

Cours 3. Mode d'évaluation de l'activité antibactérienne

1) Dans quels cas est-il nécessaire de tester *in vitro* la sensibilité d'une bactérie donnée à un traitement antibiotique ?

Deux types d'infections bactériennes

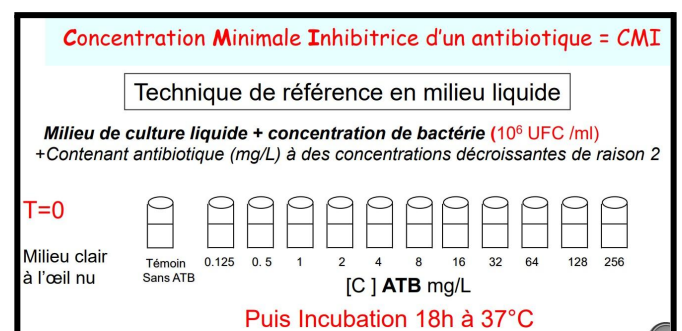
Type :	Infections stéréotypées :	Infections graves ou compliquées :
Définition :	L'antibiotique administré est toujours ou souvent efficace.	/
Exemples :	<ul style="list-style-type: none"> - L'angine à <i>Streptococcus pyogenes</i>, pour laquelle l'amoxicilline est toujours efficace. - Dans les infections urinaires basses non compliquée de la jeune femme 	<ul style="list-style-type: none"> - Infection systémique, méningite, pneumonie...
Conséquence :	Il n'est pas nécessaire de prélever pour tester <i>in vitro</i> l'efficacité de l'antibiotique.	Prélèvement nécessaire pour tester <i>in vitro</i> l'efficacité de l'antibiotique.

1bis) Par quels paramètres mesurer cette sensibilité ?

Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

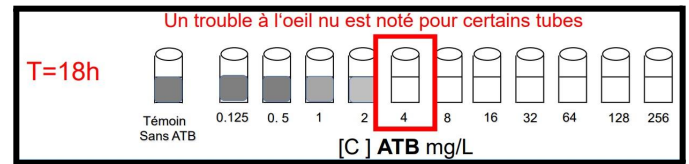
Méthode de référence réalisée en milieu liquide.

On constitue un milieu de culture liquide avec une concentration connue de bactéries (10^6 UFC/mL). On le répartit dans des tubes contenant préalablement un antibiotique de concentration décroissante de raison 2. On fait aussi un tube témoin, sans antibiotiques. On incube 18h à 37°C.



A **T=0h**, tous les tubes sont complètement **limpides**.

A **T=18h**, on voit un **trouble** dans le tube témoin et dans plusieurs tubes, qui traduit une **pousse bactérienne** (à gauche). On voit aussi plusieurs tubes avec une culture qui reste complètement **limpide** (à droite).



Définition : La CMI est la plus faible concentration pour laquelle il n'y a pas de culture visible à l'œil nu dans des conditions standardisées de culture. Ici, la CMI est à 4 mg/L.

C'est un **paramètre spécifique** d'une **souche bactérienne** vis à vis d'un **antibiotique**.

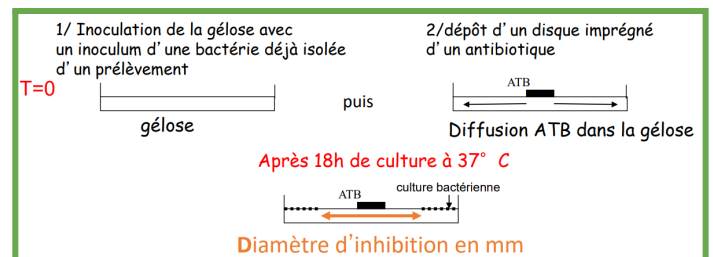
En pratique : Déterminer la **CMI** de plusieurs antibiotiques vis à vis d'une souche bactérienne responsable d'une infection est **très chronophage**. On utilise plutôt l'antibiogramme en diffusion sur milieu gélosé.

Antibiogramme en diffusion sur milieu gélosé

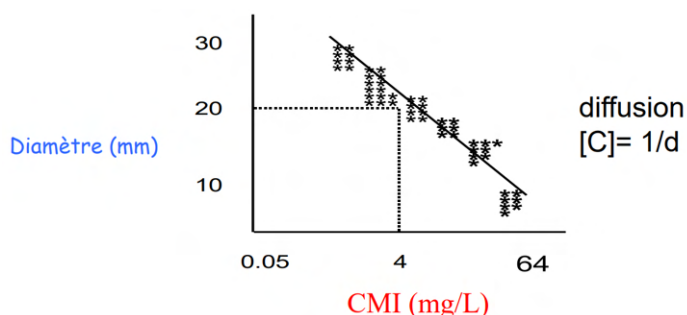
Cette technique permet de tester plus facilement plusieurs antibiotiques pour une même souche donnée. Elle est adaptée pour des laboratoires diagnostiquant plusieurs infections.

Méthode :

- 1) La **souche bactérienne** est mise en suspension dans la gélose, étalée grâce à un coton-tige.
- 2) On dépose des **disques d'antibiotiques** sur la gélose qui vont rapidement diffuser dans la gélose en fonction d'un **gradient**. Plus on s'éloigne du disque, plus la concentration d'antibiotique dans la gélose est faible.
- 3) L'ensemble est mis en culture **18h à 37°C**. On aura une **pousse bactérienne**. Donc on peut déterminer un **diamètre d'inhibition** qui, au pire, est égal au **disque d'antibiotique**.



Courbe de corrélation entre le diamètre d'inhibition et la CMI :



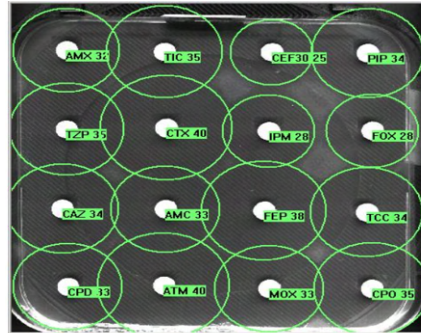
On mesure le **diamètre d'inhibition** (mm) et la **CMI** (mg/L) en différents points pour une souche donnée. On s'aperçoit qu'ils ont une **corrélation inverse**.

Plus le **diamètre** est élevé, plus la **CMI** est basse.

CMI (mg/L)
Le tutorat est gratuit. Toute vente ou reproduction est interdite.

Voici un **antibiogramme en milieu gélosé**. On peut y tester jusqu'à **16** antibiotiques.

On **estime la CMI** à partir du **diamètre**.



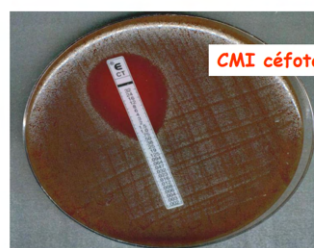
AMX=Amoxicilline
TIC= Ticarcilline
CEF= Cefalotine
PIP= Pipéracilline
TZP= Piperacilline+Tazobactam
CTX= Cefotaxime
IPM= Imipénem
FOX= Cefoxitine
CAZ= Ceftazidime
AMC=Augmentin
FEP = Céfépime
TCC = Ticarcilline +acide clavulanique

Limites : dans certains cas, on a besoin de la **CMI exacte** pour **contrôler l'efficacité d'un traitement antibiotique**. C'est dans des **situations clinique compliquées ou graves**, ou de manière **systématique pour certaines espèces bactériennes**, lorsqu'il n'y a **pas de corrélation** entre **diamètre d'inhibition** et **CMI**.
(exemple : *Streptococcus pneumoniae*). On l'a par la méthode de référence en milieu liquide ou par bandelette de CMI.

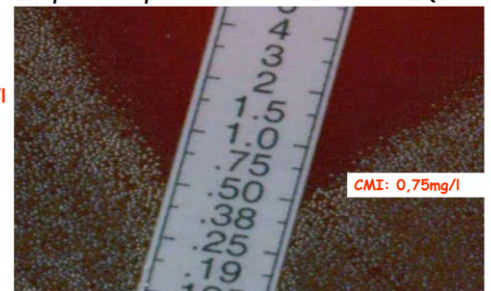
Bandelette de CMI sur milieu gélosé (E-test)

Il s'agit d'une bandelette **graduée** et **imprégnée d'un gradient d'antibiotique**. On dépose la **bandelette** sur la gélose préalablement **ensemencée avec la bactérie**. Puis on incube 18h à 37°C. On aura une **pousse bactérienne** tout autour de la bandelette, sauf là où les concentrations d'antibiotique sont trop importantes. La **CMI** peut être lue **directement** sur la bandelette graduée.

Exemple : Monsieur Dupont CMI céfotaxime (Etest)



Streptococcus pneumoniae CMI CEFOTAXIME (E-test)



Il y a une **excellente concordance** des résultats avec la **méthode de référence**. Cette méthode simple est donc très utilisée en pratique.

3) Quels sont les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par les bactéries ?

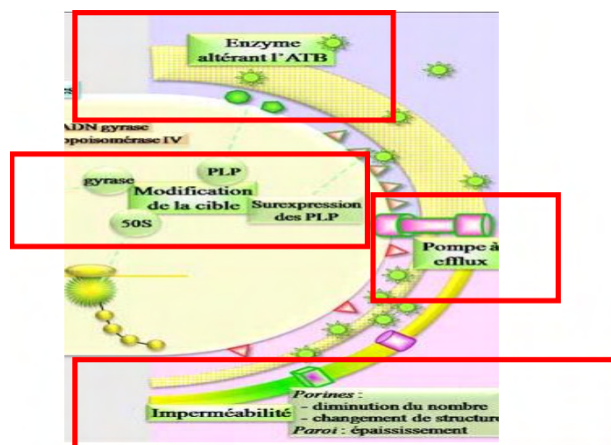
4 principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques

Au niveau de la paroi, on a des **enzymes** qui vont modifier l'antibiotique pour le rendre inefficace.

Un mécanisme de **modification de la cible**.

Un mécanisme par des **pompes d'efflux**.
L'antibiotique est rentré, mais est ensuite évacué à l'extérieur.

Un mécanisme d'**impermeabilité**.



Ces quatre grands principaux mécanismes sont **plus ou moins importants selon le type de bactérie**.

Principes de résistance aux bêta-lactamines

Mécanismes de résistances	Entérobactéries	Staphylocoques	Pneumocoques Entérocoques
Défaut de pénétration de l'antibiotique = Impermeabilité	+/-	NA	NA
Inactivation par des enzymes Hydrolytique = bêtalactamases	+++	++	NA
Diminution de l'affinité de la cible	-	++	++
Efflux actif	+/-	NA	NA

Le principal mécanisme de résistance des **Entérobactéries** est l'inactivation par des enzymes hydrolytiques : les **bêta-lactamases**.

Pour les **Staphylocoques**, c'est à la fois les **bêta-lactamases** (notamment pénicillinase, parce qu'on a utilisé beaucoup de **pénicillines**), et une **diminution de l'affinité de la cible**.

Pour les **Pneumocoques** et les **Entérocoques**, c'est **exclusivement une diminution de l'affinité de la cible**.

Distinction entre résistance naturelle et résistance acquise

Type :	Résistance naturelle	Résistance acquise
Caractéristiques :	- Présente chez <u>toutes les souches</u> de l'espèce. - Stable . - Phénotype de résistance " sauvage ".	- Propre à <u>certaines souches</u> de l'espèce. - instable le plus souvent. - Phénotype " anormal ".
Support :	- Chromosomique	- Chromosomique (mutation) - Acquisition de nouveaux gènes

4) Quels sont les principaux phénotypes de résistance naturelle des entérobactéries aux bêta-lactamines ?

Les **bêta-lactamines** sont les antibiotiques les plus largement utilisés, notamment pour traiter les infections aux **entérobactéries**. En regardant le **phénotype de résistance naturelle**, il y a deux types d'enzymes chez les entérobactéries qui permettent d'hydrolyser les bêta-lactamines :

- Résistance de type **pénicillinases**
- Résistance de type **céphalosporinases**

Les mécanismes de type **pénicillinases** rendent les bactéries résistantes aux **pénicillines** (en vert). Si on y ajoute l'**acide clavulanique**, la sensibilité aux pénicillines va être récupérée.

Antibiotiques	Penicillinases	Céphalosporinases
Amoxicilline	R	R
Ticarcilline	R	S
Pipéracilline	I	S
Amox +Ac clavulanique	S	R
Pipéracilline+Tazobactam	S	S
C1G (Céfalotine)	S	I/R
C2G (Céfamandole)	S	I/R
Cefamycine (Cefoxitine)	S	I/R
C3G (Céfotaxime, Ceftazidime)	S	S
Imipénème	S	S

Les mécanismes de type **céphalosporinases** vont

hydrolyser l'**amoxicilline**, mais pas la **ticarcilline** ni la **pipéracilline**. L'**acide clavulanique** n'a ici aucun effet, donc son association avec l'amoxicilline ne sera pas efficace.

Les bactéries sont sensibles à l'association pipéracilline + tazobactam. Par contre elles seront **R** ou **I** pour les C1G, C2G, et céfoxitine. Sensibles pour C3G et impénème. (voir le tableau)

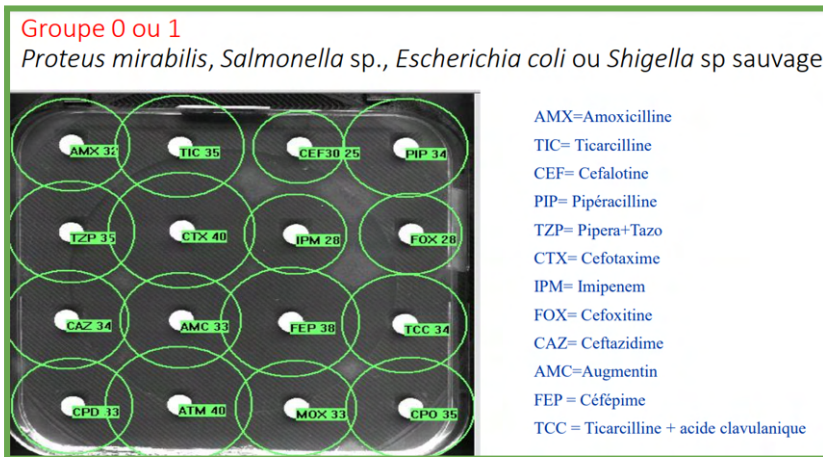
Les phénotype de résistance naturelle des entérobactéries aux bêta-lactamines sont réparties en 4 groupes :

Groupe	Phénotype	Espèces/genre
0	Pas de beta-lactamases	<i>Salmonella, Proteus mirabilis</i>
1	Céphalosporinase non exprimée (ampC)	<i>Escherichia coli, Shigella sp.</i>
2	Pénicillinase chromosomique	<i>Klebsiella pneumoniae, Citrobacter koseri</i>
3	Céphalosporinase inductible (ampC chromosomique inductible)	<i>Enterobacter, Morganella, Citrobacter freundii, Hafnia, Serratia, Providencia...</i>

(Ce tableau c'est +++, on va les détailler)

Groupe 0 ou 1

Les groupes 0 (**pas de bêta-lactamases**), et 1 (**céphalosporinases non exprimées**), donnent ce type d'antibiogramme :



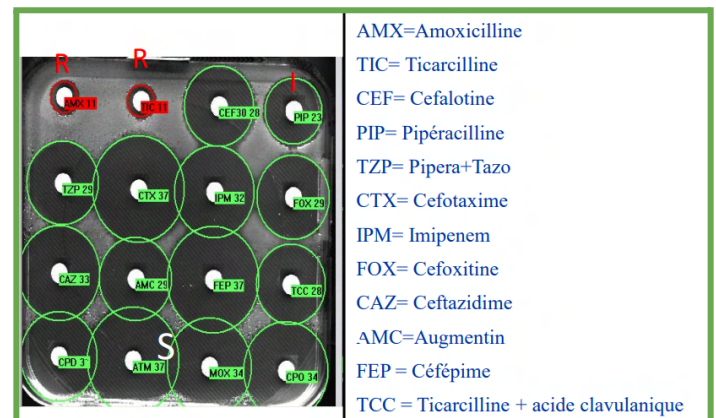
On voit que toutes les **bêta-lactamines** sont **sensibles**, puisqu'elles ont un diamètre important (en vert, il les lit tous donc apprenez bien le cours 2 et ça ira;).

Cela concerne ***Proteus mirabilis***, ***Salmonella sp.***, ***E. coli*** et ***Shigella sp.***

Groupe 2

Font partie de ce groupe : ***Klebsiella pneumoniae*** et ***Citrobacter koseri***. Elles ont une **pénicillinase chromosomique**. Celle-ci va hydrolyser l'**amoxicilline**, la **ticarcilline**, et partiellement la **pipéracilline**. L'association à de l'acide clavulanique, qui inhibe la pénicillinase, permet de récupérer la sensibilité +++.

Les autres molécules ne sont pas impactées.



Groupe 3

Les bactéries du groupe 3 ont un phénotype de **céphalosporinase inducible (ampC chromosomique inducible)**. On peut dire qu'il regroupe toutes les entérobactéries n'appartenant pas aux groupes 0, 1, et 2.

Antibiotiques	Céphalosporinases
Amoxicilline	R
Ticarcilline	S
Pipéracilline	S
Amox +Ac clavulanique	R
Pipéracilline+Tazobactam	S
C1G (Céfalotine)	I/R
C2G (Céfamandole)	I/R
Cefamycine (Cefoxitine)	I/R
C3G (Céfotaxime, Ceftazidime)	S
Imipénème	S

Pour rappel, l'**amoxicilline** est **résistante**.
L'**amoxicilline + acide clavulanique** est **résistante**.

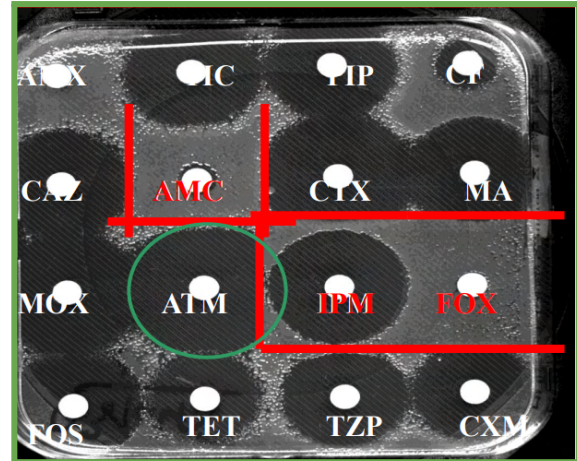
Les **C1G**, **C2G** et **céfoxitine** sont intermédiaires ou résistantes selon l'espèce bactérienne.

En présence d'inducteurs, comme l'impénème (IMP), la céfoxitine ou l'acide clavulanique, l'effet de la céphalosporinase est augmenté. ++

Cet antibiogramme correspond bien à une entérobactérie du groupe 3 (voir ci-dessus)
Il s'agit d'*Enterobacter cloacae*.

Induction

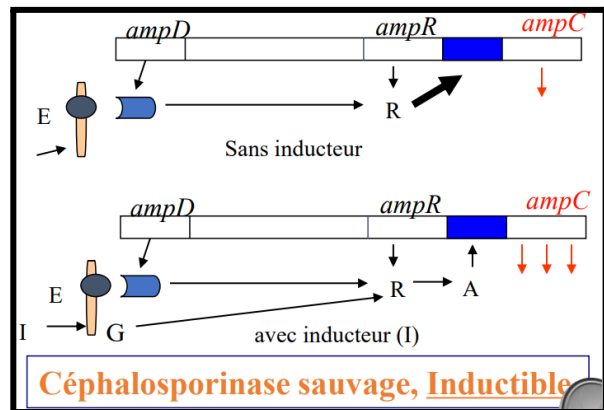
On voit aussi sur cette gélose l'**induction**. En face des disques d'**IMP**, comme avec l'**aztreonam (ATM)**, le diamètre n'est pas homogène. Les bactéries qui sont à la jonction entre l'ATM et l'IMP ont **réussi à pousser**. C'est l'IMP qui a **induit** une production de **céphalosporinase**. Les bactéries peuvent donc hydrolyser l'**ATM**.



C'est un **système de régulation inductible faisant intervenir 5 gènes** : *ampC*, *ampD*, *ampR*, *ampG* et *ampE*.

Sans inducteur : à la surface des entérobactéries du groupe 3, il y a un **senseur E** qui se lie à un produit de *ampD* et qui avec le **répresseur R** (produit de *ampR*) vont venir réguler la production de céphalosporinase en agissant sur le **promoteur** de *ampC*.

Avec inducteur : Le **répresseur R** de *ampC* est bloqué. Il y a alors une **production importante** de céphalosporinase.



5) Comment chez une entérobactérie du groupe 3, une céphalosporinase sauvage inductible peut devenir une céphalosporinase dérégulée ou hyperproduite ?

Rappels : Résistance acquise par mutation chromosomique

- La mutation est un événement rare : 10^{-6} à 10^{-9} .
Sauf dans les situations cliniques à fort inoculum et dans le tube digestif.
- C'est un événement stable, héréditaire aux cellules filles.
Mais non transmissible à d'autres espèces.
- +++ La sélection de mutants résistants se fait par l'antibiothérapie. +++

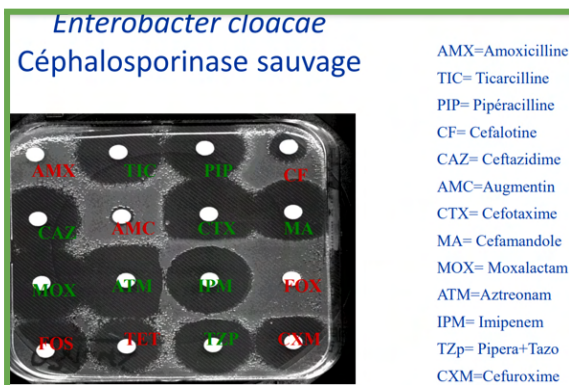
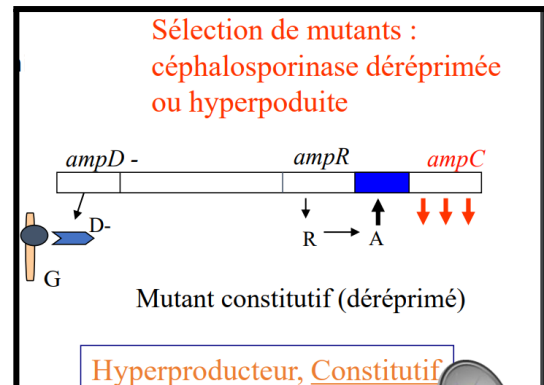
Rappels : induction

La céphalosporinase sauvage produite par *ampC* est sous contrôle de plusieurs gènes (*ampD*, *ampR*, *ampG* et *ampE*). Lorsqu'il y a une **induction (par l'IMP, l'acide clavulanique ou la cefoxitine)**, on a un contrôle du **répresseur** et donc une forte production de céphalosporinase. **Cela reste encore sous contrôle, car si on enlève l'inhibiteur, on revient au phénotype sauvage avec une production faible de *ampC*.**

Sélection de mutants

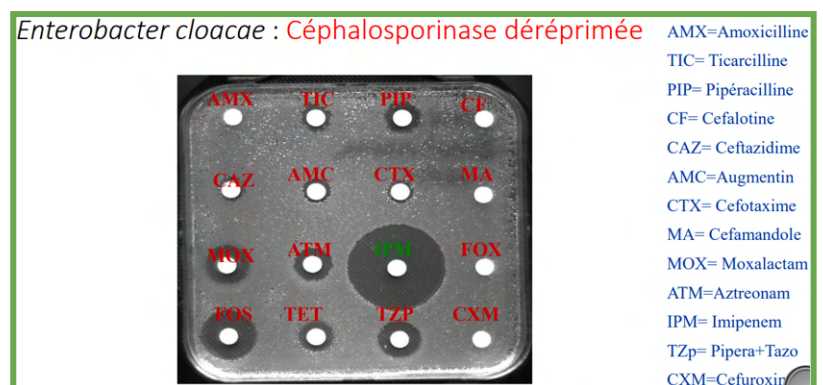
Maintenant, en cas de sélection de mutants, tout **le système de régulation ne fonctionne plus**. *ampC* produit de la céphalosporinase à **très haute quantité**.

On passe d'un **phénotype inductif** à un **phénotype constitutif** avec **hyperproduction** ou **dérépression**.



On remet l'antibiogramme d'*Enterobacter cloacae* avec une **céphalosporinase sauvage**.

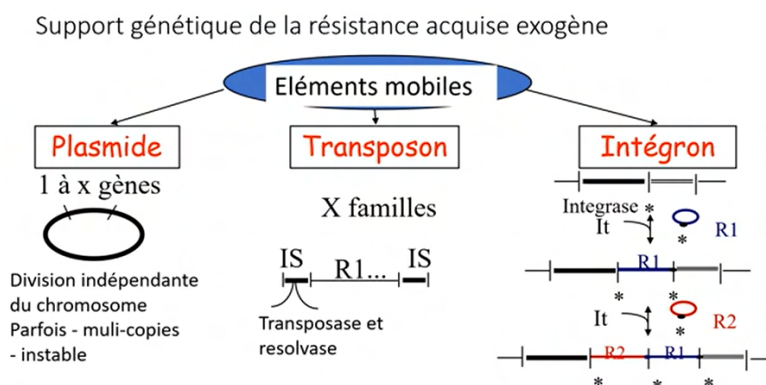
Dérépression : Dans ce phénotype, la céphalosporinase est tellement dérèprimée qu'elle va **hydrolyser** même les **pénicillines** comme la ticarcilline et la pipéracilline.



On peut aboutir à un antibiogramme montrant des **résistances à tout sauf à l'imipénème**.

6) Que signifie résistance par acquisition de gènes de type bêta-lactamases à spectre étendu ou BLSE ?

Support génétique de la résistance acquise exogène



Plasmide	Transposon	Intégron
<ul style="list-style-type: none"> - Morceaux de chromosome ayant une division indépendante du chromosome bactérien. - Parfois en multi-copies. - Instable. - Se transmet d'une bactérie à une autre. - Ils peuvent porter des gènes de résistance et les transmettre d'une espèce à une autre. 	<ul style="list-style-type: none"> - C'est un ensemble de gènes. - Ils sont encadrés par des séquences d'insertion qui portent des gènes codant pour des transposase et resolvase. - Ils peuvent comporter des gènes de résistance. - Ils sont appelés gènes sauteurs. Ils peuvent s'insérer dans un chromosome bactérien ou dans un plasmide. 	<ul style="list-style-type: none"> - Une intégrase va intégrer un morceau de gène (qui peut être un gène de résistance). - On peut avoir plusieurs gènes les uns derrière les autres, tous sous contrôle de l'intégrase. - On peut avoir des gènes de résistance différents.

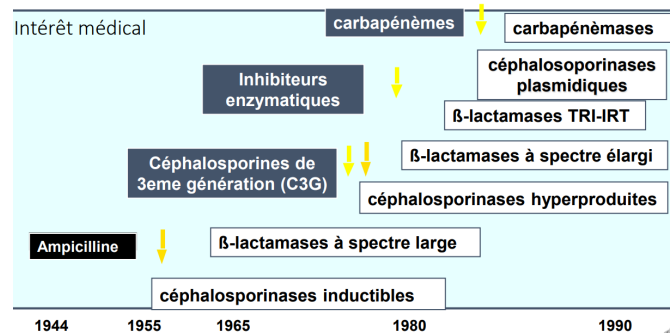
Les bactéries peuvent mettre un intégron au sein d'un transposon, faire passer ce transposon d'un plasmide à un autre, à un chromosome...

On a des phénomènes très riches, divers, parfois associés entre eux, à transmission horizontale et verticale. Cela est responsable de phénomènes d'épidémies de gènes de résistance.

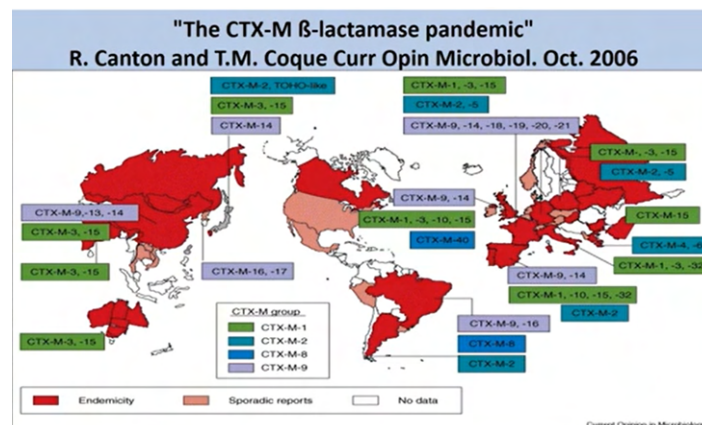
Evolution des bêta-lactamases

En effet, à chaque fois qu'on a utilisé des **antibiotiques (ampicilline, C3G, carbapénèmes)**, on a en face la **bactérie** qui a développé ou acquis des **gènes de résistance** de type **céphalosporines inductibles, bêta-lactamases à spectre large, à spectre élargi, les céphalosporines plasmidiques et les carbapénèmes** actuellement.

Evolution des β-lactamases



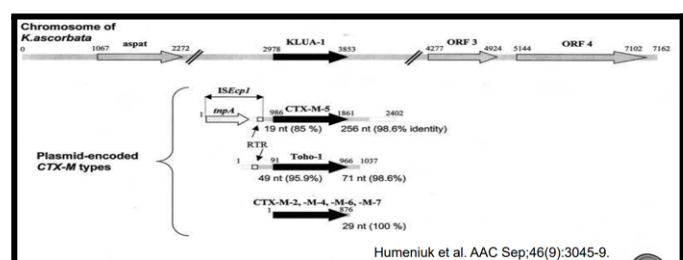
Bêta-lactamases à spectre élargi de type CTX-M



CTX-M est un gène qui a été diffusé partout dans le monde. Il est responsable actuellement de l'épidémie communautaire d'*E. coli* BLSE. En effet, **5%** de la population contient dans le tube digestif des *E. coli* qui sont de type bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE).

Les gènes CTX-M sont retrouvés **dans la communauté** chez des patients n'ayant jamais été en contact direct ou indirect avec l'hôpital.

CTX-M existe dans le chromosome d'une entérobactérie de l'environnement qui s'appelle *Kluyvera ascorbata*. Il est identique aux différents CTX-M retrouvés chez les *E. coli*.



De la **communauté**, il est rentré à l'**hôpital**, où il a largement diffusé.

Béta-lactamases chez les entérobactéries sauvages / Béta-lactamases acquises de type BLSE

Antibiotiques	Penicillinas	Céphalosporinas	Betalactamase à spectre élargie BLSE Acquisse
Amoxicilline	R	R	R
Ticarcilline	R	S	R
Pipéracilline	I	S	R
Amox +Ac clavulanique	S	R	S/R
Pipéracilline+Tazobactam	S	S	S/R
C1G (Céfalotine)	S	I/R	R
C2G (Céfamandole)	S	I/R	R
Cefamycine (Cefoxitine)	S	I/R	S pour entérobactérie Groupe 0,1,2 mais pas 3
C3G (Céfotaxime, Ceftazidime)	S	S	R
Imipénème	S	S	S

On rappelle le phénotype de pénicillinas sauvage, de céphalosporinas sauvage et on compare avec le phénotype de BLSE. Celui-ci a une **résistance à toutes les pénicillines**. Il est **recupéré partiellement à l'acide clavulanique et au tazobactam**. Il est **résistant aux C1G, C2G, et surtout aux C3G**.

Seul l'imipénème reste sensible.

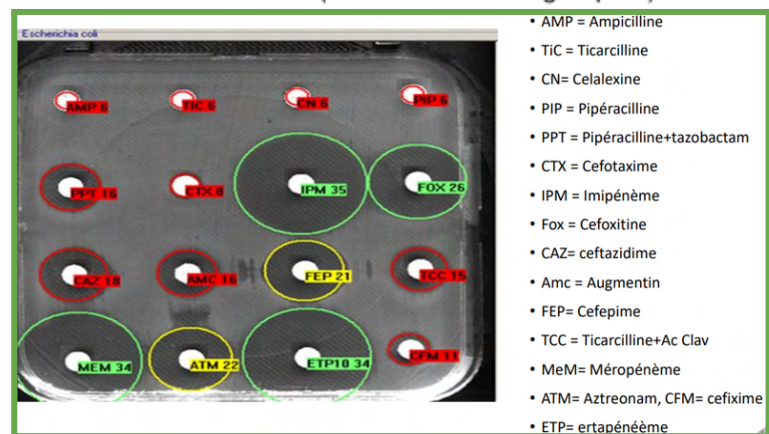
Exemple : synergie d'action

On a des bactéries qui ne poussent pas, car l'acide clavulanique et l'aztreonam, qui ont diffusé, entraînent une synergie d'action.

Idem pour céfépime et acide clavulanique.

Idem pour TCC et céfépime.

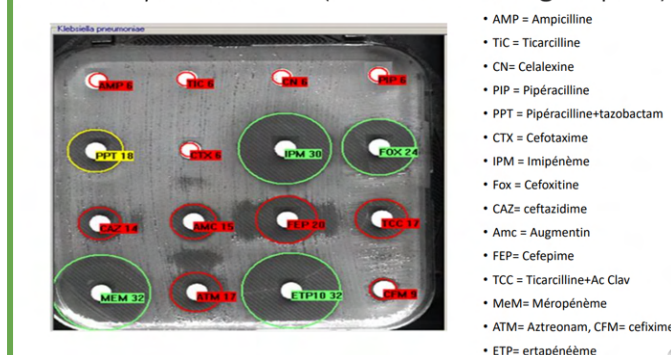
Escherichia coli (Enterobactérie du groupe 1)



C'est typiquement un CTX-M acquis chez *E. coli* avec une résistance aux C3G et aux C4G.

Exemple 2 :

Klebsiella pneumoniae (Entérobactérie groupe 2)



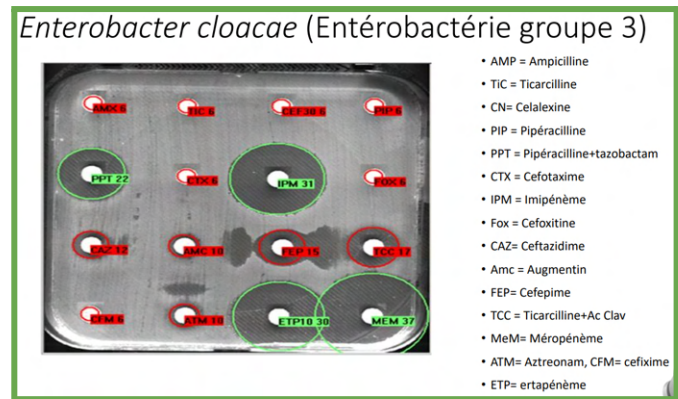
(il faut surtout comprendre le mécanisme et comprendre ce que vous voyez sur l'antibiogramme)

Ici, on a une souche de *K. pneumoniae* BLSE de type CTX-M qui confère une résistance à nouveau au céfotaxime, la ceftazidime et au céfépime.

Par exemple, on voit bien les synergies avec l'acide clavulanique et le céfépime, ou l'aztreonam et l'acide clavulanique. C'est ce qu'on appelle une **synergie en bouchon de champagne**.

Exemple 3 :

Cette BLSE peut être aussi transmise à des bactéries du groupe 3 comme chez *Enterobacter cloacae*. On voit encore le céfotaxime résistant, la ceftazidime, l'augmentin. Elle est sensible à l'augmentin de base, mais on voit une synergie avec la céfépime. Ou entre la céfépime et la TCC. C'est l'acide clavulanique qui diffuse et entraîne une action avec le céfépime.



7) Que signifie résistance par acquisition de gènes qui codent pour une enzyme de type carbapénémase (KPC, NDM, OXA-48) ?

Bêta-lactamases acquises de type carbapénémase

Bêta-lactamases chez les entérobactéries sauvages / Bêta-lactamases acquises de type Carbapénémase

Antibiotiques	Penicillinases	Céphalosporinases	Carbapénémases
Amoxicilline	R	R	R
Ticarcilline	R	S	R
Pipéracilline	I	S	R
Amox +Ac clavulanique	S	R	R
Pipéracilline+Tazobactam	S	S	R
C1G (Céfalotine)	S	I/R	R
C2G (Céfamandole)	S	I/R	R
Cefamycine (Cefoxitine)	S	I/R	I/R
C3G (Céfotaxime, Ceftazidime)	S	S	I/R
Imipénème	S	S	I/R

Les carbapénémases confèrent la résistance à plusieurs antibiotiques dont les pénicillines (*en vert toujours*), l'augmentin, la pipéracilline + tazobactam, les C1G, C2G, la céphamycine, les C3G et l'imipénème qui apparaît au minimum intermédiaire.

(Bref toute la liste ! Jspr qu'on va avoir un médoc stylé)

3 types de carbapénémases selon le génotype

Classe A :

KPC, retrouvé à New-York, en Grèce, en Israël. Ils sont essentiellement présents chez *Klebsiella pneumoniae* (à 50%), *Enterobacter cloacae* et *E. coli*.

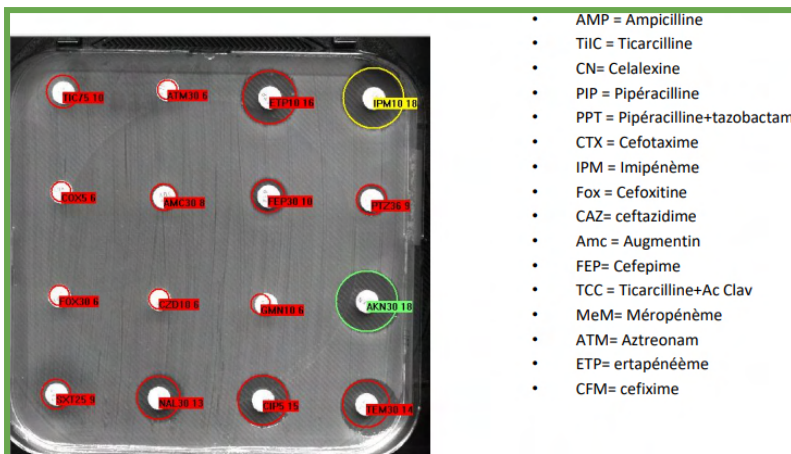
Classe B :

NDM-1, retrouvé en Inde, au Pakistan, ou en cas importés parmi différentes espèces d'entérobactéries.

Classe D :

OXA-48, est retrouvé dans les *K. pneumoniae* et *E. coli*.

Enterobacter cloacae KPC

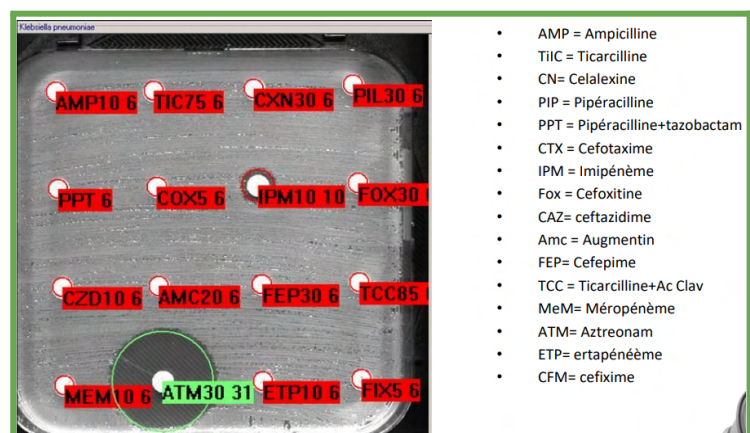


Voici un antibiogramme réalisé chez *Enterobacter cloacae* qui possède une carbapénémase de type **KPC**.

On voit une **résistance à quasiment toutes les bêta-lactamines**. On voit une **réduction d'hydrolyse partielle de l'imipénème**, et moins du **méropénème**.

Klebsiella pneumoniae NDM

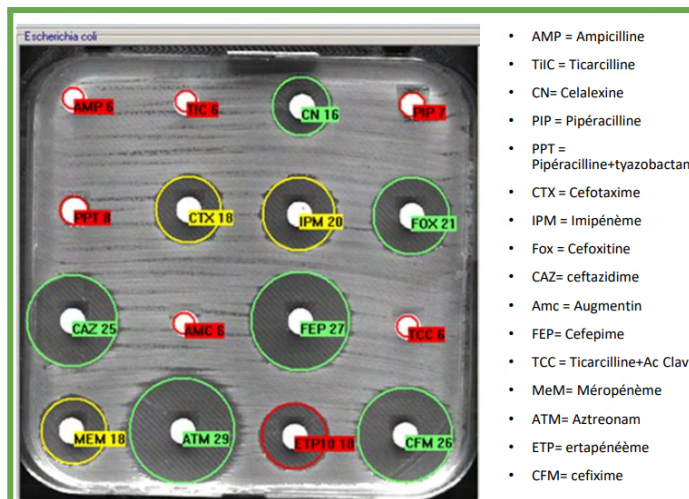
Ici, le type NDM de carbapénémase donne une **résistance à l'ertapénème (ETP)**, qui est le premier carbapénème, à l'imipénème et à toutes les autres bêta-lactamines sauf une molécule : **l'aztreonam**.



Escherichia coli OXA-48

Chez ce troisième type qu'on retrouve plus souvent en France, l'hydrolyse est beaucoup plus partielle parmi les bêta-lactamines. L'ertapénème en rouge est résistant. L'hydrolyse est partielle pour l'imipénème.

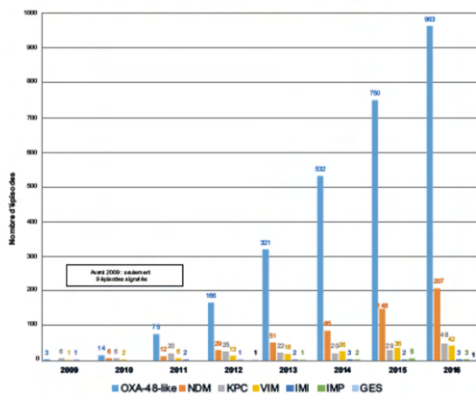
On voit que pour les OXA-48, il reste encore des possibilités thérapeutiques, notamment avec la ceftazidime, le céfépime, l'aztreonam et la céfoxitine.



Donc on a des carbapénémases qui ont des phénotypes qui varient. Ils peuvent être très élevés comme NDM ou KPC. Ou moins élevés, comme OXA-48.

Episodes impliquant des entérobactéries ayant une carbapénémase

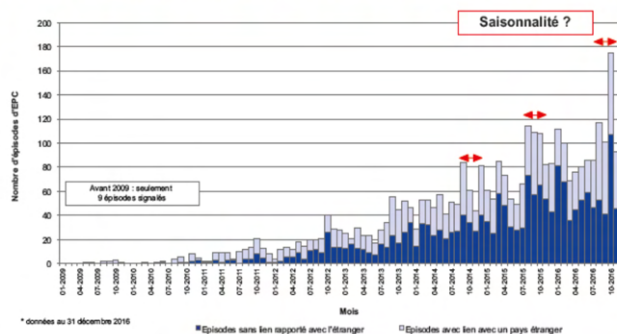
Figure 2 | Répartition des épisodes impliquant des EPC en France signalés entre 2009 et 2016, selon les mécanismes de résistance impliqués et l'année de signalement (N=3 595)



On voit que la carbapénémase qui domine en France est **OXA-48**, suivi par NDM, et beaucoup moins par KPC et autres carbapénémases.

Les épisodes impliquant des carbapénémases ont été identifiés dès **2010** et ont progressivement **augmenté par saisonnalité**. Elles sont apparues chez des patients venant de l'étranger, et sont maintenant aussi chez des patients n'ayant jamais voyagé.

Figure 1 | Evolution par mois du nombre d'épisodes impliquant des EPC en France signalés entre 2009 et 2016, selon la mise en évidence ou non d'un lien avec un pays étranger (N=3 595)



Conclusion du cours

- La CMI, le diamètre d'inhibition et l'antibiogramme sont des outils simples pour prédire l'efficacité d'un traitement antibiotique.
- Il est important de distinguer la **résistance naturelle** de la **résistance acquise** en **phénotype** et en **génotype**. La résistance acquise est un indicateur de l'émergence et de la diffusion potentielle de gènes de résistance, que ce soit en communautaire (BLSE), ou maintenant à l'hôpital pour les BLSE et les carbapénémases.
- Il existe 4 grands types de mécanismes de résistance dont la prévalence varie selon les espèces bactériennes.
- Les entérobactéries peuvent être classées en 4 groupes selon leur phénotype de résistance sauvage.
- Les céphalosporinases, BLSE ou carbapénémases (**génotypes acquis**), peuvent être à l'origine de difficultés de choix de traitement. Donc reconnaître et détecter ces mécanismes est important.