gène *pmrA* (*rpsL-neo-pmrA*) a été obtenue par PCR à l'aide des amorces *rpsL-neo-pmrAF* et *rpsL-neo-pmrAR* (Annexe 5 et Figure 14).

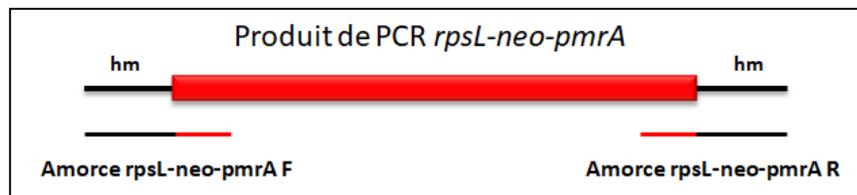


Figure 14 : Construction du produit de PCR *rpsL-neo-pmrA*.

hm : bras de 50nt homologues au gène *pmrA*

En parallèle, l'amplification des gènes *pmrA* mutés des souches résistantes à la colistine a été réalisée avec des amorces composées des mêmes 50nt en amont et en aval du gène *pmrA* (*pmrAF* (50nt) et *pmrAR* (50nt)) (Annexe 5).

➤ **Délétion du gène *pmrA* et intégration de la cassette *rpsL-neo* dans pRed/ET-TOP10**

Une culture de pRed/ET-TOP10 a été réalisée à 30° jusqu'à obtention d'une DO de 0,3 à 600nm. Du L-arabinose 10% a été additionné au milieu et la culture a ensuite été incubée à 37° sous agitation pour activer la recombinase plasmidique λ red. Après 1h d'incubation, les cellules rendues électrocompétentes par lavages à froid avec du glycérol 10%, ont été transformées par la cassette *rpsL-neo-pmrA*. Les bactéries ont alors été incubées pendant 3h à 37° sous agitation pour permettre la

recombinaison homologue entre les bras *pmrA* (50nt) de la cassette *rpsL-neo-pmrA* et le gène *pmrA* de la souche d'*E. coli* TOP10 (Figure 15). Les clones ont ensuite été sélectionnés à 30° sur un milieu MH contenant de la kanamycine et de la tétracycline. Les transformants obtenus étaient par ailleurs sensibles à la streptomycine. Deux PCR de vérification ont été faites sur ces clones montrant la délétion du gène *pmrA* et la présence de la cassette.

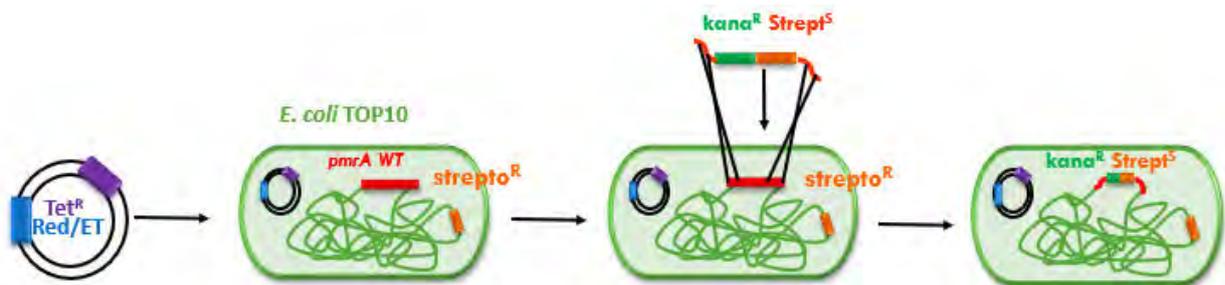


Figure 15 : Remplacement de gène avec contre-sélection sur la kanamycine (1).

Création du clone *rpsL-neo-ΔpmrA* pRed/ET TOP10 permettant la contre-sélection en remplaçant le gène *pmrA* par *rpsL-neo-pmrA* conférant une résistance à la kanamycine et restaurant la sensibilité à la streptomycine.

➤ Remplacement de la cassette *rpsL-neo-pmrA* par un gène *pmrA* muté dans pRed/ET-TOP10

Dans cette étape, la cassette *rpsL-neo-pmrA* a été remplacée par recombinaison homologue par le gène *pmrA* muté d'une souche de notre collection (Figure 16). La préparation des cellules électrocompétentes induites par l'arabinose a été réalisée par lavages à froid avec du glycérol à 10%, puis les cellules ont été transformées par le produit de PCR purifié du gène *pmrA* muté. Après 3h d'incubation à 37° (recombinaison), les bactéries ont été sélectionnées sur un milieu MH contenant 50 mg/l de streptomycine. Les clones obtenus ont ensuite été séquencés pour contrôler la présence du gène *pmrA* muté.

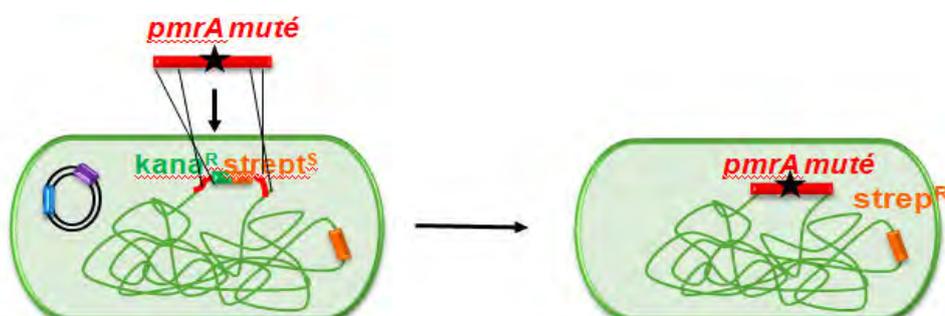


Figure 16 : Remplacement de gène avec contre-sélection sur la kanamycine (2).

Remplacement de *rpsL-neo-pmrA* par le gène *pmrA* d'une de nos souches mutées.

i. Remplacement du gène *pmrB* avec sélection avec de l'ampicilline

➤ **Délétion du gène *pmrB* et intégration de la cassette *rpsL-neo-pmrB***

Comme précédemment, il a été réalisé une recombinaison homologue (kit Counter-Selection BAC Modification Kit (147)) entre le gène *pmrB* de la souche *E. coli* TOP10 et la cassette *rpsL-neo-pmrB* de façon à obtenir une souche délétée pour le gène *pmrB* et dénommée *rpsL-neo-ΔpmrB* pRed/ET TOP10.

➤ **Clonage du gène muté dans pBR322**

Les gènes *pmrB* mutés de nos souches cliniques ont été amplifiés avec la Taq Phusion Hot Start Flex et les amorces *pmrB*-BamHIF et *pmrB*-HindIIIR pour créer des sites de restriction de part et d'autre du gène *pmrB* (en bleu, **Annexe 5**). Après digestion des amplifiats et du plasmide pBR322 par les enzymes BamHI et HindIII (Promega), les produits de digestions ont été ligués avec la T4 DNA ligase (Promega) toute la nuit à 16°C. Le produit de ligation a ensuite été électroporé dans 50μL de cellules électrocompétentes d'*E. coli* TOP10. Les transformants ont été sélectionnés sur un milieu LB contenant 100 mg/l d'ampicilline. L'insertion correcte du gène *pmrB* muté dans le plasmide pBR322 a été vérifiée par séquençage des clones obtenus, à l'aide des amorces *tet5'* et *tet3'* (**Annexe 5** et **Figure 17**).

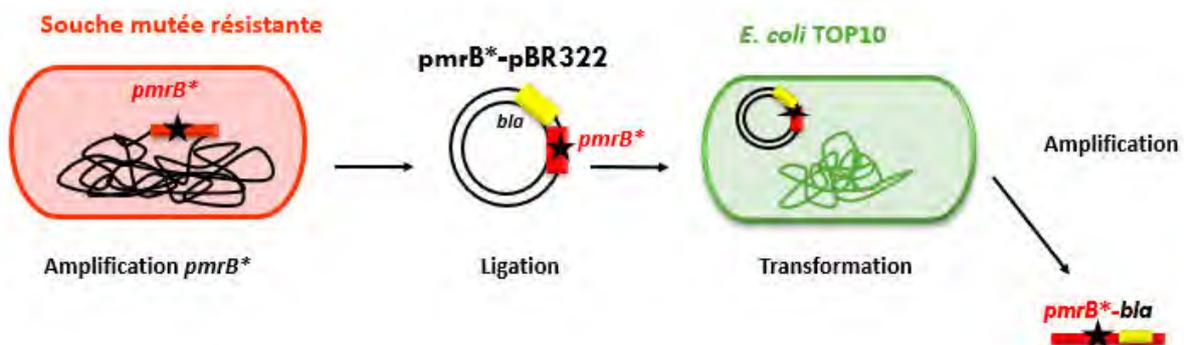


Figure 17 : Remplacement de gène avec sélection sur l'ampicilline (1).

*pmrB** : gène *pmrB* muté ; *bla* : gène de résistance à l'ampicilline

➤ **Construction du fragment d'ADN *pmrB-bla***

A partir de ce plasmide *pmrB**-pBR322, une PCR a été réalisée avec la Taq Phusion Hot Start Flex et les amorces *pmrBF* et *pmrBR-blaR* (**Annexe 5**), pour obtenir un fragment d'ADN constitué du gène *pmrB* muté suivi du gène *bla*_{TEM} du plasmide pBR322 (*pmrB*-bla*) (**Figure 17**).

➤ **Remplacement de la cassette *rpsL-neo-pmrB* par *pmrB*-bla* dans pRed/ET-TOP10**

Des cellules électrocompétentes *rpsL-neo-ΔpmrB* pRed/ET TOP10 induites par l'arabinose ont été préparées selon le protocole précédemment décrit et ont été transformées avec le produit de PCR purifié *pmrB*-bla*. Après 3h d'incubation à 37° permettant la recombinaison homologue, les bactéries ont été mises en culture sur un milieu LB contenant 100 mg/l d'ampicilline. Des PCR de vérification ont été réalisées sur les clones obtenus permettant de visualiser la présence du fragment *pmrB*-bla* (2.18kb) et l'absence du plasmide donateur. Les clones ont été séquencés afin de contrôler la présence de la mutation au sein du gène *pmrB* (Figure 18).

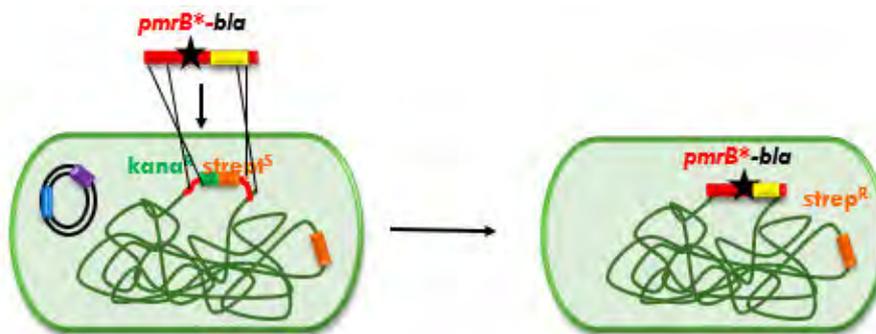


Figure 18 : Remplacement de gène avec sélection sur l'ampicilline (2).

Remplacement de *rpsL-neo-pmrB* par le produit de PCR *pmrB*-bla*

*pmrB** : gène *pmrB* muté ; *bla* : gène de résistance à l'ampicilline ; *kana*^R*strep*^S : cassette *rpsL-neo-pmrB*

j. Complémentation d'une souche sensible avec le gène muté

Nous avons également transformé les cellules *E. coli* TOP10 avec les vecteurs *pmrB*-pBR322*, c'est-à-dire ceux contenant les gènes *pmrB* mutés des souches de notre collection clonés dans le plasmide pBR322. Ces plasmides *pmrB*-pBR322* ont ensuite été extraits puis transformés dans des cellules électro-compétentes de la souche de référence *E. coli* ATCC25922. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu LB avec 100 mg/l d'ampicilline et la qualité des clones a été contrôlé par PCR et séquençage.

3. Analyse in silico

Le score Provean (<http://provean.jcvi.org>) a été utilisé pour prédire l'effet d'une modification de la séquence protéique sur la fonction de la protéine. Si ce score est $\leq -2,5$, il indique un impact de la mutation sur la structure protéique et donc un effet délétère sur la fonction de la protéine. La fonction des domaines protéiques a été recherchée dans la banque de données Ensembl Bacteria (<http://bacteria.ensembl.org>).

V. Résultats

1. Caractérisation de la collection de souches

Vingt-quatre souches *E. coli* CSR de la collection ont été isolées de prélèvements urinaires et étaient responsables d'une infection urinaire chez les patients (**Annexe 1**). Quatorze d'entre elles étaient responsables d'infection communautaires puisqu'elles ont été isolées chez des patients admis aux urgences ou étant hospitalisés depuis moins de 48h. Les 10 autres souches étaient issues d'infections urinaires associées au soins. Deux souches ont été isolées à partir d'écouvillonnages rectaux réalisés pour rechercher un portage de BMR chez un patient hospitalisé en chirurgie et un patient aux urgences. Une des souches provient d'un prélèvement respiratoire réalisé chez un patient hospitalisé depuis plus de 48h en réanimation (**Annexe 1**). Parmi les patients, seul le patient suisse avait reçu un traitement par de la colistine.

Treize de ces souches présentaient un phénotype sauvage pour tous les antibiotiques testés et une résistance isolée à la colistine. Deux *E. coli* de la collection étaient résistants à la fosfomycine en plus de leur résistance à la colistine et une souche était résistante au cotrimoxazole et aux fluoroquinolones (**Annexe 1**).

En ce qui concerne la résistance aux β -lactamines, les souches CHEVR et ROQU possédaient une pénicillinase de bas niveau et avaient un phénotype résistant à l'ampicilline et à la ticarcilline sur l'antibiogramme. Huit isolats présentaient une pénicillinase de haut niveau avec une activité des pénicillines récupérée partiellement par les inhibiteurs de β -lactamases (résistance à l'ampicilline, la ticarcilline, les associations amoxicilline / acide clavulanique et ticarcilline / acide clavulanique). Quatre de ces isolats présentaient des résistances associées : GARR et ROUS étaient résistants aux quinolones et aux aminosides, DESF et SOLA étaient résistants au cotrimoxazole (**Annexe 1**).

L'isolat BLOT exprimait faiblement sa céphalosporinase naturelle, son phénotype était intermédiaire pour l'amoxicilline et l'association amoxicilline / acide clavulanique sur l'antibiogramme. Les souches BOUJ et SOLA possédaient une BLSE les rendant résistantes aux pénicillines et aux céphalosporines de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération, leur sensibilité à la céfoxitine et aux carbapénèmes était toutefois conservée (**Annexe 1**). Cette résistance aux β -lactamines était associée à une résistance au cotrimoxazole et aux quinolones ; et pour une d'entre elle à une résistance aux aminosides (gentamicine). Ces deux isolats d'*E. coli* CSR étaient des BMR.

2. Confirmation de la résistance à la colistine

Sur les 28 souches d'*E. coli* étudiées, la résistance à la colistine a ainsi été confirmée pour 24 souches (CMI entre 4 et 16 mg/l) après détermination des CMI par microdilution en milieu liquide (**Annexe 2**). 4 souches se sont révélées être sensibles à la colistine (CMI \leq 2 mg/l). Trois souches (PETE, MART et VAL) présentaient des CMI \leq 0,25 mg/l et ont été écartées de la suite de notre étude. Une quatrième souche (FROM) présentait une CMI = 2 mg/l (sensible), elle a tout de même été incluse dans l'étude car cette CMI était élevée comparée aux autres souches d'*E. coli* sensibles. Les souches FROM, VAL, PETE ont été dépistées résistantes à la colistine par antibiogramme en système automatisé Phoenix (CMI Phoenix $>$ 4 mg/L). La dernière souche MART a été isolée sur milieu de croissance sélectif SuperPolymyxin dans le cadre d'un dépistage de portage de BMR sur écouvillonnage rectal. Ces 4 isolats sont des faux positifs de ces deux méthodes de détection de la résistance à la colistine.

3. Recherche des gènes de résistance à la colistine connus : *mcr*

Les gènes plasmidiques *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* et *mcr-5* ont été recherchés par PCR. Deux souches (BOUJ et SOLA) portaient le gène de résistance plasmidique *mcr-1*, et les CMI pour la colistine de ces deux souches étaient égales à 8 mg/l (**Annexe 2**). Aucune variation dans la séquence du gène *mcr-1* présent chez les deux isolats n'a été mise en évidence par séquençage. Chez la souche BOUJ, la résistance plasmidique *mcr-1* était associée à une BLSE (TEM-54) codée par un plasmide de type IncX4. Le type de plasmide portant de gène *mcr-1* n'a pas été déterminé pour la souche SOLA, collectée en fin d'étude.

Les autres gènes de résistance plasmidiques n'ont pas été retrouvés parmi la collection d'*E. coli* CSR. Les gènes plasmidiques *mcr-6*, *mcr-7* et *mcr-8* n'ont pas été recherchés car ils n'avaient pas encore été décrit au moment de l'étude.

4. Recherche de plasmides porteurs de nouveaux gènes résistance à la colistine

Dans notre collection de souches, nous avons aussi recherché la présence de plasmides pouvant être vecteurs de nouveaux gènes de résistance à la colistine, par des expériences de conjugaison et de transformation. Elles n'ont cependant pas pu être réalisées sur les souches BLOT, LAENS, LAMO et LANN, collectées en fin d'étude.

a. Conjugaison

La résistance à la colistine est peu aisée à transférer par conjugaison, d'après la littérature, et il n'existe pas de consensus sur la concentration en colistine à utiliser pour le milieu de sélection des transconjugants. Deux stratégies de conjugaison ont été adoptées et chacune d'elle a été réalisée deux fois pour améliorer la sensibilité de détection de nouveaux gènes de résistance plasmidiques.

Une première conjugaison a été réalisée avec sélection de transformants sur un milieu sélectif contenant de la ticarcilline a été réalisée pour les souches cliniques résistantes à la ticarcilline (**Annexe 1**). Pour les souches AF51, DESF, CHEVR et ROQ, quelques transconjugants ont été isolés sur le milieu contenant 100 mg/l de ticarcilline et 300 mg/l d'azide de sodium. Chez ces transconjugants, le transfert de β -lactamases plasmidiques, responsables de la résistance à la ticarcilline de la souche réceptrice C600, a été vérifié par antibiogrammes. Nous avons déterminé les CMI de la colistine des transconjugants obtenus, pour rechercher le cotransfert de la résistance à la colistine à C600. Pour tous les clones testés, les CMI étaient inférieures ou égales à 0,125 mg/l, comme celle de la souche C600 de départ. Par conséquent, aucune résistance à la colistine n'a été cotransférée par conjugaison en même temps que la résistance aux β -lactamines.

La souche BOUJ, possédant le gène de résistance plasmidique *mcr-1* a été utilisée comme témoin positif pour la conjugaison. Des transconjugants de cette souche ont été isolés sur le milieu contenant de la ticarcilline et ils contenaient le gène plasmidique *mcr-1* associé au gène de résistance aux β -lactamines. La résistance à la colistine a donc été transférée à C600.

En parallèle, pour toutes les souches de la collection, une expérience de conjugaison avec sélection des transconjugants sur un milieu sélectif contenant de la colistine a été réalisée. Pour toutes les souches de notre collection ainsi que pour le témoin BOUJ, aucun transconjugant n'a été retrouvé sur les géloses contenant 2 mg/l de colistine et 300 mg/l d'azide de sodium.

b. Transformation

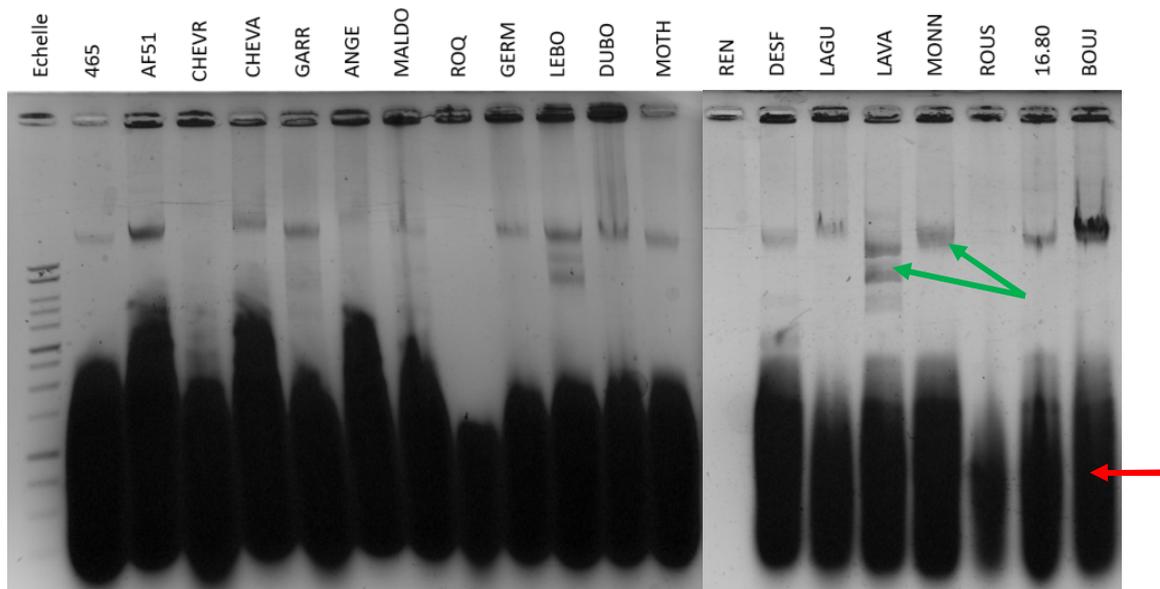


Figure 19 : Electrophorèse des extraits plasmidiques
Flèche rouge : ARN contaminant ; flèche verte : plasmides

Les extraits plasmidiques obtenus par lyse alcaline ont été déposés sur gel (**Figure 19**), et nous pouvons nettement distinguer la présence d'un ou plusieurs plasmides pour la majorité des isolats. L'extraction plasmidique a bien montré la présence de plasmide pour la souche témoin BOUJ mais aucun plasmide n'est visible pour les souches CHEVR, ROQ, REN et ROUS. Trois de ces souches possédaient pourtant une pénicillinase, et une bande aurait dû apparaître sur le gel, à moins que la quantité de plasmide soit en dessous du seuil de détection de la technique.

Après transformation d'*E. coli* TOP10 avec les extraits plasmidiques, aucune colonie n'a été retrouvée sur les géloses contenant 2 mg/l de colistine, mais nous n'avons pas obtenu non plus de transformants avec notre témoin *mcr-1* positif.

Les expériences de conjugaison et de transformation réalisées ne nous ont pas permis de mettre en évidence de résistance plasmidique dans notre collection d'*E. coli* CSR.

5. Recherche de résistances chromosomiques

A. Etude des mutations de la protéine PmrA

a. Identifications de mutations au sein de la protéine PmrA

Après PCR et séquençage des substitutions nucléotidiques ont été identifiées dans le gène *pmrA* pour 3 isolats (GERM, ROQU, MOTH) de notre collection (**Annexe 2 et 6**). Selon le score de Provean, les 3 mutations retrouvées étaient délétères pour la fonction de la protéine. Aucune mutation additionnelle n'a été identifiée dans les gènes *pmrB* et *mgrB* pour ces isolats (**Annexe 2 et 3**). Pour la souche GERM, aucune mutation de l'opéron *phoPQ* n'a été détectée, et l'amplification de cet opéron pour les souches ROQ et MOTH n'a pas donné de résultat malgré deux couples d'amorces différents utilisés (**Annexe 3**). Les 3 mutations de *pmrA* étaient situées dans le domaine REC (acides aminés 1 à 112) de la protéine PmrA, un domaine accepteur de phosphorylation.

b. Remplacements du gène *pmrA* d'*E. coli* TOP10 par le gène *pmrA* muté d'une souche CSR

Pour prouver l'implication des mutations de PmrA dans la résistance à la colistine de nos souches, nous avons réalisé un remplacement du gène *pmrA* sauvage d'*E. coli* TOP10 par les gènes mutés des souches de notre collection. Le choix de la souche *E. coli* TOP10 pour cette expérience a été guidé par la technique de remplacement de gène utilisé, nécessitant une souche *recA1* négative et résistante à la streptomycine par mutation dans le gène *rpsL*. Nous avons tout d'abord délété le gène *pmrA* d'*E. coli* TOP10 en intégrant à sa place, par recombinaison homologue, la cassette *rpsL-neo-pmrA* apportant une résistance à la kanamycine. Nous avons obtenu le mutant *rpsL-neo-ΔpmrA* pRed/ET TOP10. Puis dans un second temps nous avons remplacé la cassette *rpsL-neo-pmrA* par les gènes *pmrA* mutés des isolats GERM (L11P), ROQU (G15R), MOTH (R81H) et par le gène *pmrA* sauvage de la souche de référence *E. coli* ATCC25922 (**Figure 20**). Après vérification de nos constructions par PCR et séquençage, nous avons déterminé la CMI de la colistine des différents mutants obtenus : *pmrA*-GERM-TOP10, *pmrA*-ROQU-TOP10, *pmrA*-MOTH-TOP10, *pmrA*-ATCC25922-TOP10, *rpsL-neo-ΔpmrA*-TOP10 (**Tableau 5**).



Figure 20 : Remplacement du gène *pmrA* d'*E. coli* TOP10 par le gène *pmrA* muté d'une souche CSR.

La CMI de la colistine de la souche *E. coli* TOP10 délétée pour le gène *pmrA* (*rpsL-neo-ΔpmrA*-TOP10) était de 0,06 mg/l, comparable à celle de la souche initiale, suggérant que le gène *pmrA* n'est pas essentiel à la bactérie et que son absence n'entraîne pas de modification de la sensibilité à la colistine.

Tableau 5 - Résultats des CMI^a de la colistine pour les mutants *pmrA* d'*E. coli* TOP10.

	Mutation de <i>pmrA</i>	CMI ^a colistine (mg/l)	Phénotype
<i>E. coli</i> TOP10	WT ^b	0,03	Sensible
<i>E. coli</i> ATCC 25922	WT (témoin)	0,25	Sensible
<i>rpsL-neo-ΔpmrA</i> -TOP10	<i>ΔpmrA</i>	0,06	Sensible
<i>pmrA</i> -ATCC 25922-TOP10	WT (témoin)	0,03	Sensible
GERM	L11P	4	Résistant
<i>pmrA</i> -GERM-TOP10	L11P	0,06	Sensible
ROQU	G15R	8	Résistant
<i>pmrA</i> -ROQU-TOP10	G15R	0,125	Sensible
MOTH	R81H	8	Résistant
<i>pmrA</i> -ROQU-TOP10	R81H	0,06	Sensible

^a Concentration Minimale Inhibitrice ; ^b : sauvage ; en bleu : souches témoins ; en vert : témoin négatif ; En rouge : variation significative des CMI.

La souche reconstruite d'*E. coli* TOP10 avec le gène sauvage *pmrA* de la souche de référence ATCC25922 était également sensible à la colistine avec une CMI comparable à celle d'*E. coli* TOP10, montrant que la méthode utilisée pour l'échange allélique ne modifie pas la CMI de la colistine. Les souches reconstruites avec les gènes *pmrA* mutés des isolats ROQU et MOTH présentaient également un phénotype sensible et la variation des CMI obtenues par rapport à celles d'*E. coli* TOP10 initiale ou *pmrA*-ATCC25922-TOP10 est resté faible. Seul le mutant *pmrA*-GERM-TOP10 bien que sensible à la colistine a présenté une CMI significativement plus élevée (deux dilutions) par rapport à la CMI obtenue pour la souche parentale *E. coli* TOP10. Il n'a cependant jamais été possible d'obtenir des niveaux de résistance équivalents à ceux observés dans les souches cliniques.

B. Etude des mutations de la protéine PmrB

a. Identifications de mutations au sein de la protéine PmrB

Des mutations dans le gène *pmrB* ont été identifiées pour 15 souches de notre collection. Chacune des mutations retrouvées a été identifiée comme ayant un effet délétère sur la fonction de la protéine PmrB selon le score de Provean (**Annexe 2**). Deux souches CHEVA et REN présentaient la même délétion de 18 acides aminés (Δ 30-48). Nous avons donc effectué les expériences de complémentation et de remplacement de gène uniquement sur la souche REN. Ces deux souches ne semblaient pas reliées puisqu'elles ont été isolées à 7 mois d'intervalle, à partir de prélèvement urinaires d'un patient de l'hôpital de Dax et d'un patient du service de chirurgie vasculaire du CHU de Bordeaux (**Annexe 1**).

La souche FROM quant à elle présentait un codon stop à la place d'une leucine en position 110 rendant la protéine PmrB tronquée et ne permettant pas au score de Provean d'être appliqué dans ce cas. Aucune mutation additionnelle du gène *mgrB* n'a été retrouvée pour ces souches. De la même façon, peu de mutations additionnelles de l'opéron *phoPQ* ont été détectées parmi les souches possédant une version mutée de PmrB. Les souches CHEVA et LAVA présentaient des mutations neutres du gène *phoP* (respectivement V71F et V169I) selon le score de Provean. Une mutation délétère de *phoQ* a été identifiée chez la souche MONN (P368S). L'amplification et le séquençage de *phoPQ* ont été impossibles pour plusieurs souches de la collection malgré deux couples différents d'amorce utilisées (465, CHEVR, LEBO, MALDO et REN) (**Annexe 3**).

b. Complémentation des gènes mutés par le gène *pmrB* sauvage

A l'instar de ce qui a été fait dans des souches de *K. pneumoniae* (64), pour déterminer si les mutations identifiées étaient impliquées dans la résistance à la colistine, nous avons tout d'abord réalisé des expériences de complémentation avec le gène *pmrB* sauvage. Cela a consisté à transformer les souches cliniques résistantes, avec un plasmide apportant le gène sauvage (*pmrB*-pTOPO) en trans, de façon à retrouver un phénotype sauvage (**Figure 21**).

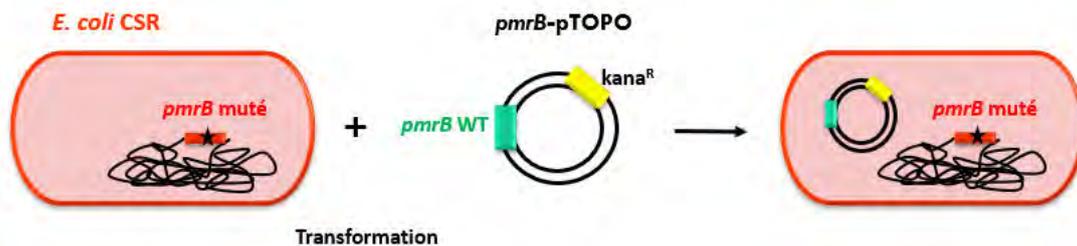


Figure 21 : Complémentation fonctionnelle des isolats d'*E. coli* CSR possédant une mutation de *pmrB*, avec un plasmide portant le gène *pmrB* sauvage.

pmrB WT : gène *pmrB* sauvage ; *kana^R* : gène conférant une résistance à la kanamycine ; CSR : résistant à la colistine.

Malheureusement, les résultats de la complémentation n'ont pas montré de restauration de la sensibilité à la colistine pour les souches testées (**Tableau 6**). En effet, les souches complémentées par ce plasmide sont restées résistantes à la colistine et présentaient des CMI proches de celles des souches parentales. En parallèle, les souches complémentées avec le plasmide témoin *mdh*-pTOPO (*mdh* est une séquence non codante) avaient aussi des CMI identiques à celles des souches parentales, montrant l'absence d'impact du plasmide sur les CMI. La souche AF51 étant résistante à la kanamycine, nous n'avons pas pu réaliser la complémentation avec le plasmide *pmrB*-pTOPO, la sélection des transformants se faisant sur kanamycine. Malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas réussi à apporter en trans le plasmide *mdh*-pTOPO dans la souche LAGU (R138H), néanmoins nous n'avons pas constaté de retour à la sensibilité de cette souche avec le plasmide *pmrB*-pTOPO.

Il a été observé une nette diminution de la CMI de la colistine pour les souches FROM (L110*) et REN (Δ 30-48) lors de l'apport en trans du plasmide *pmrB*-pTOPO, mais la même diminution a été observée avec le plasmide témoin *mdh*-pTOPO. En conséquence, les résultats obtenus par cette méthode de complémentation pour les souches FROM et REN n'ont pas été contributifs.

Pour la souche LEBO, nous avons observé que l'apport du plasmide *pmrB*-pTOPO entraînait la restauration de la sensibilité de l'isolat (CMI 2mg/L) avec une différence de deux dilutions par rapport à la souche parentale. Cependant la différence n'est que d'une dilution par rapport au clone de LEBO contenant le plasmide *mdh*-pTOPO (**Tableau 6**), et il n'a donc pas été possible de conclure sur l'impact de cette mutation dans la résistance à la colistine.

A l'inverse, pour la souche LAVA, une différence de deux dilutions a été observée entre les clones contenant les plasmides *mdh*-pTOPO et *pmrB*-pTOPO, bien qu'il n'y ait pas de retour à la sensibilité à la colistine, mais la différence par rapport à la souche parentale n'était que d'une dilution. (**Tableau 6**).

Par cette méthode, bien que des variations de CMI soient observables, elles n'ont pas permis de confirmer l'impact des mutations identifiées dans notre collection de souches, sur la résistance à la colistine.

Tableau 6 - Résultats des CMI de la colistine pour les souches CSR complémentées par le gène *pmrB* sauvage apporté en *trans* dans le plasmide pTOPO.

	Mutations de <i>pmrB</i>	CMI CS ^a (mg/l)	Phénotype	CMI <i>mdh</i> -pTOPO dans CSR ^b (mg/l)	Phénotype	CMI <i>pmrB</i> -pTOPO dans CSR (mg/l)	Phénotype
LEBO	R11L	8	Résistant	4	Résistant	2	Résistant
GARR	L13P	4	Résistant	16	Résistant	8	Résistant
465	G19E	16	Résistant	16	Résistant	8	Résistant
CHEVR	G22E	16	Résistant	8	Résistant	8	Résistant
REN	Δ30-48	4	Résistant	0,12	Résistant	0,12	Résistant
MONN	P94L	8	Résistant	8	Résistant	4	Résistant
LAENS	P94A	8	Résistant	16	Résistant	8	Résistant
LAMO	L101P	8	Résistant	8	Résistant	4	Résistant
FROM	L110*	2	Sensible	0,12	Sensible	0,06	Sensible
MALDO	T114P	8	Résistant	8	Résistant	4	Résistant
LAGU	R138H	8	Résistant	E ^c	-	8	Résistant
LAVA	R138H, G305R	8	Résistant	16	Résistant	4	Résistant
ANGE	D152V	8	Résistant	8	Résistant	8	Résistant
AF51	D315N	16	Résistant	Complémentation non réalisable avec pTOPO- <i>pmrB</i>			

^a Concentration Minimale Inhibitrice de la colistine ; ^b souche résistante à la colistine ; ^c non obtenu, plusieurs échecs ; En rouge : résultats non interprétables.

c. Complémentation par les gènes mutés chez *E. coli* TOP10 et *E. coli* ATCC 25922

À la suite de ces résultats, nous avons pensé que les mutations du gène *pmrB* étaient « dominantes » sur le phénotype observé, même en présence du gène sauvage. Nous avons donc voulu tester cette hypothèse, en réalisant l'expérience inverse de complémentation, c'est-à-dire en apportant en *trans* les gènes *pmrB* mutés (plasmides *pmrB**-pBR322) dans *E. coli* TOP10 possédant le gène sauvage (**Figure 22**). Nous avons utilisé un plasmide à faible nombre de copies pBR322, car si la mutation de PmrB était « dominante », la présence de protéines PmrB mutées même apportées en peu d'exemplaire devrait entraîner une variation des CMI. La CMI de la souche *E. coli* TOP10 pour la colistine étant très basse (0,03mg/L), la gamme de CMI a été étendue pour détecter les variations de CMI dues à l'apport en *trans* des plasmides *pmrB**-pBR322. Il a été également vérifié que la présence du plasmide pBR322 sans insert n'avait pas d'influence sur la CMI de la colistine chez *E. coli* TOP10.

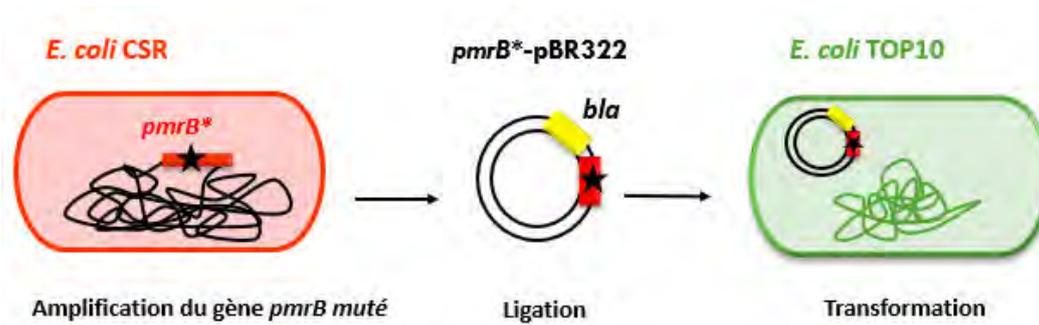


Figure 22 : Complémentation par les gènes *pmrB* mutés chez *E. coli* TOP10.

*pmrB** : gène *pmrB* muté ; *bla* : gène de résistance à l'ampicilline ; CSR : résistant à la colistine.

Les CMI de la colistine des clones obtenus sont présentées dans le tableau ci-après (**Tableau 7**). Là encore, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'implication des mutations observées dans *pmrB* sur la résistance à la colistine, car il n'a pas été constaté de diminution significative de la sensibilité à la colistine d'*E. coli* TOP10 lorsque les gènes *pmrB* mutés ont été apportés en trans à l'aide du plasmide pBR322.

La CMI de la colistine pour la souche *E. coli* TOP10 étant particulièrement basse, il était possible que la sensibilité très importante de cette souche vis-à-vis de la colistine, ne permette pas de visualiser les variations de sensibilité à la colistine. Nous avons alors réalisé la même expérience de complémentation avec la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 et les plasmides *pmrB**-pBR322. La souche *E. coli* ATCC 25922 possédait une CMI de la colistine de 0,25 mg/L, plus représentative des CMI observées pour les *E. coli* sensibles retrouvés en clinique.

Malgré cela, nous n'avons pas constaté de variation significative des CMI de la colistine pour la souche de référence lorsque les gènes *pmrB* mutés ont été apportés en trans à l'aide du plasmide pBR322. Le plasmide pBR322 sans insert n'avait pas d'influence sur la CMI de la colistine pour *E. coli* ATCC (**Tableau 7**).

Pour les deux expériences de complémentation précédentes, le clonage des gènes *pmrB* mutés de 2 souches (LEBO, MONN) n'a pu être réalisé, malgré plusieurs tentatives. Les souches LAENS et LAMO recueillies plus tardivement n'ont pas non plus pu être testées par ces méthodes.

Aucune de ces deux expériences n'a pu apporter d'information supplémentaire sur l'implication des modifications de PmrB identifiées sur la résistance à la colistine.

Tableau 7 - Résultats des CMI^a de la colistine pour les souches sensibles à la colistine complétées par les gènes *pmrB* mutés apportés en trans dans le plasmide *pmrB**-pBR322.

	Mutation de <i>pmrB</i>	CMI CS ^b (mg/l)	CMI <i>pmrB</i> *-pBR322 dans TOP10 (mg/l)	CMI <i>pmrB</i> *-pBR322 dans <i>E. coli</i> ATCC ^c 25922 (mg/l)
<i>E. coli</i> TOP10	WT	0.03	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	WT	0.25	0.06	0,25
LEBO	R11L	8	E ^d	E
GARR	L13P	4	0.06	0.12
465	G19E	16	0.06	0.12
CHEVR	G22E	16	0.03	E
REN	Δ30 to 48	4	0.06	0.25
MONN	P94L	8	E	E
LAENS	P94A	8	NR ^e	NR
LAMO	L101P	8	NR	NR
FROM	L110*	2	0.03	0.25
MALDO	T114P	8	0.06	0.25
LAGU	R138H	8	0.06	0.25
LAVA	R138H, G305R	8	0.06	E
ANGE	D152V	8	0.06	0.12
AF51	D315N	16	0.06	0.25
pBR322-TOP10	WT	0.03	-	-
pBR322- <i>E. coli</i> ATCC 25922	WT	0.125	-	-

^a Concentration Minimale Inhibitrice ; ^b colistine ; ^c American Type Culture Collection ; ^d non obtenu, plusieurs échecs ; ^e non réalisé, souche intégrée tardivement à la collection ; en bleu : souches témoin ; en vert : témoins négatifs.

d. Remplacement du gène *pmrB* d'*E. coli* TOP10 par les gènes *pmrB* mutés de nos souches

Dans un troisième temps, nous avons cherché à introduire spécifiquement les mutations retrouvées dans nos souches, dans le chromosome de la souche d'*E. coli* sensible à la colistine. Nous avons ainsi réalisé un échange allélique entre le gène *pmrB* sauvage d'*E. coli* TOP10 et le produit de PCR du gène *pmrB* muté de nos souches CSR. La méthode appliquée pour l'échange allélique de *pmrA* n'a pu être appliquée à l'identique ; en effet, malgré plusieurs tentatives, il n'a pas été possible d'obtenir des clones possédant les gènes mutés. Nous avons donc mis au point une technique différente, permettant notamment une meilleure sélection des mutants, en utilisant un milieu contenant de l'ampicilline. Nous avons en réalité remplacé le gène *pmrB* sauvage de TOP10 par le produit de PCR contenant à la fois le gène *pmrB* muté et le gène d'une pénicillinase (*pmrB**-*bla*), et rendant le mutant résistant à l'ampicilline (**Figure 23**). Il a été vérifié que l'apport du gène *bla*_{TEM} associé à *pmrB* dans la souche TOP10 n'avait pas d'impact sur la sensibilité à la colistine, en réalisant cet échange allélique avec le gène *pmrB* sauvage de la souche de référence ATCC 25922.

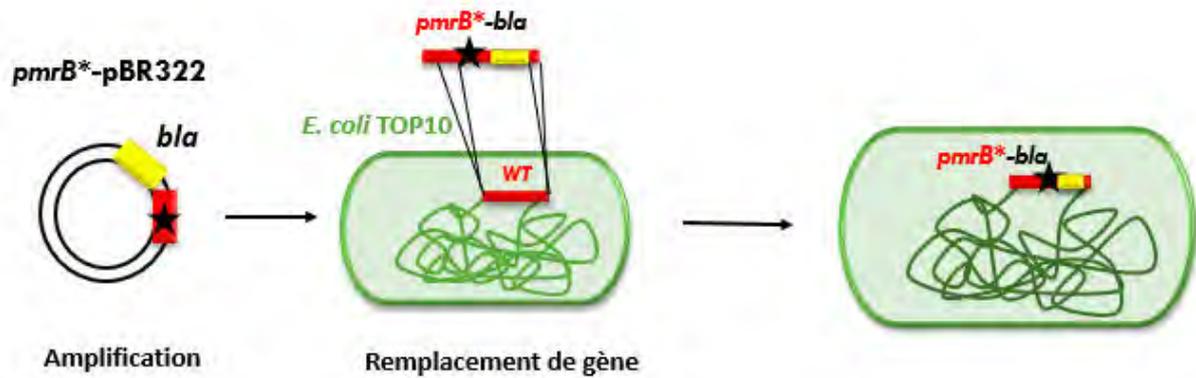


Figure 23 : Remplacement du gène *pmrB* sauvage d'*E. coli* TOP10 par les gènes *pmrB* mutés de nos souches.
*pmrB** : gène *pmrB* muté ; *bla* : gène de résistance à l'ampicilline ; WT : gène *pmrB* sauvage.

La CMI de la colistine des mutants a été déterminée ainsi que celle de la souche délétée en *pmrB* (*rpsL-neo-ΔpmrB* TOP10) (**Tableau 8**). La souche délétée en *pmrB* était sensible à la colistine et présentait une CMI proche de celle de la souche d'*E. coli* TOP10, suggérant, comme pour *pmrA*, que *pmrB* n'est pas essentiel pour la bactérie et que son absence ne modifie pas la sensibilité à la colistine. Les souches reconstruites possédant le fragment *pmrB*-bla* n'ont pas présenté de diminution de la sensibilité à la colistine. En effet, le CMI de la colistine sont identiques à celle d'*E. coli* TOP10, à celle de la souche délétée en *pmrB* et à celle de la souche reconstruite avec le gène *pmrB* sauvage associé au gène *bla_{TEM}*.

Cet échange allélique a été réalisé à partir des plasmides *pmrB*-pBR322* utilisé précédemment pour la complémentation. Ce plasmide n'ayant pu être obtenu pour les gènes *pmrB* mutés des souches LEBO, MONN, LAENS et LAMO, les mutations (R11L, P94L, P94A, et L101P) n'ont pas pu être étudiées par échange allélique.

Tableau 8 - Résultats des CMI^a de la colistine pour les mutants *pmrB* d'*E. coli* TOP10.

	Mutation de <i>pmrB</i>	CMI colistine (mg/L)	Remplacement du gène <i>pmrB</i> d' <i>E. coli</i> TOP10 par <i>pmrB</i> *- <i>bla</i> (CMI en mg/L)
<i>E. coli</i> ATCC ^b 25922	WT	0.25	0,06
<i>E. coli</i> TOP10	WT	0.03	-
LEBO	R11L	8	E ^c
GARR	L13P	4	0.06
465	G19E	16	0.06
CHEVR	G22E	16	0.06
REN	Δ30 to 48	4	0.03
MONN	P94L	8	E
LAENS	P94A	8	NR ^d
LAMO	L101P	8	NR
FROM	L110*	2	0.06
MALDO	T114P	8	0.06
LAGU	R138H	8	0.06
LAVA	R138H, G305R	8	0.06
ANGE	D152V	8	0.06
AF51	D315N	16	0.06
<i>rpsL-neo-ΔpmrB</i> TOP10	Δ <i>pmrB</i>	0.03	-

^a Concentration Minimale Inhibitrice de la colistine ; ^b American Type Culture Collection ; ^c non obtenu, plusieurs échecs ; ^d non réalisé, souche intégrée tardivement à la collection ; en bleu : souches témoins.

e. Complémentation des gènes mutés par l'opéron *pmrAB* sauvage

En dernier recours, pour essayer de déterminer l'implication des mutations observées chez nos souches dans la résistance à la colistine, nous avons réalisé des expériences de complémentation avec l'opéron *pmrAB* sauvage. En effet, nous avons émis l'hypothèse que l'apport en trans du gène *pmrB* seul ne suffisait pas à restaurer la sensibilité à la colistine et que l'apport de l'opéron *pmrCAB* était probablement nécessaire. Nous n'avons cependant pas réussi à construire un plasmide portant l'opéron *pmrCAB* dans sa totalité après plusieurs tentatives de clonages et des plasmides différents. Seul le clonage de la séquence *pmrAB* dans le plasmide pGEMT a été obtenue. La majorité des souches de la collection était résistante à l'ampicilline, or la sélection des transformants obtenus avec le plasmide *pmrAB*-pGEMT devait être réalisée sur ampicilline. Ainsi, à partir de ce plasmide, nous avons donc fabriqué le plasmide *pmrAB-mdh*-pTOPO permettant de compléter un nombre plus important de souches de notre collection en sélectionnant les transformants sur kanamycine (**Figure 24**).

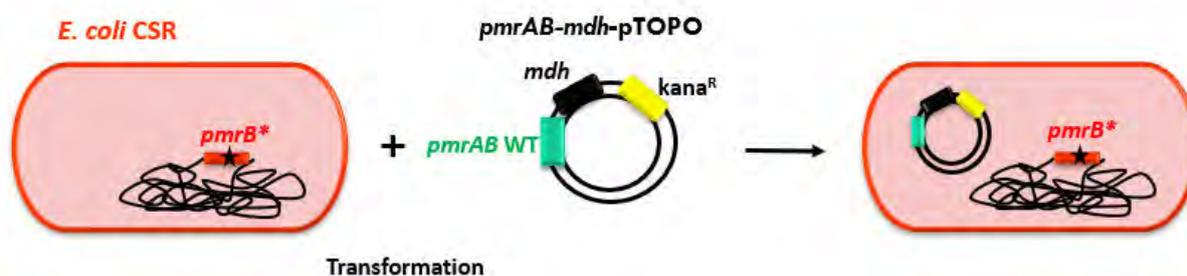


Figure 24 : Complémentation de nos gènes *pmrB* mutés par l'opéron *pmrAB* sauvage.

*pmrB** : gène *pmrB* muté ; *kana^R*: gène conférant une résistance à la kanamycine ; *pmrAB WT* : gène *pmrAB* sauvage ;
mdh : séquence non codante ; CSR : résistant à la colistine.

Comme les méthodes précédentes n'avaient pas permis de démontrer l'implication des mutations identifiées dans la résistance à la colistine, nous avons cherché un témoin positif pour appuyer les résultats de cette dernière complémentation. La mutation de PmrB L110* a été prouvée responsable de la résistance à la colistine chez la souche suédoise reconstruite DA39554 dans l'étude d'Hjort *et al* (148). Cette souche nous a aimablement été expédié par les auteurs pour que nous puissions l'utiliser en tant que témoin positif. Lors de la réalisation de l'expérience de complémentation avec le plasmide *pmrAB-mdh-pTOPO* DA39554, nous avons observé un retour vers la sensibilité à la colistine, ce qui nous a permis de valider cette technique de complémentation.

La complémentation a ensuite été réalisée sur les souches présentant une mutation dans le gène *pmrA* et sur les souches présentant une mutation dans le gène *pmrB*. Comme précédemment, la complémentation avec le plasmide *pmrAB-mdh-pTOPO* n'a pas pu être réalisée sur la souche AF51 (la sélection des transformants se faisant sur la kanamycine et AF51 étant résistante à la kanamycine).

Pour 9 des souches CSR testées (465, CHEVR, GARR, LAENS, LAMO, MALDO, LAVA, ANGE et MOTH), l'apport en trans de la séquence *pmrAB* sauvage à l'aide du plasmide *pmrAB-mdh-pTOPO*, n'a pas montré de restauration de la sensibilité à la colistine (**Tableau 9**). Ces 9 souches complémentées présentaient des CMI identiques à celles des souches parentales. Les souches complémentées en parallèle avec le plasmide *mdh-pTOPO* avaient aussi des CMI identiques à celles des souches parentales montrant l'absence d'impact du plasmide sur les CMI de ces 9 souches.

Nous n'avons pas réussi à apporter en trans les plasmides *mdh-pTOPO* et *pmrAB-mdh-pTOPO* dans la souche LAGU (PmrB R138H) et ROQ (PmrA R81H), après plusieurs tentatives.

Il a été observé une diminution de la CMI de la colistine pour les souches FROM (L110*) et REN (Δ 30-48), lors de l'apport en trans des deux plasmides *mdh*-pTOPO et *pmrAB-mdh*-pTOPO, ne permettant pas de conclure sur l'impact de ces mutations dans la résistance à la colistine (Tableau 9).

A l'inverse, pour GARR, nous avons constaté une augmentation de 2 dilutions pour les CMI de la colistine des clones obtenus avec les plasmides *mdh*-pTOPO et *pmrAB-mdh*-pTOPO (Tableau 9).

Les résultats de la souche LEBO ont montré une restauration partielle de la sensibilité à la colistine lors de l'apport du plasmide *pmrAB-mdh*-pTOPO (2 mg/l) ; les CMI présentaient ainsi une différence de deux dilutions avec la souche parentale (8 mg/l) et d'une dilution avec la souche complémentée avec le plasmide *mdh*-pTOPO (4 mg/L) (Tableau 9). Les mêmes résultats avaient été observés lors de la complémentation avec le plasmide *pmrB*-pTOPO (Tableau 6).

Tableau 9 - Complémentation des souches d' *E. coli* CSR avec le plasmide *pmrAB-mdh*-pTOPO.

	Protéine mutée	Mutations	CMI CS ^a (mg/l)	Phénotype	CMI <i>mdh</i> -pTOPO dans CSR ^b (mg/l)	Phénotype	CMI <i>pmrAB-mdh</i> -pTOPO dans CSR (mg/l)	Phénotype
		L110*	4	Résistant	4	Résistant	0,12	Sensible
		R11L	8	Résistant	4	Résistant	2	Sensible
		L13P	4	Résistant	16	Résistant	16	Résistant
		G19E	16	Résistant	16	Résistant	8	Résistant
		G22E	16	Résistant	8	Résistant	8	Résistant
		Δ 30-48	4	Résistant	0,12	Résistant	0,12	Résistant
		P94L	8	Résistant	8	Résistant	0,12	Sensible
		P94A	8	Résistant	8	Résistant	16	Résistant
		L101P	8	Résistant	8	Résistant	8	Résistant
		L110*	2	Sensible	0,12	Sensible	0,06	Sensible
		T114P	8	Résistant	8	Résistant	8	Résistant
		R138H	8	Résistant	E ^d	-	E	-
		R138H, G305R	8	Résistant	16	Résistant	4	Résistant
		D152V	8	Résistant	8	Résistant	8	Résistant
		D315N	16	Résistant	Complémentation non réalisable avec pTOPO- <i>pmrAB</i>			
		L11P	4	Résistant	4	Résistant	0,12	Sensible
		G15R	8	Résistant	E	-	E	-
		R81H	8	Résistant	8	Résistant	8	Résistant

^a Concentration Minimale Inhibitrice de la colistine ; ^b souche résistante à la colistine ; ^c non obtenu, plusieurs échecs

En bleu : témoin positif ; en vert : mutations impliquées dans la résistance à la colistine ; en rouge : non interprétable

Pour la souche MONN portant la mutation de PmrB P94L et la souche GERM portant la mutation L11P de PmrA, il a été observé une restauration totale de la sensibilité à la colistine lors de l'apport en trans du plasmide *pmrAB-mdh*-pTOPO (Tableau 9). Une diminution de 6 dilutions sur les CMI de la souche MONN complémentée avec *pmrAB-mdh*-pTOPO (0,12 mg/l) a été observée par rapport aux CMI de la colistine pour la souche parentale (8 mg/l) et pour la souche complémentée avec

le plasmide témoin *mdh*-pTOPO (8 mg/l). Une diminution de 4 dilutions de la CMI de la colistine de la souche GERM complémentée avec *pmrAB-mdh*-pTOPO (0,12 mg/l) a été observée par rapport aux CMI pour la souche parentale (4 mg/l) et pour la souche complémentée avec *mdh*-pTOPO (4 mg/l).

Malheureusement, nous n'avons pas obtenu la transformation du plasmide *pmrAB-mdh*-pTOPO pour la souche ROQ. Nous n'avons ainsi pas pu confirmer par cette méthode l'influence de la substitution G15R sur la CMI colistine observée lors du remplacement du gène *pmrA* sauvage d'*E. coli* TOP10 par le gène *pmrA-ROQ*.

VI. Discussion

Pendant plusieurs décennies, l'absence de méthodes de détection efficaces de la résistance à la colistine et l'utilisation limitée de la colistine en médecine humaine ont fait que la résistance à la colistine chez *E. coli* est encore peu documentée. C'est notamment le cas pour la résistance plasmidique qui a été découverte récemment, bien qu'elle semble avoir émergé il y a plusieurs années. Nous avons étudié cette résistance chromosomique et plasmidique à partir de 28 isolats d'*E. coli* CSR collectés pendant 2 ans au CHU Pellegrin, à Bordeaux.

La résistance à la colistine a été confirmée pour 24 des 28 souches de notre collection, deux souches ont été détectées résistantes à tort par le système Phoenix et une par la gélose SuperPolymyxin. Le taux de fausses résistances identifiées par le Phoenix sur notre collection de souches est d'environ 8% (2 souches sur 24), ceci confirme le peu de spécificité des méthodes standardisées utilisées à l'heure actuelle pour la détection de cette résistance. La confirmation de la résistance à la colistine par BMD est donc nécessaire avant son utilisation clinique dans le traitement des infections à BGN, comme recommandé par le CLSI et l'EUCAST. Néanmoins la détermination des CMI par BMD a été réalisée après congélation des souches et il se peut que cette congélation qui entraîne un stress pariétal puisse modifier la CMI de la colistine (58,149).

Les CMI de la colistine retrouvées pour nos souches se situent entre 4 et 16 mg/L, il n'a pas été observée de résistance de haut niveau à la colistine comme ce qui est observé habituellement chez d'autres BGN, notamment *K. pneumoniae* et *Enterobacter spp.* (53). Chez *E. coli*, les résistances à la colistine, qu'elles soient plasmidiques ou chromosomiques semblent être de bas niveau.

Peu de résistances associées ont été observées chez nos isolats. Dans notre collection d'*E. coli* CSR isolés à Bordeaux (26 souches), 34,6% des isolats possédaient une pénicillinase et 3,8% étaient productrices de BLSE. Par ailleurs, il n'a pas été observé de bactérie productrice de carbapénémase dans notre collection de souches. Les taux de résistance aux fluoroquinolones était superposable à ce qui est observé en France en 2017 soit environ 15% (données de l'ECDC <https://ecdc.europa.eu/>). Aucune souche ne présentait simultanément des résistances associées aux 3 principales familles d'antibiotiques (β -lactamines, fluoroquinolones et aminosides). Néanmoins, 3 souches étaient résistantes à plus de 3 familles d'antibiotiques, la proportion de BMR dans notre collection d'*E. coli* CSR est de 11,5 %, mais plusieurs solutions thérapeutiques restaient envisageables pour le traitement des infections dues à ces souches, contrairement à ce qui est habituellement observé pour *K. pneumoniae*, où la résistance à la colistine apparaît lors d'infections nosocomiales à bactéries déjà multirésistantes (32). Par ailleurs, chez *K. pneumoniae* la résistance à la colistine est souvent observée

chez des isolats recueillis chez des patients ayant été traités par la colistine (32). Dans notre étude, la grande majorité des isolats d'*E. coli* CSR collectés étaient responsables d'infections communautaires, et la résistance à la colistine était apparue sans pression de sélection, c'est-à-dire sans antécédent de traitement par cet antibiotique (seul le patient Suisse avait reçu un traitement par colistine). Cette donnée est corroborée par d'autres observations similaires faites en Espagne, au Laos, au Nigéria, en France et en Thaïlande (149). La diffusion de la résistance plasmidique à la colistine est le plus souvent attribuée au réservoir animal en raison de l'utilisation importante de cet antibiotique dans l'industrie agro-alimentaire il y a quelques années. Les taux de résistance d'*E. coli* à la colistine observés dans les élevages de porc ou de volaille sont plus élevés qu'en clinique (47,139). Cependant il n'y a pas actuellement de données concernant la diffusion de la résistance chromosomique à la colistine chez *E. coli*.

Deux de nos souches, provenant du CHU de Bordeaux, portaient le gène de résistance plasmidique *mcr-1*, ce qui est en accord avec la faible prévalence de ce gène en Europe (150). Les CMI de la colistine pour ces isolats étaient comparables à celles observées dans d'autres études soit 8mg/L. Bien qu'il n'ait pas été mis en évidence de nouveau gène de résistance plasmidique à la colistine par conjugaison ou par transformation, l'absence de résistance plasmidique dans nos souches ne peut être affirmée avec certitude. Tout d'abord, les méthodes utilisées sont peu sensibles et mobilisent peu les plasmides de grandes tailles par transformation ou les plasmides peu conjugatifs. Ceci est notamment le cas pour le gène *mcr-1*, ce qui explique sa découverte tardive (151). Dans les expériences de conjugaison réalisées par Sun et al sur des souches d'*E. coli* possédant *mcr-1*, le transfert du gène *mcr-1* était par exemple plus fréquent lorsqu'il était porté par le plasmide IncX4 que lorsqu'il était sur d'autres plasmides (151). Dans notre étude, pour la souche BOUJ, utilisée comme témoin dans les expériences de conjugaison et de transformation, le transfert de la résistance plasmidique n'a pu être obtenu que par conjugaison et jamais par transformation. La méthode de transformation utilisée dans notre travail a pourtant permis de transférer avec succès la résistance à la colistine d'une souche de *S. enterica* possédant un variant du gène *mcr-4* (autre projet de recherche de l'unité), mais le plasmide porteur de ce gène était de petite taille (environ 8kb). Par ailleurs, la résistance plasmidique à la colistine est une résistance de bas niveau, avec des CMI allant le plus souvent de 4 à 8 mg/l. Une concentration en colistine trop élevée des milieux de sélection, diminue la sensibilité de la méthode, mais à l'inverse, une concentration trop faible, entraîne une moins bonne spécificité. La sélection sur colistine des souches résistantes s'avère donc très délicate.

Dix-huit souches de la collection d'*E. coli* CSR portaient des mutations chromosomiques dans les gènes *pmrA* et *pmrB* (Annexes 1 et 6), mais aucune mutation n'a été détectée dans le gène *mgrB* qui est pourtant largement impliqué dans la résistance à la colistine chez *K. pneumoniae*. Majoritairement

les mutations ont été retrouvées dans le gène *pmrB* (15 souches), et l'ensemble des mutations ont été étudiées par plusieurs méthodes. Il a d'abord été mis en évidence que les délétions des gènes *pmrA* et *B* n'entraînaient pas de variation de la CMI de la colistine, comme cela avait été également démontré par *Froelich et al* pour *pmrA* (152) et par *Hjort et al* pour *pmrB* (148).

Les 3 substitutions retrouvées dans PmrA étaient situées dans le domaine REC de la protéine, qui est un domaine accepteur de phosphorylation (**Annexes 1 et 6**). Il semble que des modifications de ce domaine puissent être importantes pour la résistance à la colistine : 4 substitutions dans ce domaine de PmrA ont déjà été prouvées comme responsables de la résistance à la colistine chez des souches d'*E. coli* : A42T, G53V, G53E et L105P (133,137,138,148). L'échange allélique avec les gènes mutés de nos souches n'a pas apporté d'informations sur l'implication des modifications de PmrA dans la résistance à la colistine. Cependant, la complémentation des souches parentales par le plasmide *pmrAB-mdh-pTOPO* a permis de restaurer la sensibilité à la colistine pour la souche GERM. Cette souche ne présentant pas de mutation additionnelles dans les gènes d'intérêts *pmrB*, *mgrB*, *phoP* et *phoQ* ni de résistance plasmidique à la colistine, nous pouvons affirmer que la mutation L11P de PmrA est responsable de la résistance à la colistine chez cette souche. Le mécanisme de résistance à la colistine des souches MOTH et ROQU n'ont pas pu être clairement identifiés. La variation de CMI observée lors de l'échange allélique pour la souche ROQU n'a malheureusement pas pu être confirmée par complémentation avec *pmrAB-mdh-pTOPO*, par absence de transformation vraisemblablement liée à des bactéries insuffisamment compétentes.

Quatorze mutations dans le gène *pmrB* ont été retrouvées dans notre collection de souches. Ces mutations étaient localisées dans des domaines variés de la protéine PmrB, mais elles étaient plus particulièrement présentes dans le domaine HAMP, qui semble impliqué dans la régulation de la phosphorylation. Plusieurs mutations de ce domaine ont déjà été décrites dans des souches résistantes, notamment L110*, retrouvée pour notre étude dans la souche FROM (148) (**Annexe 6**).

L'absence de complémentation de nos souches résistantes avec le gène *pmrB* sauvage seul, est à l'opposé de ce qui a été démontré chez *K. pneumoniae* (153). La principale hypothèse que nous avons formulée était que la version mutée du gène *pmrB* était « dominante » sur la version sauvage de celui-ci. Cependant, la complémentation de souches sensibles *E. coli* TOP10 avec les gènes *pmrB* mutés n'a pas permis non plus de mettre en évidence une diminution de leur sensibilité à la colistine et va contre cette hypothèse. Une autre explication envisagée a donc été que la souche *E. coli* TOP10 possédait une CMI pour la colistine très faible et que les altérations du gène *pmrB* apportées dans cette souche ne suffisaient pas à entraîner une augmentation des CMI. Nous avons donc utilisé, pour la complémentation, la souche de référence *E. coli* ATCC possédant une CMI de la colistine supérieure

à celle d'*E. coli* TOP10 (respectivement 0,25mg/L et 0,03 mg/L), mais les résultats obtenus n'ont pas apporté pas d'information supplémentaire sur l'implication des mutations retrouvées dans la résistance à la colistine.

Dans la littérature, aucune mutation de PmrB impliquée dans la résistance à la colistine n'a été mise en évidence par complémentation chez *E. coli* (**Tableau 4**). L'implication des mutations L10P, V88del, R89P, L110*, G206D ayant été prouvée par remplacement de gène (133,134,141), nous avons donc mis au point une méthode similaire au laboratoire. Il n'a cependant pas été constaté non plus d'augmentation des CMI de la colistine par cette technique lors des remplacements du gène *pmrB* sauvage avec celui de nos souches CSR.

L'échange allélique réalisé pour la mutation L110* et les complémentations effectuées avec la souche présentant cette mutation (FROM) n'étaient pas en faveur d'une variation de la sensibilité à la colistine. Ceci allait à l'encontre de ce qui a été montré par *Hjort et al* (148) qui ont observé par échange allélique l'implication de cette modification de PmrB dans la résistance à la colistine par échange allélique. Cette mutation était responsable d'une diminution de la sensibilité à la colistine de leur souche reconstruite (CMI 2 mg/l) par rapport à leur souche délétée du gène *pmrB* (CMI 0,125 mg/l). Lors des déterminations de la CMI de la colistine pour la souche FROM nous avons retrouvé une CMI plus basse que la CMI initiale (0,25 – 0,5 mg/L contre 2 mg/L). Il est possible que de façon identique à ce qui a été décrit chez *K. pneumoniae*, *A. baumannii* et *P. aeruginosa*, une conservation des isolats à -80°C pendant plus de 6 mois aurait pu entraîner une perte de la résistance à la colistine (58). La congélation se fait en bouillons glycérolé, or le glycérol pourrait entraîner un stress de la paroi et induire des mutations compensatrices provoquant le retour à la sensibilité des souches.

De la même façon pour la souche REN, une diminution des CMI a été observée lors de l'apport de chacun des plasmides de l'étude, qu'il soit porteur d'un gène potentiel de résistance ou non. Lors de la préparation des cellules électro-compétentes à partir des souches cliniques, plusieurs lavages successifs sont réalisés dans du glycérol, entraînant la perte des cations Mg²⁺ et Ca²⁺ associés à la membrane bactérienne. Nous pouvons penser, là aussi, que cette préparation peut entraîner une perte de résistance à la colistine pour certaines souches, notamment pour la souche REN.

Notre dernière hypothèse est que la complémentation ou l'échange allélique avec le gène *pmrB* sauvage seul ne suffisaient pas et que le transfert de l'opéron entier était nécessaire. En effet, pour 1 souches de la collection (MONN)) ainsi que pour la souche témoin DA39554, l'apport en trans du plasmide *pmrAB-mdh-pTOPO* a entraîné le retour à un phénotype sensible et une diminution des CMI de 5 à 6 dilutions. Ceci nous permet d'affirmer que la mutation P94L de PmrB, localisée dans le domaine HAMP, est responsable de la résistance à la colistine. La substitution P94L avait déjà été

observée dans une souche résistante à la colistine (CMI > 64 mg/l), obtenue par mutation in vitro d'une souche d'*E. coli* initialement sensible à la colistine (143). Cependant elle n'avait pas encore été observée dans une souche clinique et la confirmation de l'implication de cette mutation dans la résistance à la colistine n'avait pas été réalisée.

Parmi les 19 mutations de *pmrB* identifiées chez des isolats d'*E. coli* CSR, seulement 6 mutations ont été confirmées comme responsables de la résistance à la colistine. Par ailleurs, la substitution P94L est la 2^{ème} mutation du domaine protéique HAMP à être prouvée comme entraînant une résistance à la colistine chez *E. coli*. Le faible nombre de modifications de PmrB impliquées de façon certaine dans la résistance à la colistine illustre la difficulté de l'étude de ces mutations chromosomiques chez *E. coli*.

Une autre souche de la collection (LAENS) possédait une mutation différente de PmrB en position 94, la substitution d'une proline par une alanine. Il n'a cependant pas été observé de complémentarité par *pmrAB-mdh-pTOPO* avec cette souche, toutefois, le score de Provean appliqué à cette mutation était moins délétère que pour la mutation P94L. Ces deux acides aminés, l'alanine et la leucine, sont hydrophobes selon le diagramme de Venn mais la leucine est un groupement aliphatique de taille plus importante. Cette substitution étant située dans le domaine histidine kinase (HAMP) de la protéine PmrB, le type et la taille de l'acide aminé à cette position a probablement un impact dans la conformation de la protéine et dans sa fonction kinase.

Pour la majorité de nos souches, il semble que les mutations de *pmrAB* retrouvées ne soient pas suffisantes à elles seules pour induire une augmentation des CMI à la colistine. L'origine majoritairement communautaire des souches, la perte de résistance constatée chez plusieurs souches lors de la congélation ou de la préparation de cellules compétentes, ainsi que la résistance de bas niveau observée chez *E. coli* pourraient être expliquées par le fait que les mutations retrouvées sont des mutations de régulation ou d'induction de ces gènes, et non pas des mutations entraînant une résistance constitutive à la colistine. Cet antibiotique appartient à la famille des peptides antimicrobiens cationiques (CAMPs), un type de peptides présents au niveau du tractus digestif humain (défensines et gramicidines) qui joue un rôle de protecteur antimicrobien. Sous la pression des CAMPs, les souches digestives d'*E. coli* réguleraient de façon différente les gènes impliqués dans les modifications du LPS pour résister à ces peptides (149). L'influence des sels biliaires digestifs a aussi été avancé comme pouvant avoir une influence sur l'induction de la résistance à la colistine : la mutation de *pmrA* en position 53 retrouvée chez *E. coli* CSR entraîne une hypersensibilité à l'acide déoxycholique (152).

VII. Conclusion et perspectives

La résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue un problème de santé au niveau mondial, et dans ce contexte la surveillance des BMR et la compréhension des mécanismes de résistance sont des éléments indispensables à la prise de décisions efficace pour limiter la diffusion de la résistance. L'émergence de la résistance à la colistine est la plus récente et de nombreux aspects restent encore non élucidés, notamment pour certaines espèces bactériennes comme *E. coli*.

A partir d'une collection de souches cliniques d'*E. coli* CSR provenant en majorité du CHU de Bordeaux, nous avons étudié les caractéristiques de la résistance à la colistine de ces souches. Nous avons d'abord constaté que ces souches résistantes étaient, le plus souvent, isolées d'infections communautaires, sans pression de sélection préalable par un traitement à la colistine.

Par la suite, la recherche des mécanismes de résistance nous a montré que cette résistance était essentiellement chromosomique, avec seulement 2 souches bordelaises porteuses du gène plasmidique *mcr-1*. La détection des mutations dans les gènes responsables de modifications du LPS et potentiellement impliqués dans la résistance a permis de souligner, d'une part la diversité des modifications génétiques observées, et d'autre part la large prédominance de la localisation des mutations dans le gène *pmrB*. L'analyse de ces mutations nous a permis d'identifier deux mécanismes importants impliqués dans la résistance à la colistine : une dans le gène *pmrA* dans le domaine accepteur de phosphorylation, et une autre dans le gène *pmrB* dans le domaine HAMP impliqué dans la régulation de la phosphorylation.

Cependant, le mécanisme de résistance à la colistine n'a pas été caractérisé pour un grand nombre de nos souches, montrant la difficulté de cette mise en évidence. En effet, nous avons été confrontés dans certains cas à la perte de la résistance après congélation ou après avoir rendu les bactéries électrocompétentes. Il reste toutefois de nombreuses voies à explorer :

- finaliser le séquençage de l'opéron *phoPQ*, en effet bien que cela n'ait pas été prouvé chez *E. coli*, plusieurs mutations de PhoP et de PhoQ ont été décrites comme responsables de l'acquisition de résistance à la colistine chez des souches cliniques de *K. pneumoniae* (154).

- rechercher des mutations d'autres gènes moins fréquemment impliqués dans la résistance à la colistine comme : l'opéron *crrAB*, le gène *ramA*, le gène *pmrD*... (32).

- étudier les séquences promotrices des systèmes de régulation à 2 composants ainsi que la transcription des gènes impliqués dans la modification du lipopolysaccharide.

De plus, le rôle des mutations que nous avons caractérisées comme étant responsables de la résistance à la colistine, pourrait être étudié de façon plus approfondie, d'une part en analysant par RT-PCR l'expression des gènes sous la dépendance des gènes *pmrA* et *pmrB* mutés, et responsables des modifications du LPS (*pmrC*, *pmrHFIJKLM*), et d'autre part en déterminant les modifications structurales amenées par les mutations et leur conséquences.

Actuellement, plusieurs traitements adjuvants à la colistine sont à l'étude et pourraient être des alternatives thérapeutiques d'avenir. Ces associations pourraient être testées sur nos souches. Il s'agit d'un composé issu des éponges marines, la méridianine D, qui inhibe la formation de biofilm et augmente l'action de la colistine contre les BGN (155) et du 2-aminoimidazole qui est un composé permettant la régulation négative de PmrAB et donc la diminution des modifications du lipide A (156).

Annexe 1. Caractéristiques souches d'*E. coli* résistants à la colistine : sexe du patient, service d'hospitalisation, date d'isolement, type de prélèvement, et résistances associées.

Annexe 2. CMI de la colistine, recherche des gènes *mcr*, caractéristiques des mutations de *pmrA/B* retrouvées des souches d'*E. coli* résistants à la colistine.

Annexe 3. Caractéristiques des mutations de *mgrB* et *phoP/Q* retrouvées, des souches d'*E. coli* résistants à la colistine.

Annexe 4. Amorces utilisées pour séquencer les gènes susceptibles d'être impliqués dans la résistance à la colistine chez *E. coli*.

Annexe 5. Amorces utilisées pour construire les produits de PCR utilisés dans le projet et pour vérifier les clones obtenus.

Annexe 6. Représentation sur les protéines PmrA et PmrB, des mutations déjà décrites, impliquées ou non dans la résistance à la colistine et des mutations découvertes dans cette étude.

Annexe 1. Caractéristiques souches d'*E. coli* résistants à la colistine : sexe du patient, service d'hospitalisation, date d'isolement, type de prélèvement, et résistances associées.

Souche	Sexe	Prélèvement	Date d'isolement	Service clinique	AMP	TIC	AMC	TCC	PTT	C2G	C3G	C4G	Carbapénèmes	Aminosides	Quinolones	SXT	FSF	FTN
GERM	M ^a	urines	21/03/16	Urgences	S ^c	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ROQU	F ^b	Urines	18/03/16	Rhumatologie	R ^d	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
MOTH	M	Urines	07/05/16	Urgences	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LEBO	F	Urines	31/03/16	Maternité	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
GARR	M	Urines	15/01/16	Urgences	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
465	-	Urines	-	Suisse	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CHEVR	F	Urines	13/11/15	Urgences	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CHEVA	F	Urines	09/12/15	Médecine vasculaire	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
REN	F	Urines	16/07/16	Dax	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MONN	F	Urines	04/12/16	Urgences	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
LAENS	F	Respiratoire	05/07/17	Réanimation	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LAMO	F	Urines	27/06/17	Neurologie	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FROM	F	Urines	06/07/16	Cardiologie	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MALDO	M	urines	02/02/16	Urologie	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
LAGU	F	Urines	28/09/16	Urgences	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LAVA	M	Urines	01/12/16	Dermatologie	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ANGE	F	Urines	19/01/16	Médecine interne	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Af51	-	Urines	-	Afrique du Sud	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
BOUJ	M	Urines	30/07/16	Maladies infectieuses	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S
SOLA	M	Urines	10/08/17	Urgences	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
BLOT	F	Urines	03/06/17	Urologie	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LANN	M	Urines	24/03/17	Urgences	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ROUS	M	Ecouvillonnage	27/04/16	Chirurgie	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S
DUBO	F	Urines	04/04/16	Urgences	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
DESF	F	Urines	01/08/16	Urgences	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
PETE	F	Urines	12/06/16	Urgence pédiatrique	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
VAL	F	Urines	13/09/16	Gériatrie	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MART	F	Ecouvillonnage	26/02/16	Urgences	ND ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND							

^a masculin ; ^b féminin ; ^c sensible ; ^d résistant ; ^e non déterminé ; en rouge : souches non isolées au CHU de Bordeaux, en bleu : souches possédant le gène plasmidique *mcr-1* ; en vert : souches possédant une BLSE.

Annexe 2. CMI^a de la colistine, recherche des gènes *mcr*, caractéristiques des mutations de *pmrA/B* retrouvées des souches d'*E. coli* résistants à la colistine.

Souche	CMI CS ^b (mg/l)	Phénotype	PCR <i>mcr</i>	Mutation de <i>pmrA/B</i>	Mutation de la protéine	Domaine de la protéine muté	Provean score	Prédiction de l'effet de la mutation
GERM	4	Résistant	- ^c	<i>pmrA</i>	L11P	REC ^g	-4.401	Délétère
ROQU	8	Résistant	-	<i>pmrA</i>	G15R	REC	-2.907	Délétère
MOTH	8	Résistant	-	<i>pmrA</i>	R81H	REC	-4.733	Délétère
LEBO	8	Résistant	-	<i>pmrB</i>	R11L	/	-4.477	Délétère
GARR	4	Résistant	-	<i>pmrB</i>	L13P	/	-2.907	Délétère
465	16	Résistant	-	<i>pmrB</i>	G19E	TM1 ^h	-3.283	Délétère
CHEVR	16	Résistant	-	<i>pmrB</i>	G22E	TM1	-3.089	Délétère
CHEVA	4	Résistant	-	<i>pmrB</i>	Δ30-48	TM1+PD ⁱ	-73.254	Délétère
REN	4	Résistant	-	<i>pmrB</i>	Δ30-48	TM1+PD	-73.254	Délétère
MONN	8	Résistant	-	<i>pmrB</i>	P94L	HAMP ^j	-9.638	Délétère
LAENS	8	Résistant	-	<i>pmrB</i>	P94A	HAMP	-7,710	Délétère
LAMO	8	Résistant	-	<i>pmrB</i>	L101P	HAMP	-6,546	Délétère
FROM	2	Sensible	-	<i>pmrB</i>	L110*	HAMP+HisKa ^k + HATPase ^l	NA	Délétère
MALDO	8	Résistant	-	<i>pmrB</i>	T114P	HAMP	-2.591	Délétère
LAGU	8	Résistant	-	<i>pmrB</i>	R138H	HAMP	-4.557	Délétère
LAVA	8	Résistant	-	<i>pmrB</i>	R138H, G305R	HAMP+HATPase	-4.557, -2.684	Délétère
ANGE	8	Résistant	-	<i>pmrB</i>	D152V	HisKa	-8.346	Délétère
Af51	16	Résistant	-	<i>pmrB</i>	D315N	HATPase	-3.582	Délétère
BOUJ	8	Résistant	+ ^d (<i>mcr-1</i>)	ND	NA ^f	NA	NA	NA
SOLA	8	Résistant	+ ^d (<i>mcr-1</i>)	ND	NA ^f	NA	NA	NA
BLOT	4	Résistant	-	aucune	NA	NA	NA	NA
LANN	8	Résistant	-	aucune	NA	NA	NA	NA
ROUS	4	Résistant	-	aucune	NA	NA	NA	NA
DUBO	8	Résistant	-	aucune	NA	NA	NA	NA
DESF	16	Résistant	-	aucune	NA	NA	NA	NA
PETE	0.25	Sensible	ND ^e	ND	NA	NA	NA	NA
VAL	0.125	Sensible	ND	ND	NA	NA	NA	NA
MART	0.125	Sensible	ND	ND	NA	NA	NA	NA
DA39554	4	Résistant	-	<i>pmrB</i>	L110*	HAMP+HisKa ^k + HATPase ^l	NA	Délétère

^a Concentration minimale inhibitrice ; ^b colistine ; ^c négatif ; ^d positif ; ^e non déterminé ; ^f non applicable ; ^g REC (aa 1–112) domaine receveur homologue à CheY ; ^h TM1 (aa 15-37) 1^{er} domaine transmembranaire ; ⁱ PD (aa 38-68) domaine périplasmique, ^j HAMP (aa92-144) histidine kinase, adénylyl cyclase, methyl-binding protéine, phosphatase ;

^k HisKA (aa145-205) domaine phosphoaccepteur histidine kinase A ; ^l HATPase_c (aa252-360) ATPases Histidine kinase-like.

Annexe 3. Caractéristiques des mutations de *mgrB* et *phoP/Q* retrouvées pour les souches d'*E. coli* résistants à la colistine.

Souche	Mutation de <i>mgrB</i>	Mutation de <i>phoP/Q</i>	Mutation de la protéine	Provean score	Prédiction de l'effet de la mutation
GERM	aucune	aucune	NA ^c	NA	NA
ROQU	aucune	aucune	NA	NA	NA
MOTH	aucune	aucune	NA	NA	NA
LEBO	aucune	<i>E</i> ^a	NA	NA	NA
GARR	aucune	<i>E</i>	NA	NA	NA
465	aucune	<i>E</i>	NA	NA	NA
CHEVR	aucune	<i>E</i>	NA	NA	NA
CHEVA	aucune	<i>phoP</i>	V71F	-2,014	Neutre
REN	aucune	<i>E</i>	NA	NA	NA
MONN	aucune	<i>phoQ</i>	P368S	-3.518	Délétère
LAENS	aucune	<i>E</i>	NA	NA	NA
LAMO	aucune	<i>E</i>	NA	NA	NA
FROM	aucune	aucune	NA	NA	NA
MALDO	aucune	<i>E</i>	NA	NA	NA
LAGU	aucune	aucune	NA	NA	NA
LAVA	aucune	<i>phoP</i>	V169I	-0.223	Neutre
ANGE	aucune	aucune	NA	NA	NA
Af51	aucune	aucune	NA	NA	NA
BOUJ	aucune	ND	NA	NA	NA
SOLA	aucune	ND	NA	NA	NA
BLOT	aucune	aucune	NA	NA	NA
LANN	aucune	aucune	NA	NA	NA
ROUS	aucune	aucune	NA	NA	NA
DUBO	aucune	aucune	NA	NA	NA
DESF	aucune	aucune	NA	NA	NA
PETE	ND ^b	ND	NA	NA	NA
VAL	ND	ND	NA	NA	NA
MART	ND	ND	NA	NA	NA
DA39554	aucune	aucune	NA	NA	NA

^a Echec d'amplification et de séquençage ; ^b non déterminée ; ^c non applicable.

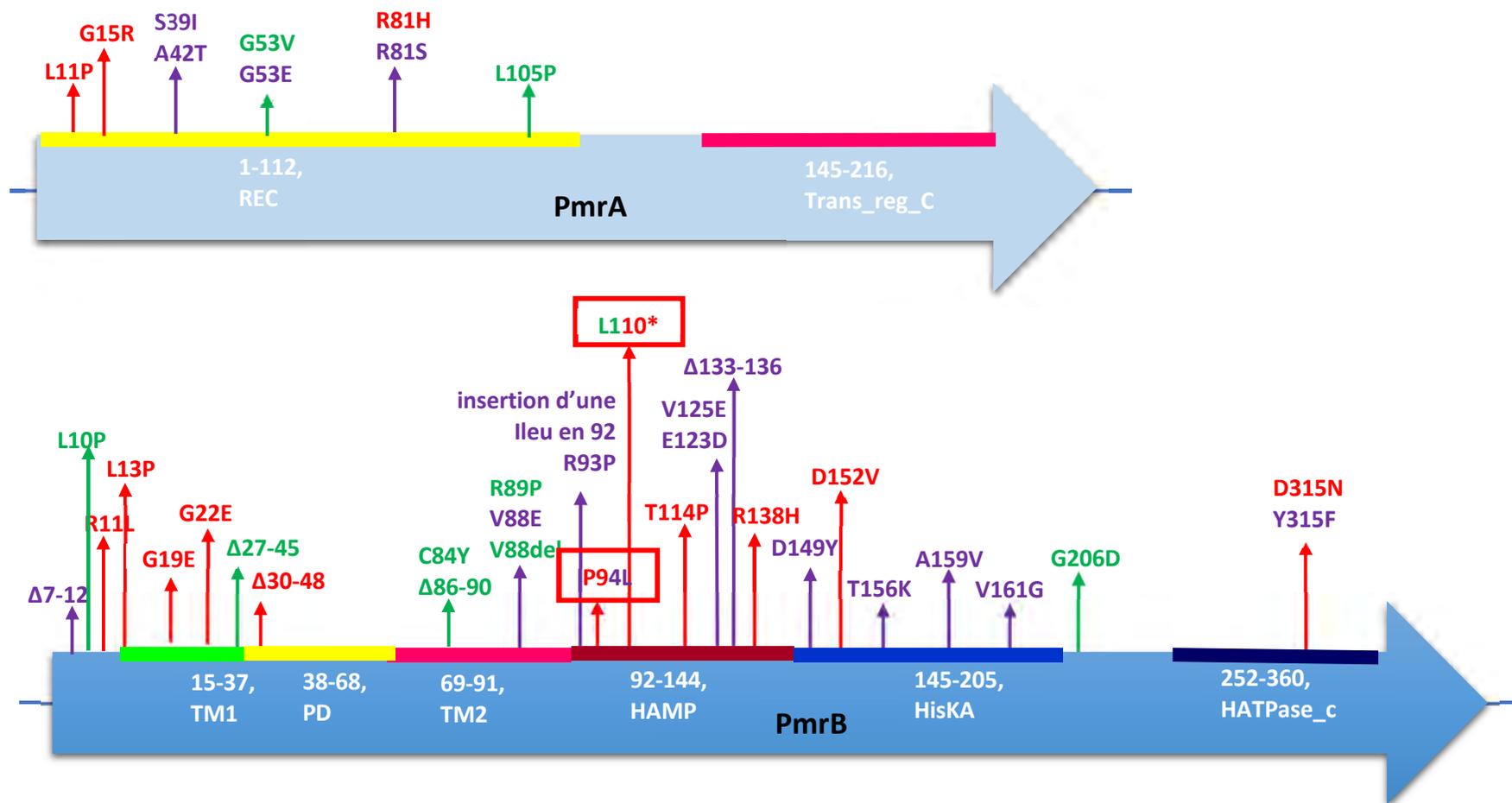
Annexe 4. Amorces utilisées pour séquencer les gènes susceptibles d'être impliqués dans la résistance à la colistine chez *E. coli*.

Nom	Sens	Séquence 5'-3'	Gène /utilisation
pmrAF (20nt)	+	GGA TTA ACT GGC GTT GAG AC	Séquençage <i>pmrA</i>
pmrAR (20nt)	-	TGG CGC AGC GAT ATT GGT CG	
pmrBF (20nt)	+	AAT CTG CGC GAC AAA GTG GG	Séquençage <i>pmrB</i>
pmrBR (20nt)	-	AAC TAC CGT GTT CAG CGT GC	
mgrBF	+	AGG CGC TGT TTA ACT AAC GC	Séquençage <i>mgrB</i>
mgrBR	-	TAG AGG CGC TAT TCT ACC AC	
phoPF	+	TGT CCG GCC TGC TTA TTA AG	Séquençage <i>phoP</i>
PhoPF2	+	TCGAGCTATCACGATGGTTG	
phoPR	-	CGA AAC TGA CGC TAT AAC CG	
phoQF	+	ATA ATG GCA AAG TGG TCA GC	Séquençage <i>phoQ</i>
PhoQF2	+	GAT GTA CTG ATG GGA CGT CT	
phoQR	-	GTT GGT ATT CCA TGT TAA GC	
PhoQR2	-	GAACGTCACTGGCAGAAACG	
mcr-1/2F	+	TAT CGC TAT GTG CTA AAG CC	Screening <i>mcr-1 et 2</i>
mcr-1/2R	-	TCT TGG TAT TTG GCG GTA TC	
mcr-1F	+	TGC CGT AAT TAT CCC ACC GT	Séquençage <i>mcr-1</i>
mcr-1R	-	ATA ACA AAC CCC ACC CCA CC	
mcr-2F	+	TGG TAC AGC CCC TTT ATT	Séquençage <i>mcr-2</i>
mcr-2R	-	GCT TGA GAT TGG GTT ATG A	
mcr-3F	+	TTA TGC TGA ACT GGC GTG GA	Recherche <i>mcr-3</i>
mcr-3R	-	TTT TGA CGT CCC AGA TAC CC	
mcr-4F	+	ATT GGG ATA GTC GCC TTT TT	Recherche <i>mcr-4</i>
mcr-4R	-	TTA CAG CCA GAA TCA TTA TCA	
mcr-5F	+	ACA ACC ACA ATG ACG ACG TC	Recherche <i>mcr-5</i>
mcr-5R	-	CTG GAA ATG AAC TTG GCA GC	

Annexe 5. Amorces utilisées pour construire les produits de PCR utilisés dans le projet et pour vérifier les clones obtenus.

Nom	Sens	Séquence 5'-3'	Gène /utilisation
rpsL-neo-pmrAF	+	ACC AGA ACT GCC TGC AAA AAC AGG CGC AAA CGC AAC ACT ATT CAC AAG ACG GCC TGG TGA TGA TGG CGG GAT CG	Construction de <i>rpsL-neo-pmrA</i>
rpsL-neo-pmrAR	-	GTC AAT ATC AGC CGT TGG CGC AGC GAT ATT GGT CGG CGC AGA AAA TGC ATT CAG AAG AAC TCG TCA AGA AGG	
rpsL-neo-pmrBF	+	CAA CAC CCT GGA AGT GCA TAT CCA CAA TCT GCG CGA CAA AGT GGG CAA AGG GCC TGG TGA TGA TGG CGG GAT CG	Construction de <i>rpsL-neo-pmrB</i>
rpsL-neo-pmrBR	-	GCG CAT ACT CTC CTC CAG GTT AAC GGA GGA GAG TGC AAT GAA AAA CCG TGT CAG AAG AAC TCG TCA AGA AGG	
pmrAF (50nt)	+	ACC AGA ACT GCC TGC AAA AAC AGG CGC AAA CGC AAC ACT ATT CAC AAG AC	Amplification de <i>pmrA</i> pour l'échange allélique
pmrAR (50nt)	-	GTC AAT ATC AGC CGT TGG CGC AGC GAT ATT GGT CGG CGC AGA AAA TGC AT	
pmrBF (50nt)	+	CAA CAC CCT GGA AGT GCA TAT CCA CAA TCT GCG CGA CAA AGT GGG CAA AG	Amplification de <i>pmrB</i> pour l'échange allélique
pmrBR (50nt)	-	GCG CAT ACT CTC CTC CAG GTT AAC GGA GGA GAG TGC AAT GAA AAA CCG TG	
pmrBF-BamHI	+	GAT GAT GGA TCC CAA CAC CCT GGA AGT GCA TAT CC	Amplification de <i>pmrB</i> avant clonage
pmrBR-HindIII	-	GAT GAT AAG CTT AAC TAC CGT GTT CAG CGT GC	
pmrBR-blaR	-	GCG CAT ACT CTC CTC CAG GTT AAC GGA GGA GAG TGC AAT GAA AAA CCG TGG AGT AAA CTT GGT CTG ACA G	Amplification <i>pmrB*-blaTEM</i>
pmrAF-BamHI	+	GAT GAT GGA TCC ACC AGA ACT GCC TGC AAA AAC	Amplification de <i>pmrAB</i> avant clonage
pmrCF-BamHI	+	GAT GAT GGA TCC CAT TTG TCA CCC TGA TGG TC	Amplification de <i>pmrCAB</i> avant clonage
mdhF	+	CCC AAC TCG CTT CAG GTT CAG	Amplification du gène <i>mdh</i>
mdhR	-	CCG TTT TTC CCC AGC AGC AG	
M13F	+	GTA AAA CGA CGG CCA GT	Vérification de l'insertion correcte du gène dans les plasmides pGEMT et pCR-Blunt II-TOPO
M13R	-	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G	
tet5'	+	GAG GCC CTT TCG TCT TCA AG	Vérification de l'insertion correcte du gène dans le plasmide pBR322
tet3'	-	GTG GTG AAT CCG TTA GCG AG	
repAF	+	GTC GCT ATG ACT TAA CGG AG	Vérification de la présence du plasmide pRed/ET
repAR	-	CCA GTA TGT TCT CTA GTG TG	

Annexe 6. Représentation sur les protéines PmrA et PmrB, des mutations déjà décrites, impliquées ou non dans la résistance à la colistine et des mutations découvertes dans cette étude.



■ Mutations déjà décrites
 ■ Mutations impliquées dans la résistance à la colistine
 ■ Mutations découvertes dans cette étude

Description des domaines des protéines PmrA et PmrB selon SMART :

Protéine PmrA : REC (aa 1–112) : domaine receveur homologue à CheY, Trans_reg_C (aa 145–216) : domaine C-terminal, régulateur transcriptionnel

Protéine PmrB : TM1 (aa 15-37) 1^{er} domaine transmembranaire, PD (aa 38-68) domaine périplasmique, TM2 (aa 69-91) 2nd domaine transmembranaire, HAMP (aa92-144) histidine kinase, adényl cyclase, methyl-binding protéine, phosphatase, HisKA (aa145-205) domaine phosphoaccepteur histidine kinase A, HATPase c (aa252-360) ATPases Histidine kinase-like

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. World Health Organization, éditeur. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014.
2. Escherich T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884. Rev Infect Dis. déc 1988;10(6).
3. Ainsworth GC, Cowan ST. Rules of nomenclature for fungi and bacteria. J Gen Microbiol. juin 1954;10(3).
4. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. janv 1998;11(1).
5. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. Int J Environ Res Public Health. déc 2013;10(12).
6. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. J Bacteriol. févr 1984;157(2).
7. Jauregui F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. BMC Genomics. nov 2008;9:560.
8. Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard A-B, Bui H, Le Bouguéne C, Denamur E. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. Mol Biol Evol. juin 2004;21(6).
9. Smati M, Clermont O, Bleibtreu A, Fourreau F, David A, Daubié A-S, et al. Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. MicrobiologyOpen. août 2015;4(4).
10. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. oct 2013;26(4).
11. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. févr 2004;2(2).
12. Köckerling E, Karrasch L, Schweitzer A, Razum O, Krause G. Public Health Research Resulting from One of the World's Largest Outbreaks Caused by Entero-Hemorrhagic *Escherichia coli* in Germany 2011: A Review. Front Public Health. déc 2017;5.
13. Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer F-D, et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). Arch Microbiol. déc 2011;193(12).
14. Morabito S, Karch H, Mariani-Kurkdjian P, Schmidt H, Minelli F, Bingen E, et al. Enteroaggregative, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O111:H2 Associated with an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome. J Clin Microbiol. mars 1998;36(3).
15. Nyholm O, Halkilahti J, Wiklund G, Okeke U, Paulin L, Auvinen P, et al. Comparative Genomics and Characterization of Hybrid Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/EPEC) Strains. PLoS ONE. août 2015;10(8).
16. Dutta S, Pazhani GP, Nataro JP, Ramamurthy T. Heterogenic virulence in a diarrheagenic *Escherichia coli*: evidence for an EPEC expressing heat-labile toxin of ETEC. Int J Med Microbiol IJMM. janv 2015;305(1).
17. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, et al. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. FEMS Microbiol Rev. juill 2016;40(4).
18. KIM KS. Human Meningitis-Associated *Escherichia coli*. EcoSal Plus. mai 2016;7(1).

19. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. sept 1997;277(5331).
20. Kaas RS, Friis C, Ussery DW, Aarestrup FM. Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics*. oct 2012;13.
21. van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J*. févr 2011;5(2).
22. Liu Y-F, Yan J-J, Lei H-Y, Teng C-H, Wang M-C, Tseng C-C, et al. Loss of Outer Membrane Protein C in *Escherichia coli* Contributes to Both Antibiotic Resistance and Escaping Antibody-Dependent Bactericidal Activity. *Infect Immun*. mai 2012;80(5).
23. Anes J, McCusker MP, Fanning S, Martins M. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. juin 2015;6.
24. Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clin Microbiol Rev*. avr 2015;28(2).
25. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. juin 2016;6(6).
26. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. mars 2008;8(3).
27. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. oct 2011;17(10).
28. Cai JC, Zhang R, Hu YY, Zhou HW, Chen G-X. Emergence of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Isolates Producing KPC-2 Carbapenemase in China. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 2014;58(2).
29. O'Neill J. Review on Antimicrobial Resistance, O'Neill Commission [Internet]. 2014. Disponible sur: <http://www.bsac.org.uk/securing-new-drugs-for-future-generations/>
30. Benedict RG, Langlykke AF. Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. *J Bacteriol*. juill 1947;54(1).
31. Hancock RE. Peptide antibiotics. *The Lancet*. août 1997;349(9049).
32. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev*. avr 2017;30(2).
33. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. janv 2005;25(1).
34. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo)*. févr 2014;67(2).
35. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. mai 2005;40(9).
36. Jayol A, Saly M, Nordmann P, Ménard A, Poirel L, Dubois V. *Hafnia*, an enterobacterial genus naturally resistant to colistin revealed by three susceptibility testing methods. *J Antimicrob Chemother*. sept 2017;72(9).
37. Ortwine JK, Kaye KS, Li J, Pogue JM. Colistin: understanding and applying recent pharmacokinetic advances. *Pharmacotherapy*. janv 2015;35(1).

38. HAS. Avis de la Commission de transparence de l'HAS [Internet]. 2017. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-16386_COLIMYCINE_PIS_RI_Avis2_CT16386.pdf
39. European Medicines Agency completes review of polymyxin-based medicines. Eur Med Agency. 2014; European Medicines Agency, London, United Kingdom.
40. Nation RL, Velkov T, Li J. Colistin and Polymyxin B: Peas in a Pod, or Chalk and Cheese? Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. juill 2014;59(1):88-94.
41. Bergen PJ, Li, J, Nation RL. Dosing of colistin—back to basic PK/PD - ScienceDirect. Curr Opin Pharmacol. oct 2011;11(5).
42. Landersdorfer CB, Nation RL. Colistin: How should It Be Dosed for the Critically Ill? Semin Respir Crit Care Med. févr 2015;36(01).
43. Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, et al. Systematic Review and Meta-Analysis of In Vitro Synergy of Polymyxins and Carbapenems. Antimicrob Agents Chemother. oct 2013;57(10).
44. Dalfino L, Puntillo F, Mosca A, Monno R, Spada ML, Coppolecchia S, et al. High-dose, extended-interval colistin administration in critically ill patients: is this the right dosing strategy? A preliminary study. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. juin 2012;54(12).
45. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. Crit Care Lond Engl. févr 2006;10(1).
46. Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. Clin Microbiol Infect. janv 2012;18(1).
47. Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, et al. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. Int J Antimicrob Agents. sept 2015;46(3).
48. Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, et al. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? Int J Antimicrob Agents. nov 2013;42(5).
49. European Medicines Agency. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. 2016 juill.
50. CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf [Internet]. 2016. Disponible sur: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf
51. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. déc 2017;
52. Jayol A, Nordmann P, Lehours P, Poirel L, Dubois V. Comparison of methods for detection of plasmid-mediated and chromosomally encoded colistin resistance in Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. févr 2018;24(2).
53. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. juin 2016;22(6).

54. Jayol A, Dubois V, Poirel L, Nordmann P. Rapid Detection of Polymyxin-Resistant Enterobacteriaceae from Blood Cultures. *J Clin Microbiol.* sept 2016;54(9).
55. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. A Universal Culture Medium for Screening Polymyxin-Resistant Gram-Negative Isolates. *J Clin Microbiol.* mai 2016;54(5).
56. Jayol A, Poirel L, André C, Dubois V, Nordmann P. Detection of colistin-resistant Gram-negative rods by using the SuperPolymyxin medium. *Diagn Microbiol Infect Dis.* mai 2018;
57. Albur M, Noel A, Bowker K, MacGowan A. Colistin susceptibility testing: time for a review. *J Antimicrob Chemother.* mai 2014;69(5).
58. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC Variability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol.* juin 2013;51(6).
59. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, et al. Heteroresistance to Colistin in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2006;50(9).
60. Gunn JS. The Salmonella PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.* juin 2008;16(6).
61. Yan A, Guan Z, Raetz CRH. An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* déc 2007;282(49).
62. Cannatelli A, Di Pilato V, Giani T, Arena F, Ambretti S, Gaibani P, et al. In vivo evolution to colistin resistance by PmrB sensor kinase mutation in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* is associated with low-dosage colistin treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2014;58(8).
63. Cheng Y-H, Lin T-L, Pan Y-J, Wang Y-P, Lin Y-T, Wang J-T. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2015;59(5).
64. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas M-V, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2014;58(8).
65. Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. *Int J Antimicrob Agents.* déc 2014;44(6).
66. Diene SM, Merhej V, Henry M, El Filali A, Roux V, Robert C, et al. The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new « killer bugs » are created because of a sympatric lifestyle. *Mol Biol Evol.* févr 2013;30(2).
67. Sun S, Negrea A, Rhen M, Andersson DI. Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2009;53(6).
68. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Poirel L. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2015;59(5).
69. Jayol A, Poirel L, Villegas M-V, Nordmann P. Modulation of mgrB gene expression as a source of colistin resistance in *Klebsiella oxytoca*. *Int J Antimicrob Agents.* juill 2015;46(1).
70. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas M-V, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* janv 2015;70(1).
71. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V, et al. MgrB Inactivation Is a Common Mechanism of Colistin Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* of Clinical Origin. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2014;58(10).

72. Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD, van Duin D, et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2015;59(1).
73. Cheng Y-H, Lin T-L, Lin Y-T, Wang J-T. Amino Acid Substitutions of CrrB Responsible for Resistance to Colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2016;60(6).
74. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Villegas M-V, Dubois V, Poirel L. High-Level Resistance to Colistin Mediated by Various Mutations in the *crrB* Gene among Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2017;61(11).
75. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* févr 2016;16(2).
76. Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* juill 2016;21(27).
77. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, et al. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio.* juin 2017;8(3).
78. Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* août 2017;22(31).
79. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother.* déc 2017;72(12).
80. AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, et al. *mcr-1* and *mcr-2* variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother.* oct 2017;72(10).
81. Yang Y-Q, Li Y-X, Lei C-W, Zhang A-Y, Wang H-N. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* avr 2018;
82. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect.* juill 2018;7(1).
83. Kieffer N, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Poirel L. High Rate of MCR-1-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among Pigs, Portugal. *Emerg Infect Dis.* déc 2017;23(12).
84. Zurfluh K, Tasara T, Poirel L, Nordmann P, Stephan R. Draft Genome Sequence of *Escherichia coli* S51, a Chicken Isolate Harboring a Chromosomally Encoded *mcr-1* Gene. *Genome Announc.* août 2016;4(4).
85. Carretto E, Brovarone F, Nardini P, Russello G, Barbarini D, Pongolini S, et al. Detection of *mcr-4* positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, October to November 2016. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* janv 2018;23(2).
86. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, Fortunato S, et al. *mcr-1.2*, a New *mcr* Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2016;60(9).

87. Wang X, Wang Y, Wang Y, Zhang S, Shen Z, Wang S. Emergence of the colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in several uncommon species of Enterobacteriaceae from commercial poultry farm surrounding environments. *Vet Microbiol.* juin 2018;219.
88. Zhao F, Feng Y, Lü X, McNally A, Zong Z. Remarkable Diversity of *Escherichia coli* Carrying *mcr-1* from Hospital Sewage with the Identification of Two New *mcr-1* Variants. *Front Microbiol.* 2017;8.
89. Tijet N, Faccione D, Rapoport M, Seah C, Pasterán F, Ceriana P, et al. Molecular characteristics of *mcr-1*-carrying plasmids and new *mcr-1* variant recovered from polyclonal clinical *Escherichia coli* from Argentina and Canada. *PLoS ONE.* juill 2017;12(7).
90. Lu X, Hu Y, Luo M, Zhou H, Wang X, Du Y, et al. MCR-1.6, a New MCR Variant Carried by an IncP Plasmid in a Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolate from a Healthy Individual. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2017;61(5).
91. Liu H, Zhu B, Liang B, Xu X, Qiu S, Jia L, et al. A Novel *mcr-1* Variant Carried by an IncI2-Type Plasmid Identified from a Multidrug Resistant Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* avr 2018;9.
92. Roer L, Hansen F, Stegger M, Sönksen UW, Hasman H, Hammerum AM. Novel *mcr-3* variant, encoding mobile colistin resistance, in an ST131 *Escherichia coli* isolate from bloodstream infection, Denmark, 2014. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* août 2017;22(31).
93. Ling Z, Yin W, Li H, Zhang Q, Wang X, Wang Z, et al. Chromosome-Mediated *mcr-3* Variants in *Aeromonas veronii* from Chicken Meat. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2017;61(11).
94. Liu L, Feng Y, Zhang X, McNally A, Zong Z. New Variant of *mcr-3* in an Extensively Drug-Resistant *Escherichia coli* Clinical Isolate Carrying *mcr-1* and blaNDM-5. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2017;61(12).
95. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance.* févr 2018;23(6).
96. Hammerl JA, Borowiak M, Schmoger S, Shamoun D, Grobbel M, Malorny B, et al. *mcr-5* and a novel *mcr-5.2* variant in *Escherichia coli* isolates from food and food-producing animals, Germany, 2010 to 2017. *J Antimicrob Chemother.* mai 2018;73(5).
97. Hasman H, Hammerum AM, Hansen F, Hendriksen RS, Olesen B, Agersø Y, et al. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Eurosurveillance.* déc 2015;20(49).
98. Zurfluh K, Poirel L, Nordmann P, Nüesch-Inderbinen M, Hächler H, Stephan R. Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2016;60(4).
99. Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect Dis.* mars 2016;16(3).
100. Poirel L, Nordmann P. Emerging plasmid-encoded colistin resistance: the animal world as the culprit? *J Antimicrob Chemother.* août 2016;71(8).
101. Matthaiou DK, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Karageorgopoulos DE, Papaioannou V, Ntani G, et al. Risk factors associated with the isolation of colistin-resistant gram-negative bacteria: a matched case-control study. *Crit Care Med.* mars 2008;36(3).

102. Kontopidou F, Plachouras D, Papadomichelakis E, Koukos G, Galani I, Poulakou G, et al. Colonization and infection by colistin-resistant Gram-negative bacteria in a cohort of critically ill patients. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. nov 2011;17(11).
103. Halaby T, al Naiemi N, Kluytmans J, van der Palen J, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Emergence of Colistin Resistance in Enterobacteriaceae after the Introduction of Selective Digestive Tract Decontamination in an Intensive Care Unit. *Antimicrob Agents Chemother*. juill 2013;57(7).
104. Strenger V, Gschliesser T, Grisold A, Zarfel G, Feierl G, Masoud L, et al. Orally administered colistin leads to colistin-resistant intestinal flora and fails to prevent faecal colonisation with extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteria in hospitalised newborns. *Int J Antimicrob Agents*. janv 2011;37(1).
105. Boyen F, Vangroenweghe F, Butaye P, De Graef E, Castryck F, Heylen P, et al. Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Vet Microbiol*. 2010;144(3-4):359-62.
106. Bogdanovich T, Adams-Haduch JM, Tian G-B, Nguyen MH, Kwak EJ, Muto CA, et al. Colistin-Resistant, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing *Klebsiella pneumoniae* Belonging to the International Epidemic Clone ST258. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. août 2011;53(4).
107. Marchaim D, Chopra T, Pogue JM, Perez F, Hujer AM, Rudin S, et al. Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Metropolitan Detroit, Michigan. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 2011;55(2).
108. Weterings V, Zhou K, Rossen JW, van Stenis D, Thewessen E, Kluytmans J, et al. An outbreak of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands (July to December 2013), with inter-institutional spread. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. août 2015;34(8).
109. Tóth A, Damjanova I, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, et al. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. juill 2010;29(7).
110. Kontopoulou K, Protonotariou E, Vasilakos K, Kriti M, Koteli A, Antoniadou E, et al. Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. *J Hosp Infect*. sept 2010;76(1).
111. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, et al. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother*. avr 2007;59(4).
112. Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Petrolito V, Sciortino D, Sciacca A, et al. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. sept 2011;17(9).
113. Mammina C, Bonura C, Di Bernardo F, Aleo A, Fasciana T, Sodano C, et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. août 2012;17(33).
114. Giani T, Arena F, Vaggelli G, Conte V, Chiarelli A, Henrici De Angelis L, et al. Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Traced to Clonal Expansion of an mgrB Deletion Mutant. *J Clin Microbiol*. oct 2015;53(10).
115. Parisi SG, Bartolini A, Santacatterina E, Castellani E, Ghirardo R, Berto A, et al. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* strains producing carbapenemases and increase of resistance to colistin

- in an Italian teaching hospital from January 2012 To December 2014. *BMC Infect Dis.* juin 2015;15.
116. Mezzatesta ML, Caio C, Gona F, Cormaci R, Salerno I, Zingali T, et al. Carbapenem and multidrug resistance in Gram-negative bacteria in a single centre in Italy: considerations on in vitro assay of active drugs. *Int J Antimicrob Agents.* août 2014;44(2).
 117. Monaco M, Giani T, Raffone M, Arena F, Garcia-Fernandez A, Pollini S, et al. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* oct 2014;19(42).
 118. Meletis G, Oustas E, Botziori C, Kakasi E, Koteli A. Containment of carbapenem resistance rates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in a Greek hospital with a concomitant increase in colistin, gentamicin and tigecycline resistance. *New Microbiol.* juill 2015;38(3).
 119. Zagorianou A, Sianou E, Iosifidis E, Dimou V, Protonotariou E, Miyakis S, et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* févr 2012;17(7).
 120. Pena I, Picazo JJ, Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. *Int J Antimicrob Agents.* mai 2014;43(5).
 121. Jayol A, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. National survey of colistin resistance among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and outbreak caused by colistin-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, France, 2014. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* sept 2016;21(37).
 122. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother.* sept 2011;66(9).
 123. Arduino SM, Quiroga MP, Ramírez MS, Merkier AK, Errecalde L, Di Martino A, et al. Transposons and integrons in colistin-resistant clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with epidemic or sporadic behaviour. *J Med Microbiol.* oct 2012;61(Pt 10).
 124. Perez LRR. Evaluation of polymyxin susceptibility profile among KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* using Etest and MicroScan WalkAway automated system. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* nov 2015;123(11).
 125. Suh J-Y, Son JS, Chung DR, Peck KR, Ko KS, Song J-H. Nonclonal Emergence of Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Blood Samples in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* Jan2010;54(1).
 126. Chen S, Hu F, Zhang X, Xu X, Liu Y, Zhu D, et al. Independent Emergence of Colistin-Resistant Enterobacteriaceae Clinical Isolates without Colistin Treatment. *J Clin Microbiol.* nov 2011;49(11).
 127. Osei Sekyere J, Amoako DG. Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine (CCCP) Reverses Resistance to Colistin, but Not to Carbapenems and Tigecycline in Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Front Microbiol.* févr 2017;8.
 128. Ni W, Li Y, Guan J, Zhao J, Cui J, Wang R, et al. Effects of Efflux Pump Inhibitors on Colistin Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2016;60(5).

129. Bengoechea JA, Skurnik M. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Mol Microbiol.* juill 2003;37(1).
130. Pilonieta MC, Erickson KD, Ernst RK, Detweiler CS. A Protein Important for Antimicrobial Peptide Resistance, Ydel/OmdA, Is in the Periplasm and Interacts with OmpD/NmpC. *J Bacteriol.* déc 2009;191(23).
131. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Albertí S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun.* déc 2004;72(12).
132. Llobet E, Tomás JM, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiol Read Engl.* déc 2008;154(Pt 12).
133. Sato T, Shiraishi T, Hiyama Y, Honda H, Shinagawa M, Usui M, et al. Contribution of novel amino acid alterations in PmrA or PmrB to colistin resistance in *mcr*-negative *Escherichia coli* clinical isolates including major multidrug-resistant lineages O25b:H4-ST131-H30Rx and non-x. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2018;
134. Hjort K, Nicoloff H, Andersson DI. Unstable tandem gene amplification generates heteroresistance (variation in resistance within a population) to colistin in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* oct 2016;102(2).
135. Castanheira M, Griffin MA, Deshpande LM, Mendes RE, Jones RN, Flamm RK. Detection of *mcr*-1 among *Escherichia coli* Clinical Isolates Collected Worldwide as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in 2014 and 2015. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2016;60(9).
136. WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.
137. Trent MS, Ribeiro AA, Doerrler WT, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR. Accumulation of a polyisoprene-linked amino sugar in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* : structural characterization and transfer to lipid A in the periplasm. *J Biol Chem.* nov 2001;276(46).
138. Froelich JM, Tran K, Wall D. A *pmrA* constitutive mutant sensitizes *Escherichia coli* to deoxycholic acid. *J Bacteriol.* févr 2006;188(3).
139. Quesada A, Porrero MC, Téllez S, Palomo G, García M, Domínguez L. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *J Antimicrob Chemother.* janv 2015;70(1).
140. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. *Int J Antimicrob Agents.* janv 2016;47(1).
141. Cannatelli A, Giani T, Aiezza N, Di Pilato V, Principe L, Luzzaro F, et al. An allelic variant of the PmrB sensor kinase responsible for colistin resistance in an *Escherichia coli* strain of clinical origin. *Sci Rep.* nov 2017;7.
142. Phan M-D, Nhu NTK, Achard MES, Forde BM, Hong KW, Chong TM, et al. Modifications in the *pmrB* gene are the primary mechanism for the development of chromosomally encoded resistance to polymyxins in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* oct 2017;72(10).
143. Lee J-Y, Choi M-J, Choi HJ, Ko KS. Preservation of Acquired Colistin Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2016;60(1).

144. Luo Q, Yu W, Zhou K, Guo L, Shen P, Lu H, et al. Molecular Epidemiology and Colistin Resistant Mechanism of *mcr*-Positive and *mcr*-Negative Clinical Isolated *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2017;8.
145. Olaitan AO, Thongmalayvong B, Akkhavong K, Somphavong S, Paboriboune P, Khounsy S, et al. Clonal transmission of a colistin-resistant *Escherichia coli* from a domesticated pig to a human in Laos. *J Antimicrob Chemother.* déc 2015;70(12).
146. Saly M, Jayol A, Poirel L, Megraud F, Nordmann P, Dubois V. Prevalence of faecal carriage of colistin-resistant Gram-negative rods in a university hospital in western France, 2016. *J Med Microbiol.* juin 2017;66(6).
147. Heermann R, Zeppenfeld T, Jung K. Simple generation of site-directed point mutations in the *Escherichia coli* chromosome using Red(R)/ET(R) Recombination. *Microb Cell Factories.* 2008; 7: 14.
148. Hjort K, Nicoloff H, Andersson DI. Unstable tandem gene amplification generates heteroresistance (variation in resistance within a population) to colistin in *Salmonella enterica*: Colistin heteroresistance due to amplification of the *pmrD* gene. *Mol Microbiol.* oct 2016;102(2).
149. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents.* mai 2017;49(5).
150. Castanheira M, Griffin MA, Deshpande LM, Mendes RE, Jones RN, Flamm RK. Detection of *mcr-1* among *Escherichia coli* Clinical Isolates Collected Worldwide as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in 2014 and 2015. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2016;60(9).
151. Sun J, Fang L-X, Wu Z, Deng H, Yang R-S, Li X-P, et al. Genetic Analysis of the IncX4 Plasmids: Implications for a Unique Pattern in the *mcr-1* Acquisition. *Sci Rep.* déc 2016;
152. Froelich JM, Tran K, Wall D. A *pmrA* Constitutive Mutant Sensitizes *Escherichia coli* to Deoxycholic Acid. *J Bacteriol.* 1 févr 2006;188(3).
153. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas M-V, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2014;58(8).
154. Cheng Y-H, Lin T-L, Pan Y-J, Wang Y-P, Lin Y-T, Wang J-T. Colistin Resistance Mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* Strains from Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2015;
155. Huggins WM, Barker WT, Baker JT, Hahn NA, Melander RJ, Melander C. Meridianin D Analogues Display Antibiofilm Activity against MRSA and Increase Colistin Efficacy in Gram-Negative Bacteria. *ACS Med Chem Lett.* juill 2018;9(7).
156. Brackett CM, Furlani RE, Anderson RG, Krishnamurthy A, Melander RJ, Moskowitz SM, et al. Second Generation Modifiers of Colistin Resistance Show Enhanced Activity and Lower Inherent Toxicity. *Tetrahedron.* juin 2016;72(25).

ABSTRACT**STUDY OF COLISTIN-RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* FROM A UNIVERSITY HOSPITAL IN WESTERN FRANCE**

The increasing incidence of antibiotic resistance, especially in *Escherichia coli* is very worrying and leads to therapeutic impasses. It is necessary to keep active drugs, such as colistin, as last resort in treatment of infections caused by these multidrug-resistant bacteria. The predominant mechanism of colistin resistance in enterobacteria is the addition of cationic groups on the lipopolysaccharide surface that increase its positive charge and decrease the affinity of polymyxins. Mutations in the genes involved in the addition of cationic groups (*pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ* and *mgrB*) and recently described *mcr* plasmid genes may be responsible for the acquisition of this resistance.

A series of colistin-resistant *E. coli* isolates recovered from Bordeaux's university hospital was investigated to determinate the colistin resistance mechanisms. Two strains had the *mcr-1* plasmid resistance gene. Complementation leading to the expression of a wild-type PmrA and PmrB proteins restored the susceptibility to colistin for 2 isolates, confirming that the substitution in PmrB (P94L) and in PmrA (L11P) was responsible for the resistance phenotype. Diversity of genetic events that can lead to colistin resistance in *Escherichia coli*, showing its adaptability and key role in antibiotic resistance.

KEYWORDS : Colistin ; *Escherichia coli* ; antimicrobial resistance ; PmrA ; PmrB ; *mcr*

RESUME

Etude de la résistance à la colistine chez *Escherichia coli*, à partir d'une collection de souches cliniques isolées au CHU de Bordeaux

L'incidence croissante de la résistance aux antibiotiques, notamment chez *Escherichia coli* est très préoccupante et conduit à des impasses thérapeutiques. Il est nécessaire de conserver des molécules actives, utilisables en dernier recours dans le traitement des infections dues à ces germes multirésistants, comme la colistine. Le mécanisme prépondérant responsable de résistance à la colistine chez les entérobactéries est l'ajout de groupements cationiques à la surface du lipopolysaccharide qui augmentent sa charge positive et diminuent l'affinité des polymyxines. Des mutations dans les gènes régulant l'ajout des groupements cationiques (*pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ* et *mgrB*) et des gènes plasmidiques *mcr* récemment décrits, peuvent être responsables de l'acquisition de cette résistance.

L'objectif de cette étude était de déterminer les mécanismes de résistance à la colistine de vingt-huit souches cliniques d'*E. coli* isolées au CHU de Bordeaux. Différents mécanismes chromosomiques et plasmidiques responsables de résistance à la colistine ont été identifiés dans les souches de la collection. Deux d'entre elles possèdent le gène de résistance plasmidique *mcr-1* déjà décrit. Par complémentation avec un plasmide portant les gènes *pmrA* et *pmrB* sauvage, nous avons également identifié deux nouvelles mutations responsables de la résistance à la colistine. Une mutation dans le gène *pmrB* générant la substitution d'un unique acide aminé P94L dans la protéine PmrB et une mutation du gène *pmrA* générant la substitution L11P dans la protéine PmrA sont responsables de la résistance à la colistine. Une diversité importante d'évènements génétiques peut générer une résistance à la colistine chez *Escherichia coli* montrant ses capacités d'adaptation et son rôle clé dans la résistance aux antibiotiques.

TITRE ET RESUME EN ANGLAIS : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Biologie Médicale

MOTS-CLES : Colistine ; *Escherichia coli* ; résistance aux antibiotiques ; PmrA ; PmrB ; *mcr*

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR :

Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité (MFP) UMR-5234
146 rue Léo Saignat Batiment 3A 33076 BORDEAUX Cedex

DIRECTEUR DE THESE : Madame le Professeur Véronique Dubois