



HAL
open science

analyse génomique et transcriptomique de bactéries productrices de carbapénèmases

Agnès Jousset

► **To cite this version:**

Agnès Jousset. analyse génomique et transcriptomique de bactéries productrices de carbapénèmases. Bactériologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS527 . tel-03092307

HAL Id: tel-03092307

<https://theses.hal.science/tel-03092307>

Submitted on 2 Jan 2021

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

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

Analyse génomique et transcriptomique de bactéries productrices de carbapénèmase

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

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

Unité EA7361
« Structure, dynamique, fonction et expression de
 β -lactamase à large spectre »

Thèse présentée et soutenue au Kremlin-Bicêtre, le 14 Décembre 2018, par

Agnès Jousset

Composition du Jury :

Alban Le Monnier	Président
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris Sud	
Marie-Cécile Ploy	Rapporteur
Professeure des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Limoges	
Vincent Cattoir	Rapporteur
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Rennes 1	
Guillaume Arlet	Examineur
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris VI	
Thierry Naas	Directeur de thèse
Maître de Conférence Universitaire-Praticien Hospitalier, Université Paris Sud	
Rémy Bonnin	Co-Encadrant
Maître de Conférence Universitaire, Université Paris Sud	

Remerciements

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

- Monsieur le Professeur Alban Le Monnier, merci de présider ce jury et de partager votre expertise.
- Madame la Professeure Marie-Cécile Ploy et Monsieur le Professeur Vincent Cattoir, merci de l'attention et de l'intérêt avec lesquels vous avez lu et corrigé ce travail afin de l'améliorer.
- Monsieur le Professeur Guillaume Arlet et Monsieur le Professeur Youri Glupczynski, merci d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.
- Monsieur le Docteur Thierry Naas pour m'avoir donné la chance de faire ma thèse de sciences au sein de son unité de recherche. Merci de m'avoir proposé ce sujet passionnant et de m'avoir laissé l'autonomie nécessaire pour me l'approprier et le mener à bien.
- Monsieur le Docteur Rémy Bonnin, merci pour ton aide au quotidien, ta disponibilité, ton soutien et ta patience pour m'enseigner les bases de la Génétique !

Un grand merci à l'ensemble des membres de l'unité EA7361/EERA et du CNR de m'avoir accueillie à bras ouverts : mon éternelle co-assistante de coeur Lauraine Gauthier, mon actrice préférée Delphine Girlich, l'efficace Laurent Dortet, l'incontournable Gaëlle Cuzon, le pilier du laboratoire Saoussen Oueslati et la perfectionniste Florence Bussy. C'est un plaisir de travailler avec vous, sans perdre la touche d'humour quotidienne ! A Sandrine, Elodie, Garance, Aimie, Anaïs, Laura, Julie, et Thibaud, merci de vos encouragements et de permettre à cette équipe d'exister. Merci à Anaïs Potron pour son aide lointaine mais cruciale dans l'écriture de ce manuscrit. Une pensée pour les étudiants ayant quitté le laboratoire, mais qui ont marqué nos esprits par leurs nombreuses qualités : Linda, Cynthia, Sockccheng et Victor.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe de Pasteur d'avoir apporté leur expertise et leur savoir-faire dans l'étude de la résistance aux antibiotiques. Un grand merci à Isabelle Rosinski-Chupin ; sans ton aide, je ne serais pas allée bien loin dans l'analyse d'un transcriptome. Merci pour ton regard aiguisé dans la relecture des articles et de ce manuscrit, source de commentaires pertinents. Je tiens à remercier Philippe Glaser dont le travail a apporté beaucoup de valeur ajoutée à cette thèse.

Je remercie chaleureusement tous les membres du laboratoire de bactériologie-hygiène de Bicêtre pour leur sympathie au quotidien ; Monsieur le Docteur Nicolas Fortineau pour m'avoir acceptée comme Assistante au laboratoire et m'avoir laissée libre d'arranger mon emploi du temps pour concilier les deux activités durant ces 4 années.

Last but not least, un merci sûrement bien trop faible pour mes parents, mes sœurs, mes neveux, mes beaux-parents et tous mes amis ; merci de votre soutien et rassurez-vous, c'est presque terminé. A Guillaume, merci de m'avoir aidée, écoutée et encouragée, sans ton soutien, cette thèse n'aurait pas vu le jour. A Oscar, merci d'être là.

Tables des matières

ABREVIATIONS.....	10
--------------------------	-----------

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
-----------------------------------	-----------

A. INTRODUCTION	12
------------------------------	-----------

I. Les bêta-lactamines.....	12
1. Histoire.....	12
2. Structure et classification	12
a. Les pénicillines.....	13
b. Les céphalosporines.....	13
c. Les monobactames.....	14
d. Les carbapénèmes.....	14
3. Mécanisme d'action des β -lactamines.....	15
4. Mécanisme de résistance aux β -lactamines.....	16
a. Imperméabilité	16
b. Excrétion de l'antibiotique : systèmes d'efflux.....	17
c. Modification de la cible.....	19
d. Inactivation enzymatique de l'antibiotique.....	19
II. Les bêta-lactamases.....	20
1. Structure et classification	20
a. Classification de Ambler.....	21
b. Classification de Bush et Jacoby.....	22
2. Mécanisme d'action.....	24
3. BLSE.....	25
a. Définitions.....	25
b. Généralités.....	26
c. Les BLSE « majeures » : TEM, SHV et CTX-M.....	26
d. Les BLSE « mineures ».....	27
4. Les céphalosporinases	28
a. Distribution	28
b. Classification et nomenclature des pAmpC.....	28
c. Propriétés enzymatiques.....	30
d. Régulation des cAmpC.....	32
e. Régulation des pAmpC.....	35
f. Environnement génétique.....	35
i. pAmpC.....	35
ii. cAmpC.....	36

B. LES CARBAPENEMASES.....	38
-----------------------------------	-----------

I. Historique.....	38
II. Carbapénèmases de classe A.....	38
1. Carbapénèmases de type GES.....	39
a. Epidémiologie et spectre d'hydrolyse	39
b. Environnement génétique.....	40
2. Carbapénèmases de type IMI.....	40
a. Epidémiologie et spectre d'hydrolyse	40
b. Environnements et supports génétiques.....	40
3. Carbapénèmases de type KPC.....	41
a. Spectre d'hydrolyse	42
b. Epidémiologie	43
c. Supports génétiques.....	44

i.	Environnement génétique du gène <i>bla_{KPC}</i>	44
ii.	Plasmides portant KPC.....	47
d.	Expression du gène <i>bla_{KPC}</i>	47
e.	Le groupe-clonal CG258.....	49
f.	Le succès d'un clone épidémique.....	51
III.	Carbapénèmases de classe B.....	52
1.	Carbapénèmases de type IMP.....	52
a.	Epidémiologie.....	52
b.	Environnement génétique.....	53
2.	Carbapénèmases de type VIM.....	53
a.	Epidémiologie.....	53
b.	Environnement génétique.....	54
3.	Carbapénèmases de type NDM.....	54
a.	Epidémiologie.....	54
b.	Environnement génétique.....	55
4.	Autres métallo- β -lactamases.....	57
IV.	Carbapénèmases de classe D.....	57
1.	Généralités sur les oxacillinases.....	57
2.	Epidémiologie.....	59
3.	Spectre d'hydrolyse.....	60
4.	Environnement génétique.....	63
5.	Support génétique.....	64
6.	Origine.....	64
V.	Méthodes de détection des Entérobactéries Productrices de Carbapénèmase (EPC).....	65
1.	Méthodes phénotypiques.....	65
a.	Antibiogramme et concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	65
b.	Disques combinés ou tests phénotypiques d'inhibition.....	67
c.	CIM-test et dérivés.....	67
2.	Tests d'hydrolyse.....	69
a.	Tests colorimétriques.....	69
b.	Identification d'une activité carbapénèmase par spectrométrie de masse.....	70
3.	Tests immunochromatographiques.....	70
4.	Techniques moléculaires.....	71
VI.	Données cliniques.....	71
1.	Facteurs de risque d'acquisition des EPC.....	71
2.	Devenir des patients infectés.....	72
3.	Devenir des patients colonisés.....	73
4.	Traitement des infections dues à des EPC.....	73
a.	Anciennes molécules.....	73
b.	Avibactam.....	75
C.	SUPPORT GENETIQUE DES B-LACTAMASES TRANSFERABLES OU ACQUISES.....	76
I.	Les plasmides.....	76
II.	Les éléments transposables.....	77
1.	Les séquences d'insertion.....	77
a.	Généralités.....	77
b.	Structure.....	78
i.	Transposase.....	78
ii.	Séquences inversées répétées.....	78
iii.	Séquences en répétition directe.....	79
c.	Les différents modes de transposition.....	79
i.	Transposition réplivative.....	80
ii.	Transposition non réplivative.....	81
iii.	Transposition <i>one-ended</i>	81
iv.	Transposition en cercle roulant.....	82
d.	Les séquences d'insertion « <i>common region</i> » : ISCR.....	82
e.	Rôle des séquences d'insertion.....	83
2.	Transposons.....	83

a.	Transposons composites	83
b.	Transposons non-composite type Tn3	84
c.	Transposons conjugatifs	84
III.	Gènes cassettes et intégrons	85
1.	Structure des intégrons	85
2.	Les différents types d'intégrons.....	85
a.	Intégrons plasmidiques.....	85
b.	Intégrons chromosomiques.....	86
D.	APPORT DU NGS DANS L'ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	87
I.	Aspects techniques	87
1.	Séquençage par Illumina®.....	88
2.	Séquençage par Ion Torrent.....	89
3.	Le séquençage PacBio®	90
4.	Le système Nanopore	91
5.	Applications	91
a.	Le séquençage <i>de novo</i>	91
b.	Le re-séquençage	93
c.	Comparaison des techniques et leurs applications.....	93
II.	Applications en bactériologie clinique	96
1.	Suivi d'épidémies hospitalières locales	96
2.	Epidémiologie mondiale et surveillance des clones « à haut risque »	97
3.	Identification de nouveaux mécanismes de résistance	98
4.	L'antibiogramme <i>in silico</i>	99
5.	Evolution génomique.....	100
6.	La métagénomique	102
7.	Etude transcriptomique par RNA-seq.....	102
III.	Le RNA-seq et ses applications en bactériologie.....	102
1.	Expression et annotation de gènes.....	103
2.	Analyse différentielle.....	106
3.	Identification de petits ARN non codants.....	106
4.	Séquençage de l'extrémité 5' des ARN – Identification des TSS	107
5.	Dual RNA-seq	109
	OBJECTIFS SCIENTIFIQUES	110
	RESULTATS	113
	Chapitre 1 : A 4.5 years within-patient evolution of a colistin resistant KPC-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST258	114
	Chapitre 2 : Promoter characterization and expression of the <i>bla</i>_{KPC-2} gene in <i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Acinetobacter baumannii</i>	123
	Chapitre 3 : Transcriptional landscape of a <i>bla</i>_{KPC-2} plasmid and response to imipenem exposure in <i>Escherichia coli</i> TOP10	131
	Chapitre 4 : ACT-28, a chromosomally-encoded AmpC with carbapenemase activity from <i>Enterobacter kobei</i>	177
	Chapitre 5 : CTX-M-15-producing <i>Shewanella</i> sp. clinical isolate expressing OXA-535, a chromosome-encoded OXA-48 variant, putative progenitor of the plasmid-encoded OXA-436	212
	Chapitre 6 : Genetic and biochemical characterization of OXA-535, a distantly-related OXA-48-like β-lactamase.	225

DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	233
REFERENCES	245
ANNEXES	264

Liste des figures et des tableaux

FIGURES

Figure 1. Structure des β -lactamines.....	13
Figure 2. Principales familles de pompes à efflux avec leurs substrats antibiotiques connus.....	18
Figure 3. Mécanisme d'action simplifié des β -lactamases à sérine active.....	24
Figure 4. Dendrogramme des AmpC chromosomiques et plasmidique.....	29
Figure 5. Mécanismes impliqués dans la régulation du gène <i>bla_{ampC}</i> - Expression d'AmpC dans une souche sauvage, sans inducteur.....	33
Figure 6. Mécanismes impliqués dans la régulation du gène <i>bla_{ampC}</i> - Induction par les β -lactamines (céfoxitine, imipénème, acide clavulanique).....	33
Figure 7. Mécanismes impliqués dans la régulation du gène <i>bla_{ampC}</i> - phénomène de dépression.....	34
Figure 8. Organisation génétique des céphalosporinases chromosomiques.....	37
Figure 9. Environnement génétique du gène <i>bla_{IMI-1}</i> présent au sein d'éléments intégrés mobiles appelés EcloIMEX.....	41
Figure 10. Distribution géographique des souches de <i>K. pneumoniae</i> produisant KPC.....	44
Figure 11. Représentation schématique des différentes structures du transposon Tn4401 identifiées sur différents plasmides porteurs du gène <i>bla_{KPC}</i>	45
Figure 12. Structures génétiques des NTE _{KPC}	46
Figure 13. Structure du Tn4401g.....	46
Figure 14. Impact des différentes structures du Tn4401 dans l'expression du gène <i>bla_{KPC}</i>	48
Figure 15. Phénomène d'hétérorésistance vis à vis des carbapénèmes d'une souche de <i>K. pneumoniae</i> produisant KPC.....	49
Figure 16. Histoire évolutive hypothétique des souches de <i>K. pneumoniae</i> ST258.....	50
Figure 17. Répartition mondiale de la carbapénémase NDM chez les entérobactéries et <i>P. aeruginosa</i>	55
Figure 18. Environnement génétique du gène <i>bla_{NDM-1}</i> chez <i>A. baumannii</i> et chez les entérobactéries.....	56
Figure 19. Distribution des entérobactéries produisant une carbapénémase OXA-48-like.....	60
Figure 20. Environnement génétique des transposons Tn1999-like portant le gène <i>bla_{OXA-48}</i> chez les entérobactéries.....	63
Figure 21. Algorithme phénotypique de criblage des souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases au sein des souches non-sensibles aux carbapénèmes.....	66
Figure 22. Protocole pour la réalisation du CIM-test.....	68
Figure 23. Protocole pour la réalisation du rCIM.....	69
Figure 24. Organisation générale d'une séquence d'insertion.....	79
Figure 25. Représentation schématique simplifiée de la transposition répliquative.....	80
Figure 26. Représentation schématique simplifiée de la transposition non répliquative.....	81
Figure 27. Organisation d'un transposon de classe II, cas du transposon Tn3.....	84
Figure 28. Modèle de capture des gènes par les systèmes d'intégrons.....	86
Figure 29. Séquençage de type illumina.....	89
Figure 30. Utilité des techniques de séquençage avec longs <i>reads</i> afin d'améliorer l'assemblage des régions avec séquences répétées.....	92
Figure 31. Effet de l'évolution d'un génome bactérien sur la reconstruction de la chaîne de transmission.....	101
Figure 32. Visualisation des données de RNA-seq par le logiciel BamView.....	104
Figure 33. Applications du RNA-seq.....	105
Figure 34. Couverture vs profondeur.....	106
Figure 35. Détermination des TSS par RNA-seq.....	108
Figure 36. Principe du Dual RNA-seq.....	109

TABLEAUX

Tableau 1. Classification des β -lactamases.....	23
Tableau 2. Éléments conservés dans les sites actifs des enzymes à sérine active (S).....	25
Tableau 3. CMI des transformants <i>E. coli</i> TOP10 après clonage des gènes <i>bla</i> _{ACT-1} et <i>bla</i> _{CMY-2} dans pTOPO et <i>bla</i> _{ADC-68} dans pHSG398.....	30
Tableau 4. Propriétés enzymatiques des céphalosporinases ayant une activité carbapénèmase détectable.....	31
Tableau 5. Activité enzymatique des variants KPC-2, KPC-3, KPC-14 et KPC-28.....	42
Tableau 6. Paramètres cinétiques des variants OXA-163 et OXA-405 comparés à OXA-48.....	61
Tableau 7. CMIs des transformants <i>E. coli</i> TOP10 produisant les variants OXA-162, OXA-204, OXA-181, OXA-232, OXA-163 et OXA-48.....	62
Tableau 8. Paramètres cinétiques d'OXA-48 et ses variants OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204 et OXA-232.....	62
Tableau 9. Variants oxacillinases chromosomiques identifiées chez différentes espèces de <i>Shewanella</i> spp.	65
Tableau 10. <i>Breakpoints</i> cliniques et épidémiologiques proposés par l'EUCAST.....	67
Tableau 11. Comparaison des différents systèmes de séquençage, aspects techniques.....	94
Tableau 12. Principales applications des différents systèmes de séquençage en bactériologie....	95
Tableau 13. Récapitulatif des promoteurs préférentiels pour chaque structure génétique dans chaque espèce.....	124

Abréviations

5' RACE *Rapid amplification of cDNA-ends*
ADNc ADN complémentaire
ANI *Average Nucleotide Identity*
BLSE β -lactamase à Spectre Etendu
CHDL *Carbapenem-Hydrolyzing class D β -Lactamase*
EUCAST *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
C3G Céphalosporine de 3^e Génération
CG *Clonal Group*
CIM *Carbapenem Inactivation Method*
CMI Concentration Minimale Inhibitrice
ECC *Enterobacter cloacae* complex
EPC Entérobactérie Productrice de Carbapénémase
HTS *High-Throughput Sequencing*
IRL *Inverted Repeat Left*
IRR *Inverted Repeat Right*
IS *Insertion Sequence*
kb kilobase
kDa kiloDalton
MBL Métallo- β -lactamase
NGS *Next Generation Sequencing*
ORF *Open Reading Frame*
pb paire de bases
PLP Protéine de Liaison aux Pénicillines
PCR *Polymerase Chain Reaction*
RPKM *Reads Per Kilobase per Million mapped reads*
SLV *Single-Locus Variant*
SNP *Single Nucleotide Polymorphism*
ST *Sequence-Type*
TSS *Transcriptional Start Site*
UTR *Untranslated Region*

Etude bibliographique

A. Introduction

I. Les bêta-lactamines

1. Histoire

En 1928, Fleming a découvert la première β -lactamine en observant l'inhibition de la croissance de staphylocoques au voisinage d'une moisissure (*Penicillium notatum*) qui avait contaminé le milieu de culture [1,2]. Il fallut attendre les années 1940 pour que deux chimistes, Florey et Chain, parviennent à extraire la molécule active de ce champignon, la pénicilline G.

Depuis, de nombreuses molécules ont été découvertes ou synthétisées et leur spectre d'action s'est progressivement élargi aux staphylocoques producteurs de pénicillinase, aux entérobactéries, à *Pseudomonas aeruginosa* et enfin aux staphylocoques résistants à la méticilline.

2. Structure et classification

La base commune à toutes les β -lactamines est le cycle β -lactame, sur lequel se greffent une chaîne latérale d'une part et un cycle à 5 ou 6 atomes d'autre part (Figure 1).

On distingue :

- les cycles β -lactames associés à cinq atomes :
 - S en position 1 : pénames
 - C en position 1 et double liaison en 2-3 : carbapénèmes
- les cycles β -lactames associés à 6 atomes avec double liaison en 3-4 : céphèmes
- le cycle β -lactame seul : monobactames (dont l'unique représentant est l'aztréonam)

Toutes ces molécules ont des caractéristiques communes, mais des spectres d'action et des indications qui leur sont spécifiques.

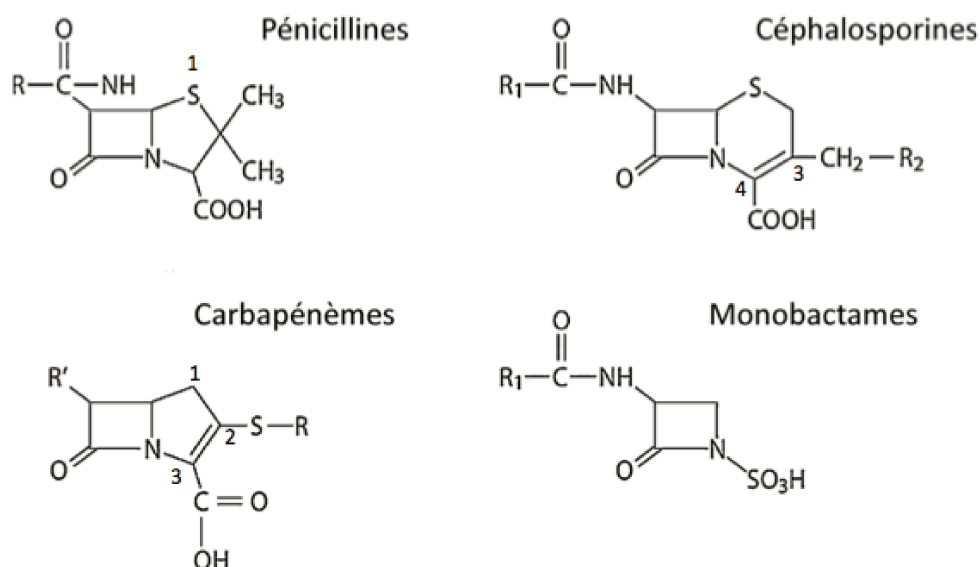


Figure 1. Structure des β -lactamines.

a. Les pénicillines

La découverte de la pénicilline par Fleming date des années 1930 mais la purification du noyau péname ou 6-APA (acide 6 amino-penicillanique), dont dérivent les pénicillines, date des années 1960. Dans les années 70-80, la production industrielle des pénicillines semi-synthétiques (ticarcilline, pipéracilline, méticilline, cloxacilline, témocilline) a été amorcée. Ces molécules présentaient un spectre élargi aux staphylocoques producteurs de β -lactamases, aux entérobactéries et à *Pseudomonas aeruginosa*, grâce à la modification chimique du noyau 6-APA [3].

b. Les céphalosporines

L'activité des β -lactamines à l'encontre des entérobactéries s'est encore renforcée avec la production, dans les années 70, du noyau céphème (Figure 1). Entre les années 70 et 90, plusieurs générations de céphalosporines ont été commercialisées. Il en existe actuellement quatre, dont le spectre d'action est de plus en plus large avec une activité sur les entérobactéries productrices de pénicillinases et de céphalosporinases [4]. Les céphalosporines de 3^e génération (C3G) sont les plus fréquemment utilisées dans le traitement d'une infection probabiliste par une entérobactérie. Les céphalosporines de 2^e génération de la famille des céphamycines se distinguent par leur résistance à

l'hydrolyse induite par les β -lactamases à spectre élargi (BLSE). Les céphalosporines de 4^e génération quant à elles ne sont pas inactivées par les céphalosporinases hyperproduites [4].

Les dernières céphalosporines synthétisées telles que la ceftaroline et le ceftobiprole se démarquent par leur activité dirigée contre certaines bactéries à Gram positif dont les staphylocoques résistants à la méticilline [5]. Enfin, le ceftolozane démontre une très bonne activité anti-pyocyanique [6].

c. Les monobactames

Les monobactames sont des β -lactamines qui ne possèdent qu'un seul cycle β -lactame (Figure 1). Les monobactames sont inactifs sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies mais sont en revanche très actifs sur les entérobactéries. L'activité anti-Gram négatif de l'aztréonam, seule molécule de type monobactame commercialisée, est globalement comparable à celle des C3G.

d. Les carbapénèmes

La famille des carbapénèmes est caractérisée par des molécules dont la structure de base dérive de la thiénamycine, antibiotique naturellement produit par *Streptomyces cattleya* [7] et découvert dans les années 1970. L'instabilité de cette molécule naturelle a conduit à l'élaboration d'un dérivé, la N-formimidoyl thiénamycine, ou imipénème.

Les carbapénèmes sont les β -lactamines possédant le spectre d'activité le plus large, incluant des bactéries à Gram positif (notamment les streptocoques, *S. aureus* sensible à la méticilline) et des bactéries à Gram négatif aérobies et anaérobies. Les carbapénèmes possèdent en particulier une bonne activité sur les entérobactéries, y compris les souches productrices de BLSE. Tous les carbapénèmes ont des spectres d'action proches à l'exception de l'ertapénème, inactif sur *Enterococcus* spp., *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et les autres bacilles à Gram négatif non fermentaires [8].

Quatre molécules sont actuellement disponibles en France : l'imipénème, l'ertapénème, le méropénème, et le doripénème. Les études menées *in vitro* ont montré que l'imipénème possédait une activité légèrement plus importante vis-à-vis des bactéries à Gram positif et moindre vis-à-vis des Gram négatif, comparée à celle du méropénème [9]. Ces deux molécules sont actuellement utilisées dans le traitement des infections sévères et nécessitent plusieurs administrations par jour du fait d'une demi-

vie courte. L'ertapénème a été développé compte-tenu de sa demi-vie plus longue (4 h au lieu de 1 h pour les autres molécules), ce qui permet son administration une fois par jour seulement. Le doripénème est la dernière molécule mise sur le marché et aurait une meilleure activité, *in vitro*, vis-à-vis de *P. aeruginosa*.

3. Mécanisme d'action des β -lactamines

Les cibles des β -lactamines sont les PLP pour « Protéines Liant les Pénicillines ». Localisées sur la face externe de la membrane cytoplasmique, ces enzymes interviennent dans la synthèse du peptidoglycane grâce à leur fonction de transglycosylase, transpeptidase et carboxypeptidase. Ces PLP sont présentes de manière universelle chez les procaryotes mais leur nombre et leur spécificité varient selon les espèces bactériennes. Elles sont divisées en deux catégories en fonction de leur poids moléculaire : les PLP de haut poids moléculaire et les PLP de bas poids moléculaire. Chaque β -lactamine possède une cible préférentielle, une PLP pour laquelle son affinité est maximale.

La première étape pour l'activité des β -lactamines est leur pénétration dans la bactérie pour atteindre leur cible. Le peptidoglycane, réseau tridimensionnel à larges mailles n'est pas un obstacle à l'entrée des antibiotiques. Cependant, chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe constitue une double barrière de perméabilité : la couche externe de lipopolysaccharide s'oppose à l'entrée des substances lipophiles et la bicouche phospholipidique interne s'oppose à l'entrée des substances hydrophiles. Seuls les antibiotiques hydrophiles peuvent traverser la membrane externe des bactéries à Gram négatif, par l'intermédiaire des porines, canaux formés par des protéines transmembranaires. La diffusion au travers de ces pores est strictement passive : elle est d'autant plus facile que les molécules sont de petite taille (poids moléculaire inférieur à 600 Daltons), hydrophiles et chargées positivement. Les β -lactamines sont des acides organiques relativement forts, pour la plupart solubles dans l'eau et complètement ionisés en solution.

Parvenues dans l'espace périplasmique, les β -lactamines agissent comme des substrats suicides des PLP. En effet, elles possèdent une analogie structurale avec le peptide D-Ala-D-Ala, substrat naturel des PLP. L'antibiotique se fixe au niveau du site actif des PLP, puis le cycle β -lactame s'ouvre et forme une liaison covalente avec la

sérine active de la poche catalytique des PLP. L'inhibition de ces enzymes induit un arrêt de la synthèse du peptidoglycane et donc un arrêt de la croissance bactérienne (effet bactériostatique). Les β -lactamines ont également un effet bactéricide qui résulterait de phénomènes secondaires déclenchés par l'altération du peptidoglycane conduisant à la lyse bactérienne.

4. Mécanisme de résistance aux β -lactamines

L'activité d'une β -lactamine dépend de la combinaison de plusieurs mécanismes : (i) sa pénétration à travers la paroi bactérienne, (ii) son affinité pour sa cible, les PLP et (iii) sa capacité à s'accumuler au voisinage de cette cible en résistant notamment à l'hydrolyse par les β -lactamases. Quatre mécanismes peuvent conduire à la résistance aux β -lactamines, chacun pouvant correspondre à la résistance naturelle d'une espèce bactérienne ou à une résistance acquise par mutation ou acquisition de gène(s).

a. Imperméabilité

Des résistances acquises aux β -lactamines par diminution de la perméabilité au niveau de la paroi ont été rapportées chez de nombreuses entérobactéries comme *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., et *Serratia* spp. suite à une altération quantitative ou qualitative des porines. Ce mécanisme s'exprime généralement à bas niveau, et est souvent associé à d'autres mécanismes de résistance aux β -lactamines comme la production de β -lactamase [10,11]. Chez les entérobactéries, ce mécanisme n'est pas spécifique et peut affecter l'activité de multiples familles d'antibiotiques [11].

Les défauts de perméabilité membranaire sont une cause importante de la résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif non fermentant tel que *P. aeruginosa*, notamment dûs à la perte ou à l'inactivation de la porine D2 [12].

Chez *E. coli*, l'altération des porines OmpA, OmpC et OmpF est fréquemment décrite dans les isolats multirésistants, notamment en association avec la production d'une β -lactamase comme une céphalosporinase [13] ou une BLSE [14].

Chez *K. pneumoniae*, l'inactivation des porines OmpK35 et/ou OmpK36 peut être responsable de la résistance aux carbapénèmes en association avec une BLSE ou une

céphalosporinase acquise [15,16]. Chez *Enterobacter* spp. hyperproducteurs de céphalosporinase naturelle, il a été montré que les porines OmpF et OmpC sont moins exprimées dans les souches résistantes aux carbapénèmes en comparaison aux souches sensibles [16,17]. Cette résistance est souvent plus marquée pour l'ertapénème que pour les autres carbapénèmes. L'analyse des gènes codant pour ces porines a mis en évidence des insertions ou des délétions conduisant à un décalage du cadre de lecture et ainsi à l'apparition de codons stops de traduction de la protéine correspondante [18]. Des mutations ponctuelles dans la séquence codante du gène ainsi qu'au niveau de son promoteur ont également été identifiées [16].

b. Excrétion de l'antibiotique : systèmes d'efflux

Les pompes à efflux sont des transporteurs membranaires qui excrètent activement les molécules toxiques, dont les antibiotiques, vers l'extérieur de la bactérie. Elles peuvent être classées en fonction de leur capacité à excréter spécifiquement un type de molécule (par exemple, pompes d'efflux des tétracyclines Tet, des macrolides Mef) ou à prendre en charge des molécules très différentes et contribuer ainsi à la multirésistance (pompes MDR « *multidrug resistance* »). Il existe cinq familles de pompes à efflux associées à une résistance aux antibiotiques, la famille ABC (ATP-Binding Cassette transporters), la famille SMR (Small Multidrug Resistance), la famille MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion), la famille MFS (Major Facilitator Superfamily) et la famille RND (Resistance Nodulation cell Division) (Figure 2) [19]. Elles peuvent aussi être différenciées selon la source d'énergie utilisée pour le transport de molécules, la force proton-motrice (familles MFS, RND et SMR), les ions sodium (famille MATE), ou l'hydrolyse d'adénosine triphosphate (transporteurs ABC) [20].

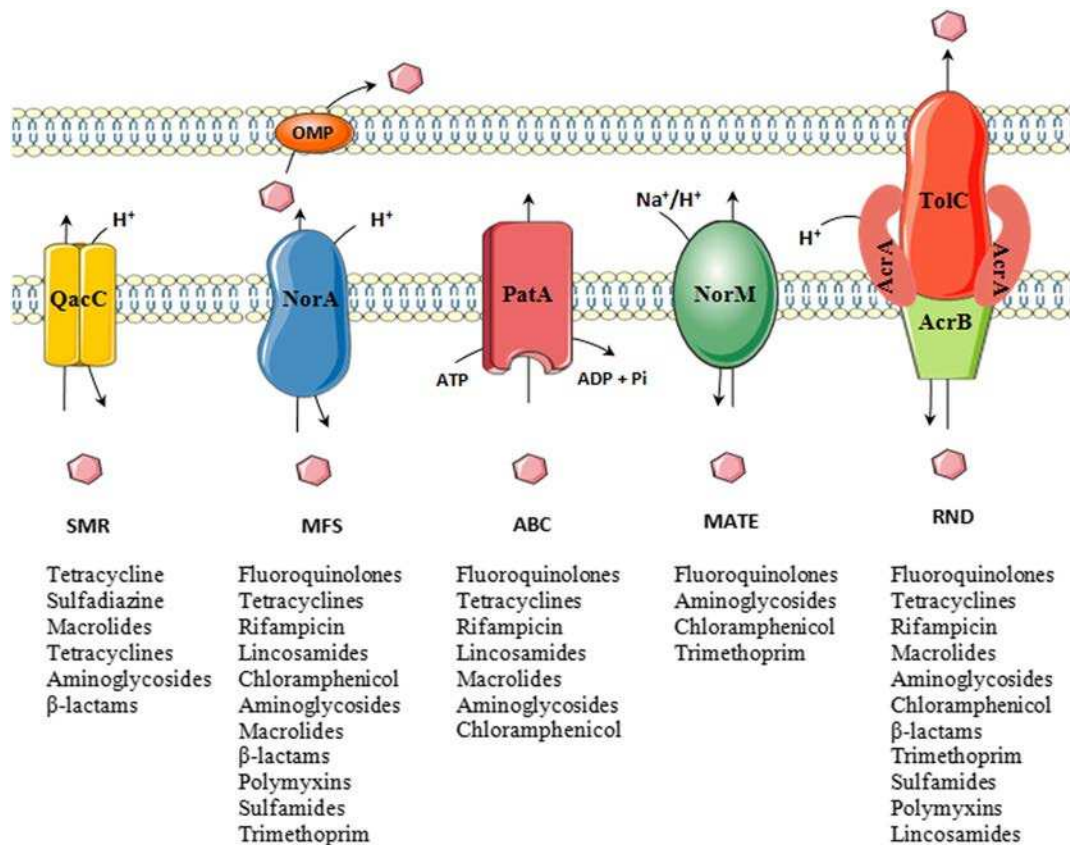


Figure 2. Principales familles de pompes à efflux avec leurs substrats antibiotiques connus.

Famille SMR « Small Multidrug Resistance » family, famille MFS « Major Facilitator Superfamily », Famille ABC « ATP-binding cassette », Famille MATE « Multidrug and Toxic compound Extrusion », Famille RND « Resistance-Nodulation-Division. OMP (outer membrane protein) : protéine de membrane externe. D'après Yilmaz et Özcengiz [19].

Chez les bactéries à Gram négatif, les pompes les plus fréquemment rencontrées sont de type RND comme AcrAB-TolC chez *E. coli* ou MexAB-OprM chez *P. aeruginosa* [21,22]. Ces pompes à efflux sont des systèmes tripartites composés d'un transporteur, d'une protéine périplasmique ou MFP (*Membrane Fusion Protein*) et d'une porine située dans la membrane externe ou OMF (*Outer Membrane Factor*). La surexpression de ces systèmes est à l'origine d'une résistance de bas niveau et croisée à différentes familles d'antibiotiques. Des mutations intervenant dans les gènes régulateurs impliqués dans l'expression des systèmes d'efflux peuvent entraîner leur surexpression. Chez *E. coli*, le système MarAB est impliqué dans l'expression de la pompe à efflux AcrAB-TolC. Des mutations du gène *marR* conduisent à la surexpression du gène *marA* participant lui-même à la régulation de l'expression du système d'efflux AcrAB-TolC [23].

Chez *K. pneumoniae*, AcrAB et OqxAB sont deux pompes d'efflux bien caractérisées qui contribuent à la multi-résistance [24]. Des mutations dans les répresseurs *acrR* et *oqxR*

peuvent être responsables de la surexpression de leur pompe respective [24,25]. Des systèmes appartenant à d'autres familles de pompes d'efflux ont également été décrits, comme KdeA (famille MATE), KmrA (famille MFS) et KpnEF (famille SMR) [26]. Cependant, l'annotation automatique de génomes par homologie de séquence révèle la présence de nombreuses protéines de transport et d'efflux hypothétiques encore non caractérisées [26].

c. Modification de la cible

La perte d'affinité des PLP pour les β -lactamines peut être due à des modifications qualitatives (mutations modifiant la conformation d'une PLP de forte affinité, acquisition de gènes entiers ou de fragments de gènes codant pour des PLP de faible affinité) ou quantitatives (mutations entraînant la diminution de production d'une PLP de forte affinité ou l'hyperproduction d'une PLP de faible affinité). Alors que ce mécanisme de résistance est prédominant chez les bactéries à Gram positif, il semble marginal chez les entérobactéries. Des souches de *Proteus mirabilis* résistantes à l'imipénème et au mécilinam ont ainsi été décrites par perte d'affinité de la PLP2 et diminution quantitative de la PLP1A [27]. Plus récemment, des mutations dans les séquences protéiques des PLP2 ont également été identifiées chez 2 isolats cliniques de *E. coli* de sensibilité diminuée à l'imipénème uniquement (Concentration Minimale Inhibitrice à 3 mg/L) en France [28].

d. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

C'est le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries. Les β -lactamases inactivent les β -lactamines par ouverture du cycle β -lactame au niveau de la liaison amide, conduisant à une perte de leur activité. Chez les entérobactéries, à l'exception de quelques espèces phénotypiquement sensibles à toutes les β -lactamines (*E. coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *P. mirabilis*), de nombreuses espèces sont naturellement résistantes aux aminopénicillines et aux céphalosporines de première génération par production de β -lactamases naturelles. Cette résistance est liée à la présence de gènes chromosomiques codant pour diverses β -lactamases dont la production est soit constitutive (ex : pénicillinase SHV chez *K. pneumoniae*), soit inductible par la présence d'un gène régulateur localisé en amont du gène codant pour la

β -lactamase (ex : céphalosporinase chez *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp.).

II. Les bêta-lactamases

La découverte des β -lactamases a suivi de peu l'utilisation des β -lactamines en thérapeutique. La première enzyme capable de dégrader la pénicilline a été identifiée chez « *Bacterium coli* » en 1940 [29]. Il s'agissait en réalité de la céphalosporinase chromosomique de *E. coli* [30]. Quelques années plus tard, des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la pénicilline par production d'une β -lactamase plasmidique ont été décrites. L'introduction dans les années 70-80 des céphalosporines à large spectre a donné lieu à l'émergence de nouvelles enzymes capables d'hydrolyser les céphalosporines de 3^e génération, les BLSE ou β -lactamases à spectre élargi dérivant des pénicillinases de type TEM et SHV par mutations, ainsi que les céphalosporinases acquises [31,32].

L'émergence de ces enzymes au sein des bactéries impliquées en pathologie humaine a favorisé l'utilisation des carbapénèmes, qui sont les seules β -lactamines restant actives. Malheureusement, de nouvelles enzymes avec un spectre toujours plus large ont été sélectionnées depuis le début des années 2000, les carbapénèmases, hydrolysant la quasi-totalité des β -lactamines [33]. Actuellement, la résistance aux β -lactamines à spectre large par ce type de mécanisme représente une menace pour le traitement des infections à bacilles à Gram négatif. Nous allons décrire, dans ce chapitre, les différents types de β -lactamases, leur spectre d'activité ainsi que leur distribution dans le monde bactérien.

1. Structure et classification

Actuellement, plus de 4200 séquences protéiques de β -lactamases sont disponibles dans les banques de données (www.blddb.eu) [34]. Les β -lactamases présentent une grande diversité de structure primaire et de propriétés catalytiques, ce qui a conduit à l'élaboration de plusieurs classifications, dont deux sont actuellement utilisées : la classification structurale de Ambler [35] et la classification fonctionnelle de Bush [36].

a. Classification de Ambler

Cette classification groupe les β -lactamases en quatre classes en fonction de leur homologie de séquence en acides aminés. Les β -lactamases de classe A, C et D sont des enzymes à sérine active, qui intervient dans le processus catalytique de l'enzyme. Elles possèdent toutes trois motifs conservés et partiellement dégénérés, également présents au niveau du site actif : motifs S-X-X-K, S-D-N et K-T-G. Les enzymes de classe B, quant à elles, sont des métallo- β -lactamases à zinc.

- **β -lactamases de classe A ou pénicillinases** : ces enzymes constituent le groupe le plus important ; elles hydrolysent préférentiellement les pénicillines (amoxicilline, ticarcilline, pipéracilline) et sont habituellement sensibles aux inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, tazobactam, sulbactam).

- **β -lactamases de classe B ou métallo- β -lactamases ou MBL** : elles possèdent un large spectre d'action incluant toutes les β -lactamines (les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes) à l'exception de l'aztréonam. Leur activité nécessite la présence d'un ou plusieurs ions Zn^{2+} au niveau de leur site actif. Elles sont résistantes à l'inhibition par l'acide clavulanique, mais sont inhibées par des agents chélateurs d'ions divalents tels que l'EDTA (Acide éthylène diamine tétra-acétique) [37].

- **β -lactamases de classe C ou céphalosporinases ou AmpC** : leur spectre comprend les aminopénicillines, les céphalosporines de première génération (C1G) et, pour certaines, les céphalosporines de deuxième génération (C2G). Les carboxypénicillines, uréidopénicillines et céphalosporines de troisième génération (C3G) sont hydrolysées en cas d'hyperproduction de l'enzyme. Les céphalosporines de quatrième génération (céfépime et cefpirome) (C4G) et les carbapénèmes sont très peu hydrolysés. *In vitro*, l'activité des céphalosporinases est inhibée par l'ajout de cloxacilline dans le milieu de culture. Les céphalosporinases résistent aux inhibiteurs de β -lactamases classiques (clavulanate et tazobactam) mais sont sensibles aux inhibiteurs nouvellement commercialisés tels que l'avibactam.

- **β -lactamases de classe D ou oxacillinases** : Il s'agit d'une classe très hétérogène d'un point de vue structure et spectre d'hydrolyse [38]. Ces enzymes se caractérisaient initialement par une hydrolyse plus rapide de l'oxacilline que de la benzylpénicilline, mais cette définition a évolué face à la très grande variété des enzymes appartenant à cette classe. Certaines ont un spectre étroit incluant les pénicillines et les C1G, d'autres un spectre élargi aux C2G, C3G et C4G, voire même aux carbapénèmes. Elles ne sont généralement pas sensibles au clavulanate, au tazobactam et au sulbactam, mais leur activité peut être inhibée *in vitro* par le chlorure de sodium [38].

b. Classification de Bush et Jacoby

Les versions successives de la classification fonctionnelle des β -lactamases publiées en 1989 [39] et 1995 [40] ont été réactualisées en 2010 par K. Bush et G. Jacoby [36]. Cette classification prend en compte le profil de substrats et celui d'inhibition.

Cette classification distingue 3 sous-groupes (Tableau 1) :

- groupe 1 : correspond aux céphalosporinases de la classe C de Ambler
- groupe 2 : regroupe les classes A et D de Ambler. Ce groupe est subdivisé en sous-groupes de 2a à 2f, basé sur le spectre d'hydrolyse des différentes enzymes
- groupe 3 : correspondent à la classe B de Ambler. Deux sous-groupes (3a et 3b) peuvent être individualisés sur la base de données structurales, d'affinité pour l'ion Zn^{2+} et de caractéristiques hydrolytiques.

Groupe selon Bush-Jacoby (2009)	Groupe selon Bush, Jacoby, Medeiros (1995)	Groupe selon Ambler	Substrat préférentiel	Inhibiteur		Caractéristiques fonctionnelles	Exemples
				CLA TZB	EDTA		
1	1	C	Céphalosporines	Non	Non	Hydrolyse plus élevée des céphalosporines que de la benzylpénicilline et hydrolyse des céphamycines	E. coli AmpC, ACT-1, CMY-2
1e	Non inclus	C	Céphalosporines	Non	Non	Augmentation de l'hydrolyse de la ceftazidime et le plus souvent des autres oxyimino- β -lactamines	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Pénicillines	Oui	Non	Hydrolyse plus élevée de la benzylpénicilline que des céphalosporines	PC1
2b	2b	A	Pénicillines, Céphalosporines	Oui	Non	Même niveau d'hydrolyse de la benzylpénicilline que des céphalosporines	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Céphalosporines à spectre large, monobactams	Oui	Non	Augmentation de l'hydrolyse des oxyimino- β -lactamines (céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, céfépime et aztréonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Pénicillines	Non	Non	Résistance à l'acide clavulanique et au tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	Non inclus	A	Céphalosporines à spectre large, monobactams	Non	Non	Augmentation de l'hydrolyse des oxyimino- β -lactamines associée à une résistance à l'acide clavulanique et au tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbénicilline	Oui	Non	Augmentation de l'hydrolyse de la carbénicilline	PSE-1, CARB-3
2ce	Non inclus	A	Carbénicilline, céfépime	Oui	Non	Augmentation de l'hydrolyse de la carbénicilline, du céfépime et du ceftiprome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilline	Variable	Non	Augmentation de l'hydrolyse de la cloxacilline et de l'oxacilline	OXA-1, OXA-10
2de	Non inclus	D	Céphalosporines à spectre large	Variable	Non	Hydrolyse de la cloxacilline, de l'oxacilline et des oxyimino- β -lactamines	OXA-11, OXA-15
2df	Non inclus	D	Carbapénèmes	Variable	Non	Hydrolyse de la cloxacilline, de l'oxacilline et des carbapénèmes	OXA-23, OXA-48
2e	2 ^e	A	Céphalosporines à spectre large	Oui	Non	Hydrolyse des céphalosporines, inhibition par l'acide clavulanique mais pas pour l'aztréonam	CepA
2f	2f	A	Carbapénèmes	Variable	Non	Augmentation de l'hydrolyse des carbapénèmes, des oxyimino- β -lactamines et des céphamycines	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B	Carbapénèmes	Non	Oui	Hydrolyse de toutes les β -lactamines, carbapénèmes inclus mais pas des monobactams	IMP-1, VIM-1, IND-1
3b	3	B	Carbapénèmes	Non	Oui	Hydrolyse préférentielle des carbapénèmes	CphA, Sfh-1
Non inclus	4	inconnu					

Tableau 1. Classification des β -lactamases
CLA : acide clavulanique, TZB : tazobactam. D'après Bush *et al.* [36]

2. Mécanisme d'action

Le processus enzymatique repose sur un résidu sérine pour les enzymes de classe A, C et D ou sur un ou plusieurs ion(s) Zn^{2+} pour les métallo-enzymes. Dans tous les cas, l'inactivation de la β -lactamine se fait par l'ouverture de son cycle β -lactame au niveau de la liaison amide, selon une réaction d'hydrolyse (Figure 3).

Dans le cas des enzymes à sérine active, le résidu S70 est impliqué dans l'attaque nucléophile du substrat conduisant à l'ouverture du cycle β -lactame. Ce mécanisme fait habituellement intervenir deux molécules d'eau localisées au niveau du site actif de l'enzyme et se déroule en trois phases (Figure 3) :

- Liaison réversible non covalente entre la β -lactamine et la β -lactamase ;
- Rupture du noyau β -lactame par acétylation covalente avec la sérine du site actif (formation d'un complexe acyl-enzyme intermédiaire avec la β -lactamine) ;
- Intervention d'une molécule d'eau permettant l'hydrolyse de l'acyl-enzyme pour réactiver la β -lactamase et libérer la molécule d'antibiotique inactivée.

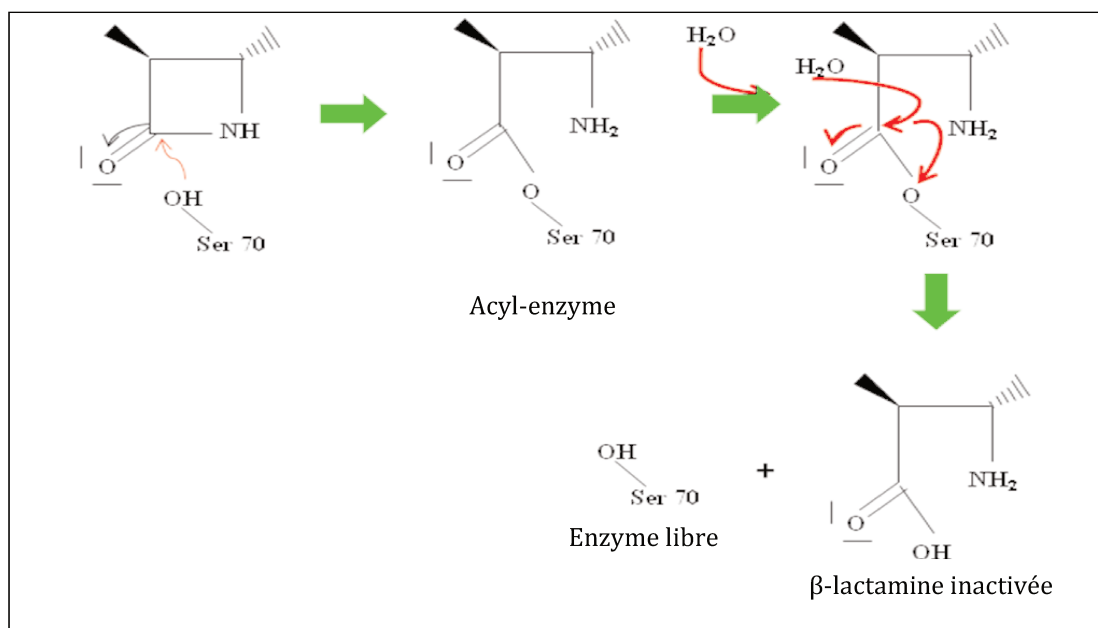


Figure 3. Mécanisme d'action simplifié des β -lactamases à sérine active.

Trois motifs conservés, et partiellement dégénérés, ont été mis en évidence chez les β -lactamases à sérine active. Ces motifs sont présents au niveau du site actif et interviennent de façon directe ou indirecte dans l'activité catalytique (Tableau 2). Ces

résidus sont également présents dans les modules liant la pénicilline des DD-peptidases à sérine [41].

Enzyme	Éléments		
	1	2	3
β-lactamases			
Classe A	SXXX	SDN	(K/R)(S/T)G
Classe C	SXXX	YAN	KTG
Classe D	STFK	SXV	K(T/S)G
DD-peptidase	S(T/S)FK	(Y/S)X(N/C)	(H/K)(T/S)G

Tableau 2. Éléments conservés dans les sites actifs des enzymes à sérine active (**S**).

3. BLSE

a. Définitions

Le terme β-lactamases à spectre étendu (BLSE) a été initialement utilisé pour définir une β-lactamase, dont le spectre d'hydrolyse a été étendu suite à l'introduction d'une ou plusieurs substitution(s) dans sa séquence protéique [31]. Deux types de BLSE sont à distinguer. Le premier type appartient au groupe 2be de la classification de Bush et Jacoby et à la classe A de Ambler, tandis que le deuxième type appartient à la classe D, correspondant aux oxacillinases dont le spectre est également étendu aux C3G et/ou C4G.

La définition actuelle des β-lactamases à spectre étendu est restreint aux β-lactamases de classe A et appartenant au groupe fonctionnel 2be, capables d'hydrolyser au moins un représentant des oxyimino-céphalosporines (tels que le cefotaxime, la ceftazidime), l'oxyimino-monobactam (l'aztréonam) et inhibées par l'acide clavulanique [36].

Par ailleurs, il convient de différencier des BLSE, les céphalosporinases ou AmpC qui se distinguent par leur capacité à hydrolyser les céphamycines (céfoxitine), et leur très faible capacité à hydrolyser les C4G et leur résistance aux inhibiteurs de β-lactamase classiques.

b. Généralités

La première BLSE a été identifiée en 1983 chez deux souches cliniques de *K. pneumoniae* et *Serratia marcescens* [42]. Il s'agissait de SHV-2, dérivant de la pénicillinase à spectre étroit SHV-1.

Depuis, plusieurs familles de BLSE ont été identifiées dans les bacilles Gram négatifs incluant trois familles majeures (type TEM, SHV et CTX-M) et des BLSE plus rarement identifiées dites mineures [36].

c. Les BLSE « majeures » : TEM, SHV et CTX-M

Les premières BLSE identifiées étaient des enzymes qui dérivait des pénicillinases de type TEM et SHV isolées classiquement chez *E. coli* et *K. pneumoniae* respectivement [43]. Ces enzymes alors non-BLSE ont évolué au cours des années 1980 grâce à des mutations spécifiques qui ont contribué à élargir la poche catalytique des β -lactamases [44]. Les BLSE type TEM et SHV étaient portées par des plasmides transférables entre de nombreuses espèces d'entérobactéries, mais étaient principalement présentes chez *K. pneumoniae* et *E. coli*.

Les enzymes de la famille des CTX-M (pour Cefotaximase-Munich) ont été décrites pour la première fois en 1989 en Allemagne, et ont supplanté les enzymes type TEM et SHV dès le début des années 2000 [43]. Une étude française multicentrique a récemment caractérisé la diversité enzymatique chez 200 isolats d'entérobactéries productrices de BLSE [45]. Uniquement des BLSE dites « majeures » ont été retrouvées et plus de 80% étaient de type CTX-M.

Au sein des CTX-M, six groupes, dont les séquences protéiques des enzymes diffèrent de plus de 10%, sont actuellement reconnus : CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 et KLUC. Cependant, ces groupes partagent des caractéristiques communes :

- les gènes *bla* codant ces enzymes proviennent de différentes espèces du genre *Kluyvera*, entérobactérie rarement impliquée en pathologie humaine.
- Les enzymes de type CTX-M hydrolysent préférentiellement le céfotaxime en comparaison à la ceftazidime, à l'inverse des enzymes de type TEM et SHV.

Grâce à leur présence sur un grand nombre de plasmides de différents groupes d'incompatibilité, les CTX-M sont devenues en quelques années les BLSE les plus répandues sur l'ensemble des régions du globe. L'enzyme la plus fréquemment

rencontrée en pathologie humaine est CTX-M-15 (groupe CTX-M-1), suivie de CTX-M-14 (groupe CTX-M-9) [45].

Cette diffusion des CTX-M est particulièrement préoccupante car elle ne concerne plus seulement les bactéries classiquement responsables d'infections nosocomiales. En France, une étude récente menée chez des enfants non hospitalisés a montré que le taux de portage d'entérobactéries productrices de BLSE a doublé sur les 5 dernières années passant de 4,8% en 2010 à 10,2% en 2015 [46].

Alors que dans les années 1990 les BLSE étaient principalement produites par des *K. pneumoniae*, nous assistons à une augmentation des cas au sein de l'espèce *E. coli*, considéré à la fois comme un commensal du microbiote humain mais également comme un pathogène communautaire majeur. Une étude menée à l'AP-HP indique qu'en 1997, 40% des souches productrices de BLSE étaient des *K. pneumoniae* et 20% des *E. coli*, alors qu'en 2005 cette proportion s'est inversée avec 50% de *E. coli* et 20% de *K. pneumoniae* [47]. Une étude a estimé à plus d'un milliard et demi le nombre d'individus colonisés sur Terre [48]. Cette diffusion semble liée à la fois au succès des éléments génétiques mobiles portant *bla*_{CTX-M} mais également au succès de certains clones capables de créer de véritables épidémies et de diffuser mondialement, comme le clone de *E. coli* ST-131 [49]. Ainsi, une étude portant sur le portage chez les enfants indique que la prévalence de ce clone est passée de 5% en 2010 à 37% en 2015 [46].

d. Les BLSE « mineures »

D'autres BLSE sont distribuées plus fréquemment chez *P. aeruginosa* et dans une bien moindre mesure chez *Acinetobacter* mais restent plus rarement identifiées chez les entérobactéries. Il s'agit principalement des enzymes GES, PER et VEB.

- les BLSE de type GES : le gène *bla*_{GES-1} (pour Guiana Extended-Spectrum β -lactamase) a été identifié dans un isolat clinique de *K. pneumoniae* en France d'un patient originaire de Guyane française [50]. Au sein de la famille des β -lactamases de type GES, les profils de substrat diffèrent. Certains variants tels que GES-1, GES-3 et GES-7 possèdent un profil de type BLSE de classe A, mais épargnent l'aztréonam. Certains variants ont un profil hydrolytique étendu aux carbapénèmes (GES-2 et GES-8) ou aux carbapénèmes et céphamycines (GES-4, -5, -6).

- Les BLSE de type PER (pour Pseudomonas Extended Resistance) ont été identifiées pour la première fois dans un isolat de *P. aeruginosa* d'un patient turc [51]. Douze variants ponctuels de PER ont été décrits incluant un groupe (PER-2 et PER-6) qui ne partage que 85% d'identité de séquence en acides aminés en comparaison avec PER-1.
- Les BLSE de type VEB-1 (pour Vietnamese Extended-spectrum β -lactamase) ont été caractérisées pour la première fois en 1999, dans une souche de *E. coli* isolée d'un patient du Vietnam et transféré à l'hôpital Antoine Bécère (Clamart) [52].
- les SFO-1 (*Serratia fonticola*) [53], BES-1 (Brazilian extended-spectrum β -lactamase) [54], BEL-1 (Belgium extended-spectrum β -lactamase) [55] et TLA-1 (Tlahuicas, tribu indienne) [56] sont rarement isolées à ce jour.

4. Les céphalosporinases

a. Distribution

Un grand nombre de bactéries possèdent naturellement dans leur génome un gène codant pour une céphalosporinase appelé *ampC*. Il s'agit des principalement des entérobactéries du groupe III (*Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., *Providencia* spp.) mais également des membres du phylum des Actinobacteria (*Mycobacterium smegmatis*), ou de l'ordre des Pseudomonadales au sein des Gammaproteobacteria (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*...) [30]

Parallèlement, au début des années 1990, sont apparues des souches produisant une AmpC chez des espèces dépourvues de céphalosporinases naturelles telles que *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Salmonella* spp. Le support de l'AmpC est alors plasmidique (pAmpC) [57].

b. Classification et nomenclature des pAmpC

Ces enzymes sont classées en six groupes sur la base de leur identité protéique avec les céphalosporinases chromosomiques de certaines espèces bactériennes :

- le groupe *Citrobacter freundii* qui comprend de nombreuses enzymes, comme CMY-2 à 7, CMY-12 à 18, CMY-21 à 23, LAT-1 et BIL-1. Au sein de ce groupe, l'enzyme CMY-2 qui est la pAmpC la plus répandue dans le monde.

- le groupe *Aeromonas* qui est subdivisé en deux sous-groupes, celui des enzymes de type FOX et celui qui comprend MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 à 11 et CMY-19.
- le groupe *Enterobacter* qui comprend les enzymes ACT-1 et MIR-1
- le groupe *Morganella morganii* qui comprend les enzymes de type DHA
- le groupe *Hafnia alvei* qui comprend les enzymes de type ACC.

La nomenclature des AmpC fait référence [32]:

- à la résistance conférée vis-à-vis de certains substrats : aux céphamycines (CMY), à la céfoxitine (FOX), au moxalactam (MOX), au latamoxef (LAT)
- à la classe de la β -lactamase : AmpC-type (ACT), Ambler Class C (ACC)
- au lieu de découverte : Hôpital de Miriam aux Etats-Unis (MIR-1), Hôpital de Dhahran en Arabie Saoudite (DHA)
- au nom du patient chez qui la souche a été isolée : Bilal (BIL-1)

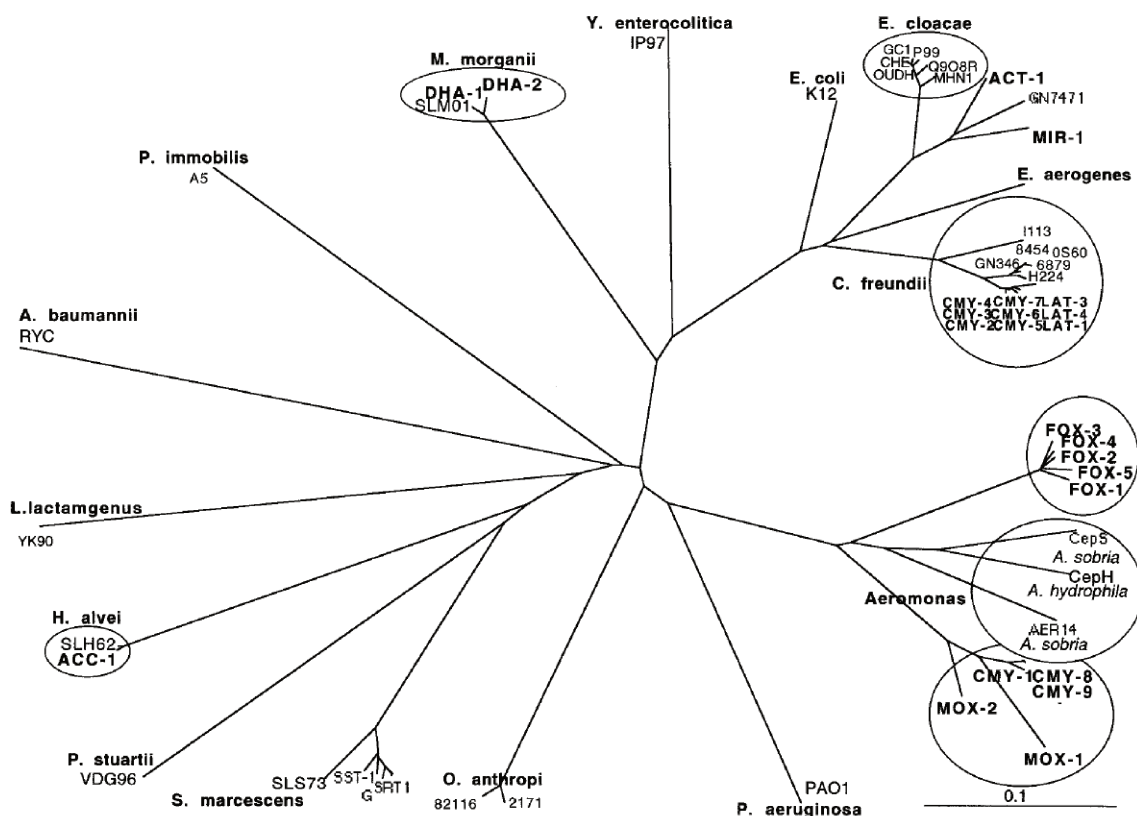


Figure 4. Dendrogramme des AmpC chromosomiques et plasmidique

Réalisé par ClustalX (Méthode *Neighbor-joining*). La longueur des branches est proportionnelle au nombre d'acides aminés de différence. D'après Philippon *et al.* [32].

c. Propriétés enzymatiques

Les céphalosporinases sont actives envers les pénicillines G et les aminopénicillines, mais hydrolysent préférentiellement les céphalosporines y compris les céphamycines comme la céfoxitine à la différence des BLSE. Malgré une forte affinité pour des substrats tels que les oxyimino-céphalosporines et les monobactames, l'hydrolyse de ces molécules est faible en raison d'une faible vitesse de déacylation (V_{max}).

Certaines céphalosporinases se distinguent par leur capacité à hydrolyser l'imipénème et sont parfois considérées comme de réelles carbapénèmases de classe C [58] (Tableau 3, Tableau 4). Il s'agit de ACT-1, CMY-2, CMY-10 retrouvées sur des plasmides chez les entérobactéries et ADC-68, une céphalosporinase chromosomique de *A. baumannii*. CMY-10 et ADC-68 sont les enzymes qui possèdent la meilleure efficacité catalytique vis à vis de l'imipénème (Tableau 4) [59–61].

Vecteur	TOP10(pACT-1)	TOP10(pCMY-2)	TOP10(pADC-68)	TOP10
	pTOPO	pTOPO	pHSG398	pTOPO
Amoxicilline	ND	ND	256	8
Pipéracilline	ND	ND	128	ND
Céfalotine	ND	ND	256	8
Cefoxitine	512	128	ND	ND
Cefuroxime	512	128	ND	ND
Cefotaxime	64	128	32	0,06
Ceftazidime	128	256	16	0,12
Céfépime	0,25	1	ND	ND
Imipénème	0,25	0,5	8	0,25
Meropénème	0,016	0,064	4	0,06
Ertapénème	0,032	0,064	16	0,01
Référence	[59]	[59]	[60]	[62]

Tableau 3. CMI des transformants *E. coli* TOP10 après clonage des gènes *bla_{ACT-1}* et *bla_{CMY-2}* dans pTOPO et *bla_{ADC-68}* dans pHSG398.

ND = non déterminé

	Km (μM)				<i>k</i> _{cat} (s ⁻¹)				<i>k</i> _{cat} /Km (mM.s ⁻¹)			
	ACT-1	CMY-2	CMY-10	ADC-68	ACT-1	CMY-2	CMY-10	ADC-68	ACT-1	CMY-2	CMY-10	ADC-68
Benzyl-pénicilline	ND	ND	20,5±1,2	23,5±0,2	ND	ND	3,06 ±0,24	85,4 ±0,4	ND	ND	140±10	3630 ± 30
Céphaloridine	420±30	125 ±30	ND	ND	481+/- 18	412 ±25	ND	ND	1145	3300	ND	ND
Céfalotine	ND	ND	ND	21,5±0,2	ND	ND	ND	65,8± 1,5	ND	ND	ND	3060 ± 30
Ceftazidime	ND	ND	33,9±3,2	ND	ND	ND	5,0 ± 0,04	ND	ND	ND	150±10	ND
Imipénème	3 ± 1	1 ± 0,5	11,4 ±0,7	0,83 ±0,004	0,02 ±0,005	0,04 ±0,01	1,6 ± 0,1	0,14 ±0,002	7	40	140 ±10	170 ± 1
Référence	[58]	[58]	[60]	[59]	[58]	[58]	[60]	[59]	[58]	[58]	[60]	[59]

Tableau 4. Propriétés enzymatiques des céphalosporinases ayant une activité carbapénèmase détectable.

ND = non déterminé

d. Régulation des cAmpC

Chez les entérobactéries du groupe III, la production de l'AmpC chromosomique est induite en présence de β -lactamines [63]. Certaines molécules sont capables d'induire plus fortement l'expression du gène *ampC*, il s'agit de la ceftioxime, l'imipénème et l'acide clavulanique [63].

Ce mécanisme d'induction est complexe et fait intervenir plusieurs partenaires cellulaires, dont les principaux sont AmpR, AmpD et AmpG [64].

- *ampR* code pour une protéine qui joue le rôle de régulateur de transcription de AmpC. AmpR est un régulateur transcriptionnel de type LysR, il active l'expression d'AmpC en présence de β -lactamines, mais se comporte comme un répresseur de l'expression d'AmpC en l'absence de β -lactamines. AmpR se fixe au niveau du site opérateur localisé dans le motif LysR situé en amont du gène *ampC*. La régulation de l'expression d'AmpC via AmpR est également dépendante du métabolisme du peptidoglycane [64]. En effet, un des précurseurs du peptidoglycane (l'UDP-MurNAc-pentapeptide) diminue la capacité de la protéine AmpR à activer l'expression d'AmpC, alors que les produits de dégradation du peptidoglycane (1,6-anhydromuropeptides) ont l'effet inverse.
- *ampD* code pour une protéine cytosolique qui agit comme répresseur de l'expression d'AmpC. La protéine AmpD est une N-acétylmuramyl-L-alanine amidase qui contribue au métabolisme du peptidoglycane. En particulier, AmpD reconnaît et détruit spécifiquement les 1,6-anhydromuropeptides qui sont des activateurs de l'expression d'AmpC.
- AmpG est une protéine transmembranaire de 53 kDa qui joue le rôle de perméase localisée au niveau de la membrane interne pour le transport des fragments de dégradation du peptidoglycane.

Trois scenarios peuvent se produire :

1. En l'absence d'inducteur :

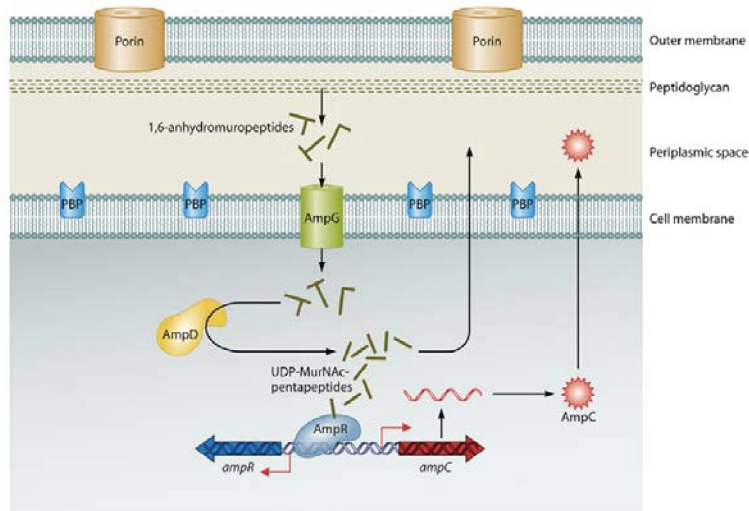


Figure 5. Mécanismes impliqués dans la régulation du gène *bla_{ampC}* - Expression d'AmpC dans une souche sauvage, sans inducteur.

Le peptidoglycane est en perpétuel remaniement, des fragments de muuropeptides (1,6-anhydromuropeptides) sont générés dans l'espace périplasmique et sont transportés dans le cytoplasme par la perméase AmpG. Ils sont alors clivés par AmpD pour générer des fragments d'UDP-MurNac-pentapeptides capables d'être réintégrés lors de la formation du peptidoglycane. Ces UDP-pentapeptides forment également un complexe avec AmpR fixé sur la région intergénique entre *ampR* et *ampC*, pour réprimer la transcription d'*ampC*. D'après Lister *et al.* [64].

2. En présence d'inducteur :

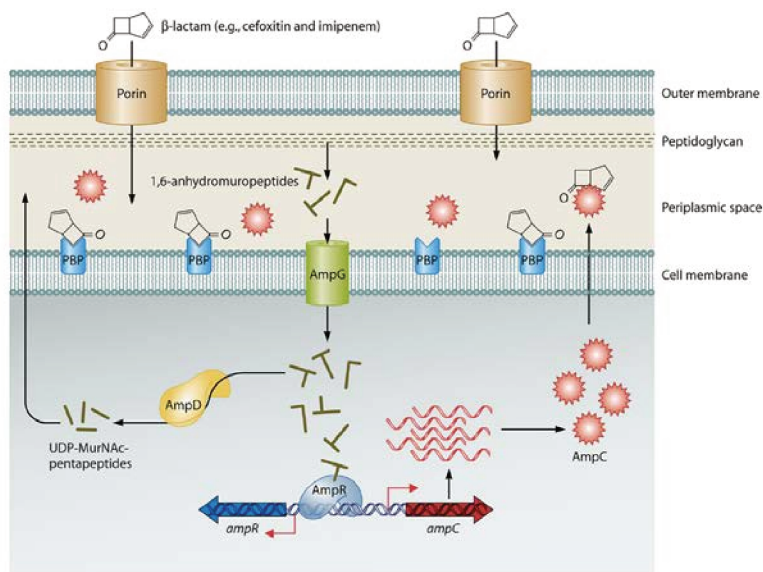


Figure 6. Mécanismes impliqués dans la régulation du gène *bla_{ampC}* - Induction par les β -lactamines (céfoxitine, imipénème, acide clavulanique).

On observe une accumulation de muuropeptides dans le cytoplasme qui surchargent l'activité de AmpD, qui n'est plus capable de dégrader l'ensemble des muuropeptides. Les peptides sont alors capables de déplacer les fragment d'UDP-pentapeptides d'AmpR pour s'y fixer, permettant à AmpR d'agir comme un activateur de transcription d'*ampC*. D'après Lister *et al.* [64]

3. Le phénomène de « dérégulation » d'AmpC :

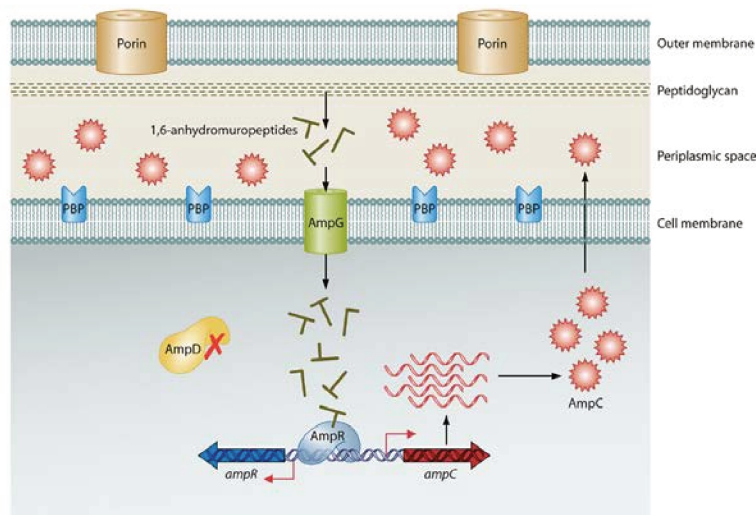


Figure 7. Mécanismes impliqués dans la régulation du gène *bla_{ampC}* – phénomène de dérégulation.

Des mutations sur chacun des acteurs de la cascade de régulation peuvent survenir et conduire à une forte production d'AmpC, même en l'absence de β -lactamine inductrice. Les plus fréquentes sont les mutations modifiant l'activité qualitative ou quantitative de l'amidase AmpD. AmpD moins active conduit à l'accumulation dans le cytoplasme de fragments de muuropeptides inducteurs, ce qui maintient AmpR en conformation d'activateur transcriptionnel. Les mutations dans le régulateur *ampR* sont moins fréquentes. D'après Lister *et al.* [64].

Une fois apparues, les mutations conférant une résistance aux C3G et à l'aztréonam sont stables. On considère que 30 à 40% des isolats de *Enterobacter cloacae* complex sont actuellement résistants aux C3G sur l'ensemble de la planète [63].

D'autres partenaires impliqués dans la régulation d'*ampC* ont récemment été identifiés chez les bactéries appartenant au complexe *E. cloacae* (ECC). Il s'agit de deux PLP : DacB et AmpH [63].

- DacB (ou PLP4) : une souche de *E. cloacae* au phénotype sauvage pour les β -lactamines et dont le gène *dacB* a été inactivé (*ECL Δ dacB*) présente des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) élevées pour les C3G, sans que le niveau d'expression d'*ampC* ne soit augmenté [63]. Des phénomènes de régulation post-transcriptionnelle modifiant la stabilité du transcrit d'*ampC* pourraient

expliquer l'augmentation de l'activité de la β -lactamase sans modification de la transcription.

- AmpH : chez *E. cloacae*, son rôle dans la régulation du gène *bla_{ampC}* est mineur et intervient principalement en présence de molécules inductrices comme la céfoxitine, grâce à une affinité supérieure pour cet antibiotique que pour le peptidoglycane.

e. Régulation des pAmpC

Lorsqu'elles sont présentes sur des plasmides, les pAmpC confèrent à la bactérie qui héberge le plasmide un phénotype de résistance équivalent au phénomène de dérégulation observé chez les Enterobactéries du groupe III, c'est à dire une résistance qui touche les C3G, les carboxy- et uréido-pénicillines, mais épargnant les C4G et les carbapénèmes [30,65]. Cette forte expression des pAmpC est due à la présence de multiples copies du plasmide portant le gène de résistance, ainsi qu'à la présence de promoteurs forts souvent apportés par des séquences d'insertion présentes en amont du gène *ampC* [30].

Certaines pAmpC comme DHA-1, DHA-2, ACT-1 et CMY-13 sont inductibles en raison de la présence du gène *ampR* en amont du gène *ampC*. Il est alors possible d'observer sur l'antibiogramme des images d'antagonisme entre les oxyimino-céphalosporines et des molécules inductrices comme la céfoxitine, l'acide clavulanique, ou l'imipénème.

f. Environnement génétique

i. pAmpC

Plusieurs éléments génétiques mobiles ont été associés à la mobilisation des gènes *bla_{ampC}* sur des plasmides, notamment les séquences d'insertion (IS). La séquence d'insertion *ISEcp1* est présente en amont de plusieurs allèles CMY (dont CMY-2) et ACC-1. Cette IS apporte une séquence promotrice permettant une forte expression du gène. Cela a été démontré notamment dans le cas du gène *bla_{CMY-7}*, dont la transcription commence au sein de l'*ISEcp1*, à un niveau bien supérieur à son équivalent chromosomique chez *C. freundii* [65]. Dans le cas du gène *bla_{ACC-1}*, *ISEcp1* est le plus souvent tronquée suite à l'insertion d'une IS26. La présence d'une 2^e copie de l'IS26 en aval, et de séquences directes répétées indiquent qu'un évènement de transposition s'est produit [66].

Le gène *bla*_{CMY-10} a été décrit en aval d'un intégron de classe I porté par un plasmide conjugatif [67]. Entre l'intégron et le gène *bla*_{CMY-10}, une copie de *ISCR1* est présente [67]. Cette IS a été décrite comme impliquée dans la mobilisation d'autres céphalosporinases comme les gènes *bla*_{CMY-9}, *bla*_{DHA-1}, et *bla*_{MOX-1} [68]. Ces séquences d'insertion particulières apportent également des séquences promotrices.

Dans le cas de CMY-13, deux copies d'IS26 sont présentes de part et d'autre d'un fragment de 4,252 bp comportant *bla*_{CMY-13} et *ampR*, mais l'absence de répétitions directes communes indique que cette structure a peut-être été acquise *via* un événement de recombinaison entre deux IS26 [69].

ii. cAmpC

L'environnement génétique des *ampC* chromosomiques diffère selon l'espèce. En aval du gène *ampC* chromosomique, les gènes *blc* et *sugE* sont présents chez les bactéries du genre *Citrobacter* et *Enterobacter*. Ces gènes sont fréquemment mobilisés sur les plasmides en même temps que le gène *ampC* [32] (Figure 8).

La longueur de la région intergénique entre *ampR* et *ampC* diffère selon l'espèce bactérienne (Figure 8). Chez *E. coli* où *ampR* est absent, des insertions nucléotidiques en amont d'*ampC* peuvent conduire à la création d'un nouveau promoteur permettant une forte expression du gène [70]. Des mutations dans les séquences promotrice ou atténuatrice ont également été associées à des modifications d'expression d'*ampC*. En apportant des séquences promotrices, l'insertion d'IS en amont d'*ampC* chez *E. coli* est également responsable d'une forte expression de la céphalosporinase [71,72]. L'antibiogramme de ces souches est alors similaire à celui observé lors du phénomène de dérépression d'une entérobactérie du groupe III [30].

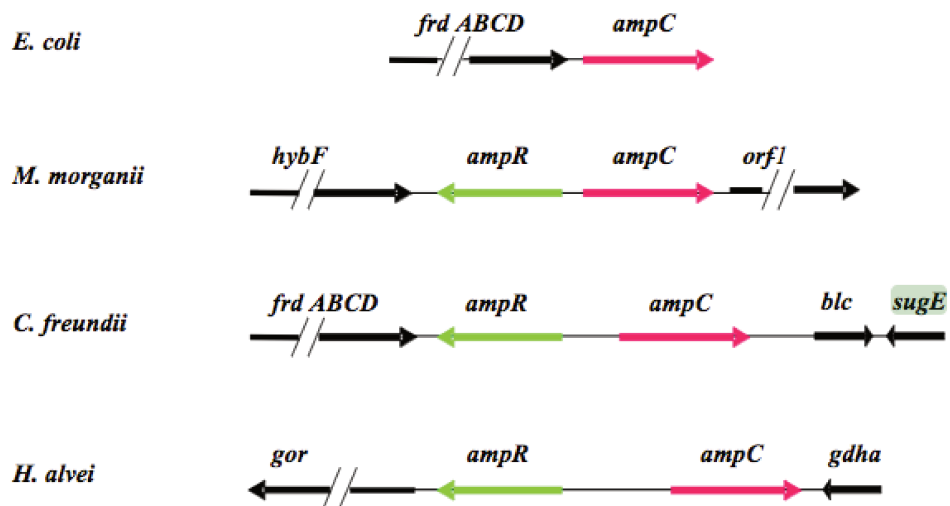


Figure 8. Organisation génétique des céphalosporinases chromosomiques.

La longueur de la région intergénique entre *ampR* et *ampC* diffère selon l'espèce bactérienne. *C. freundii* et *E. cloacae* présentent la même organisation génétique. D'après C. Verdet (<http://www.microbes-edu.org/mecanisme/conference/verdet2.pdf>).

B. Les carbapénèmases

Les carbapénèmases sont des β -lactamases caractérisées par leur capacité à hydrolyser les molécules de la famille des carbapénèmes mais leur spectre d'activité très large conduit, le plus souvent, à une dégradation de toutes les molécules de la famille des β -lactamines. Il existe des carbapénèmases appartenant principalement aux classes A, B et D de Ambler [73] et leurs déterminants génétiques peuvent être localisés soit sur le chromosome bactérien, soit sur des plasmides.

I. Historique

Jusqu'au début des années 1990, seules les carbapénèmases chromosomiques naturelles de classe B de certaines espèces comme *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp., *Bacillus cereus* et *Bacteroides fragilis* étaient identifiées [74]. La description des carbapénèmases acquises restait anecdotique. Les premières carbapénèmases de classe A chromosomiques identifiées furent SME-1 et NMC-A isolées respectivement d'une souche de *S. marcescens* en 1982 à Londres [75], et de *E. cloacae* en 1990 en France [76]. La première carbapénèmase de classe B, IMP-1, a été décrite en 1991 dans une souche de *S. marcescens* au Japon [77]. A cette époque, la majorité des métallob- β -lactamases étaient découvertes dans des souches de *Pseudomonas* spp. mais beaucoup plus rarement à partir d'entérobactéries [78]. C'est au début des années 2000 que l'émergence de nouvelles carbapénèmases acquises s'est accrue. Les carbapénèmases plasmidiques de classe A, GES et KPC, ainsi que les métallob- β -lactamases de type VIM et NDM ont par exemple diffusé dans de nombreuses espèces d'entérobactéries et sont actuellement décrites dans de nombreuses régions du monde [79].

II. Carbapénèmases de classe A

Les carbapénèmases de classe A appartiennent au groupe 2f de la classification de Bush, ont un spectre d'hydrolyse large incluant les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes et sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam.

1. Carbapénèmases de type GES

a. Epidémiologie et spectre d'hydrolyse

Un an après la découverte de GES-1, BLSE sans activité carbapénèmase, GES-2 a été identifiée en 2002 dans une souche de *P. aeruginosa* en Afrique du Sud [80]. GES-1 et GES-2 diffèrent par la substitution d'un seul acide aminé au niveau du site actif, en position 170 (Gly170Asp). Ce fut le premier cas décrit d'extension du spectre d'une β -lactamase aux carbapénèmes par mutation ponctuelle.

Actuellement, 37 variants de la β -lactamase GES ont été identifiés dont 11 possèdent une activité hydrolytique vis-à-vis de l'imipénème. Il s'agit des variants : GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-14, GES-18, GES-20, GES-21 et GES-24 (www.bldb.eu). Tous ces variants sont mutés en position 170 (Gly170Asp ou Gly170Ser). Le variant GES-13 possède lui aussi la mutation 170(Gly170Asp) mais une autre mutation à la position 104 (Glu104Lys) semble réduire la capacité de cette enzyme à hydrolyser l'imipénème [81]. Le variant GES-11, décrit chez *A. baumannii*, confère également une diminution de sensibilité vis-à-vis des carbapénèmes [82]. En revanche, il conserve une glycine en position 170 alors qu'une alanine est trouvée en position 243 à la place d'une glycine. La position 243 est impliquée dans l'extension du spectre vis-à-vis de l'aztréonam comme décrit avec GES-9 (Gly243Ser) [55]. Le variant GES-14, quant à lui, possède la double mutation Gly170Ser et Gly243Ala. Ce fut le premier variant hydrolysant l'intégralité des β -lactamines [83].

Les carbapénèmases de type GES ont été décrites dans différentes espèces d'entérobactéries (*E. coli*, *K. pneumoniae*) [84–86], mais aussi chez *P. aeruginosa* [80,87,88], et *A. baumannii* [82,83,89]. Elles ont été identifiées ponctuellement au Japon, en Corée du Sud, en Chine, en Afrique du Sud, en Amérique du Sud, en Espagne, au Portugal, en Grèce et en Belgique [84,87,89–96]. La plupart des souches productrices des enzymes de type GES ont été rapportées sporadiquement, mais des épidémies ont également été décrites (épidémies de souches de *P. aeruginosa* GES-2 en Afrique du Sud [92], et GES-5 au Japon [97], ou de souches de *K. pneumoniae* GES-5 en Corée du Sud [84]).

b. Environnement génétique

Les gènes codant pour les β -lactamases de type GES sont portés par des intégrons de classe 1, de taille et de composition variées [98].

La majorité des gènes *bla_{GES}* est localisée sur des plasmides, à l'exception des gènes *bla_{GES-13}* et *bla_{GES-18}*, pour lesquels l'hypothèse d'une localisation chromosomique a été envisagée [99].

2. Carbapénèmases de type IMI

a. Epidémiologie et spectre d'hydrolyse

La première souche de *E. cloacae* produisant IMI-1 a été identifiée aux Etats-Unis en 1984 [100]. A la différence des carbapénèmases portées par des plasmides, le support du gène *bla_{IMI-1}* est chromosomique, et les résistances associées aux autres familles d'antibiotiques (fluoroquinolones, aminosides,...) sont rares.

La diffusion de cette carbapénèmase semble encore limitée à certaines zones géographiques, mais depuis quelques années, le nombre de souches isolées en France, aux Etats-Unis, en Finlande, en Croatie, en Irlande, et à Singapour ne cesse d'augmenter [101]. Récemment, une épidémie comprenant 18 souches de *E. cloacae* produisant IMI-1 a été rapportée à Mayotte, dont 16 appartenaient au ST820 [102].

Les carbapénèmases de type IMI présentent un profil d'hydrolyse atypique, avec une forte hydrolyse de l'imipénème et de l'amoxicilline, et peu d'activité envers les céphalosporines. Sur l'antibiogramme, la résistance à l'imipénème est nettement plus marquée que la résistance à l'ertapénème ou au méropénème.

Il existe actuellement 17 variants d'IMI déposés dans la base de données du NCBI.

b. Environnements et supports génétiques

Les gènes *bla_{IMI}* chromosomiques font partie d'éléments intégratifs appelés EcloIMEX (Figure 9). Cette structure est mobilisée par une recombinase qui reconnaît des séquences particulières nommées XERC/D. Lorsque la recombinase reconnaît ces séquences, elle peut insérer la séquence d'ADN exogène. Il existe actuellement 8 variants de cette structure. Dans certaines structures de type EcloIMEX, une délétion d'une

portion contenant le gène codant pour la recombinase a été identifiée [102]. Cette délétion a pour conséquence de rendre cette structure inactive. On peut cependant imaginer l'action d'une recombinase Xer en trans. Il est intéressant de préciser que les gènes *bla_{IMI-1}* sont précédés d'un régulateur de type LysR appelé *imiR*.

Initialement rapportés chez *E. cloacae*, *bla_{IMI-2}*, *bla_{IMI-3}*, ont également été décrits sur des plasmides portés par *E. coli* et *Raoultella ornithinolytica* respectivement [103]. L'analyse de l'environnement génétique de ces gènes révèle la présence de séquences d'insertion et de transposons (parfois tronqués) probablement impliqués dans la mobilisation du gène de résistance [103].

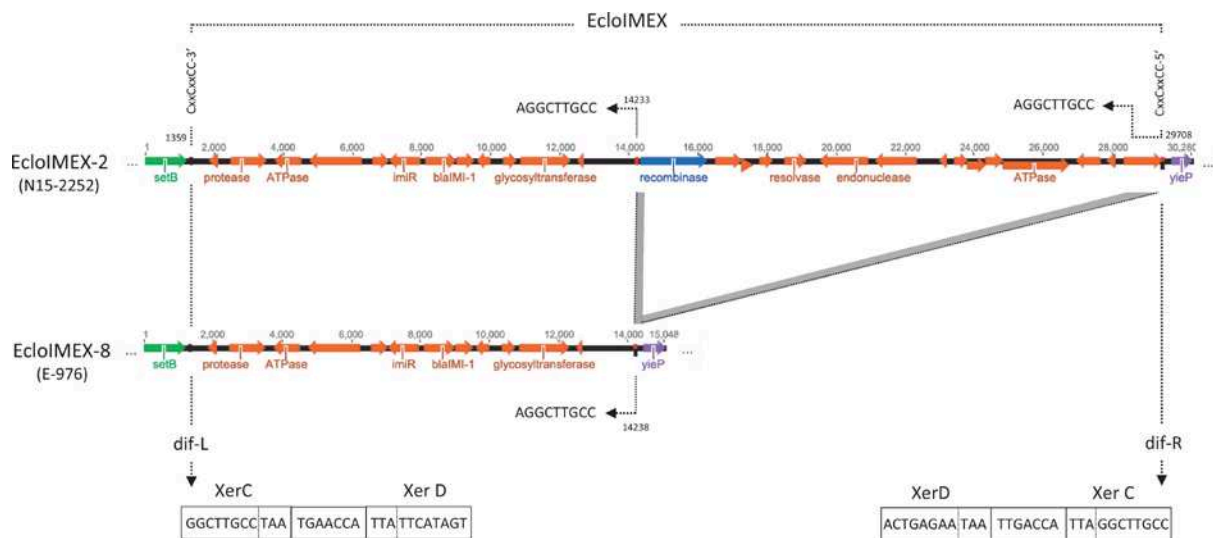


Figure 9. Environnement génétique du gène *bla_{IMI-1}* présent au sein d'éléments intégrés mobiles appelés EcoIMEX.

Les structures EcoIMEX-2 et EcoIMEX-8 (privée du gène codant la recombinase) sont représentés ici. D'après Milgen *et al.* [102].

3. Carbapénèmases de type KPC

La première souche productrice de KPC-1 a été isolée en 1996 aux Etats-Unis [104]. Il s'agissait d'une souche de *K. pneumoniae* résistante à toutes les β -lactamines, carbapénèmes inclus. Cette première description a rapidement été suivie par la publication d'un autre variant KPC-2 [105]. Depuis, un nouveau séquençage du gène *bla_{KPC-1}* a révélé une parfaite identité de séquence avec *bla_{KPC-2}* et seul le nom de KPC-2 est maintenu. Plus de trente autres variants, se distinguant par au moins une substitution en acide aminé, ont été rapportés (KPC-3 à KPC-38). L'alignement protéique des différents variants de KPC révèle une faible diversité, avec entre 1 et 7 acides-aminés de différence (www.bldb.eu).

a. Spectre d'hydrolyse

Les données biochimiques révèlent que les enzymes de type KPC sont capables d'hydrolyser toutes les β -lactamines : pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames [104]. Malgré son appartenance à la classe A de Ambler, l'acide clavulanique et le tazobactam inhibent faiblement l'activité hydrolytique des β -lactamases de type KPC [104]. Quelques différences dans le spectre d'hydrolyse ont été mises en évidence parmi les différents variants. Ainsi, les variants KPC-3 à KPC-11 hydrolysent plus la ceftazidime que KPC-2 [106]. Plusieurs substitutions ont été identifiées, à savoir M49I, P104R, P104L, V240G, V240A, et H274Y. Les substitutions P104R et H274Y confèrent la plus forte augmentation de l'activité d'hydrolyse vis à vis de la ceftazidime, en augmentant chacune la valeur k_{cat}/K_m d'un facteur 10 par rapport à KPC-2. Par ailleurs, une substitution à la position de l'Arg164 localisée au niveau de la boucle Ω de KPC-2, position conservée entre les β -lactamases de classe A, est également associée à une augmentation d'activité vis à vis de la ceftazidime [101,107]. KPC-14 et KPC-28 possèdent une faible efficacité catalytique envers les carbapénèmes. Ce sont également les seuls variants possédant une délétion de 2 acides-aminés aux positions 242 et 243. Cette particularité pourrait expliquer leur spectre d'hydrolyse particulier (Tableau 5).

KPC-25, KPC-29 et KPC-34 possèdent respectivement une insertion de 2 (+L169 +E170), 3 (+275D, +276D, +277K) et 7 (séquence HSEAKDDK aux positions 271 à 278) acides aminés.

Substrate	K_m (μ M)				k_{cat}				k_{cat}/K_m			
	KPC-2	KPC-3	KPC-14	KPC-28	KPC-2	KPC-3	KPC-14	KPC-28	KPC-2	KPC-3	KPC-14	KPC-28
Pipéracilline	137	255	6	11	59	38	0,8	0,95	434	150	127	86
Cefoxitine	>1000	>1000	NH	NH	>12	>4	ND	ND	2	1,6	ND	ND
Cefotaxime	>1000	335	77	75	>163	403	4	5	95	1202	52	67
Ceftazidime	>1000	656	41	125	>16	9	1	4	0.6	14	24	32
Céfépime	>1000	491	34	30	>48	14	1.7	2.5	13	29	50	83
Imipenem	198	235	5	18	47	31	0.006	0.006	237	131	1.2	0.34
Méropénème	45	18	7	NH	3	2	0.003	ND	67	103	0.4	ND
Ertapénème	30	25	5	9	4	3	0.002	0.004	133	114	0.47	0.42

Tableau 5. Activité enzymatique des variants KPC-2, KPC-3, KPC-14 et KPC-28.

D'après Oueslati *et al.*, données non publiées [108].

b. Epidémiologie

Initialement décrite aux Etats-Unis, la dissémination de la carbapénèmase KPC est rapidement devenue mondiale dès le milieu des années 2000, en touchant dans un premier temps Israël [109,110], la Grèce [111,112] et la Colombie en plus des Etats-Unis [113–117] en raison des rapatriements sanitaires organisés entre les structures de soins de ces différents pays [118].

L'Amérique du Sud connaît également une importante dissémination de souches productrices de KPC, comme par exemple en Argentine, au Brésil ou en Colombie [119–121]. En Europe, des cas isolés et des épidémies ont été rapportés chez les entérobactéries, en particulier en France [122], en Allemagne [123], en Croatie [124], en Belgique [125], en Finlande [126], en Italie [127], en Suède, en Norvège [128], en Pologne [129], en Suisse [130], en Irlande [131] et en Espagne [132]. Des souches productrices de la carbapénèmase KPC ont également été identifiées en Asie (Singapour, Corée, Inde) [133,134], au Canada [135], en Afrique du Sud [136], en Grande Bretagne [137] et en Iran [138] (Figure 10).

A ce jour, KPC est considérée endémique dans plusieurs pays dont l'Amérique du Nord, l'Argentine, le Brésil, la Colombie, l'Asie du Sud-Est, la Grèce, Israël, l'Italie, la Pologne, et Porto Rico [118].

La dissémination mondiale de KPC semble être étroitement lié à la diffusion d'un seul clone de *K. pneumoniae* appartenant au séquence-type (ST) 258. Pour illustrer l'importance de l'association entre KPC et le ST258, on considère que plus de 77% des épidémies à KPC-Kp aux USA et 90% des infections à KPC-Kp en Israël sont dues au clone ST258 [118].

Cependant, KPC a également été identifiée dans de nombreuses autres espèces d'entérobactéries (*E. coli*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *M. morgani*), ainsi que dans des souches de bacilles à Gram négatif non fermentants, comme *P. aeruginosa* et *A. baumannii* à Porto Rico principalement [58].

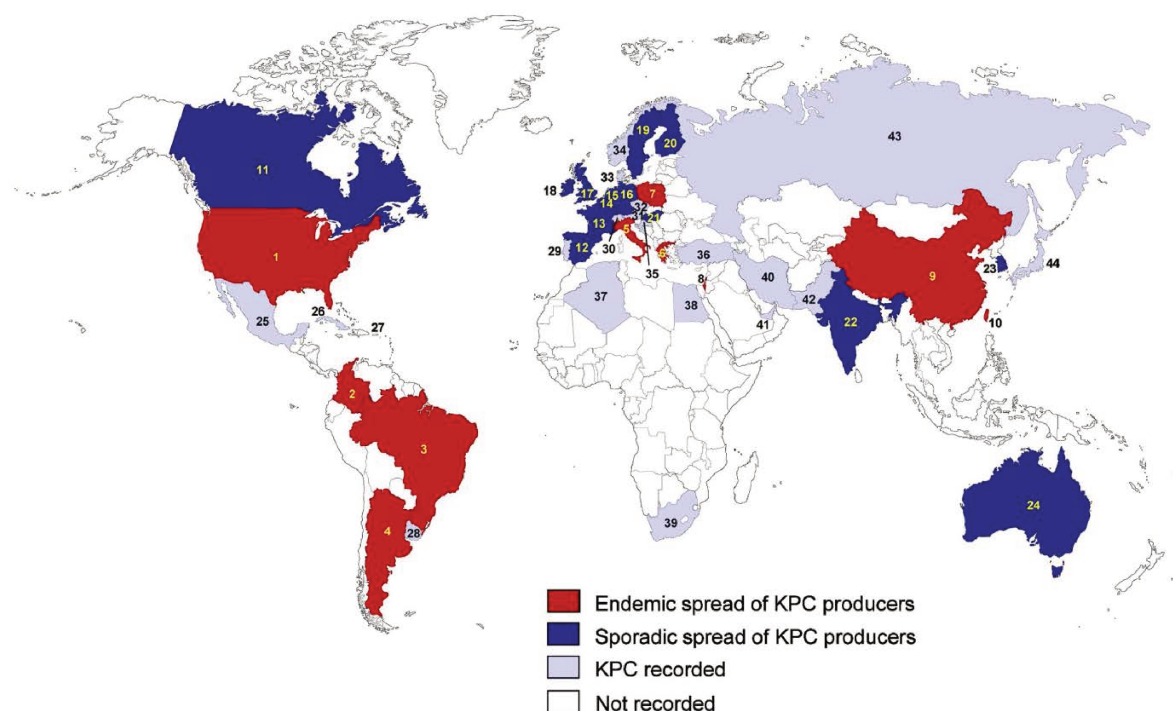


Figure 10. Distribution géographique des souches de *K. pneumoniae* produisant KPC.

D'après Lee *et al.* [58]

(1) USA; (2) Colombie; (3) Brésil; (4) Argentine; (5) Italie; (6) Grèce; (7) Pologne; (8) Israël; (9) Chine; (10) Taiwan; (11) Canada; (12) Espagne; (13) France; (14) Belgique; (15) Pays-Bas; (16) Allemagne; (17) Grande-Bretagne; (18) Irlande; (19) Suède; (20) Finlande; (21) Hongrie; (22) Inde; (23) Corée du Suid; (24) Australie; (25) Mexique; (26) Cuba; (27) Porto Rico; (28) Uruguay; (29) Portugal; (30) Suisse; (31) Autriche; (32) République Tchèque; (33) Danemark; (34) Norvège; (35) Croatie; (36) Turquie; (37) Algérie; (38) Egypte; (39) Afrique du Sud; (40) Iran; (41) Emirats Arabe Unis; (42) Pakistan; (43) Russie; (44) Japon

c. Supports génétiques

i. Environnement génétique du gène *bla_{KPC}*

Dans la majorité des cas, le gène *bla_{KPC}* est porté par un transposon de type Tn3, appelé Tn4401 d'environ 10 kb, délimité par 2 séquences inversées imparfaites de 39 pb [139]. Ce transposon est constitué de deux cadres ouverts de lecture, codant pour une transposase (*tnpA*) et une résolvasse (*tnpR*) ainsi que de deux séquences d'insertion différentes ISKpn7 et ISKpn6. Ces deux séquences d'insertion présentent des séquences en répétitions directes indiquant leur acquisition plus récente. Huit isoformes du transposon Tn4401 ont été identifiées (isoforme a à i) (Figure 11). Ces isoformes se distinguent les uns des autres par des délétions de taille variable en amont du gène *bla_{KPC}*. La délétion la plus courte est de 68 pb pour l'isoforme Tn4401d, la plus longue étant de 255 pb pour l'isoforme Tn4401e [140]. Les isoformes les plus largement répandus sont les isoformes a et b.

Aux extrémités de ce transposon, sont présentes des séquences répétées de 5 bp (TSD pour Target Site Duplication) témoignant de son l'intégration par un événement de transposition. Cuzon *et al.* ont démontré sa capacité de transposition selon une fréquence estimée à $4,4 \times 10^{-6}$ sans spécificité de séquence au niveau du site d'insertion [139]. D'autre part, chez certains plasmides largement répandus (pKpQIL-like), l'insertion du Tn4401 s'est produite au sein d'une séquence d'insertion appelée ISKpn31 [141,142].

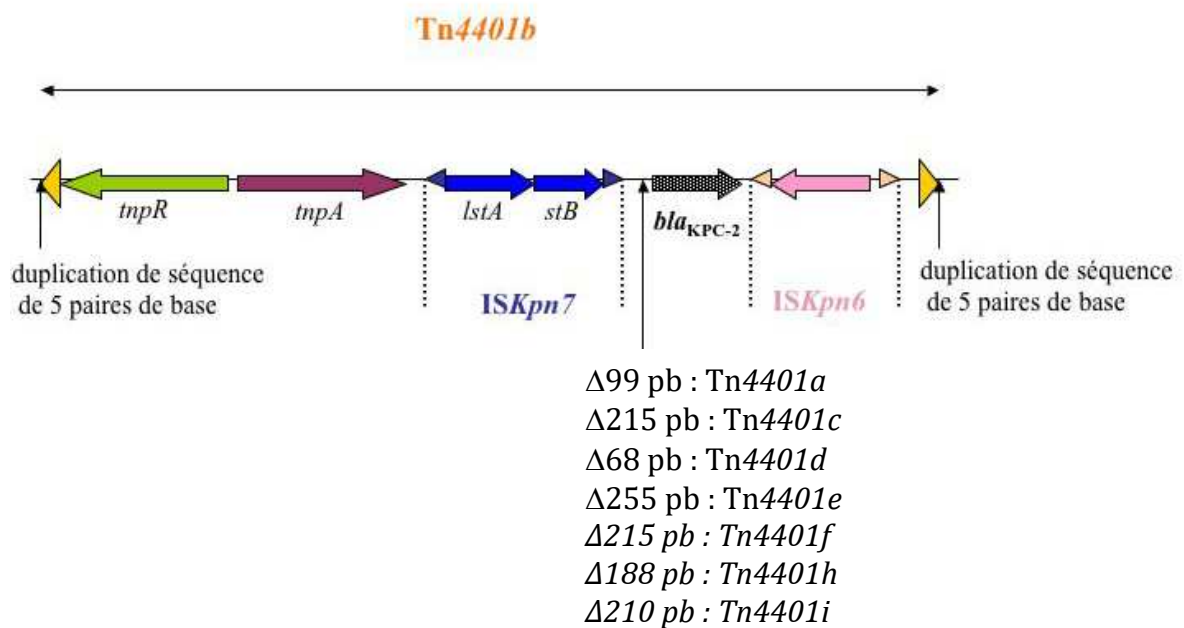


Figure 11. Représentation schématique des différentes structures du transposon Tn4401 identifiées sur différents plasmides porteurs du gène *bla_{KPC}*.

Les flèches indiquent les régions codantes et le sens de transcription. Le transposon Tn4401 est délimité par deux séquences répétées inversées (triangles jaunes). Les séquences répétées inversées des séquences d'insertion ISKpn6 et ISKpn7 sont indiquées par de petits triangles jaunes et gris respectivement. Les délétions en amont du gène *bla_{KPC}* à l'origine des différents isoformes sont indiquées. D'après Nordmann *et al.* [143] et Naas *et al.* [140].

Le gène *bla_{KPC}* a également été identifié sur d'autres éléments génétiques mobiles non liés au Tn4401, principalement dans des souches isolées de Chine ou d'Argentine non-*K. pneumoniae*, ou plus rarement des souches de *K. pneumoniae* non-ST258. En 2014, Chen *et al.* ont proposé de nommer ces éléments NTE_{KPC} pour « non-Tn4401 elements » et ont défini trois groupes. Dans les groupes NTE_{KPC} -I et II, une séquence partielle de l'ISKpn6 avec sa séquence inversée gauche est toujours présente en aval du gène *bla_{KPC}*, suggérant que ces NTE_{KPC} dérivent du Tn4401 par recombinaison génétique. A noter que

le *Tn4401g* tel qu'il fut décrit par Cheruvanky *et al.* ne possède pas les éléments génétiques nécessaires pour être considéré comme un isoforme de *Tn4401*, mais selon la nomenclature de Chen *et al.*, devrait plutôt appartenir aux NTE_{KPC} -II [144] (Figure 13).

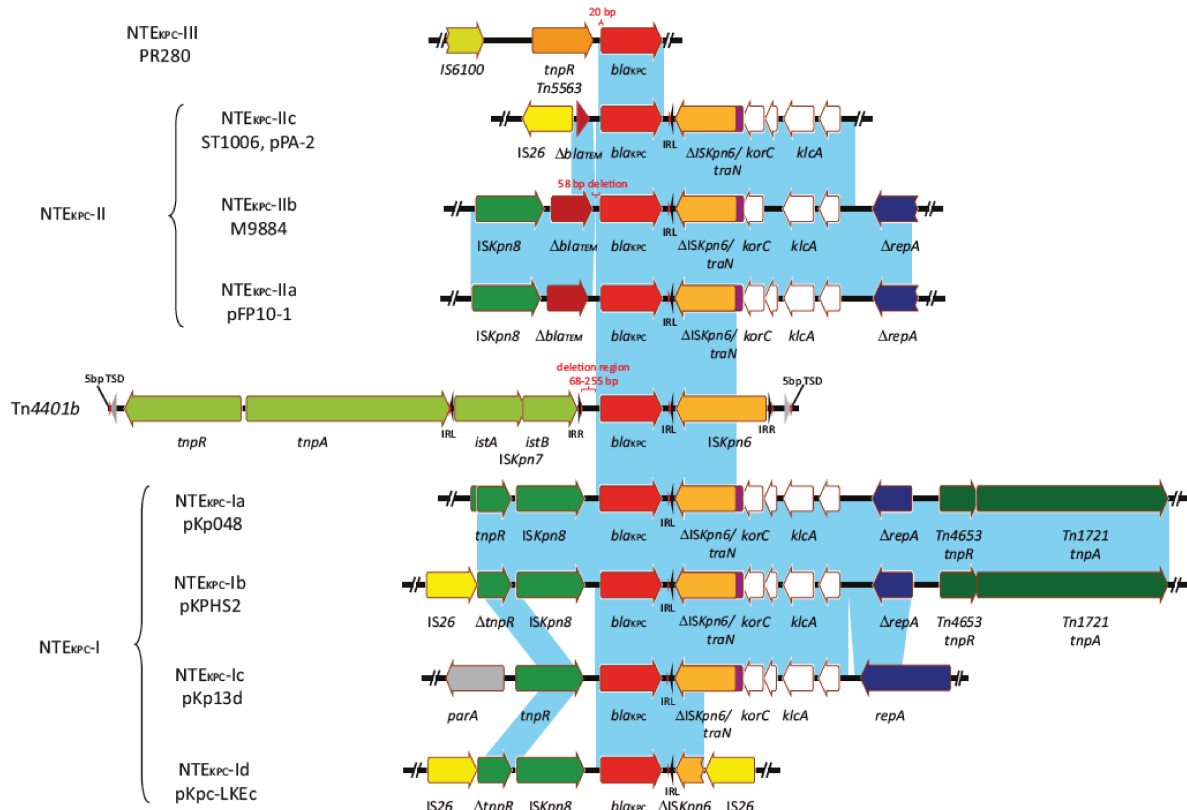


Figure 12. Structures génétiques des NTE_{KPC}.

3 groupes de NTE_{KPC} sont définis en fonction de la séquence présente en amont du gène *bla*_{KPC} : NTE_{KPC} -I : pas d'insertion ; NTE_{KPC} -II : insertion du gène *bla*_{TEM} tronqué, NTE_{KPC} -III : insertion de *Tn5563/IS6100*. Les zones bleues signalent les régions présentant une forte homologie de séquence. D'après Chen *et al.* [118].

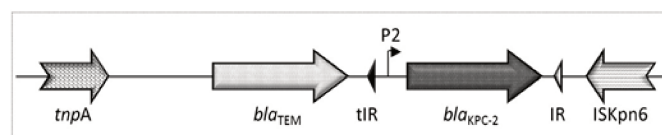


Figure 13. Structure du *Tn4401g*.

Par l'absence de l'*ISKpn7* et la présence du gène *bla*_{TEM}, le *Tn4401g* devrait être considéré comme une structure NTE_{KPC} -II selon la nomenclature de Chen *et al.* D'après Cheruvanky *et al.* [144].

ii. Plasmides portant KPC

Le gène *bla_{KPC}* est dans la grande majorité des cas porté par des plasmides, appartenant à différents groupes d'incompatibilité : IncFII, FIA, I2, A/C, N, X, R, P, U, W, L/M et ColE [49,145–147]. Cependant, en raison de leur fréquente association avec les souches du ST258, les plasmides possédant un réplicon de type IncFII sont majoritaires au niveau mondial.

Ces plasmides portent de nombreux gènes de résistance aux β -lactamines et à d'autres familles d'antibiotiques comme les aminosides, les quinolones, les tétracyclines, les sulfamides [147]. Une grande partie des plasmides véhiculant KPC portent un opéron de transfert, codant la machinerie nécessaire au processus de conjugaison, facilitant la diffusion de ces plasmides multi-résistants à d'autres souches et d'autres espèces.

pKpQIL fut le premier plasmide de type IncFII_{K2} portant KPC-3 et provenant d'une souche de *K. pneumoniae* ST258 israélienne à être entièrement séquencé en 2006 [148]. pKpQIL et ses dérivés appelés pKpQIL-like portant majoritairement le gène *bla_{KPC-2}* ont ensuite été décrits dans de nombreux pays, dont la Pologne, l'Italie, la Colombie et le Royaume-Uni [146]. Le 2^e plasmide prédominant est pBK15692, présent principalement aux USA. Il s'agit d'un plasmide de type IncI2 portant le gène *bla_{KPC-3}* [118].

d. Expression du gène *bla_{KPC}*

Dans la séquence complète du Tn4401b, la région intergénique entre l'*ISKpn7* et le gène *bla_{KPC}* contient deux séquences promotrices. P2 dont la boîte -35, est présente dans l'*ISKpn7*, est le promoteur principal du gène chez *E. coli* [140]. Chez les entérobactéries, l'association des deux promoteurs P1 et P2 (formant l'isoforme Tn4401a) permet l'expression la plus forte du gène *bla_{KPC}*. Une séquence appelée P3 présente uniquement dans l'isoforme b, n'est pas un réel promoteur mais semble être un atténuateur de l'expression de KPC en formant une structure tige-boucle empêchant l'activité de la polymérase [140].

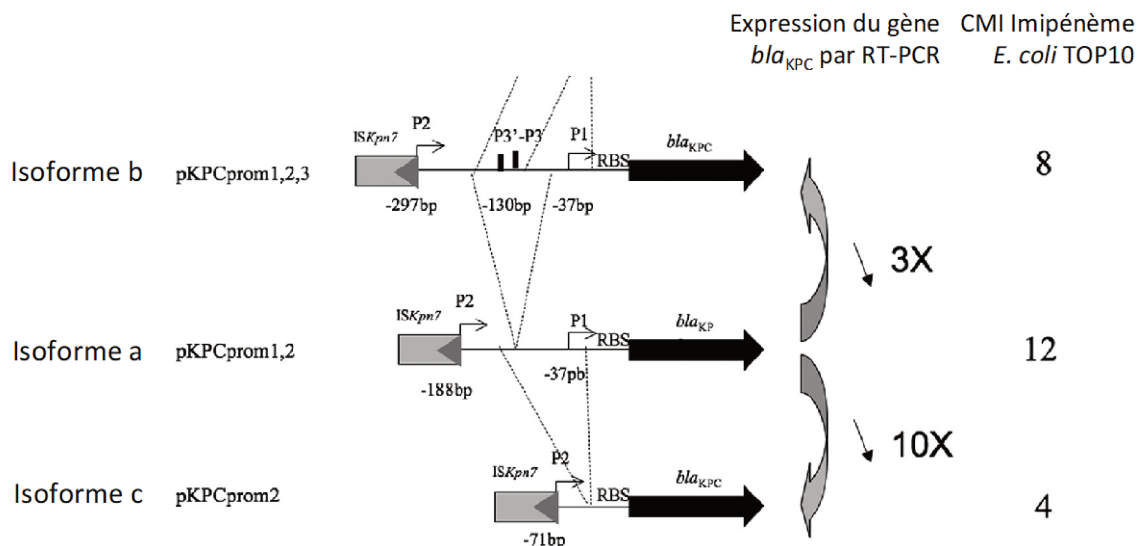


Figure 14. Impact des différentes structures du Tn4401 dans l'expression du gène *bla_{KPC}*.

Les 3 structures génétiques ont été clonées dans le vecteur PCR-ScriptCam pour expression dans *E. coli* TOP10. Trois séquences P1, P2 et P3 peuvent être présentes en amont du gène *bla_{KPC-2}*. C'est la présence des promoteurs P1 et P2 (Tn4401a) qui permet la plus forte expression du gène, mesurée par RT-PCR et CMI à l'imipénème. Adapté de Naas *et al.* [140]

Cependant, la présence de promoteurs différents et le nombre de copies de plasmides par bactérie ne suffisent pas à expliquer les variations d'expression du gène *bla_{KPC}* et le niveau de résistance aux carbapénèmes dans les souches cliniques [149]. Sur l'antibiogramme, le diamètre d'inhibition autour de l'imipénème est plus ou moins réduit en fonction des souches, et peut même rester dans la zone de sensibilité [113].

Par ailleurs, l'une des caractéristiques phénotypiques des *K. pneumoniae* productrices de KPC, est la présence de microcolonies dans la zone d'inhibition autour du disque contenant un carbapénème (Figure 15). Le repiquage de ces colonies et la réalisation du même test n'aboutissent pas à la sélection de mutants résistants, mais le même phénomène d'hétérorésistance persiste. Ce phénomène d'hétérorésistance est observé beaucoup plus rarement avec les autres carbapénémases. De rares études se sont penchées sur ce phénomène. Un défaut de perméabilité par diminution de l'expression de la porine OmpK36 a été mis en évidence dans une sous-population de *K. pneumoniae* KPC après 4h d'exposition à l'imipénème [150]. Une autre équipe a montré que c'était le niveau d'expression du gène *bla_{KPC}* qui était augmenté dans la sous-population hétérorésistante [151]. Les mécanismes qui conduisent à ce phénotype particulier ne sont pas encore bien élucidés et ont soulevé notre intérêt dans l'étude de l'expression de cette carbapénémase.

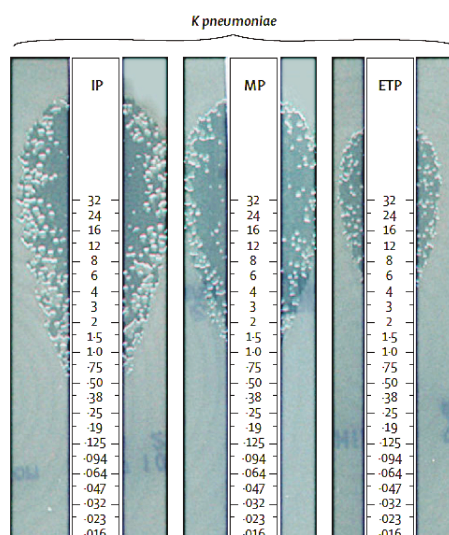


Figure 15. Phénomène d'hétérorésistance vis à vis des carbapénèmes d'une souche de *K. pneumoniae* produisant KPC.

On note la présence de micro-colonies dans la zone d'inhibition de la bandelette E-test.

IP= imipénème ; MP = méropénème ; ETP = ertapénème. D'après Nordmann *et al.* [143]

e. Le groupe-clonal CG258

Pour étudier les liens phylogéniques entre les différents ST de *K. pneumoniae*, Breurec et al. ont proposé de définir des groupes-clonaux (CG), nommés en fonction du ST prédominant et incluant les single-locus variants (SLV) ainsi que leurs propres SLV. Alors que la diffusion des souches de *K. pneumoniae* est polyclonale, la diffusion de KPC est due à un nombre limité de clones. KPC a été identifiée dans environ 7,5% des ST [118]. Mais la majorité des souches appartiennent au CG258 regroupant plus de 40 ST, dont les plus prédominants sont les ST258, ST11, ST340, ST437 et ST512 [147].

Au sein du CG258, 16 STs présentent un allèle de MLST unique pour le gène *tonB*, l'allèle *tonB79*. Ce sous-groupe nommé CG258-*tonB79* permet de désigner les STs les plus proches au sein du CG258, et de les individualiser du ST11 et ses propres SLV [152]. C'est la détection de cet allèle par une PCR en temps réel ciblant 2 SNPs de l'allèle *tonB* qui est à l'origine des techniques de détection moléculaire du ST258 [153].

Des études de génomique comparative ont montré que l'évolution du génome des *K. pneumoniae* semble être principalement le résultat de phénomènes de recombinaison homologues, plutôt que d'une accumulation de mutations ponctuelles [154]. Une illustration des phénomènes de recombinaison survenant chez *K. pneumoniae* est la présence du même sérotype capsulaire, codé par l'opéron *cps*, chez plusieurs ST

différents. Une zone de 160 kb de haute hétérogénéité a été identifiée dans le chromosome de souches de *K. pneumoniae*, témoignant d'un endroit favorable aux phénomènes de recombinaison, notamment pour ce locus *cps* et également pour un élément intégratif et conjugatif appelé ICEKp1 [118].

Chen *et al.* ont identifié le ST258 comme une souche hybride, composée à 80% du génome de souches ST11-like et 20% du génome de souches ST442-like (Figure 16). L'analyse de 83 génomes du sous-groupe CG258-tonB79 provenant de souches d'origines géographiques diverses a distingué 2 clades génétiques (I et II). Leur différence réside principalement dans une région d'environ 215 kb, comprenant l'opéron *cps* et une partie de la région de haute hétérogénéité présente chez l'ensemble des *K. pneumoniae*. Les séquences des opérons *cps* diffèrent entre les 2 clades : *cps1* pour le clade I et *cps2* pour le clade II. Il semblerait que les souches ST258 clade I aient évolué à partir d'une souche ST258 clade II par remplacement de la région codant la capsule polysaccharidique provenant du ST42 (Figure 16).

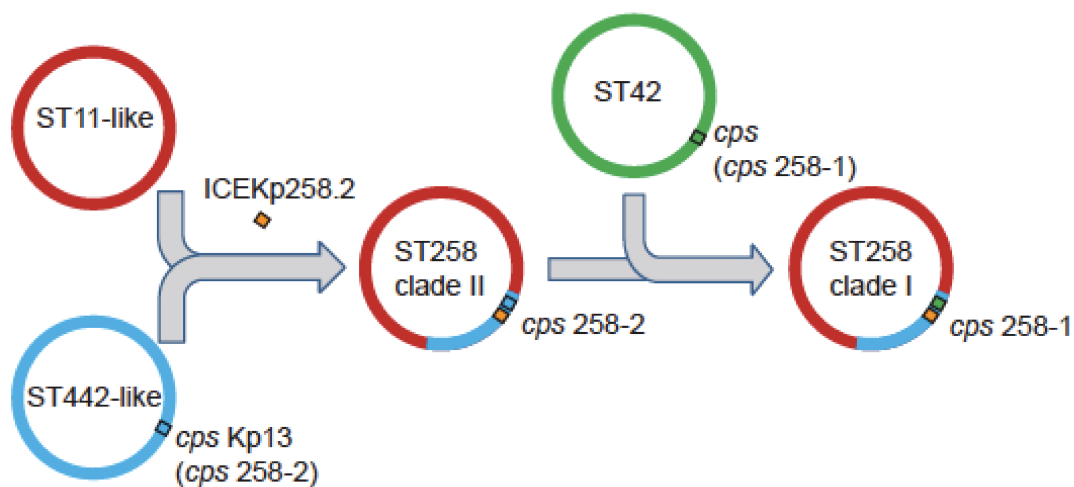


FIG 4 Hypothesized evolutionary history in *K. pneumoniae* ST258 strains.

Figure 16. Histoire évolutive hypothétique des souches de *K. pneumoniae* ST258.

Les souches de ST258 sont composées à 80% du génome de souches ST11-like et à 20% du génome de souches ST442-like. Un élément ICEKp258.2 est présent uniquement dans les génomes des souches du ST258. Le clade I diffère du clade II par remplacement de la région codant la capsule polysaccharidique provenant du ST42 (gène *cps 258-1*). D'après Chen *et al.* [155].

Alors que les plasmides de type IncFII_{K2} associés à pKpQIL sont distribués dans des souches de *K. pneumoniae* des clades I et II, les plasmides portant *bla*_{KPC-3} comme pBK15692 sont principalement distribués dans le clade II. Cette association plasmide-

fond génétique suggère qu'une évolution convergente s'est produite au sein du ST258, et que quelques clones prédominants ont émergé de cette rencontre « clade » et « plasmide-KPC ». Cette association pourrait accroître le fitness ou du moins contrebalancer le coût du plasmide dans ce clone épidémique, comme cela a été décrit pour les souches d'*E. coli* ST131 portant *bla*_{CTX-M-15} sur des plasmides de type IncFII_{K2} [156].

f. Le succès d'un clone épidémique

La diffusion et le succès des entérobactéries productrices de KPC semble être multifactoriels : (i) *bla*_{KPC} est porté par un transposon actif, (ii) ce transposon a transposé sur de nombreux plasmides conjugatifs, (iii) ces plasmides sont hautement compatibles avec un hôte préférentiel, *K. pneumoniae* ST258.

Les souches du ST258 semblent être particulièrement adaptées à l'environnement hospitalier et à la pression antibiotique qui y réside. Cependant, cet avantage ne permet pas d'expliquer le succès planétaire de ce clone. Le gène *bla*_{KPC} a été décrit dans plus d'une centaine de ST différents, mais aucun n'a diffusé si largement. Cela laisse à penser qu'en plus de l'avantage conféré par la multi-résistance, il existe des facteurs génétiques unique au ST258 (chromosomiques et/ou plasmidiques) qui contribuent au succès de ce clone.

De nombreuses études ont porté sur l'analyse des facteurs génétiques chromosomiques qui pourraient contribuer au succès du clone ST258.

- les souches du ST258 ne se distinguent pas par leur capacité à causer plus d'infection. Une étude a montré que les souches du ST258 étaient peu virulentes dans un modèle animal immunocompétent, étaient hautement sensibles à l'action bactéricide du sérum et étaient rapidement phagocytées *in vitro* [157]. Ces souches sont dépourvues de certains facteurs de virulence bien caractérisés chez *K. pneumoniae*, comme les gènes codant les antigènes capsulaires K1, K2 et K5, l'aérobactine, et le régulateur mucoïde *rpmA* [157].
- L'élément ICEKp258.1 présent dans les souches ST11 et ST258 porte un système de sécrétion de type IV. L'élément ICEKp258.2 qui est unique au ST258 possède un cluster de gènes codant pour des pili de type IV, qui pourraient favoriser l'adhésion

des bactéries sur les surfaces inertes, ou encore la muqueuse intestinale. De plus, l'ICEKp258.2 possède un système de restriction-modification de type III qui pourrait accroître la spécificité d'hôte lors des échanges d'éléments génétiques.

- Les recombinaisons qui touchent le locus *cps* (*cps1* et *cps2* dans la région de 215 kb différenciant les clades I et II) contribuent largement à modifier le pouvoir antigénique des souches de *K. pneumoniae*. En modifiant la composition de sa capsule, les souches peuvent échapper à la réponse immunitaire de l'hôte [158].

III. Carbapénèmases de classe B

Les carbapénèmases de classe B sont caractérisées par leur résistance aux inhibiteurs de β -lactamases classiques (acide clavulanique et tazobactam), et par une inhibition de leur activité par l'EDTA (acide éthylènediamine tétra-acétique), chélateur des ions Zn^{2+} (et autres cations divalents) nécessaires à l'interaction entre les β -lactamines et le site actif de l'enzyme. Elles possèdent également un spectre d'hydrolyse large puisque les pénicillines et toutes les céphalosporines sont hydrolysées à l'exception de l'aztréonam. Au sein de ce groupe, les carbapénèmases de type VIM, IMP et NDM sont les plus répandues.

1. Carbapénèmases de type IMP

a. Epidémiologie

Soixante-quinze variants du gène *bla*_{IMP} ont été identifiés depuis la description de IMP-1 dans une souche de *S. marcescens* au Japon en 1991 [77]. La carbapénèmase IMP a ensuite été détectée dans de nombreuses espèces d'entérobactéries (*Klebsiella spp*, *Providencia rettgerii*, *Enterobacter spp*, *E. coli* [159–163]), chez *P. aeruginosa* [164,165] et chez *A. baumannii* [166,167] et plus récemment dans des souches de *Achromobacter xylosoxidans* [168].

A l'heure actuelle, les carbapénèmases de type IMP sont endémiques au Japon et à Taiwan et ont disséminé en Chine et en Corée [79]. Des cas sporadiques ont été décrits en Europe [165,169,170], en Amérique du Sud [171], au Canada [172], aux Etats-Unis [173], en Australie [174] et en Afrique [175].

De nombreuses épidémies impliquant des bactéries productrices de IMP ont été rapportées [159,172,176] (112, 230, 352). *Acinetobacter baumannii* reste l'espèce bactérienne dans laquelle IMP a été le plus souvent décrite [79].

b. Environnement génétique

Les gènes *bla*_{IMP} sont associés à des intégrons de classe 1 ou de classe 3 [177,178]. L'environnement génétique de ces intégrons a été étudié précisément et il a été montré qu'ils étaient insérés au sein de transposons de type Tn21 et Tn5051 qui pourraient être à l'origine de la mobilité des gènes *bla*_{IMP} [179]. Une étude réalisée en Australie a montré que différents environnements génétiques sur plusieurs types de plasmides pouvaient être associés à l'intégron de classe 1 contenant le gène *bla*_{IMP-4}, avec notamment l'identification de transposons de type Tn21, de Tn172 ou de Tn1696 [180].

2. Carbapénèmases de type VIM

a. Epidémiologie

La carbapénémase VIM-1 (pour « Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase ») a été décrite pour la première fois en 1997 dans une souche de *P. aeruginosa* isolée à Vérone, Italie [181]. Un second variant VIM-2 a ensuite été identifié en France [182]. À ce jour, 57 variants ont été décrits, principalement chez *P. aeruginosa*, mais également dans une moindre mesure chez *A. baumannii* [183] et certaines espèces d'entérobactéries comme *Klebsiella* spp, *E. coli*, *Enterobacter* spp, *P. mirabilis* [184–186], *Providencia stuartii* [187], et *S. marcescens* [188].

La carbapénémase VIM-2 a particulièrement diffusé chez *P. aeruginosa* à travers le monde et a été décrite sur tous les continents [33]. De nombreuses épidémies dues à des souches productrices de VIM ont été décrites [183,188–190]. L'enzyme VIM est maintenant répandue de manière endémique en Grèce et en Italie (entérobactéries) ainsi qu'en Russie (*P. aeruginosa*) [79].

b. Environnement génétique

Les différents variants alléliques du gène *bla_{VIM}* sont localisés au sein d'intégrons de classe 1 sous forme de gènes cassettes. Ces intégrons ont été identifiés soit sur le chromosome soit sur des plasmides, et sont habituellement insérés dans un transposon de type Tn402 (ou Tn5090) [191,192]. Chez *P. aeruginosa*, les gènes *bla_{VIM-1}* et *bla_{VIM-2}* ont été décrits dans des intégrons tronqués au niveau de leur région 3'CS [193], ou dans des structures incomplètes dérivant de Tn402 [194]. Enfin, ces éléments dérivés de Tn402 peuvent eux-mêmes être localisés dans des transposons de type 3 [195].

3. Carbapénèmases de type NDM

a. Epidémiologie

La métallo- β -lactamase NDM-1 (New Delhi Métallo- β -lactamase) a initialement été identifiée en Suède en 2008, dans une souche de *K. pneumoniae* et une souche de *E. coli* isolées chez un patient qui avait été auparavant hospitalisé en Inde [196]. Par la suite, une étude parue en 2010 a montré la forte prévalence de souches d'entérobactéries productrices de la carbapénèmase NDM-1 en Grande-Bretagne, en Inde et au Pakistan [197]. Dans la plupart des cas, un voyage en Inde ou des liens avec l'Inde, le Pakistan et le Bangladesh ont été retrouvés, indiquant que le sous-continent indien est un réservoir de gènes *bla_{NDM-1}* [198]. Les gènes de type *bla_{NDM}* ont également été largement identifiés dans diverses espèces de bacilles à Gram négatif isolés à partir de prélèvements d'eau réalisés à New Delhi [199], et dans des germes purement « communautaires » comme *Salmonella* spp. [200] et *Vibrio cholerae* [201], suggérant la forte présence de cette carbapénèmase dans l'environnement. Dans un certain nombre d'autres cas, des liens avec les pays des Balkans ont pu être mis en évidence, ces pays constituant vraisemblablement un réservoir secondaire de ce déterminant de résistance [202]. Depuis, NDM-1 a été identifié dans de nombreux pays de tous les continents dont l'Afrique [198,203,204] (Figure 17).

Initialement identifié dans des souches d'entérobactéries, le gène *bla_{NDM-1}* a été rapporté dans des souches de *A. baumannii* en Chine [205] et de *P. aeruginosa* en Serbie [206]. Initialement, la dissémination de la carbapénèmase NDM semble s'être faite sous la

forme de cas sporadiques mais de nombreux cas d'épidémies ont depuis été rapportés, impliquant des souches d'entérobactéries [207–211] ou de *A. baumannii* [212].

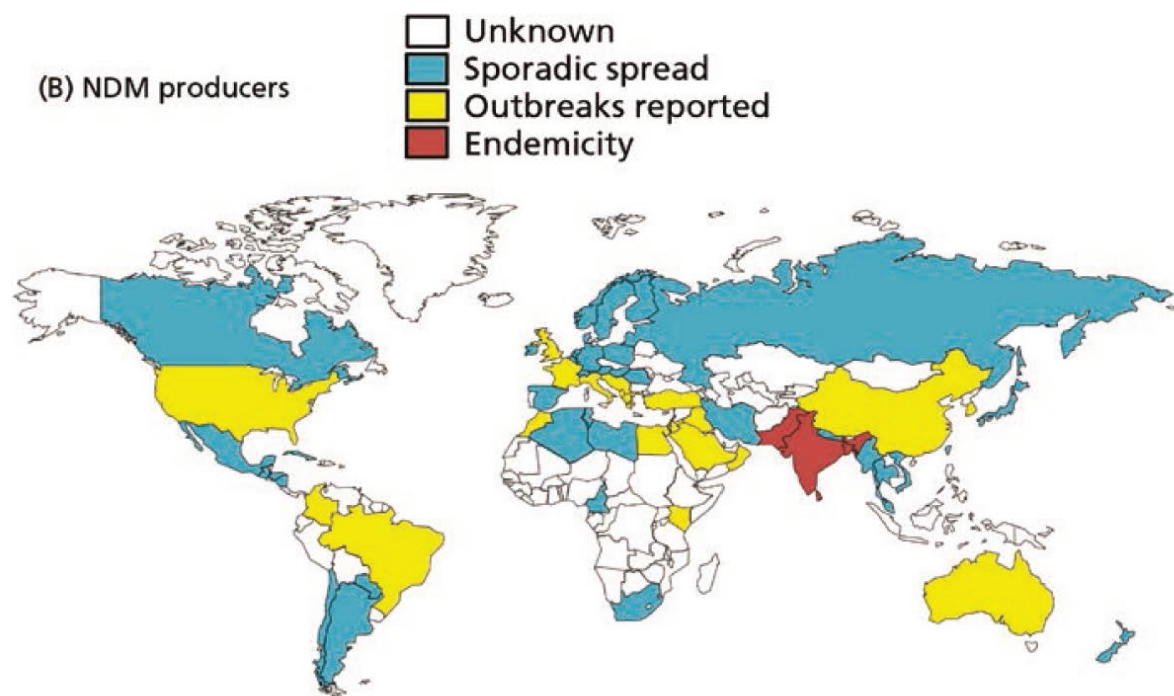


Figure 17. Répartition mondiale de la carbapénèmase NDM chez les entérobactéries et *P. aeruginosa*.

D'après Bonomo *et al.* [79]

Actuellement, 24 variants du gène bla_{NDM-1} ont été identifiés. Récemment, une étude a comparé l'activité hydrolytique des variants NDM-1 à NDM-17 [213]. Le clonage individuel de chaque gène dans le même vecteur d'expression (pHSG298) suivi d'une étude de sensibilité aux β -lactamines ne révèle pas de différence majeure entre les différents variants, hormis pour NDM-10 dont les CMI pour l'ampicilline, l'imipénème et le méropénème sont diminuées de plus de 2 dilutions par rapport à NDM-1. L'ajout d'EDTA (50 μ M) ou de Zinc (10 μ M) dans le milieu de culture révèle des différences d'efficacité hydrolytique entre les variants. NDM-15 est le variant le moins impacté par une faible concentration en Zn dans le milieu [213].

b. Environnement génétique

Dans toutes les souches étudiées, un fragment de la séquence d'insertion IS*Aba125*, initialement identifiée chez *A. baumannii*, précède toujours le gène bla_{NDM} (Figure 18)

[214]. Cependant, chez les entérobactéries, aucune structure de transposon complète impliquant IS*Aba125* n'a été identifiée. La découverte de ce fragment a focalisé la recherche d'une structure génétique présente chez *Acinetobacter* spp. Le gène *bla*_{NDM} a été identifié chez *A. baumannii* au sein d'un transposon composite Tn125, encadré par deux copies de IS*Aba125* [215]. Ce transposon aurait ensuite disséminé chez les entérobactéries qui en possèdent toujours une version tronquée [214] (Figure 18).

Dans toutes les souches étudiées, le gène *bla*_{NDM} est associé au sein d'un même opéron avec le gène *ble*_{MBL}, codant pour une protéine conférant une résistance à la bléomycine [216]. *bla*_{NDM} et *ble*_{MBL} sont exprimés de façon constitutive à partir du même promoteur, apporté par l'IS*Aba125* [217]. Il est donc possible que les molécules proches de la bléomycine, sécrétées par *Streptomyces* sp. ou présentes comme contaminant dans l'environnement, puissent jouer un rôle dans la pression de sélection conduisant à la dissémination de souches productrices de NDM [216].

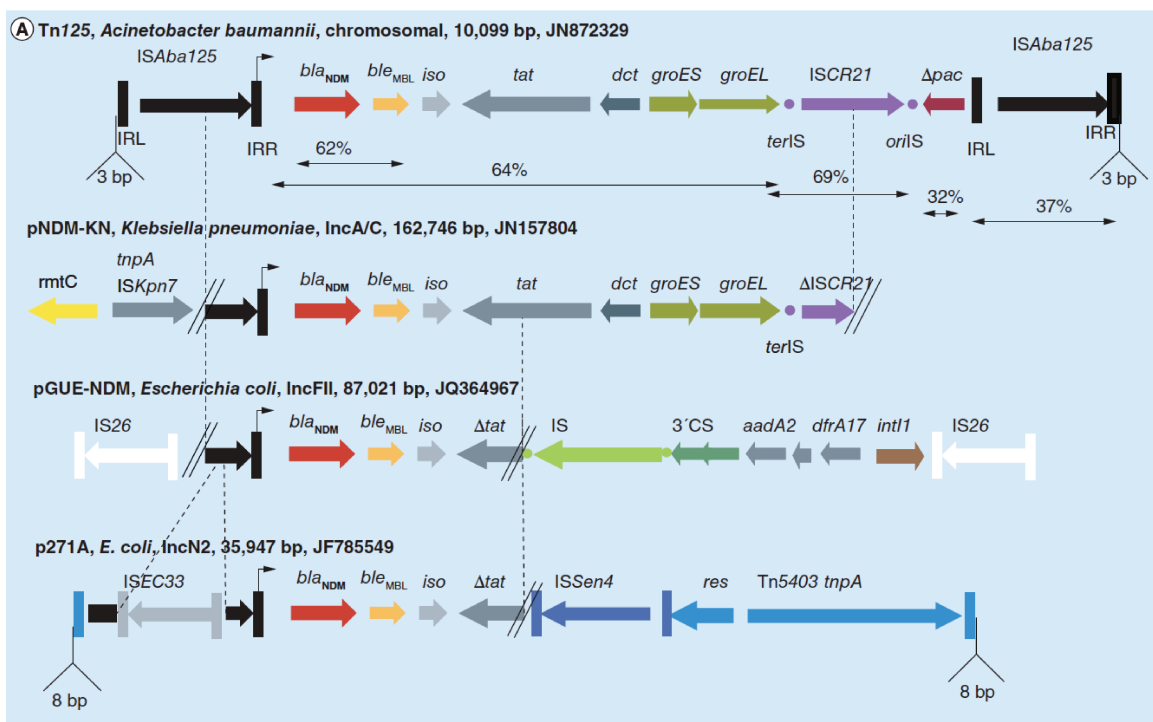


Figure 18. Environnement génétique du gène *bla*_{NDM-1} chez *A. baumannii* et chez les entérobactéries.

D'après Bonnin *et al.* [214]

4. Autres métallo-β-lactamases

Les autres métallo-β-lactamases sont d'importance moindre puisqu'elles ont très peu diffusé ou ont été rapportées sporadiquement.

SPM-1 (pour « Sao Paulo Métallo-β-lactamase ») a été rapportée pour la première fois au Brésil dans une souche de *P. aeruginosa* en 2002 [218] et a, depuis, été responsable de plusieurs épidémies dans ce pays [219,220] pour devenir la métallo-β-lactamase la plus fréquente au Brésil [171]. Une souche importée a également été décrite en Suisse [221].

GIM-1 (pour « German Imipenemase ») et AIM-1 (pour « Adelaïde Imipenemase ») ont été décrites chez *P. aeruginosa* en Allemagne [222] et en Australie [223], respectivement. La carbapénèmase DIM a été caractérisée chez *Pseudomonas stutzeri* en Hollande [224], SIM-1 chez *A. baumannii* en Corée du Sud [225] et enfin KHM-1 chez *Citrobacter freundii* au Japon [226]. Plus récemment, 3 nouvelles carbapénèmases ont été identifiées : SMB-1 dans une souche de *S. marcescens* isolée au Japon [227], FIM-1 dans une souche de *P. aeruginosa* isolée en Italie [228] et TMB-1 dans une souche de *Achromobacter xylosoxidans* isolée en Libye [229]. TMB-2 a été identifié dans deux souches de *Acinetobacter* sp. isolées au Japon [230]. Chez ces bacilles à Gram négatifs non fermentants, le support de *bla*_{TMB} est chromosomique, au sein d'un intégron de classe 1. En 2018, TMB-1 a été identifié pour la première fois en France dans 2 espèces d'entérobactéries, *Enterobacter hormachei* et *Citrobacter freundii*, chez un patient en provenance de Tunisie. Le gène *bla*_{TMB-1} et son intégron étaient portés par plasmide conjugatif de type IncN et encadrés par deux séquences d'*ISKpn19*, formant un transposon composite [231].

IV. Carbapénèmases de classe D

1. Généralités sur les oxacillinases

La classe D de Ambler groupe les β-lactamases appelées oxacillinases qui sont des enzymes à sérine active. Ces enzymes sont classées dans le groupe 2d de la classification de Bush. Elles étaient initialement définies comme des β-lactamases hydrolysant plus rapidement l'oxacilline et la cloxacilline que la benzylpénicilline [36]. Cette définition ne semble plus valable puisque certaines oxacillinases ont été décrites comme hydrolysant

peu ou pas la cloxacilline et l'oxacilline. Cependant, toutes les oxacillinases hydrolysent les aminopénicillines et les carboxypénicillines. Leur activité n'est habituellement pas inhibée par l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam, mais peut être inhibée *in vitro* par le chlorure de sodium (NaCl).

À ce jour, 657 β -lactamases de classe D ont été recensées. Cette classe est constituée d'enzymes très variées sur les plans génétique et biochimique [38]. En effet, les β -lactamases de classe D peuvent avoir un spectre d'hydrolyse étroit ou étendu, certaines n'hydrolysant que les pénicillines, certaines hydrolysant également les céphalosporines à large spectre et d'autres ayant la capacité d'hydrolyser les carbapénèmes [38].

Seul un nombre limité de β -lactamases de classe D possèdent une activité carbapénémase et sont dans ce cas nommées CHDL (*Carbapenem-Hydrolyzing class D β -Lactamases*). Ces enzymes sont classées dans le groupe 2df de la classification de Bush. Pour ces enzymes, l'hydrolyse des carbapénèmes est généralement faible et les céphalosporines de troisième génération ne sont pas ou peu hydrolysées.

La première β -lactamase de classe D ayant une activité carbapénémase a été identifiée dans les années 90, dans une souche de *A. baumannii*, et nommée OXA-23 [232]. Depuis, les souches de *A. baumannii* OXA-23 ont diffusé dans le monde entier [233] avec un grand nombre d'épidémies décrites [234–236]. Chez ce genre bactérien, OXA-23 est actuellement la carbapénémase la plus fréquemment identifiée. Cette carbapénémase a été identifiée de rares fois dans les entérobactéries et uniquement chez des souches de *P. mirabilis* dans laquelle le gène *bla*_{OXA-23} était chromosomique [237].

Les CHDL ont été classées en 12 groupes en fonction de leur séquence protéique : OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-134a, OXA-143, OXA-211, OXA-213, OXA-214, OXA-229, et OXA-235. La plupart de ces enzymes sont associées au genre *Acinetobacter*. Les enzymes du groupe OXA-48 à l'inverse sont identifiées quasiment exclusivement chez les entérobactéries. Ce groupe comporte actuellement 29 variants dont les plus fréquents sont : OXA-48, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244, et OXA-370 [34].

2. Epidémiologie

La carbapénèmase OXA-48 a été identifiée pour la première fois chez *K. pneumoniae* 11978 isolée en Turquie en 2001 [238]. Cette souche exprimait en fait plusieurs β -lactamases, dont la BLSE SHV-2a et les β -lactamases à spectre étroit TEM-1 et OXA-47 auxquelles étaient associées des modifications de plusieurs protéines de membrane externe, ceci conduisant dans cet isolat clinique à un profil de résistance de haut niveau aux antibiotiques [238]. Jusqu'en 2010, OXA-48 n'a été identifiée que dans des souches isolées chez des patients hospitalisés en Turquie ou ayant un lien avec la Turquie [239], tandis que de rares cas sporadiques étaient rapportés du Liban, de Belgique [240], de Tunisie [241], de Grande-Bretagne [242], de France et d'Égypte [243]. Depuis, OXA-48 est devenue endémique en Turquie, dans plusieurs pays du pourtour Méditerranéen et du Moyen-Orient. Plusieurs épidémies hospitalières ont été décrites dans des pays d'Europe de l'Ouest, notamment en France, en Allemagne, en Espagne, aux Pays-Bas et en Grande-Bretagne [244]. Des souches produisant OXA-48 ont également été décrites en Afrique Centrale, en Afrique du Sud [245,246] et plus récemment en Europe de l'Est [247], en Russie [248] au Canada, aux États-Unis [58].

OXA-181 diffère d'OXA-48 par la présence de quatre substitutions d'acide-aminés. La première souche a été décrite en 2011, chez un patient transféré d'Inde [249]. Ce variant a été identifié dans plusieurs pays (Grande-Bretagne, Roumanie, Canada, Australie, Japon, Nouvelle-Zélande) mais un lien avec l'Inde est presque systématiquement retrouvé [58]. Les variants OXA-162, OXA-204, et OXA-232 ont été identifiés pour la première fois chez des patients provenant de Turquie, de Tunisie, d'Inde respectivement [38,250,251]. OXA-370 est le variant d'OXA-48 le plus fréquemment isolé au Brésil [252]. Les variants OXA-163 et OXA-405 qui se distinguent par leur capacité d'hydrolyse accrue vis à vis des C3G ont été découverts en Argentine, en et en France.

En quelques années, la distribution de la carbapénèmase OXA-48 et de ses variants est devenue mondiale [79] (Figure 19).

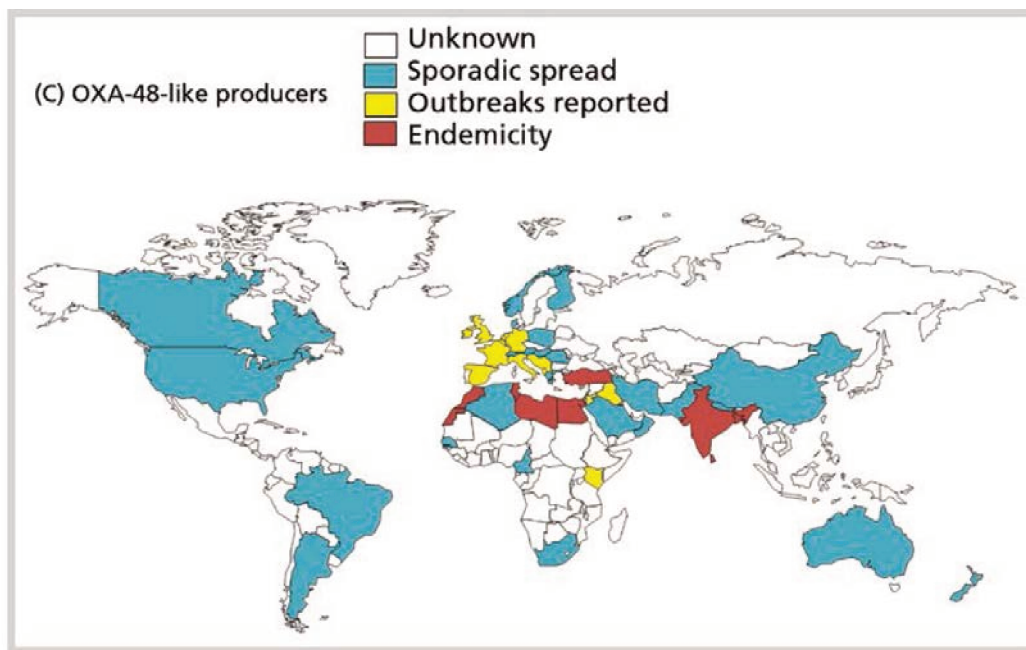


Figure 19. Distribution des entérobactéries produisant une carbapénémase OXA-48-like. D'après Bonomo *et al.* [79].

3. Spectre d'hydrolyse

OXA-48 est une β -lactamase à spectre étroit qui possède la particularité d'hydrolyser fortement toutes les pénicillines et les céphalosporines à spectre étroit. Certaines céphalosporines à large spectre sont très faiblement hydrolysées (céfotaxime et céfépime). OXA-48 hydrolyse également les carbapénèmes (imipénème, méropénème et ertapénème), mais à très faible niveau et avec une efficacité catalytique 100 fois plus forte pour l'imipénème par rapport à l'ertapénème et au méropénème (Tableau 6, Tableau 7).

OXA-181 et OXA-232 possèdent globalement les mêmes propriétés enzymatiques qu'OXA-48, même si OXA-232 semble hydrolyser un peu plus faiblement l'imipénème (Tableau 7, Tableau 8) [62].

Les variants OXA-163 et OXA-405 se distinguent par leur capacité à hydrolyser la ceftazidime, le céfotaxime et l'aztréonam tandis que leur activité vis à vis des carbapénèmes est marginale. Sur l'antibiogramme, le phénotype conféré par ces enzymes semble plus proche des BLSE que des carbapénémases.

Substrat	<i>K_m</i> (μM)			<i>k_{cat}</i> (s ⁻¹)			<i>k_{cat}/K_m</i> (mM ⁻¹ / s ⁻¹)		
	OXA-405	OXA-163	OXA-48	OXA-405	OXA-163	OXA-48	OXA-405	OXA-163	OXA-48
Pénicilline G	18	13	ND	12	23	ND	667	1800	ND
Ampicilline	212	315	395	29	23	955	137	70	2400
Oxacilline	69	90	95	19	34	130	275	370	1400
Temocilline	NH	NH	45	NH	NH	0,3	ND	ND	6,6
Cephalotine	18	10	195	8	3	44	444	300	225
Cefotaxime	369	45	>900	9,7	10	>9	26	230	10
Ceftazidime	>1000	>1000	NH	>0,7	>8	NH	0,7	3	NH
Imipénème	532	520	13	0,1	0,03	4,8	0,2	0,06	370
Meropénème	>2000	>2000	11	>0,1	>0,1	0,07	0,09	0,03	6,2
Ertapénème	88	130	100	0,04	0,05	0,13	0,4	0,3	1,3

Tableau 6. Paramètres cinétiques des variants OXA-163 et OXA-405 comparés à OXA-48

ND : non déterminé

NH : non hydrolysé

Données non publiées.

β-lactamines	CMI (mg/L)						
	TOP10 (pTOPO-OXA-162)	TOP10 (pTOPO-OXA-204)	TOP10 (pTOPO-OXA-181)	TOP10 (pTOPO-OXA-232)	TOP10 (pTOPO-OXA-163)	TOP10 (pTOPO-OXA-48)	TOP10
Pénicilline G	>256	>256	>256	>256	>256	>256	64
Ampicilline	>256	>256	>256	>256	>256	>256	8
Oxacilline	>256	>256	>256	>256	>256	>256	512
Témocilline	>256	256	>256	32	32	>256	8
Céfalotine	32	16	32	64	64	16	8
Céfotaxime	0,5	0,25	1	0,125	16	0,25	0,06
Ceftazidime	0,5	0,5	0,5	1	64	0,25	0,125
Imipénème	2	2	4	1	0,5	2	0,25
Meropénèm	0,5	0,25	0,5	0,25	0,06	0,25	0,06
Ertapénème	0,5	0,5	1	0,5	0,06	0,5	0,01
Doripénème	0,5	0,5	0,5	0,25	0,125	0,5	0,06

Tableau 7. CMIs des transformants *E. coli* TOP10 produisant les variants OXA-162, OXA-204, OXA-181, OXA-232, OXA-163 et OXA-48
D'après Oueslati *et al.* [62]

Substrat	K _m (µg)						K _{cat} (s ⁻¹)						K _{cat} /K _m (mM ⁻¹ /s ⁻¹)					
	48	162	163	181	204	232	48	162	163	181	204	232	48	162	163	181	204	232
Benzyl-pénicilline	ND	35	13	90	90	60	ND	123	23	444	353	125	ND	3400	1800	5000	4100	2100
Ampicilline	400	313	315	170	450	220	955	269	23	218	389	132	2400	830	70	1300	860	600
Oxacilline	95	75	90	80	100	130	130	3	34	90	56	156	1400	40	370	1100	540	1200
Temocilline	45	170	NH	60	75	60	0,3	0,7	NH	0,3	0,5	0,03	6	4	ND	5	7	0,5
Céfalotine	195	180	10	250	270	125	44	12	3	13	12	13	225	70	300	50	45	105
Cefotaxime	>900	310	45	>1000	990	>1000	>9	3	10	>62	12	>6,5	10	10	230	13	12	6
Ceftazidime	NH	NH	>1000	NH	NH	>1000	NH	ND	8	ND	ND	>0,6	NH	ND	3	ND	ND	0,1
Imipénème	13	25	520	13	9	9	4,8	11	0,03	7,5	4	0,2	370	420	0,06	550	420	20
Meropénème	10	80	>2000	70	60	100	0,07	0,1	>0,1	0,1	0,05	0,03	6	1,3	0,03	1,5	0,8	0,3
Ertapénème	100	30	130	100	90	110	0,13	0,3	0,05	0,2	0,1	0,04	1	9	0,3	2	1	0,4
Doripénème	ND	50	NH	55	25	10	ND	0,05	NH	0,04	0,02	0,005	ND	1	NH	0,7	0,8	0,5

Tableau 8. Paramètres cinétiques d'OXA-48 et ses variants OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204 et OXA-232

4. Environnement génétique

Contrairement à d'autres gènes codant pour des oxacillines, classiquement identifiés sous forme de gènes cassettes au sein d'intégrons de classe 1, l'étude de l'environnement génétique du gène *bla_{OXA-48}* a mis en évidence une structure de type transposon de classe 1. Une séquence d'insertion *IS1999* a été identifiée en amont du gène *bla_{OXA-48}* et fournit également au gène *bla_{OXA-48}* des séquences promotrices capables d'assurer son expression [238]. Une seconde séquence *IS1999* encadre le gène *bla_{OXA-48}*, formant ainsi un transposon composite de 4,5 kb, appelé *Tn1999* (Figure 20) [253]. La présence de duplications de séquences de 9 paires de bases de part et d'autre du transposon signe un événement de transposition [253]. Depuis, cinq structures dérivées du *Tn1999* ont été décrites chez les entérobactéries (Figure 20). Parmi les souches OXA-48, l'isoforme *Tn1999.2* est plus fréquemment identifiée par rapport à *Tn1999.1*. Il a été montré que, au sein du transposon *Tn1999.2*, l'insertion de *IS1R* en amont du gène *bla_{OXA-48}* augmente son expression [243].

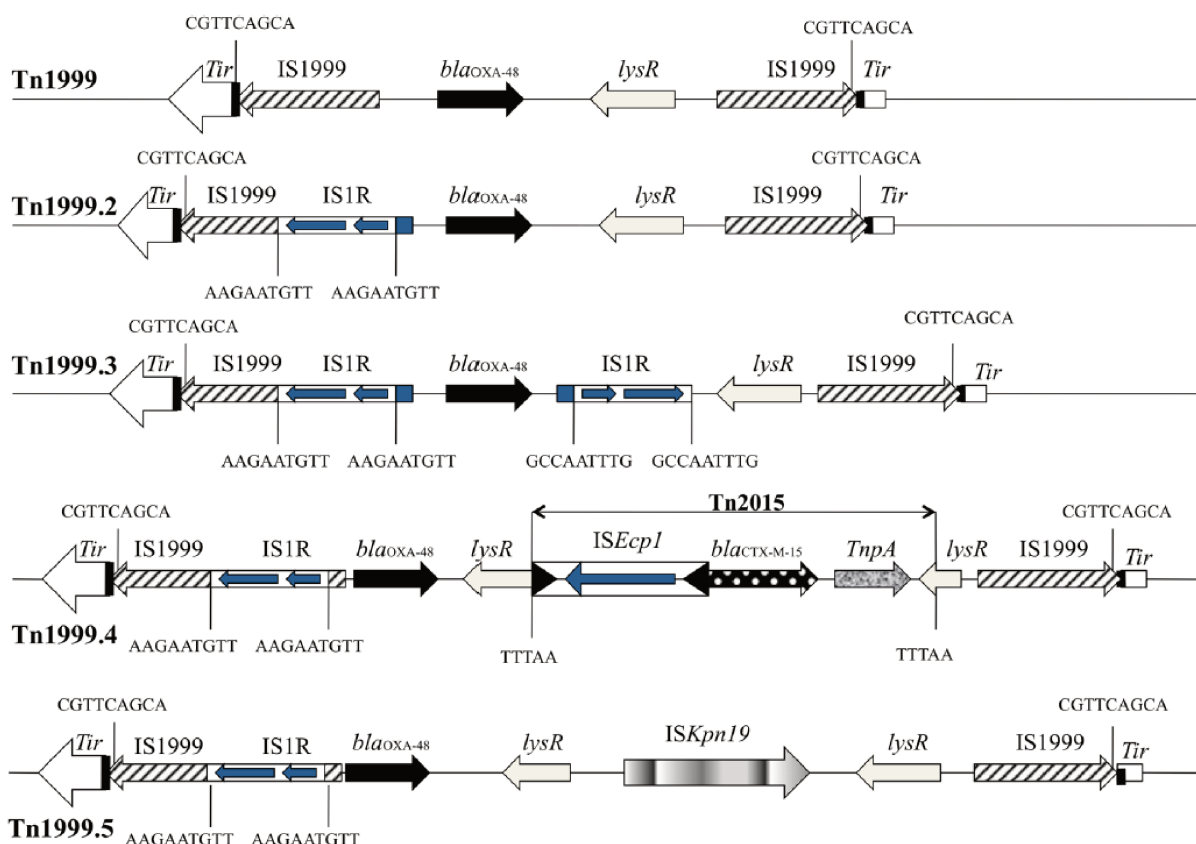


Figure 20. Environnement génétique des transposons *Tn1999*-like portant le gène *bla_{OXA-48}* chez les entérobactéries.

D'après Mairi *et al.* [254].

5. Support génétique

Dans la grande majorité des cas, le gène *bla*_{OXA-48} est porté par des plasmides de type IncL de 62 kb environ, dont le représentant est le plasmide pOXA-48a (61,881 pb). Au sein de ce plasmide, le transposon Tn1999 s'est inséré au sein d'un gène *tir* codant pour une protéine responsable de l'inhibition de transfert du plasmide. L'inactivation de ce gène se traduit par la capacité du plasmide à conjuguer avec une haute fréquence [255] et serait un argument expliquant sa diffusion dans de nombreuses espèces d'entérobactéries [256].

Dans de rares cas, le gène *bla*_{OXA-48} a été retrouvé au niveau chromosomique, principalement chez l'espèce *E. coli*. L'acquisition d'une séquence d'insertion IS1R en amont du gène *bla*_{OXA-48} (formant le Tn1999.2) a généré la formation d'un transposon composite, grâce à une autre copie d'IS1R située environ 21 kb en aval. Ce transposon appelé Tn6237 est capable de s'insérer à différents endroits du chromosome de *E. coli* [257,258].

Le gène *bla*_{OXA-181} est majoritairement associé à des plasmides conjugatifs de type IncT et IncX3, et également à des plasmides non conjugatifs de type ColE. *bla*_{OXA-204} et *bla*_{OXA-370} sont portés par des plasmides de type IncA/C et IncF respectivement [259,260]. De façon intéressante, le gène *bla*_{OXA-181} n'est pas associé au transposon Tn1999 mais à la séquence d'insertion ISEcp1 [261]. Cette IS est impliquée dans la diffusion mondiale des gènes *bla*_{CTX-M} ainsi que de certains variants de CMY [262,263].

6. Origine

De nombreux gènes codant pour des oxacillinases à propriétés de carbapénèmases ont été identifiés au niveau du chromosome des bactéries du genre *Shewanella*, suggérant qu'elles puissent constituer un réservoir de gènes (Tableau 9). Ainsi, *Shewanella oneidensis* MR-1 possède au niveau chromosomique le gène *bla*_{OXA-54}, un variant de *bla*_{OXA-48}. Le gène *bla*_{OXA-55} a été identifié chez *S. algae* et *bla*_{OXA-181} chez *Shewanella xiamenensis*. Des études de métagénomique réalisées sur des prélèvements d'eaux ont permis d'identifier la présence de plusieurs espèces de *Shewanella* ainsi que plusieurs variants d'oxacillinase comme *bla*_{OXA-199}, *bla*_{OXA-252}, *bla*_{OXA-514}, et *bla*_{OXA-515} [264].

Espèces	Variant	Référence
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	<i>bla</i> _{OXA-54}	[265]
<i>Shewanella algae</i>	<i>bla</i> _{OXA-55}	[266]
<i>Shewanella xiamenensis</i>	<i>bla</i> _{OXA-181}	[261]
<i>Shewanella xiamenensis</i>	<i>bla</i> _{OXA-48b}	[267]
<i>Shewanella xiamenensis</i>	<i>bla</i> _{OXA-199}	[268]
<i>Shewanella xiamenensis</i>	<i>bla</i> _{OXA-204}	[267]
<i>Shewanella xiamenensis</i>	<i>bla</i> _{OXA-416}	[269]
<i>Shewanella xiamenensis</i>	<i>bla</i> _{OXA-514}	[264]
<i>Shewanella</i> sp.	<i>bla</i> _{OXA-515}	[264]
<i>Shewanella xiamenensis</i>	<i>bla</i> _{OXA-252}	[264]
<i>Shewanella</i> spp.	<i>bla</i> _{OXA-546} à <i>bla</i> _{OXA-553}	[270]
<i>Shewanella algae</i>	<i>bla</i> _{OXA-666}	Soumission directe à Genbank
<i>Shewanella xiamenensis</i>	<i>bla</i> _{OXA-538}	Soumission directe à Genbank

Tableau 9. Variants oxacillines chromosomiques identifiées chez différentes espèces de *Shewanella* spp.

V. Méthodes de détection des Entérobactéries Productrices de Carbapénèmase (EPC)

1. Méthodes phénotypiques

a. Antibiogramme et concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La production d'une carbapénèmase doit être suspectée dès les premiers résultats de l'antibiogramme lorsque qu'une souche présente une diminution de sensibilité à au moins un des carbapénèmes. Toutefois, les niveaux de résistance aux carbapénèmes des Entérobactéries Productrices de Carbapénèmases (EPC) varient d'une souche à l'autre en fonction de la carbapénèmase produite, ainsi que des autres β -lactamases associées (BLSE, céphalosporinases...) et de l'association de mécanismes non enzymatiques. Les diamètres d'inhibition autour des carbapénèmes peuvent être plus ou moins réduits, et même rester dans la zone de sensibilité pour les enzymes de type OXA-48, les plus fréquemment isolées en France.

Des recommandations nationales sont émises par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) depuis 2015 afin d'aider les laboratoires dans la détection des EPC. Dans ce rapport, l'algorithme de dépistage débute par la détermination de la sensibilité à l'ertapénème, car il s'agit du carbapénème permettant d'obtenir une sensibilité maximale dans le dépistage des souches d'EPC [271]. Ainsi, toute souche

possédant une diminution de sensibilité à l'ertapénème (CMI > 0,5 mg/L ou un diamètre d'inhibition < 25 mm) doit être suspectée comme EPC et faire l'objet de tests complémentaires (Figure 21).

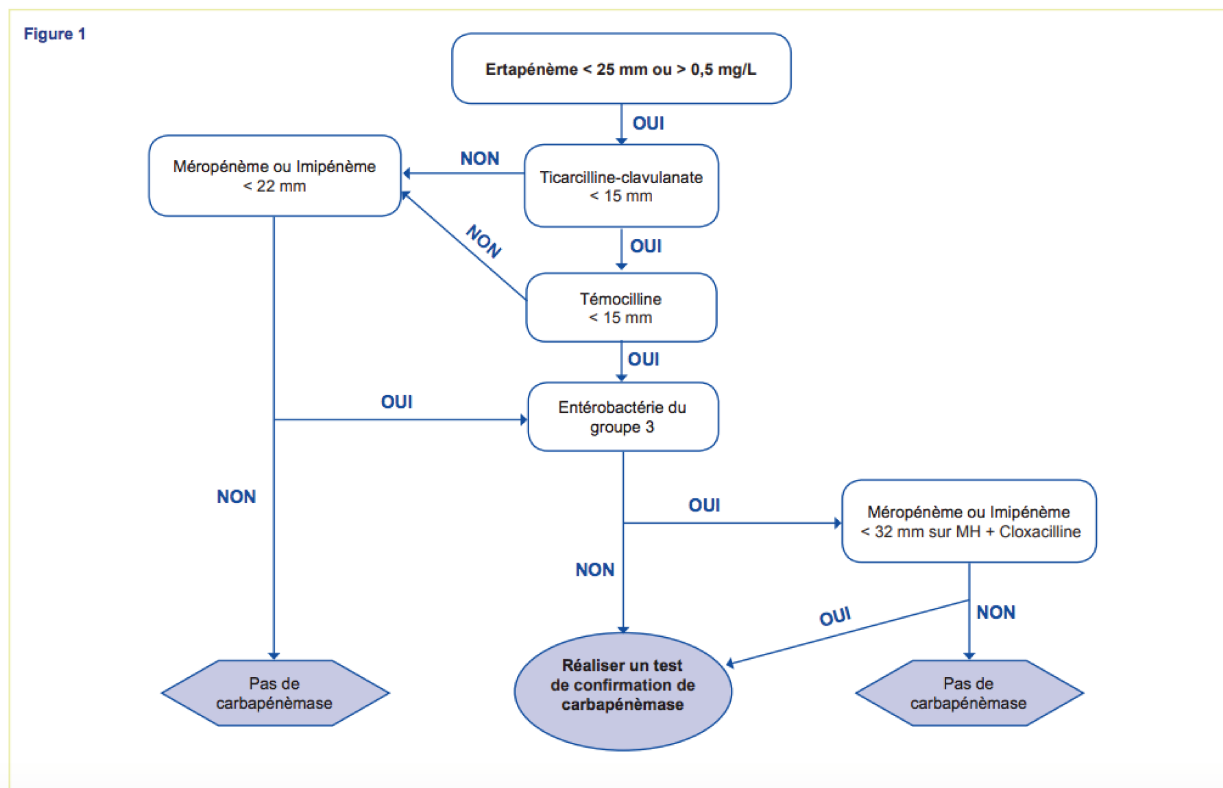


Figure 21. Algorithme phénotypique de criblage des souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases au sein des souches non-sensibles aux carbapénèmes.

Recommandations du CASFM 2018 v2

(http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFMV2_SEPTEMBRE2018.pdf)

Des recommandations européennes (EUCAST) ont récemment introduit la notion de *cut-off* « épidémiologique » ou « screening *cut-off* » à différencier des concentrations critiques cliniques utilisées pour conseiller un traitement antibiotique (Tableau 10). Les valeurs de *cut-offs* optimales sont régulièrement soumises à débat et dépendent de l'épidémiologie locale [272,273]. Des *cut-offs* abaissés permettent d'améliorer la détection des EPC, en particulier celles qui ne présentent phénotypiquement qu'une diminution faible de sensibilité aux carbapénèmes, comme la majorité des souches produisant des enzymes de type OXA-48. En contrepartie, la spécificité est moindre, puisque les CMI des souches associant BLSE et/ou céphalosporinase et/ou imperméabilité dépassent régulièrement ces *cut-offs* épidémiologiques.

Les méthodes en milieu liquide posent également d'importants problèmes de détection, puisqu'elles n'identifient pas certaines souches productrices d'OXA-48 pour lesquelles les CMI des carbapénèmes sont basses [273,274].

	EUCAST 2018	
	<i>Clinical breakpoints S/I (mg/L)</i>	<i>Screening cut-offs (mg/L)</i>
Imipénème	≤2	
Ertapénème	≤0,5	>0,125
Méropénème	≤2	>0,125

Tableau 10. *Breakpoints* cliniques et épidémiologiques proposés par l'EUCAST.

b. Disques combinés ou tests phénotypiques d'inhibition

Des tests phénotypiques basés sur les propriétés inhibitrices de l'acide boronique vis-à-vis des carbapénémases de type KPC, de l'acide dipicolinique ou de l'EDTA vis-à-vis des métallo-β-lactamases et de la cloxacilline vis-à-vis des céphalosporinases ont été commercialisés par différents fabricants [275,276]. Afin de pouvoir détecter également les carbapénémases de type OXA-48, un disque contenant de la témocilline est présent dans certains kits commerciaux. En effet, 90% des souches produisant une carbapénémase de type OXA-48 sont très résistantes à la témocilline (diamètre d'inhibition inférieur à 12 mm pour des disques chargés à 30 µg) [277]. Ce disque est très sensible pour la détection des EPC de type OXA-48 mais sa spécificité est médiocre car d'autres mécanismes peuvent induire une résistance à la témocilline [277]. Les algorithmes utilisant ces disques combinés présentent des bonnes sensibilités et spécificités, sont peu coûteux et ne nécessitent pas de compétences techniques particulières, mais nécessitent une incubation de 18-24h pour être interprétables [79].

c. CIM-test et dérivés

Le *Carbapenem-Inactivation Method* (CIM) test peut être considéré comme un dérivé du test de Hodge, il repose sur l'hydrolyse du méropénème contenu dans un disque chargé à 10 µg pendant 2h par la souche à tester, puis l'étude de la sensibilité d'une souche de *E. coli* sensible ATCC 29522 à ce disque [278]. Si la souche à tester produit une carbapénémase, le méropénème est hydrolysé pendant l'incubation, et la souche de *E. coli* ATCC 29522 poussera au contact du disque. A l'inverse, si la souche à tester ne produit pas de carbapénémase, le méropénème restera actif et une zone d'inhibition sera visible (Figure 22).

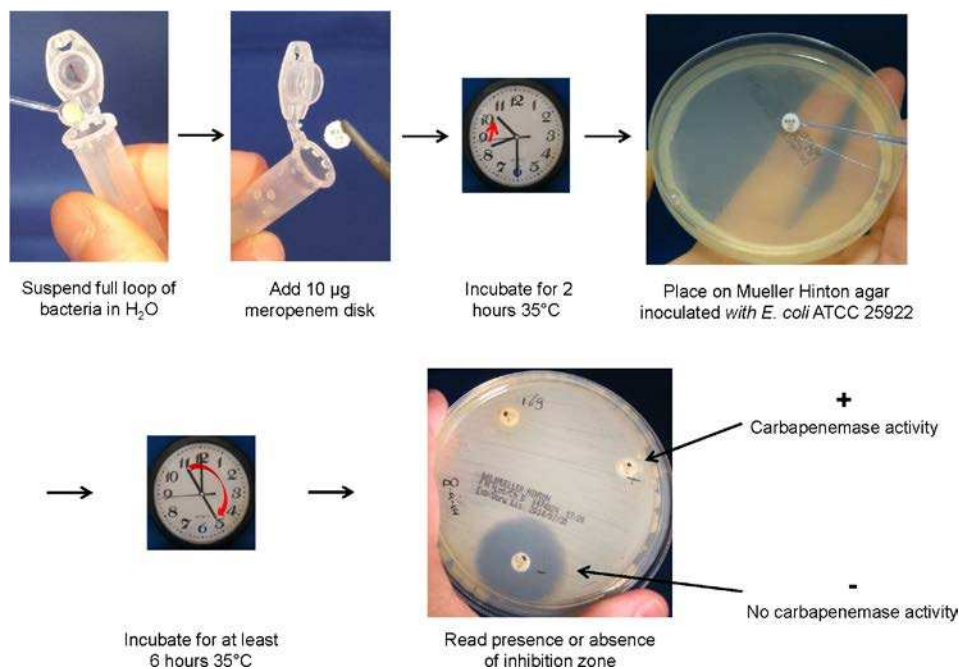


Figure 22. Protocole pour la réalisation du CIM-test.

D'après Van der Zwaluw *et al.* [278].

Le modified-CIM (mCIM) est une version légèrement modifiée du CIM qui permet d'augmenter la sensibilité du test pour la détection des carbapénèmases de type OXA-48, notamment en prolongeant l'incubation du disque de méropénème avec la souche à tester à 4h. Le mCIM a fait l'objet d'une évaluation multicentrique [279], et a été intégré aux recommandations américaines du CLSI (Clinical and Laboratory Standards) pour la détection des EPC avec spécification de diamètres limites.

Le rapid-CIM (rCIM) repose également sur l'hydrolyse du méropénème contenu dans 2 disques chargés à 10µg [280]. Après libération de l'antibiotique dans la suspension bactérienne par agitation forte, c'est l'activité du surnageant qui est testée vis à vis d'une suspension de *E. coli* sensible ATCC 29522 avec une turbidité mesurée à 1 MacFarland (Figure 23). Si la bactérie testée produit une carbapénémase, le méropénème est hydrolysé et on observe une croissance de la souche ATCC (Δ DO en 2h > 1 MacFarland). A l'inverse, si la bactérie testée ne produit pas de carbapénémase, le méropénème présent dans le surnageant reste actif et inhibe la croissance de la souche ATCC (Δ DO en 2h < 0,5 McF). L'avantage principal du rCIM est la détection rapide de la croissance de la souche *E. coli* ATCC ou de son inhibition en 2h. A l'inverse de l'ensemble des autres techniques

phénotypiques, le rCIM ne nécessite pas d'incubation d'une durée de 18-24h supplémentaires.

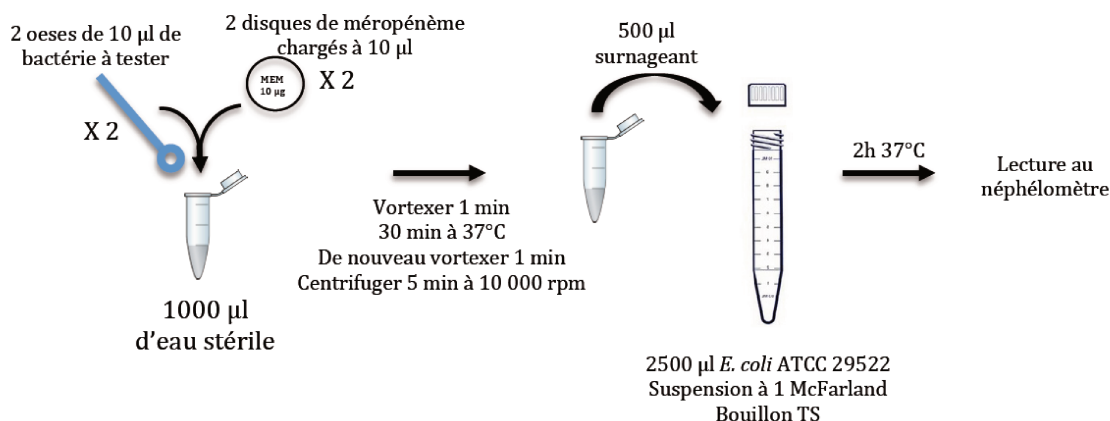


Figure 23. Protocole pour la réalisation du rCIM.

La bactérie à tester est suspendue dans 1 ml d'eau contenant 2 disques de méropénème. Après une incubation de 30 min, le surnageant de cette suspension est mélangé à 2,5 ml d'une solution de *E. coli* sauvage ATCC 29522 (1 McFarland). Si la bactérie produit une carbapénémase, le méropénème a été préalablement hydrolysé, une croissance de la souche sauvage de *E. coli* ATCC est détectable en 2h par le néphélomètre.

2. Tests d'hydrolyse

a. Tests colorimétriques

Le CarbaNP test est une technique biochimique colorimétrique de diagnostic rapide d'une activité carbapénémase [275]. Son principe repose sur la mise en évidence d'une acidification du milieu lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénémase. L'indicateur de pH change de couleur (du rouge au jaune) lorsque le milieu devient acide, traduisant la présence d'une carbapénémase. Ce test est capable de détecter l'ensemble des enzymes possédant une activité carbapénémase sans restriction de classe. Il possède une excellente spécificité. Sa sensibilité varie de 90% à 100% selon les études ; un défaut de sensibilité a été rapporté pour certains variants de type OXA-48 et certains variants GES pour lesquels l'activité carbapénémase est faible [281–283].

Le β -CARBA test est également un test colorimétrique de détection rapide d'une activité carbapénémase basé sur l'hydrolyse d'un substrat, une β -lactamine chromogénique dont

l'identité reste inconnue. Les avantages de ce test sont sa grande facilité d'utilisation et d'interprétation. L'inconvénient principal est l'absence de détection de certaines enzymes de classe A non-KPC, comme IMI, SME et FRI, très minoritaires en France, et de certains variants d'OXA-48 [282].

b. Identification d'une activité carbapénèmase par spectrométrie de masse

Cette technique repose sur la détection d'un carbapénème et de son éventuel produit de dégradation par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Plusieurs techniques « maison » ont été développées, mais une seule est actuellement commercialisée : MBT STAR®-Carba IVD Kit (Bruker Daltonics) [284–286]. Ces techniques présentent de très bonnes sensibilités et spécificités mais nécessitent une mise au point fine, du personnel particulièrement formé et un spectromètre de masse avec système ouvert [79].

La spectrométrie de masse a également été utilisée pour détecter les souches produisant spécifiquement la carbapénèmase KPC [287]. En effet, sur les spectres utilisés pour l'identification de la bactérie, un pic situé à 11,109 Da est présent uniquement chez les souches produisant cette carbapénèmase [287,288]. Ce pic correspond à une protéine hypothétique appelée p019, dont le gène est localisé sur le plasmide pKpQIL, en aval du site d'insertion du Tn4401a. Il est cependant nécessaire d'indiquer que ce gène est absent des plasmides portant les autres isoformes du Tn4401 ou les structures de type NTE_{KPC}. p019 est présent dans 97,8% des génomes possédant Tn4401a [288]. Par son manque de sensibilité vis à vis de l'ensemble des structures génétiques portant *bla*_{KPC}, cette technique ne peut donc pas être utilisée pour le diagnostic des EPC dans des zones à faible prévalence en KPC mais son intérêt réside principalement dans le suivi d'épidémies après caractérisation génétique de la souche incriminée [141].

3. Tests immunochromatographiques

Récemment, plusieurs tests immunochromatographiques ont été mis sur le marché pour la détection des principales carbapénèmases circulant en France. Les premiers tests étaient unitaires, et permettaient la détection des carbapénèmases de type OXA-48 ou KPC [281,289]. Rapidement, des tests multiplexés ont été commercialisés pour la détection de 3 types de carbapénèmase (RESIST-3 O.K.N (CORIS Bioconcept) pour la détection d'OXA-48-like/KPC/NDM puis de 4 carbapénèmases avec RESIST-4 O.K.N.V (CORIS Bioconcept)

permettant la détection de VIM en plus [290]. Enfin, le kit NG-Test CARBA 5 (NG Biotech) est capable de détecter les enzymes de type OXA-48-like/KPC/NDM/VIM et IMP [291,292]. Ces tests présentent d'excellentes sensibilités et spécificités. Leur intérêt majeur est leur facilité d'utilisation et l'obtention d'un résultat rapide (15 min) sans difficulté d'interprétation.

4. Techniques moléculaires

De nombreuses techniques moléculaires reposant sur la réaction de PCR ont été commercialisées afin de détecter les principaux gènes codant les carbapénèmases (OXA-48-like, NDM, VIM, KPC) à partir de colonies obtenues en culture [293,294] pour certains kits directement à partir d'un prélèvement de dépistage rectal (Xpert CARBA-R, Check-Direct CPE) [295,296]. Cette détection à partir de prélèvements cliniques est un avantage majeur, en permettant de gagner 24h à 48h dans l'identification d'un porteur d'EPC dans certains cas.

Les techniques de biologie moléculaire sont souvent considérées comme le gold-standard pour l'identification précise des mécanismes de résistance aux carbapénèmes. Elles nécessitent toutefois un équipement coûteux souvent réservé aux laboratoires spécialisés et ne permettent de détecter que des gènes connus. Ceci est une limite bien connue des tests de détection basés sur la PCR.

VI. Données cliniques

1. Facteurs de risque d'acquisition des EPC

Les infections associées aux EPC ne sont pas spécifiques et sont majoritairement associées aux soins. Dans la majorité des cas, une étape de colonisation digestive précède l'infection. En étudiant une cohorte de 1806 patients colonisés par une EPC à l'admission, Tischendorf et al. ont montré qu'une infection survenait chez 16,5% d'entre eux [297]. En France, des mesures d'hygiène hospitalière drastiques sont donc mises en place dès qu'un patient est identifié comme « porteur » d'une EPC. Ce sont ces porteurs asymptomatiques qui contribuent le plus à la diffusion des bactéries hautement résistantes.

Les facteurs de risque d'acquisition d'une EPC sont principalement l'usage préalable d'antibiotiques, la prise en charge dans une structure de soins, l'existence de comorbidités

chroniques et la présence de matériel invasif comme les cathéters [298,299]. Un point crucial dans l'implantation des bactéries hautement résistantes semble être la perturbation de l'équilibre du microbiote digestif [298]. Par ailleurs, la notion de voyage dans un pays où la diffusion des EPC est endémique est également un facteur important d'acquisition et de diffusion des EPC au niveau mondial [300–302]. Le rapatriement sanitaire d'un patient provenant d'un hôpital étranger doit conduire à la mise en place de mesures d'hygiène avant même l'obtention des résultats des dépistages rectaux. Cependant, le nombre de cas d'acquisition d'EPC sans lien avec l'hôpital augmente progressivement, principalement en Inde [303]. Ce constat n'est pas étonnant car un nombre croissant d'études rapporte la présence de carbapénèmases dans l'environnement comme notamment en Inde [199], en Algérie [304], au Maroc [305], au Liban [306], en Italie [307], en Chine [308] et au Brésil [309].

2. Devenir des patients infectés

La mortalité associée aux bactériémies dues à des Entérobactéries Résistantes aux Carbapénèmes (ERC) varie entre 20 et 70% selon les études [310–314]. Cependant, le mécanisme de résistance aux carbapénèmes n'y est pas toujours clairement identifié. Récemment, une étude a montré que la probabilité de décès était 4 fois supérieure chez les patients infectés par une EPC comparés aux patients infectés par des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes par un autre mécanisme [314]. Dans cette cohorte, les EPC (majoritairement des souches produisant KPC) possédaient des CMI aux carbapénèmes plus élevées que les ERC non carbapénémase, et les co-résistances à d'autres familles d'antibiotiques (aminosides, fluoroquinolones, tigécycline, colistine) étaient également plus fréquentes. Par ailleurs, il a été montré que parmi les infections dues à des souches produisant KPC, la survie des patients était moins bonne lorsque les souches possédaient des CMI à l'imipénème ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ en comparaison au groupe de patients dont les souches possédaient des CMI ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ [315]. L'absence de molécules antibiotiques efficaces semble donc être responsable de cette surmortalité. Certains schémas thérapeutiques basés sur la combinaison de plusieurs antibiotiques efficaces sont associés à un meilleur pronostic [315] (cf : paragraphe Traitement des infections dues à des EPC, page 73).

3. Devenir des patients colonisés

Il existe peu de données sur le devenir à long-terme des patients porteurs d'EPC. Certaines études rapportent qu'une partie des cohortes de patients peut se décoloniser spontanément après 6 mois de portage, tandis que certains patients restent porteurs encore plusieurs années après l'acquisition [316–318]. Certains facteurs de risque ont été associés à l'absence de décolonisation comme les fréquentes ré-hospitalisations [316,318], l'usage de cathéters invasifs [317] et la présence d'EPC dans les prélèvements cliniques [316]. Une étude a montré que la probabilité de décolonisation était supérieure pour les porteurs de NDM que pour les porteurs de KPC [319]. Lorsque le suivi porte sur des voyageurs sains, sans notion d'hospitalisation, la probabilité de décolonisation semble plus importante, et parfois inférieure à 1 mois [302].

Cependant, il est difficile de comparer les études entre elles, car les modalités de suivis diffèrent [320]. Le nombre de prélèvements à effectuer et leur chronologie, les techniques à utiliser ne sont pas clairement établies (biologie moléculaire, étape d'enrichissement...). La plupart des études arrêtent le suivi après 12 mois. Il est très important de différencier la décolonisation et un portage sous le seuil de détection [321]. En effet, le manque de sensibilité de certaines méthodes pour le suivi du portage peut mener à de faux négatifs. Il est également probable que bien qu'elles soient en quantité inférieure au seuil de détection, un seul traitement antibiotique puisse sélectionner à nouveau ces EPC.

4. Traitement des infections dues à des EPC

a. Anciennes molécules

Le nombre croissant d'infections causées par des EPC a entraîné un regain d'intérêt pour des anciennes molécules antibiotiques, comme la fosfomycine, et la colistine, délaissée pour des raisons de toxicité. Les aminosides, pour des bactéries « sensibles » sur l'antibiogramme, peuvent être utilisés en monothérapie, notamment pour le traitement des infections urinaires.

La plupart des études évaluant les traitements des infections dues à des EPC concernent des infections par des souches produisant KPC. Elles ont évalué l'efficacité de quelques molécules antibiotiques actives, souvent en association les unes avec les autres : (i) colistine + carbapénème, (ii) colistine + tigécycline, (iii) colistine + fosfomycine, (iv) association de 2 carbapénèmes, ou encore (v) association de 3 molécules parmi cette liste. Les associations

de 2 molécules actives ou plus (notamment celles comprenant un carbapénème) sont associées à une meilleure survie dans plusieurs études [79,322,323]. L'association de 2 carbapénèmes repose sur le fait que l'ertapénème pourrait servir de substrat « suicide » vis à vis de la carbapénémase, permettant à l'imipénème ou au méropénème d'interagir avec leur cible bactérienne [324–326].

Dans le traitement des bactériémies, c'est l'association d'un carbapénème avec la colistine qui est favorisée, en raison d'une action synergique possible [327] alors que les taux plasmatiques obtenus lors d'un traitement par tigécycline sont insuffisants en raison d'une très forte diffusion de la molécule dans les tissus.

Cependant, l'utilisation de la colistine à large échelle dans des pays comme la Grèce a conduit à la sélection de souches résistantes à cet antibiotique, par l'apparition de mutations chromosomique dans les gènes impliqués dans la cascade de synthèse du LPS bactérien. En 2017, 14% des souches des souches de *K. pneumoniae* produisant KPC étaient résistantes à la colistine [328].

L'efficacité des carbapénèmes dans le traitement des infections impliquant des souches OXA-48, pour lesquelles les CMI des carbapénèmes sont basses, est controversée. En effet, Maherault *et al.* ont rapporté un cas de bactériémie impliquant une souche de *K. pneumoniae* OXA-48 (sensible aux carbapénèmes) efficacement traitée par imipénème [329]. Cependant, l'efficacité des carbapénèmes est contestée puisque plusieurs échecs thérapeutiques ont aussi été rapportés [243,330].

En théorie, la ceftazidime pourrait être utilisée dans le traitement des infections dues à des souches productrices de OXA-48 mais ne produisant pas de BLSE, puisque la ceftazidime n'est pas hydrolysée par la β -lactamase OXA-48 [331]. Cependant, malgré ces données obtenues dans un modèle de souris, très peu de données cliniques chez l'homme confirment leur efficacité.

De la même façon, l'aztréonam pourrait être utilisé dans le traitement des infections dues à des MBL. Cependant, il est fréquent qu'une BLSE et/ou une céphalosporinase soit également présente dans ces souches, rendant l'aztréonam inutilisable. Les situations d'impasses thérapeutiques sont fréquentes face des souches produisant des MBL.

b. Avibactam

Un nouvel inhibiteur de β -lactamase, l'avibactam (anciennement NXL104) a été mis sur le marché en France en 2016, en association avec la ceftazidime, sous le nom de Zavicefta (CZA). L'autorisation de mise sur le marché a été obtenue dans le traitement des infections intra-abdominales compliquées et des infections urinaires compliquées dont les pyélonéphrites aiguës et des pneumonies nosocomiales.

Le Zavicefta est actif *in vitro* vis-à-vis de larges collections de souches d'entérobactéries et de *P. aeruginosa* produisant des enzymes de classe A (BLSE, carbapénèmases dont KPC), de classe C mais également de classe D comme OXA-48 [332–335] et les souches résistantes sont principalement productrices de MBL. Son activité sur des souches de *K. pneumoniae* produisant KPC a également été démontrée, mais quelques mécanismes de résistance ont déjà été décrits, incluant la production de plusieurs types de carbapénèmases, la surexpression de pompes d'efflux et la diminution de l'expression de certaines porines [336–338]. Ce sont les souches productrices de KPC-3 qui sont majoritairement concernées par la résistance au CZA. Les mutations touchant la boucle Ω de KPC, et notamment la mutation D179Y, sont le plus souvent retrouvées chez les souches résistantes [339,340]. Ces mutations ont pour effet d'augmenter l'affinité de KPC pour la ceftazidime et de réduire celle pour l'inhibiteur [341]. Étonnamment, les souches devenues résistantes au CZA ont une sensibilité parfois totalement restaurée pour le méropénème [342]. Cependant, l'exposition au méropénème de telles souches semble aboutir rapidement *in vitro* à la sélection d'isolats résistants à l'ensemble des β -lactamines [343,344].

Globalement, le taux de succès thérapeutique varie entre 45 et 74% des cas, mais des rechutes peuvent se produire dans 23%, et la résistance au Zavicefta peut se produire après quelques jours de traitement [336].

Plusieurs études cliniques de phase III ont montré la non-infériorité du Zavicefta en comparaison à un traitement par un carbapénème ou par l'association pipéracilline-tazobactam [336]. Cependant, ces études ne comportaient pas de patients infectés par des EPC et les données manquent encore pour évaluer l'efficacité clinique de cette combinaison sur cette population. Dans un centre aux Etats-Unis, l'utilisation du Zavicefta, dans le traitement de bactériémies dues à *K. pneumoniae* KPC était associée un meilleur taux de succès ($p= 0,006$) et de survie ($p= 0,01$) que les autres traitements utilisant un carbapénème et un aminoside ($p= 0,04$) ou un carbapénème et la colistine ($p = 0,004$).

C. Support génétique des β -lactamases transférables ou acquises

Les gènes codant pour les β -lactamases peuvent être localisés sur le chromosome bactérien ou sur des plasmides. Dans le premier cas, la résistance est généralement stable et transmise à la descendance de la bactérie (transfert vertical). Dans le cas des plasmides, la résistance peut être transmise de façon horizontale, d'une souche à une autre, appartenant ou non à la même espèce, selon le spectre d'hôtes du plasmide.

De plus, ces gènes peuvent être situés sur des éléments génétiques mobiles chromosomiques ou plasmidiques contenant des systèmes de capture de gènes. Ces systèmes sont à l'origine de la dissémination de certains gènes de résistance au sein des différentes espèces bactériennes.

I. Les plasmides

Les plasmides sont des molécules d'ADN double brin, le plus souvent circulaires, de tailles variables, capables de répllication autonome et transmissibles à la descendance et par transfert horizontal. Le nombre de copies du plasmide au sein d'une souche varie en fonction de la régulation de la répllication par des systèmes de contrôle stricts.

La classification des plasmides est basée sur les mécanismes inhérents à la répllication et au contrôle de celle-ci, qui sont étroitement liés à la stabilité des plasmides dans les cellules. On parle ainsi d'incompatibilité : les plasmides d'un même groupe d'incompatibilité utilisent les mêmes contrôles génétiques lors de la répllication et ne peuvent coexister de façon stable au sein d'une même bactérie [345]. Une trentaine de groupes d'incompatibilité ont été identifiés chez les entérobactéries par les techniques de typage par PCR (PCR-based replicon typing ou PBRT) ciblant soit le gène de la réplicase soit les itérons, courtes séquences d'ADN impliquées dans la régulation de répllication [346]. Certains sont particulièrement associés à la résistance aux antibiotiques, notamment les plasmides de type IncF, IncA/C, IncL/M, IncI1, IncH, et IncN [347]. Depuis, l'avènement du séquençage haut débit a permis d'augmenter considérablement le nombre de plasmides totalement séquencés, et le nombre de réplicons associés. Actuellement, la base de données PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) permet d'identifier plus de 120 réplicons à partir des données de séquençage [348].

Une autre caractéristique des plasmides est leur capacité à être transférés par conjugaison ou non. Les plasmides conjugatifs, généralement de grande taille, peuvent se transmettre horizontalement entre bactéries. Chez les bacilles à Gram négatif, la conjugaison est sous la dépendance de l'opéron *tra* qui commande la synthèse de *pili* « sexuels » formant un pont cytoplasmique entre la bactérie donneuse et la bactérie réceptrice. D'autres fonctions sont impliquées dans la diffusion des plasmides et leur stabilité. Les systèmes de partition sont impliqués dans la répartition du plasmide lors de la division cellulaire et permettent un maintien du plasmide [349]. La présence de systèmes d'addiction tels que les systèmes toxine/antitoxine joue également un rôle dans le maintien des plasmides dans la population bactérienne [350]. Ces systèmes possèdent des caractéristiques structurales variées mais sont basés sur le même principe : coder une toxine stable et une antitoxine plus labile. Si le plasmide est perdu, l'antitoxine est rapidement dégradée et la bactérie meurt sous l'effet de la toxine persistante [350].

Les plasmides sont impliqués dans l'acquisition de mécanismes de résistance aux antibiotiques, de facteurs de pathogénicité et de nouvelles propriétés métaboliques.

II. Les éléments transposables

Les éléments transposables sont des séquences d'ADN capables de promouvoir leur translocation d'un site à un autre, qu'il soit localisé sur une même molécule d'ADN ou non. Ils doivent s'intégrer dans un réplicon pour être dupliqués avec lui. À la différence de la recombinaison classique, la transposition s'effectue en l'absence d'homologie génétique entre l'élément transposable et la molécule d'ADN cible. Elle conduit à l'insertion d'un élément génétique transposable dans l'ADN cible; il y a donc addition et non échange de matériel génétique.

Les éléments transposables bactériens impliqués dans la résistance aux antibiotiques comprennent essentiellement les séquences d'insertion et les transposons.

1. Les séquences d'insertion

a. Généralités

Les séquences d'insertion (IS) sont des fragments d'ADN de taille variable mais généralement inférieure à 2,5 kb. Elles possèdent une organisation génétique simple et sont

capables de s'exciser et de s'insérer à différents endroits dans une séquence d'ADN cible. Leur séquence code pour une transposase qui contribue à la mobilité de l'élément ainsi qu'à son intégration au sein de la séquence cible [351]. Il existe actuellement plusieurs milliers de séquences déposées sur la base de données ISFinder (<http://www-is.biotoul.fr>) [352]. Les IS identifiées chez les procaryotes sont regroupées en une vingtaine de familles. Elles sont classées en fonction des similarités dans leur organisation génétique, des homologies de séquence de leur transposase, de leurs séquences répétées inversées, des duplications de site générées et de leur fréquence de transposition [351]. Les IS peuvent être présentes en une ou plusieurs copies sur le chromosome bactérien mais aussi sur des plasmides.

b. Structure

Les IS ne codent généralement pour aucune autre fonction que celles qui permettent leur mobilisation.

i. Transposase

La transposase est la protéine indispensable pour la mobilisation de la séquence d'insertion. La protéine est codée par une ou deux phases ouvertes de lecture occupant la quasi-totalité de la séquence de l'IS. La transposase possède deux domaines fonctionnels. Le premier est impliqué dans l'activité catalytique et se situe dans le domaine C terminal de la protéine, alors que l'extrémité N terminale assure la reconnaissance de certains domaines de l'ADN. Le domaine catalytique possède une triade catalytique DDE très conservée parmi les IS et qui joue un rôle important dans les réactions de transposition [351].

ii. Séquences inversées répétées

Les IS sont délimitées par des séquences inversées répétées (IR) plus ou moins parfaites de 5 à 40 pb appelées « *Inverted Repeat Left* (IRL) et *Inverted Repeat Right* (IRR) ». Ces séquences sont indispensables pour la transposition et sont constituées de deux domaines fonctionnels : le premier correspond aux 2-3 dernières paires de bases et est reconnu lors de l'étape de clivage médiée par la transposase alors que le second est impliqué dans la fixation de la transposase se trouvant à l'intérieur des séquences inversées répétées (Figure 24) [351,353].

iii. Séquences en répétition directe

Ces séquences en répétition directe, également nommées *Direct Repeat* (DR) ou *Target Site Duplication* (TSD), sont générées par les IS lors de leur insertion. Ces DR représentent une duplication du site d'insertion formant, aux extrémités de l'IS, deux séquences en répétition directe. Les DR sont de taille variable (entre 2 et 15 paires de bases). La duplication de site d'insertion est une signature d'un événement de transposition (Figure 24). Cependant, en fonction du type de transposase, certaines IS ne font pas de DR lors d'un événement de transposition. Cela dépend du mécanisme de clivage de l'ADN.

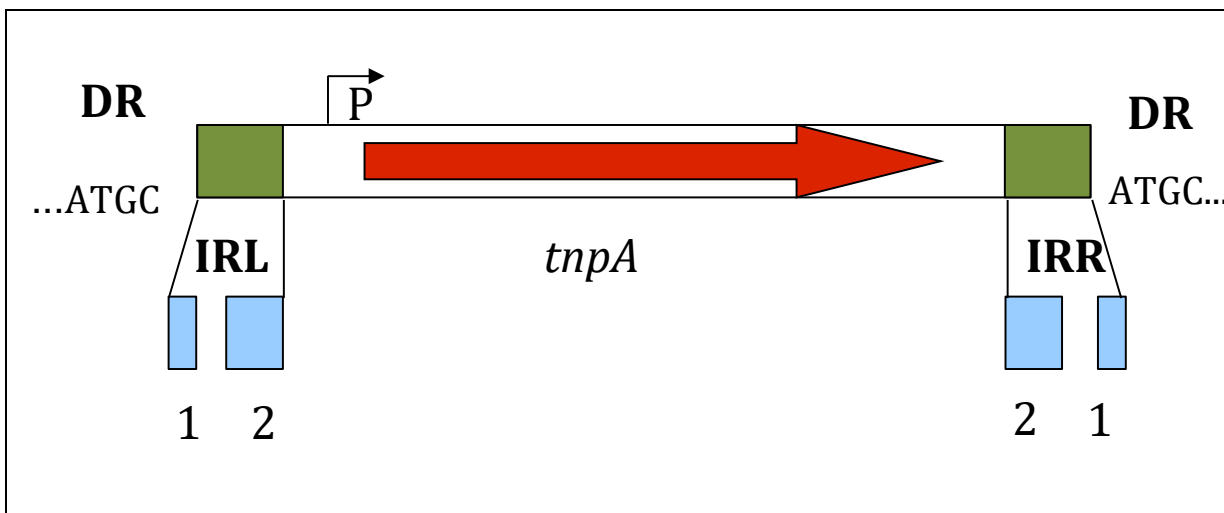


Figure 24. Organisation générale d'une séquence d'insertion.

La flèche rouge représente le gène *tnpA* codant la transposase. Les boîtes vertes représentent les séquences répétées inversées gauche (IRL) et droite (IRR) (inverted repeat right and left). Les séquences nucléotidiques ATGC correspondent à des exemples de séquences répétées direct (DR). Les boîtes 1 représentent les dernières bases impliquées dans le clivage et transfert des brins. Les boîtes 2 représentent les bases impliquées dans la reconnaissance de la séquence d'insertion par la transposase. La flèche P indique le promoteur et le site de fixation du ribosome.

c. Les différents modes de transposition

Tandis que l'initiation de la transposition se fait par transfert de brins aux extrémités 3' de l'IS, le devenir de la réaction est gouverné par le clivage aux extrémités 5' de l'élément [354]. Il existe plusieurs modes de transposition :

- La transposition répllicative (dite copier-coller)
- La transposition non-répllicative (dite couper-coller)
- La transposition *one-ended*
- La transposition par cercle roulant.

i. Transposition réplivative

Si le clivage en 5' se produit après le transfert de brin en 3', le donneur et la molécule cible seront liés de façon covalente. Pendant que le transfert de brin en 3' joint le transposon à une cible, une extrémité 3'OH est libérée dans la molécule cible au niveau de la jonction. Celle-ci peut servir d'amorce pour la réplication de l'élément par les fonctions de l'hôte et génère des cointégrats où le donneur et la molécule cible sont séparés par une copie du transposon en répétition directe à chaque jonction (Figure 25). Au cours de la réaction, l'élément est dupliqué, de sorte que l'entité transposée soit une copie de l'élément original. Une copie demeure au site d'origine, tandis que l'autre est insérée dans un nouveau site. La transposition réplivative s'accompagne donc d'une augmentation du nombre de copies du transposon et implique deux types d'activités enzymatiques : une transposase qui agit sur les extrémités du transposon d'origine et une résolvase qui agit sur les copies dupliquées.

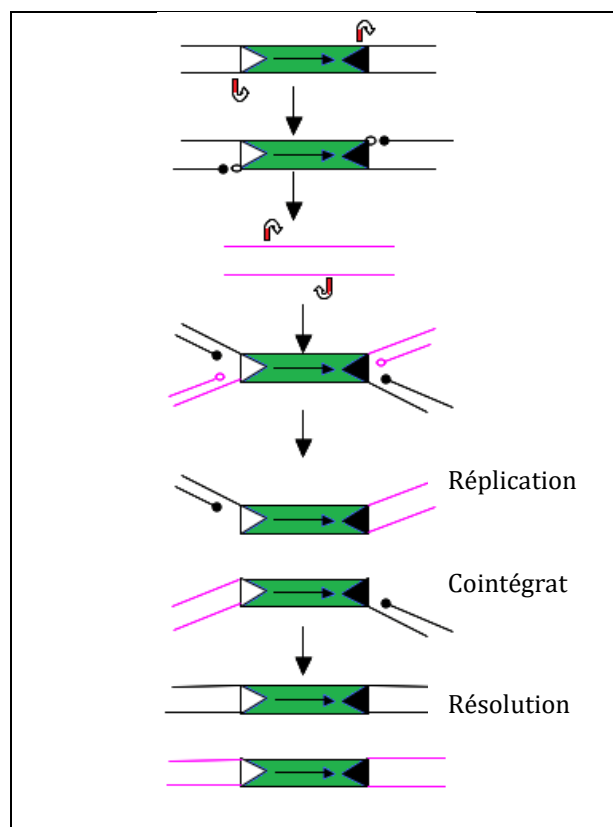


Figure 25. Représentation schématique simplifiée de la transposition réplivative.

Les flèches courbes indiquent les clivages catalysés par la transposase. Les extrémités 3'OH et 5'P sont symbolisés par un rond blanc et un rond noir, respectivement. La transposition réplivative crée une copie de l'IS suite à la réplication, entraînant la formation d'un cointégrat. Après résolution du cointégrat, une copie de l'IS est insérée dans le site receveur (rose). L'autre reste au niveau du site donneur.

ii. Transposition non réplivative

Si le clivage aux extrémités 5' a lieu en même temps que le clivage en 3', le transposon est physiquement séparé du site donneur. Le transfert de brin au niveau de la cible résulte en une insertion directe de l'élément (Figure 26). On parle d'une transposition de type couper-coller. Le clivage double brin à chaque extrémité du transposon empêche ainsi toute transposition de type répliatif. L'élément transposé se déplace donc directement d'un site à un autre, il est conservé. Cependant en se dégageant de l'ADN donneur, l'IS, ou le transposon, laisse généralement une coupure qui peut être létale si elle n'est pas réparée.

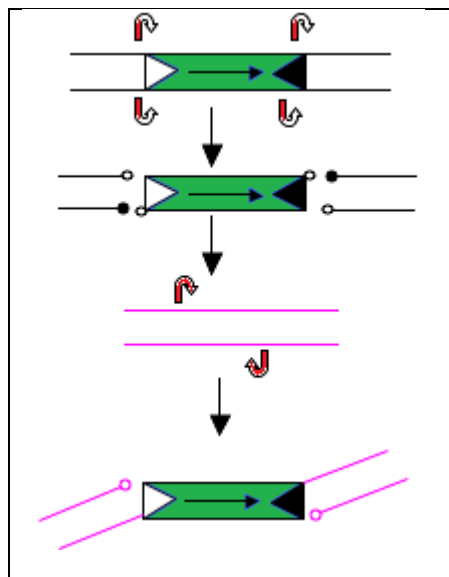


Figure 26. Représentation schématique simplifiée de la transposition non réplivative.

Ce mécanisme permet à une IS de se déplacer sous la forme d'une entité physique, d'un site donneur (noir) à un site receveur (rose).

iii. Transposition one-ended

Ce mode de transposition est propre à certaines séquences d'insertion comme *ISEcp1*, *IS1247* ou encore *IS911* [355–357]. Une seule copie de ces IS mobiliserait les séquences situées à son extrémité droite, ce qui est considéré comme un procédé de transposition *one-ended* car une seule copie de l'IS est requise. Généralement, ces IS ont également une séquence inversée droite (IRR) imparfaite. Ceci a pour conséquence une mauvaise reconnaissance de cette IRR et la reconnaissance d'autres séquences situées en aval présentant une certaine homologie avec l'IRR. Dans ces cas, l'ensemble des éléments génétiques situés entre l'IS et la séquence ressemblant à l'IRR seront mobilisés [355].

ISEcp1 appartient à la famille IS1380 (<http://www-is.biotoul.fr/>). L'analyse de séquences variables séparant *ISEcp1* du codon d'initiation de plusieurs gènes de β -lactamases a permis de déterminer les séquences inversées répétées de cette IS. *ISEcp1* possède deux IR imparfaites de 14 pb, dont 12 sont complémentaires, et un gène codant pour une transposase de 420 acides aminés. L'insertion d'un transposon constitué d'*ISEcp1*, de séquences génétiques variables et d'une séquence faisant office de séquence inversée répétée droite génère une duplication du site d'insertion de 5 pb, toujours riche en AT [355]. Il a été montré que *ISEcp1* était capable de mobiliser *in vitro* le gène chromosomique *bla*_{CTX-M-2} à partir de son réservoir, *Kluyvera ascorbata*, vers une localisation plasmidique dans *E. coli* [358]. *ISEcp1* a été décrite en association à un grand nombre de β -lactamases comme les BLSE de type CTX-M [263,359–361] ou les céphalosporinases plasmidiques de type CMY ou ACC [262,362,363].

iv. Transposition en cercle roulant

Ce type de transposition est très différent des mécanismes cités précédemment. La transposase forme une boucle entre les régions nommées *oriIS* et *terIS* situées respectivement en aval et en amont de l'IS. La région *oriIS* constitue l'origine de réplication et la région *terIS*, la terminaison de réplication. Ces séquences d'insertion transposent selon un mécanisme dit de « cercle roulant ». Dans certains cas, la transposase reconnaît une séquence alternative comme *terIS* et emporte la séquence d'ADN adjacente [68].

d. Les séquences d'insertion « common region » : ISCR

Les ISCR appartiennent à la famille IS91. Leur mécanisme d'action diffère de celui des IS classiques. Elles n'ont pas de séquences répétées inversées ni de séquences en répétition directe. L'activité de la transposase est basée sur un résidu tyrosine et non sur le motif DDE classique des transposases. Leur mécanisme de transposition correspondrait à celle du cercle-roulant. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucune preuve expérimentale, mais un nombre croissant d'études rapporte la présence d'ISCR adjacentes à des gènes de résistance, renforçant l'hypothèse selon laquelle ces éléments permettent l'acquisition de résistance par mobilisation de gènes [364]. Par ailleurs, certaines ISCR, telles que *ISCR1* et *ISCR4*, apportent un promoteur fort pour l'expression des gènes situés en aval [68,365]. Il a aussi été

démontré expérimentalement que le gène codant la β -lactamase TLA-1 était sous le contrôle de promoteur présent dans *ISCR20* [364].

e. Rôle des séquences d'insertion

L'insertion d'une IS conduit habituellement à l'inactivation du gène qui subit l'insertion par interruption de son cadre de lecture. Mais les IS peuvent aussi apporter des séquences promotrices, permettant l'expression de gènes situés à proximité du site d'insertion. L'IS peut apporter, par exemple, la séquence promotrice -35 pb (généralement localisée au niveau de l'IRR) qui, située à une distance optimale (17 pb pour le facteur σ^{70} de *E. coli*) d'une séquence promotrice -10 pb, constitue un promoteur hybride capable de conduire l'expression des gènes situés en aval [263,354]. L'IS peut également apporter le promoteur complet. A titre d'exemple, l'insertion d'IS2 en amont du gène *bla_{AmpC}* de *E. coli* augmente de vingt fois l'expression du gène conduisant à une augmentation de la production de β -lactamase et à une augmentation du niveau de résistance à l'ampicilline [71]. De même, l'insertion d'IS*Aba9* en amont du gène *bla_{OXA-51}* entraîne une surexpression de l'oxacillinase naturelle chromosomique de *A. baumannii* [366]. Un promoteur complet est également apporté par IS1999 située en amont des gènes *bla_{OXA-48}* et *bla_{VEB-1}* [238,367] ou par IS*Ecp1* située en amont du gène *bla_{CTX-M-19}*.

2. Transposons

Ces structures, également capables de transposer, sont plus complexes que les séquences d'insertion. Les transposons les plus fréquemment impliqués dans la mobilisation de gènes de résistance sont les transposons composites et les transposons de type Tn3.

a. Transposons composites

Les transposons composites, ou transposons de classe I, sont constitués d'un fragment d'ADN encadré par deux copies de la même IS. Lors de la transposition d'une IS, la transposase reconnaît ses deux IR. Il peut arriver que cette IS reconnaisse son IRL et une IRR (ou vice versa) appartenant à une autre IS située dans son environnement proche. Il y a alors transposition des deux IS simultanément. Le fragment d'ADN encadré par ces deux IS, qui peut contenir des gènes de résistance, de virulence ou de métabolisme, est ainsi mobilisé. La transposition des transposons de classe I est généralement non-répliquative en fonction du type d'IS encadrant le transposon. Une seule copie du transposon est ainsi conservée. Un

exemple de transposon composite impliqué dans la résistance aux β -lactamines est le transposon Tn1999, à l'origine de la mobilisation du gène codant pour la carbapénèmase OXA-48 [253].

b. Transposons non-composite type Tn3

Les transposons de type Tn3, ou transposons de classe II, se caractérisent par l'absence d'IS à leurs extrémités et la présence d'ADN exogène à l'intérieur de la séquence délimitée par les IR (Figure 27). Une transposase permet la mobilisation des transposons de type Tn3. Ces transposons transposent de façon très efficace, selon un mode réplcatif et en entraînant une duplication du site d'insertion de 5 pb. Ne s'excisant pas du réplcon donneur, deux copies du transposon initial sont donc obtenues après le mécanisme de transposition. Le gène *bla*_{TEM-1}, très largement répandu, et qui code pour une pénicillinase, ainsi que le gène *bla*_{KPC}, codant pour une carbapénèmase, sont associés à un transposon de type Tn3, responsable de leur dissémination [368,369].

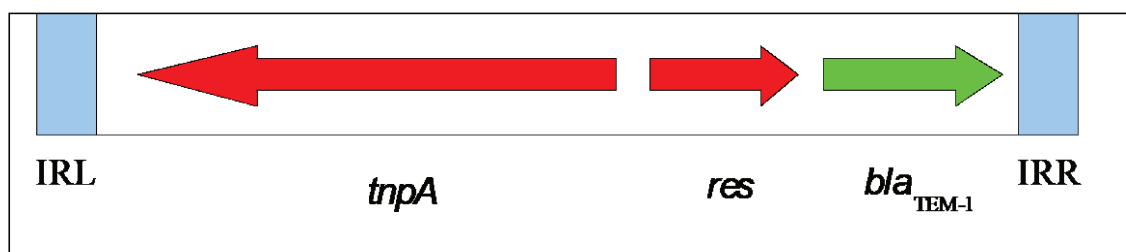


Figure 27. Organisation d'un transposon de classe II, cas du transposon Tn3.

Les transposons de classe I sont formés d'une transposase et d'une séquence d'ADN plus ou moins longue situées entre deux IR. La transposase reconnaît les deux IR permettant la mobilisation. Les boîtes bleues représentent les IR gauche et droite du transposon. La transposase (*tnpA*) et la resolvase (*res*) sont indiquées en rouge. La flèche verte représente le gène codant pour la β -lactamase.

c. Transposons conjugatifs

Les transposons conjugatifs ont été mis en évidence dans des bactéries à Gram positif. Ils sont aussi capables de s'exciser d'une molécule d'ADN pour s'insérer dans une nouvelle molécule d'ADN cible, mais ils se distinguent des éléments génétiques transposables classiques par l'absence de séquences inversées répétées à leurs extrémités et par leur capacité à se transférer d'une cellule à une autre par conjugaison. Ils sont donc en partie constitués de gènes nécessaires à leurs fonctions de transfert et sont généralement de taille

importante (environ 15 à 70 kb). Le spectre d'hôte des transposons conjugatifs est large, permettant des transferts vers la quasi-totalité des bactéries à Gram positif mais également vers des bactéries à Gram négatif [370].

III. Gènes cassettes et intégrons

Les structures de type intégrons ont été caractérisées à la fin des années 1980 [371,372]. Ces structures sont considérées comme des vecteurs majeurs dans l'acquisition des gènes de résistance, en particulier chez les bacilles à Gram négatif [373,374]. Les intégrons ne sont pas des éléments mobiles par eux-mêmes, mais ils sont capables de capturer des séquences d'ADN dites cassettes et de les exprimer. Ceci aboutit à la formation de structures complexes qui peuvent coder pour plusieurs gènes de résistance à des antibiotiques de familles différentes.

1. Structure des intégrons

Les intégrons se caractérisent par une structure de base contenant les éléments essentiels à leur fonctionnement, associés à un nombre variable de gènes cassettes codant pour des fonctions accessoires. L'élément essentiel de la structure de base est le gène *intl* qui code pour une intégrase. Cette enzyme est capable d'exciser et d'intégrer les gènes cassettes au niveau d'un site de recombinaison spécifique adjacent au gène *intl* et nommé *attI*. L'expression des gènes cassettes intégrés est assurée par plusieurs promoteurs (P_c et P_2) présents au niveau du gène *intl* ou de la séquence *attI* (Figure 28). Les gènes cassettes forment la partie variable de l'intégron. Ils sont constitués par une phase ouverte de lecture (ORF) immédiatement suivie par un site de recombinaison reconnu par l'intégrase et nommé *attC* (anciennement élément 59be).

2. Les différents types d'intégrons

a. Intégrons plasmidiques

Les intégrons peuvent être mobilisés en s'associant à des structures génétiques mobiles comme les transposons et les plasmides. La plupart des gènes cassettes qu'ils contiennent sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Cinq classes d'intégrons ont été définies en fonction de la séquence du gène codant pour l'intégrase [375]. Les intégrons de classe 1 sont les plus fréquents et sont formés par deux régions flanquantes conservées,

5'CS et 3'CS, encadrant une région variable au sein de laquelle viennent s'insérer les gènes cassettes. La région 3'CS est composée des gènes *qacE* (partiellement délété) codant pour la résistance aux ammoniums quaternaires, *sull* codant pour la résistance aux sulfonamides et *orf5* de fonction inconnue. Parmi les β -lactamases, les gènes *bla_{VEB}*, *bla_{GES}*, *bla_{VIM}* et *bla_{IMP}* sont identifiés sous forme de gènes cassettes [98,376].

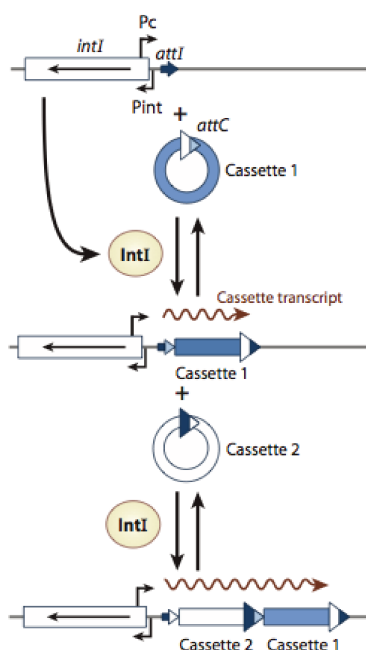


Figure 28. Modèle de capture des gènes par les systèmes d'intégrons.

attI : site de recombinaison au niveau de l'intégron, *attC* : site de recombinaison au niveau du gène cassette, *intI* : gène codant pour l'intégrase ; *IntI* : intégrase ; *Pc* : promoteur. D'après Cambray *et al.* [375].

b. Intégrons chromosomiques

Les intégrons chromosomiques (IC) ont été identifiés chez *V. cholerae* avec la mise en évidence d'analogies de séquences entre des intégrons et des séquences répétées présentes dans le génome de *V. cholerae* et nommées VCRs (pour « *V. cholerae* repeats ») [377]. Ils possèdent une intégrase spécifique et ne sont pas associés à des éléments génétiques mobiles. Ils ont, par la suite, été décrits dans de nombreuses espèces bactériennes [375]. La plupart des gènes cassettes composant les ICs sont de fonction inconnue ou codent pour des enzymes du métabolisme, des facteurs de virulence ou des agents interagissant avec les acides nucléiques.

D. Apport du NGS dans l'étude de la résistance aux antibiotiques

Le séquençage haut débit (*high-throughput sequencing*), aussi appelé NGS (*Next-Generation Sequencing*) regroupe un ensemble de techniques et de technologies développées dans le but de générer et lire en parallèle à un haut débit des millions de séquences d'ADN indépendantes (de 25 à 10 000 pb selon les techniques). Ces petits fragments, appelés *reads*, forment les données brutes et sont ensuite réorganisés par traitement informatique pour reconstituer la séquence du brin d'ADN cible, ou identifier le brin matrice d'un transcrit d'ARN.

Ces techniques se sont généralisées depuis une dizaine d'années, et ont remplacé la technique de séquençage Sanger qui avait permis le séquençage des premiers génomes bactériens (*Haemophilus influenzae* et *Bacillus subtilis*) et du génome humain. Les principales techniques de séquençage seront abordées dans cette section, ainsi que leurs applications en bactériologie clinique. L'accès au NGS a notamment permis le développement des études de métagénomique, le typage bactérien associé à l'étude d'épidémies hospitalières, la découverte de nouveaux mécanismes de résistance...

Par ailleurs, le séquençage de l'ensemble des ARN (*via* la conversion en ADNc) d'une population bactérienne par RNA-seq tend à remplacer les techniques de microarray dans l'analyse différentielle de l'expression des gènes et l'identification de petits ARN régulateurs. Cette technique est également suffisamment résolutive pour identifier au nucléotide près les sites de démarrage de transcription.

I. Aspects techniques

Le pyroséquençage a été la première technique de NGS développée par 454 Life-Sciences et commercialisée par Roche. Son principe est fondé sur une PCR en émulsion amplifiant des fragments d'ADN bornés par des adaptateurs et immobilisés chacun sur une bille différente qui constituait un microréacteur [378].

Le système SOLiD® (*sequencing by oligonucleotide ligation and detection*), développé par la société Applied Biosystems, permettait le séquençage de fragments d'ADN amplifiés en utilisant une technique de ligature séquentielle d'oligonucléotides couplés à un fluorochrome [378]. Ces 2 techniques sont progressivement délaissées par les laboratoires,

au profit des plateformes Illumina qui sont devenues en quelques années leader du marché grâce à leurs performances et leur facilité d'utilisation. En raison de leur abandon progressif, ces techniques ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

Plus récemment, d'autres technologies ont vu le jour : le séquençage Ion Torrent® dont les applications sont similaires au système Illumina, et deux techniques de séquençage de très longs fragments (plusieurs dizaines de kb) par PacBio® et Nanopore®.

1. Séquençage par Illumina®

La première étape consiste à fragmenter le génome d'intérêt en millions de petits fragments d'ADN et à leur lier des adaptateurs pour permettre leur amplification et leur séquençage [379]. Cette collection de fragments amplifiés est appelée « librairie » (anglicisme pour *library*, banque de fragments d'ADN). Les fragments d'ADN « étiquetés » d'une petite séquence nucléotidique spécifique d'un échantillon (ou code-barre), se fixent sur un support solide (la *flowcell*) par hybridation de l'adaptateur à des séquences complémentaires. À cette étape, une amplification est réalisée pour multiplier ces fragments d'ADN immobilisés, puis des nucléotides couplés à des fluorochromes sont chargés sur la *flowcell* (Figure 29). Ces nucléotides possèdent une propriété de terminaison réversible, permettant à la réaction de séquençage de se produire en présence des quatre nucléotides simultanément. On parle de séquençage par synthèse [379].

La société Illumina propose plusieurs types de séquenceurs dont (a) le séquenceur à très haut débit de type HiSeq 2000, pouvant fournir un téraoctet de données et pouvant rivaliser avec le seuil des 1000\$ pour un génome humain [380], et (b) le séquenceur de « pailasse » de type MiSeq, recourant à la même technologie mais avec un débit beaucoup plus faible [378]. Ce type de séquenceur est plus adapté pour des génomes de petite taille comme ceux des procaryotes et des petits eucaryotes ou d'amplicons.

Le séquençage Illumina® permet d'obtenir une grande profondeur de séquençage, correspondant au nombre de lectures (ou *reads*) obtenues indépendamment pour chaque base ciblée : elle s'exprime en nombre de fois (X). Ainsi, une « profondeur de 100X » signifie que la base, ou la région considérée, a été séquencée 100 fois de manière indépendante. Très souvent, la profondeur de séquençage est une valeur moyenne sur l'ensemble des régions ciblées.

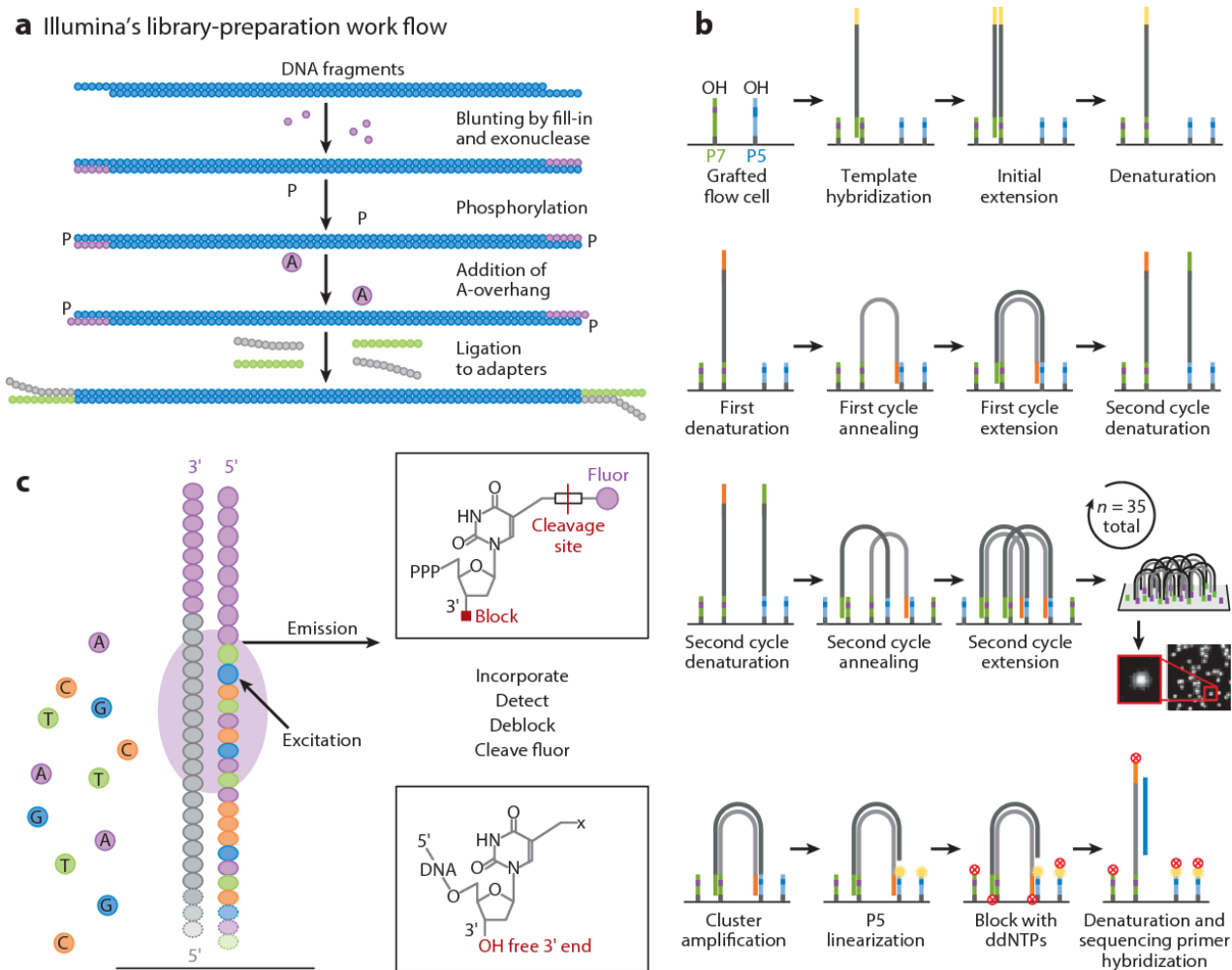


Figure 29. Séquençage de type illumina.

(a) La préparation de la librairie permet la fixation d'adaptateurs aux extrémités 5' et 3' des fragments d'ADN à séquencer. Cette librairie est ensuite chargée sur la *flowcell*. (b) Les fragments d'ADN s'y fixent par hybridation aux séquences oligonucléotidiques P5 et P7 complémentaires des adaptateurs. L'action de la polymérase permet la synthèse du 1er brin d'ADN complémentaire qui sera lié de façon covalente à la *flowcell*. Le fragment d'ADN initial ayant servi de matrice est éliminé au lavage. La synthèse du 2^e brin d'ADN se fait après formation d'un pont grâce à la présence de l'adaptateur 3' complémentaire de l'un des deux oligonucléotides fixés sur la *flowcell*. Un fragment d'ADN est amplifié plusieurs fois ($n=35$) jusqu'à l'obtention de copies identiques multiples formant un cluster. Les brins formant le cluster sont ensuite linéarisés. Les extrémités 3'-OH sont bloquées pour éviter les réactions d'hybridations et permettre la réaction de séquençage. (c) Des dNTPs marqués par 4 fluorochromes différenciant les 4 bases sont ajoutés. À chaque nucléotide incorporé, un signal fluorescent dont la longueur d'onde dépend du fluorochrome est émis. Une caméra est capable de détecter le signal fluorescent et son intensité pour l'ensemble des clusters séquencés. D'après Mardis [381].

2. Séquençage par Ion Torrent

Une des technologies de séquençage les plus récentes, commercialisée sous le nom Ion Torrent® par ThermoFisher Scientific [382], repose sur un séquençage couplé à une détection par semi-conducteur. Elle exploite un processus biochimique bien caractérisé :

lorsqu'un nucléotide est incorporé dans un brin d'ADN par une polymérase, un ion hydrogène (H⁺) est libéré et détecté par un capteur pHmètre miniaturisé. Comme le séquenceur envoie séquentiellement les nucléotides, tout nucléotide ajouté à une matrice d'ADN sera décelé comme une variation de tension, et le système PGM™ détectera l'incorporation. Le système Ion Torrent® possède deux grands types de séquenceurs différenciés par le débit possible : Ion PGM® (*Personal Genome Machine*) et Ion Proton® qui possède un débit supérieur. Ce système de séquençage possède des caractéristiques et applications similaires à celles du système Illumina®.

3. Le séquençage PacBio®

L'une des avancées les plus importantes est probablement le système de séquençage SMRT (*Single Molecule Real Time*) mis au point par *Pacific Biosciences* [383,384], réalisant le séquençage en temps réel d'une molécule sans amplification préalable. Une ADN polymérase est fixée au fond d'un puits avec une seule molécule d'ADN comme matrice. Chacun des quatre nucléotides est couplé à un fluorochrome distinct. Lorsque le nucléotide est incorporé par l'ADN polymérase, le fluorochrome est clivé. Un détecteur capte le signal fluorescent correspondant et le nucléotide est identifié selon le fluorochrome détecté. La longueur des séquences obtenues atteint plusieurs kb (jusqu'à 60 kb selon le fabricant). En 2013, la société a commercialisé PacBio RS II, une nouvelle version du séquenceur qui utilise les 150 000 puits de la cellule de séquençage simultanément, doublant le débit (150 000 séquences simultanées). Les applications de ce système sont multiples. Cependant, la longueur des séquences produites (10 kb en moyenne) est particulièrement intéressante pour l'assemblage de génome *de novo* car elle permet de couvrir des régions répétées comme des séquences d'insertion. Le nombre de séquences totales étant plus faible que celui obtenu avec le système Illumina®, la profondeur de séquençage (c'est-à-dire le nombre de fois où chaque nucléotide est séquencé) reste relativement basse (au maximum 50X pour un génome de procaryote). De plus, le pourcentage d'erreur reste, malgré les progrès significatifs des dernières versions, relativement élevé (environ 10-15 %) en comparaison à celui observé avec le séquençage Illumina® (< 0,01 %) (Tableau 11). Ce système est donc peu indiqué pour du re-séquençage ou une étude transcriptomique (à l'exception de la découverte de transcrits alternatifs).

4. Le système Nanopore

Le système Nanopore, commercialisé par Oxford Nanopore technologies sous le nom minION®, est comme pour PacBio® un système de séquençage en temps réel à partir d'une molécule unique, sans amplification préalable [385,386]. Le principe repose sur le passage d'une molécule d'ADN simple brin à travers un pore protéique extrêmement fin permettant de calculer la taille de la base franchissant ce pore et donc d'en déduire l'identité exacte de la base. Selon Oxford Nanopore technologies, des séquences pouvant dépasser les 200 kb peuvent être générées, mais dans les faits, sont comprises, en moyenne, entre 5 et 30 kb. La longueur des *reads* est favorisée par rapport au nombre de *reads*, limitant la profondeur de séquençage obtenue. Ce type de séquenceur est particulièrement indiqué pour du séquençage *de novo*, y compris pour des génomes possédant de nombreuses séquences répétées (cas des eucaryotes supérieurs). En revanche, comme pour la technologie PacBio®, le taux d'erreur est relativement élevé (environ 10-15 %).

5. Applications

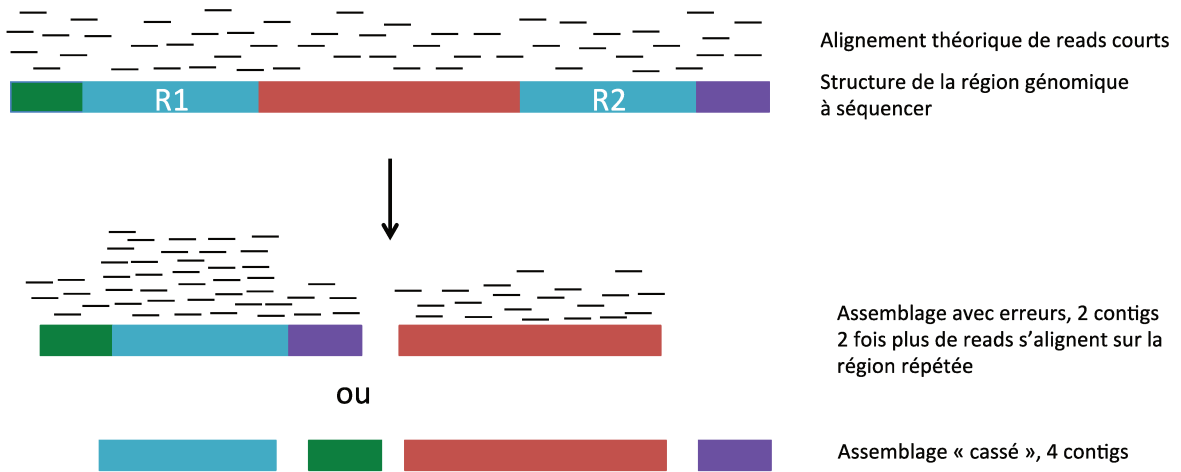
a. Le séquençage *de novo*

Le séquençage *de novo* consiste à obtenir la séquence nucléotidique primaire d'un organisme pour lequel il n'existe pas une séquence de référence dans les banques de données. C'est l'une des principales applications du NGS en bactériologie et elle permet notamment d'établir la séquence génomique d'une nouvelle espèce bactérienne, avec parfois la découverte de nouveaux opérons pouvant produire des molécules d'intérêt (antibiotiques, antifongiques, etc.) [387]. On peut également parler de séquençage *de novo* pour des organismes déjà connus mais ayant une grande variabilité intra-espèce, et dont les différents clones sont assez éloignés en termes de séquence primaire. C'est le cas chez la majorité des entérobactéries.

D'un point de vue méthodologique, il est moins compliqué de reconstituer (ou d'assembler) un génome complet à l'aide des *reads* longs. Ainsi, les technologies PacBio® ou Nanopore semblent plus particulièrement adaptées, notamment lorsque de nombreuses séquences répétées sont présentes au sein d'un génome (Figure 30). Parmi ces séquences répétées, les séquences d'insertions et autres éléments génétiques mobiles posent un vrai problème pour l'assemblage mais également certaines séquences non mobiles telles que les opérons ARN 23S-16S-5S (généralement 4 à 5 copies). Compte-tenu du fort taux d'erreur de ces techniques, il est souvent nécessaire de combiner les résultats de ce séquençage avec un

séquençage par la technique Illumina (Figure 30).

A.



B.

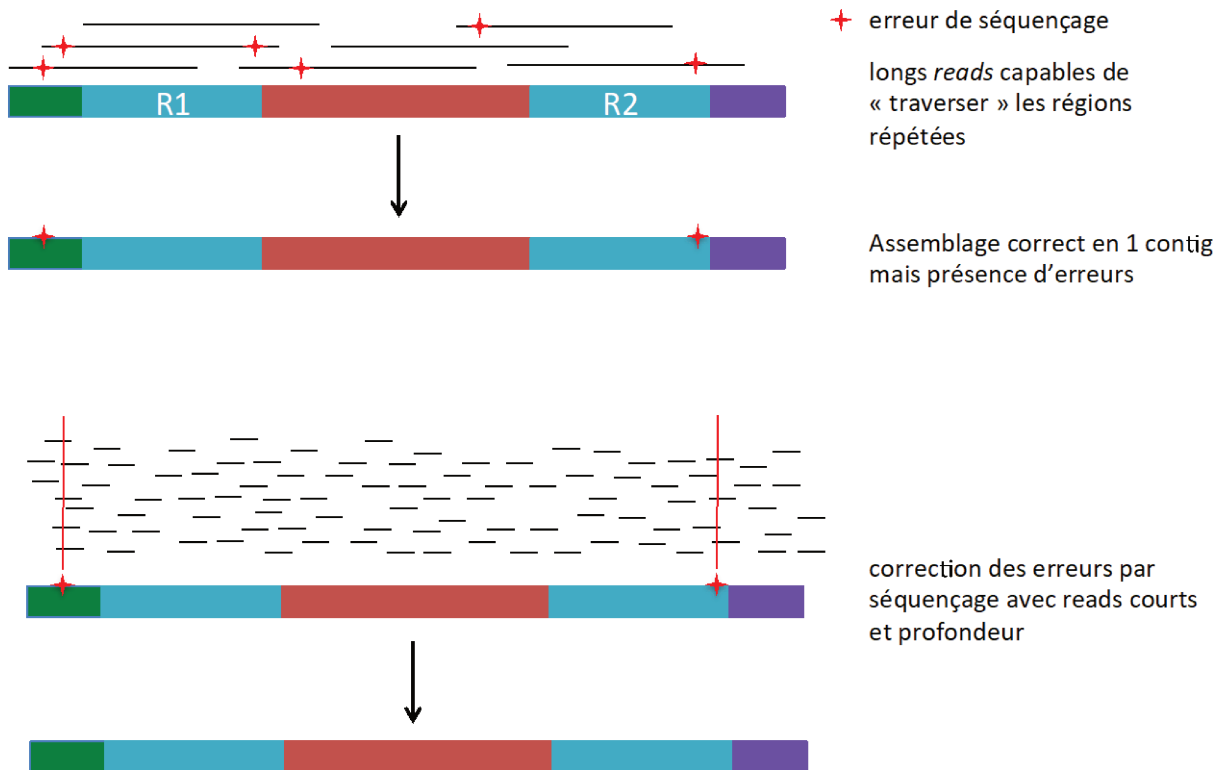


Figure 30. Utilité des techniques de séquençage avec longs *reads* afin d'améliorer l'assemblage des régions avec séquences répétées.

- A. Avec les techniques type Illumina® fournissant des *reads* courts, la présence de séquences répétées induit des erreurs d'assemblage ou des ruptures de contigs.
- B. Les longs *reads* des techniques PacBio ou Nanopore permettent d'obtenir un contig unique. Cependant, il est souvent nécessaire de combiner un séquençage avec *reads* courts afin de corriger les erreurs ponctuelles et obtenir ainsi une séquence de référence exacte.

b. Le re-séquençage

La reconstitution du génome d'un organisme à partir des données générées par le NGS et utilisant un génome de référence est appelée re-séquençage. Appliqué au génome humain, pour lequel plus de 1 000 génomes ont été séquencés, il a ainsi permis de mettre au jour de nombreux variants structuraux impliqués dans diverses maladies [379]. Il s'agit ici du séquençage d'un organisme très proche de l'organisme de référence qui a pour but de mettre en évidence des variations géniques telles que des mutations ponctuelles ou des insertions/délétions de gènes. En effet, cela permet de comparer le génome d'isolats très proches et de déterminer le nombre de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) les différenciant. Le critère majeur de choix de la technique NGS à envisager est alors la profondeur de séquençage et le séquençage Illumina® est donc particulièrement adapté à cette indication.

c. Comparaison des techniques et leurs applications

Les Tableaux 11 et 12 récapitulent les principales techniques de séquençage et leurs indications.

	Illumina®	Illumina®	AB SOLiD®	454®	Ion torrent®	PacBio®	Nanopore®
Modèle	MiSeq®	HiSeq 2000®	5500 Series Genetic Analysis Systems	GS FLX+	PGM®	PacBio RS II	MinION®
Taille des <i>reads</i>	1 x 36 pb à 2 x 300 pb	1 x 35 pb à 2x300 pb	35-75 pb	700	35-400	5-60 kb	jusqu'à 200 kb
Débit Nombre de <i>reads</i>	540 Mb à 15 Gb 12-50 millions (MiSeq Reagent Kit v3)	47 à 600 Gb 1,5 à 6 milliards	10-15 Gb/jour 80 millions	700 Mb 1 million	600Mb-2GB 4-5 millions (Ion 318™ Chip V2)	500Mb-1Gb 55 000	Jusqu'à 42Gb 2,5 à 4,4 Millions
Temps de séquençage	4h à 56h	1,5 à 11 jours	3,5 jours	23h	4h-7h	4h	1 min jusqu'à 48h (temps réel)
Taux d'erreur	< 0,001 %	< 0,001 %	0,06%	0,01%	0,01%	5 à 15 %	5 à 15 %

Tableau 11. Comparaison des différents systèmes de séquençage, aspects techniques.

D'après Bonnin *et al.* [379].

Exemple d'applications en bactériologie	Caractéristiques à favoriser	Automate					
		454 GS Junior	454 GS FLX	MiSeq	HiSeq 2000	5500 xl SOLiD	PacBio RS
Séquençage <i>de novo</i> d'un génome pour obtenir une séquence entière servant de référence	- longs <i>reads</i> - couverture de l'ensemble du génome	✓	✓✓	✓	✓	✗	✓✓
Caractérisation rapide d'un génome	- temps de préparation de la librairie + séquençage < 48h - couverture suffisante	✓	✓✓	✓✓	✗	✗	✓✓
Séquençage rapide d'un petit nombre de souches (<20) pour analyse comparative des gènes	- haut débit - faisabilité du protocole de librairie + séquençage - « faible coût »	✗	✓	✓✓	✓✓	✓	✓
Re-séquençage d'un grand nombre de souches similaires (>50) pour phylogénie et identification de SNPs	- très haut débit - « faible » coût - Haute fidélité	✗	✗	✓	✓✓	✓	✓
Séquençage d'amplicons ARN 16S	- forte profondeur - taux d'erreur <1%	✓	✓✓	✓✓	✓	✓	✗

✗ non adapté, ✓ adapté, ✓✓ particulièrement adapté

Tableau 12. Principales applications des différents systèmes de séquençage en bactériologie.

Adapté de Loman *et al.* [378].

II. Applications en bactériologie clinique

1. Suivi d'épidémies hospitalières locales

En bactériologie, l'une des applications du re-séquençage est le suivi d'épidémies hospitalières. Les séquences obtenues peuvent être alignées et comparées à un génome de référence s'il est disponible. Dans le cas inverse, une première étape consistera à obtenir la séquence primaire d'un isolat de l'épidémie afin de pouvoir s'en servir par la suite comme génome de référence. Ensuite, la comparaison des différents isolats fait intervenir des outils bio-informatiques qui permettent la mise en évidence des SNPs. L'analyse phylogénétique qui en résulte permet d'identifier des potentielles chaînes de transmission entre patients infectés par des souches identiques [388].

Une des études phares montrant son rôle primordial en épidémiologie hospitalière fut l'analyse d'une épidémie à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) dans une unité de réanimation néo-natale d'un hôpital de Cambridge en Angleterre [388, 389]. Dans cette étude, quatorze isolats ont été séquencés : sept étaient potentiellement associés à l'épidémie (patient index et six autres cas) et sept autres (deux cas sporadiques et cinq isolats provenant d'autres services de l'hôpital) n'en faisaient pas partie, *a priori*. Établi à partir des données de NGS, le génotypage par MLST révélait que les isolats étaient du type ST22. Certains, non reliés à l'épidémie, appartenaient également à ce même ST. L'analyse des génomes a mis en évidence que les sept isolats de l'épidémie étaient extrêmement proches avec moins de 15 SNPs, à l'exception d'un isolat qui présentait 51 SNPs uniques et qui était muté dans le gène *mutS*, connu pour conférer un phénotype hyper-mutateur [391,392]. À l'opposé, les souches de *S. aureus* ST22 non reliées à l'épidémie différaient de plus de 100 SNPs par rapport aux isolats épidémiques [389]. Cette étude montre bien les limites du MLST et l'avantage du NGS dans l'analyse fine des épidémies.

Une autre étude, témoignant l'intérêt du NGS pour analyser une épidémie à l'échelle régionale, est celle récemment rapportée par Zhou *et al.* [393]. Dix-neuf isolats de *K. pneumoniae* ST15 produisant la β -lactamase à spectre étendu CTX-M-15, provenant de patients infectés ou colonisés par cette bactérie et hospitalisés dans plusieurs

établissements de soins néerlandais (distants d'environ 80 km) lors de deux années successives, ont été séquencés par la technologie Illumina®. Le caractère épidémique d'un unique clone de *K. pneumoniae* ST15 est devenu irréfutable grâce aux données NGS. En effet, la présence de seulement 2 à 4 SNPs de différence entre des isolats de patients censés être « non apparentés », a conduit à ré-investiguer les liens épidémiologiques, confirmés par la suite.

2. Epidémiologie mondiale et surveillance des clones « à haut risque »

Le développement des techniques de NGS au niveau mondial est reconnu pour son intérêt de santé publique pour la surveillance moléculaire des mécanismes de résistance et de l'émergence de certains clones dits « à haut risque » de dissémination [49,388]. Des stratégies internationales de surveillance se mettent en place notamment au niveau européen via l'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) pour que le NGS se généralise au plus grand nombre de pays pour accroître les données librement partagées [394].

Des études utilisant les techniques de NGS ont permis de mettre en évidence la diffusion de clones entre des pays éloignés, comme dans le cas d'une souche de *P. aeruginosa* Liverpool qui s'est transmise entre des cliniques pour patients atteints de mucoviscidose situées à la fois en Grande Bretagne et aux Etats-Unis [395]. Chez *Clostridium difficile*, l'acquisition de la résistance aux fluoroquinolones par le clone 027/BI/NAP1 a permis de mettre en évidence la différenciation de deux lignées au début des années 2000 [396]. Le clone résistant aux fluoroquinolones s'est distingué par sa capacité à diffuser plus rapidement au sein des structures de soin dans plusieurs régions du globe (Grande-Bretagne, Europe de l'Ouest, Australie...) [396].

Cependant, ces deux exemples ne correspondent pas tout à fait à la définition d'un clone à risque, qui doit présenter plusieurs caractéristiques d'après la définition de Mathers *et al.* [49] : (i) une distribution mondiale, (ii) une multi-résistance aux anti-infectieux, (iii) une capacité à coloniser les patients sur le long terme (> 6 mois), (iv) une forte transmissibilité, (v) une pathogénicité ou un fitness accru et enfin (vi) une capacité à causer des infections sévères ou récurrentes.

L'exemple le plus typique pour illustrer les clones à haut risque est la description des souches de *K. pneumoniae* ST258 associées à la diffusion mondiale de la carbapénèmase KPC (cf : paragraphe Le groupe-clonal CG258, page 49).

Les souches de *E. coli* appartenant au ST131 productrices de BLSE de type CTX-M-15 sont également considérées comme formant un clone à haut risque de diffusion [49]. Ce clone a été identifié pour la première fois au milieu des années 2000, chez des patients atteints d'infections urinaires, sans lien particulier avec les structures de soin. Ces souches se distinguaient par leur capacité à diffuser en communautaire. En plus de produire une BLSE, les isolats sont en majorité résistants aux fluoroquinolones. Au début de cette diffusion, un lien avec l'étranger était souvent rapporté, notamment avec le sous-continent indien. C'est d'ailleurs à partir d'une souche indienne qu'a été identifié CTX-M-15, un variant de CTX-M-3 [397]. Ce variant, contrairement à CTX-M-3, hydrolyse la ceftazidime [398]. La diffusion de ce clone sur l'ensemble des régions du globe fut si rapide, que la notion de voyage n'a rapidement plus été associée aux infections par *E. coli* ST131. Actuellement, les études de prévalence indiquent que les souches du ST131 forment entre 10 et 30% de l'ensemble des isolats de *E. coli* [399].

A l'instar des souches de *K. pneumoniae* ST258, le succès du clone *E. coli* ST131 semble être la résultante d'une combinaison entre un plasmide multi-résistant de type IncF, un gène *bla*_{CTX-M-15} conférant la résistance à la majorité des β -lactamines, et un clone capable de causer des infections communautaires chez l'homme et de diffuser rapidement, notamment au sein du cercle familial [49].

L'analyse des génomes des *E. coli* ST131 a permis d'identifier plusieurs lignées. La lignée *fimH30* est la plus prévalente et est composée à plus de 70% de souches résistantes aux fluoroquinolones [400]. A l'intérieur de cette lignée présentant pourtant peu de variabilité génétique, on distingue deux sous-lignées sur la base de 3 SNPs présents dans le core-génome : H30-R correspondant à des souches ne produisant pas de BLSE, et H30-Rx pour la sous-lignée produisant une BLSE [401,402].

3. Identification de nouveaux mécanismes de résistance

L'accès au génome complet d'une bactérie permet l'identification de nouveaux mécanismes de résistance et la détermination rapide de la nature du support de ces résistances (chromosome vs plasmide). C'est grâce au NGS que l'équipe de Liu *et al.* a pu récemment identifier le gène *mcr-1*, premier déterminant plasmidique conférant la résistance à la colistine [403]. Tout nouveau mécanisme de résistance est par définition absent des bases de données publiques qui permettent l'étude du résistome complet.

Dans ce cas, il est important d'identifier des gènes candidats par un processus d'annotation du génome, qui informera sur le contenu génique de la souche à caractériser puis de caractériser phénotypiquement ces gènes candidats. Par exemple, de nombreux gènes sont annotés comme β -lactamases putatives mais l'analyse bio-informatique ne permet pas toujours de différencier une β -lactamase d'une PLP. Dans le cas de la découverte du gène *mcr-1*, l'annotation du plasmide indiquait la présence d'une phospho-éthanolamine transférase [403]. Ce sont les expériences de transfert de plasmide et de clonage qui ont permis ensuite d'établir le lien entre ce gène et le phénotype de résistance à la colistine [403].

4. L'antibiogramme *in silico*

Les données de NGS peuvent également être utilisées pour déterminer le phénotype de sensibilité d'une bactérie aux antibiotiques. On appelle « antibiogramme *in silico* » le fait de prédire la sensibilité aux agents antimicrobiens par des outils bio-informatiques. Certaines études ont montré une bonne corrélation entre génotype et phénotype notamment chez *E. coli* (97,8%) [404], chez les Salmonelles mineures (99%) [405] et chez *Campylobacter* (99,2%) [406].

Cette corrélation semble être moins bonne chez *Klebsiella* sp. où les phénomènes d'imperméabilité et d'efflux ont un effet non négligeable sur les phénotypes observés. En effet, la présence de certaines mutations ou polymorphismes chromosomiques dans des gènes impliqués dans la composition de la paroi bactérienne peut rendre difficile le lien génotype-phénotype. Cette notion a été notamment illustrée chez les souches de *K. pneumoniae* KPC du ST258 dont la boucle transmembranaire de la porine OmpK36 est mutée, conduisant à une diminution de perméabilité aux carbapénèmes. Des mutations situées dans des régulateurs (*ompR*) et dans des composants de la chaîne respiratoire (gènes *nuo*) ont aussi été impliquées dans des diminutions de sensibilité à plusieurs familles d'antibiotiques [407].

Une autre limite est l'impossibilité de prédire le niveau d'expression d'un gène par la seule analyse de la séquence. Seules des expériences supplémentaires par RT-PCR ou par transcriptomique globale, impossibles à mettre en place pour une réponse rapide, permettraient d'obtenir des informations sur ce niveau d'expression. Comme preuve de concept, l'équipe de Suzuki *et al.* a généré *in vitro* une souche d'*E. coli* devenue résistante

aux céphalosporines uniquement par diminution de l'expression de la porine OmpF [407].

Malgré ces limites, dans son rapport de 2016, l'EUCAST identifiait le NGS comme une technique pouvant remplacer dans un avenir proche les méthodes phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques [408].

5. Evolution génomique

Une autre application du re-séquençage est le suivi de l'évolution dans le temps d'un génome d'un pathogène lors de son interaction avec l'hôte. Plusieurs études ont décrit l'apparition de mutations dites « patho-adaptatives » dont on pense qu'elles ont un impact positif sur la capacité de la bactérie à interagir avec l'hôte lors d'un processus d'infection ou de colonisation durant dans le temps [409]. La fréquence d'apparition de ces mutations ponctuelles varie en fonction de l'espèce bactérienne, ainsi que de la pression de sélection appliquée (mise sous traitement antibiotique par exemple). Chez *Helicobacter pylori*, le taux annuel de mutations est estimé à 30 mutations/an chez le même hôte [410]. Chez *S. aureus*, ce taux est estimé à 8 mutations/an, tandis que le génome de *Mycobacterium tuberculosis* semble être plus stable avec uniquement 0,5 mutations/an [411,412].

A la notion de mutations patho-adaptatives s'ajoute la notion de dérive génétique qui est la conséquence des erreurs aléatoires et imprévisibles commises par l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN. La dérive génétique est la probabilité de fixer une mutation qui ne confère aucun avantage à la bactérie. Elle est notamment reflétée par l'apparition de mutations synonymes, sans convergence particulière dans une voie métabolique spécifique et sans impact sur le fitness bactérien [409].

La variabilité génétique résultant de la dérive génétique et des mutations patho-adaptatives est également à prendre en compte lors de l'étude d'épidémies hospitalières qui durent dans le temps. Sous l'effet d'un portage de longue-durée au niveau du tube digestif par exemple, la souche épidémique évolue et se diversifie dans le temps, et peut être à l'origine de plusieurs sous-populations bactériennes, transmises à d'autres patients (Figure 31).

Dans la plupart des cas, les techniques de bactériologie classiques basées sur l'étude d'une ou deux colonies de bactéries multi-résistantes sur milieu sélectif ne permettent pas d'évaluer la diversité de ces sous-populations.

Le transfert horizontal de gènes contribue également à la diversification des génomes. Ces transferts peuvent aboutir à des phénomènes de recombinaison impliquant de larges fragments de chromosome. Chez *H. pylori*, lorsque plusieurs souches partagent le même habitat, on considère que la recombinaison homologe accélère l'évolution des génomes d'un facteur 100 [409].

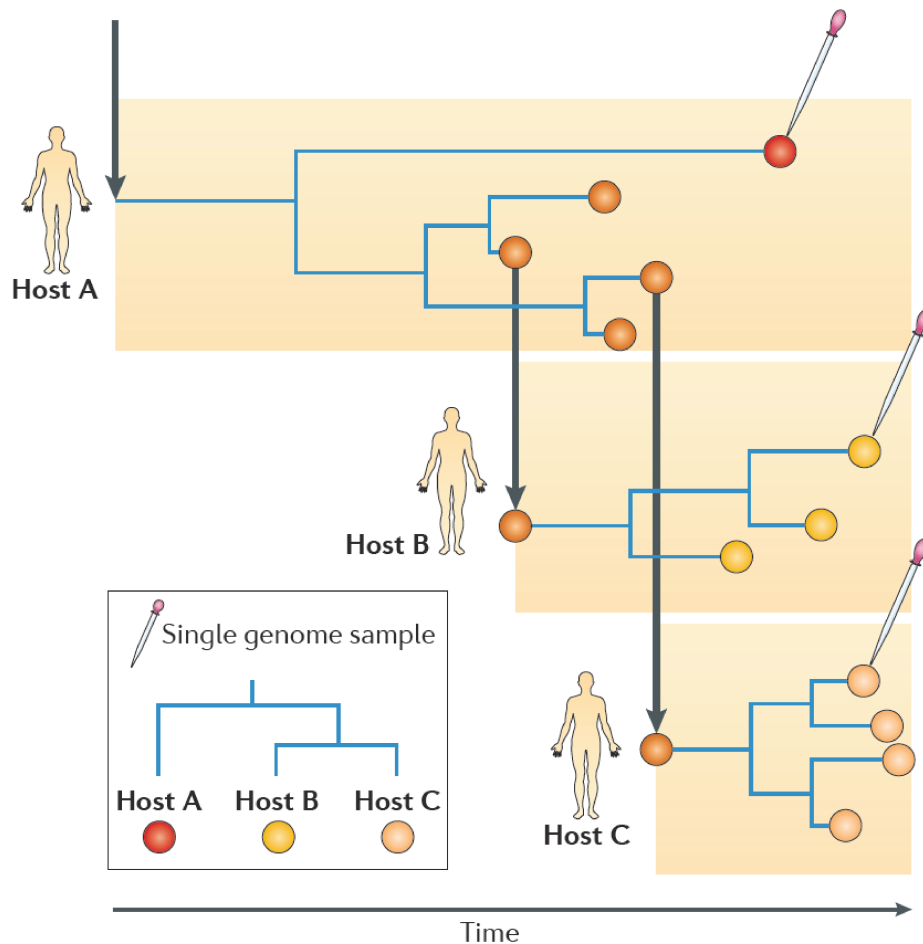


Figure 31. Effet de l'évolution d'un génome bactérien sur la reconstruction de la chaîne de transmission.

Les cercles colorés représentent la variabilité génétique d'un génome bactérien au cours d'un processus de colonisation perdurant dans le temps.

Dans cet exemple, trois hôtes sont colonisés par une bactérie pathogène. L'hôte A s'est infecté en premier, et a transmis la bactérie aux hôtes B et C (indiqué par les flèches verticales).

Si un seul génome est séquencé par hôte (encadré), l'information sur l'évolution de la souche épidémique est perdue, ce qui peut conduire à identifier les souches des hôtes B et C comme étant les plus proches par rapport à la souche ancestrale de l'hôte A et émettre l'hypothèse que l'hôte B est la source de la contamination de l'hôte C ou inversement.

Cette erreur peut être évitée si l'évolution des génomes au cours de l'infection est prise en compte, en séquençant plusieurs isolats par hôte plusieurs fois au cours du portage. Dans cet exemple, les 3 génomes provenant de l'hôte B forment un clade proche du clade formé par les génomes provenant de l'hôte A. Ce raisonnement applicable aussi au clade formé par les génomes issus de l'hôte C permettent d'établir la chaîne de transmission de l'hôte A à la fois vers l'hôte B et vers l'hôte C. D'après Didelot *et al.* [409].

6. La métagénomique

Enfin, l'avènement du NGS a complètement révolutionné la métagénomique en révélant la richesse microbienne de certaines niches écologiques. Un métagénome correspond à l'ensemble des gènes des microorganismes partageant la même niche écologique, appelée microbiome.

On distingue la métagénomique globale, qui consiste à séquencer les génomes entiers, de la métagénomique ciblée qui consiste à séquencer uniquement les amplicons, notamment l'ARN16S [379]. Ces types d'analyses permettent de décrire la composition d'un écosystème, d'évaluer l'abondance et la diversité de certains de ses composants. Certaines études ont mis en évidence une corrélation entre maladies et altérations du microbiote [413].

L'identification bactérienne à l'échelle de l'espèce est difficile voire impossible en se basant uniquement sur des amplicons d'ARN 16S, on parle plutôt d'OTU (*Operationnal Taxonomic Unit*) pour définir un ensemble de bactéries dont la séquence d'ARN 16S est similaire à plus de 97%. Pour le moment, ces techniques ne permettent pas d'analyser la diversité génétique et l'apparition de SNPs dans une sous-population bactérienne spécifique. De la même façon, il est la plupart du temps impossible d'assembler des génomes à partir de données de métagénomique.

7. Etude transcriptomique par RNA-seq

Afin d'étudier l'expression d'un gène, il est souvent plus facile de mesurer la quantité de transcrits que la quantité de protéines du fait de la stabilité de la protéine et des phénomènes de régulations post-transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle qui peuvent survenir. Le transcriptome d'une cellule désigne l'ensemble des molécules d'ARN présentes à un instant précis.

III. Le RNA-seq et ses applications en bactériologie

Le transcriptome désigne l'ensemble des transcrits présents dans une cellule à un instant donné. Bien que les ARNm ne constituent qu'une étape de l'expression des gènes, leur abondance est souvent corrélée à l'activité des protéines codées.

L'étude transcriptomique à l'échelle du génome a été rendue possible par l'utilisation de

puces à ADN (ou microarray) qui ont permis d'évaluer le niveau d'expression des gènes dans différentes conditions biologiques, et d'identifier de nombreux petits ARN non codants au rôle régulateur.

Le développement des plateformes de séquençage haut débit a ensuite été appliqué au séquençage des ARN, c'est le RNA-seq. Il s'agit en réalité du séquençage de fragments d'ADN issus de la de rétro-transcription des ARN en ADN complémentaires (ADNc). Grâce à sa haute résolution, sa sensibilité et la possibilité d'étudier un grand nombre d'échantillons, le RNA-seq s'est considérablement développé ces dernières années au détriment des techniques de microarray.

Les applications du RNA-seq en microbiologie sont multiples. L'analyse d'un transcriptome permet de définir de nouvelles unités de transcription pouvant correspondre à un gène, à un opéron ou encore à un ARN non codant. Le séquençage de la région 5' des transcrits (5'RNA-seq) permet d'établir une cartographie des sites de démarrage de transcription et ainsi d'identifier la présence de promoteurs multiples et de régions non traduites pouvant modifier l'expression d'un gène. Il est également possible d'étudier le transcriptome d'une bactérie dans différentes conditions biologiques afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés. Enfin, les techniques de Dual-seq mises au point récemment ont permis de nouvelles études de l'interaction « hôte-bactérie ».

1. Expression et annotation de gènes

Les *reads* issus du séquençage des fragments de la librairie d'ADNc sont dans un premier temps alignés sur un génome de référence. Il est possible ensuite de visualiser cet alignement, et de différencier les *reads* provenant du brin codant et du brin non codant (Figure 32). La réalisation de librairies « directionnelles » permet de conserver l'information du sens du transcrit jusqu'au séquençage. Ainsi, lors de l'alignement des données brutes sur le génome de référence, il sera possible de différencier la transcription « sens » de l'« antisens » et ainsi identifier la présence de régions non traduites avant le codon START (5'-UTR pour Untranslated Region) et après le codon STOP (3'-UTR). Ces régions ont un rôle dans la stabilité des transcrits et dans l'expression finale en protéines [414]. La région 5'-UTR peut constituer un site de fixation pour des petits ARN régulateurs qui s'y fixent par appariement, et influencent

ainsi la stabilité de l'ARNm [415]. Par auto-hybridation, les transcrits antisens peuvent inhiber l'expression d'un gène ou à l'inverse la favoriser en stabilisant le transcrit d'ARNm en question [416].

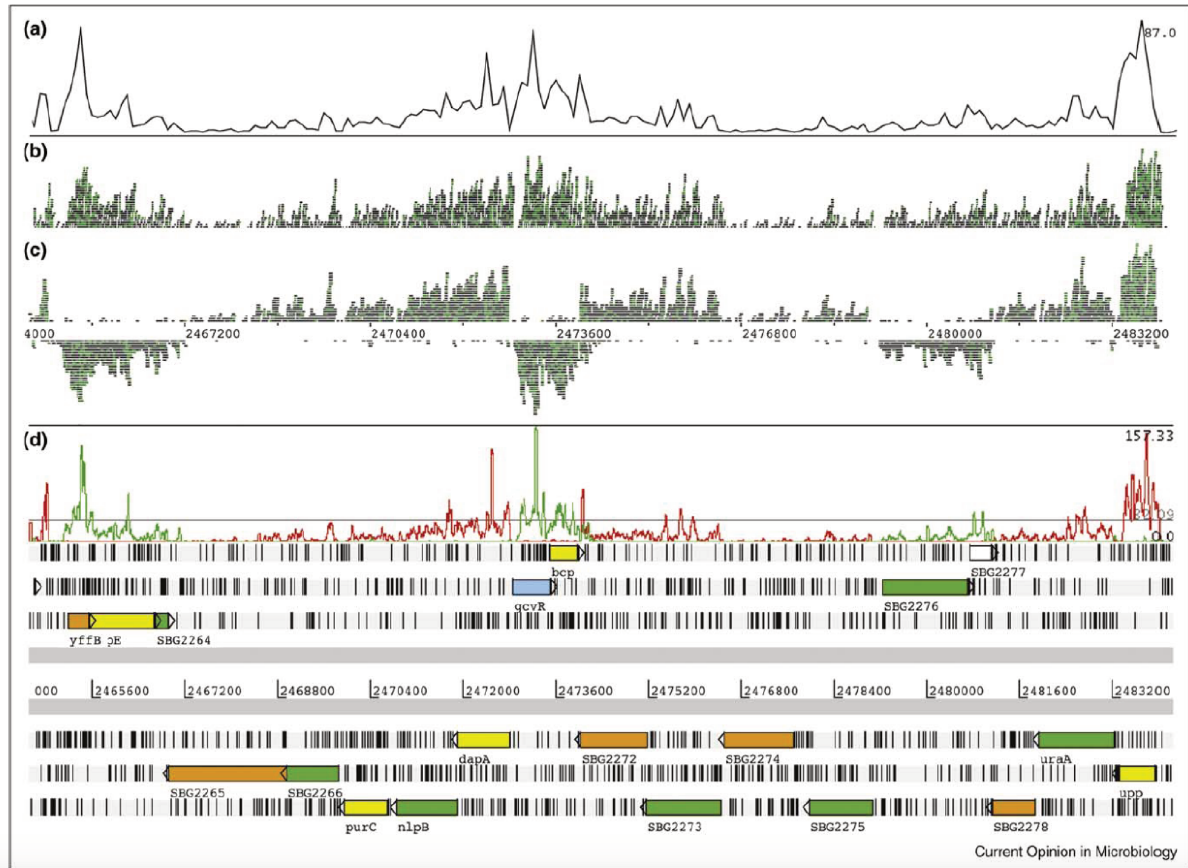


Figure 32. Visualisation des données de RNA-seq par le logiciel BamView.

- (a) Visualisation non directionnelle lissée des *reads* alignés sur le génome
 - (b) visualisation non directionnelle des *reads* « bruts » alignés sur le génome
 - (c) visualisation directionnelle des *reads* « bruts » alignés sur le génome
 - (d) visualisation lissée des *reads*, en rouge les *reads* alignés sur le brin (-) et en vert les *reads* alignés sur le brin (+)
- D'après Croucher *et al.* [417].

Grâce à sa haute résolution, le RNA-seq a permis de corriger certaines annotations proposées par les logiciels de prédiction bioinformatiques et d'identifier de nouvelles unités transcriptionnelles, correspondant à des gènes, des ARN non codants ou des opérons (Figure 33). Pour réaliser de l'annotation de génome, il est important d'avoir suffisamment de « profondeur » (nombre de *reads* par échantillon) pour pouvoir identifier les transcrits de faible abondance. La contrepartie de l'augmentation du nombre de *reads* est l'augmentation en parallèle du coût du séquençage. Il est donc

nécessaire de trouver un équilibre entre profondeur et coût. Globalement, par échantillon, 5 à 10 millions de *reads* provenant d'ARN non ribosomiques suffisent pour l'analyse des gènes exprimés chez les bactéries. En dépassant 50 millions de *reads*, on ne gagne plus en sensibilité, tandis que des contaminations par l'ADN génomique sont détectées [418] (Figure 34).

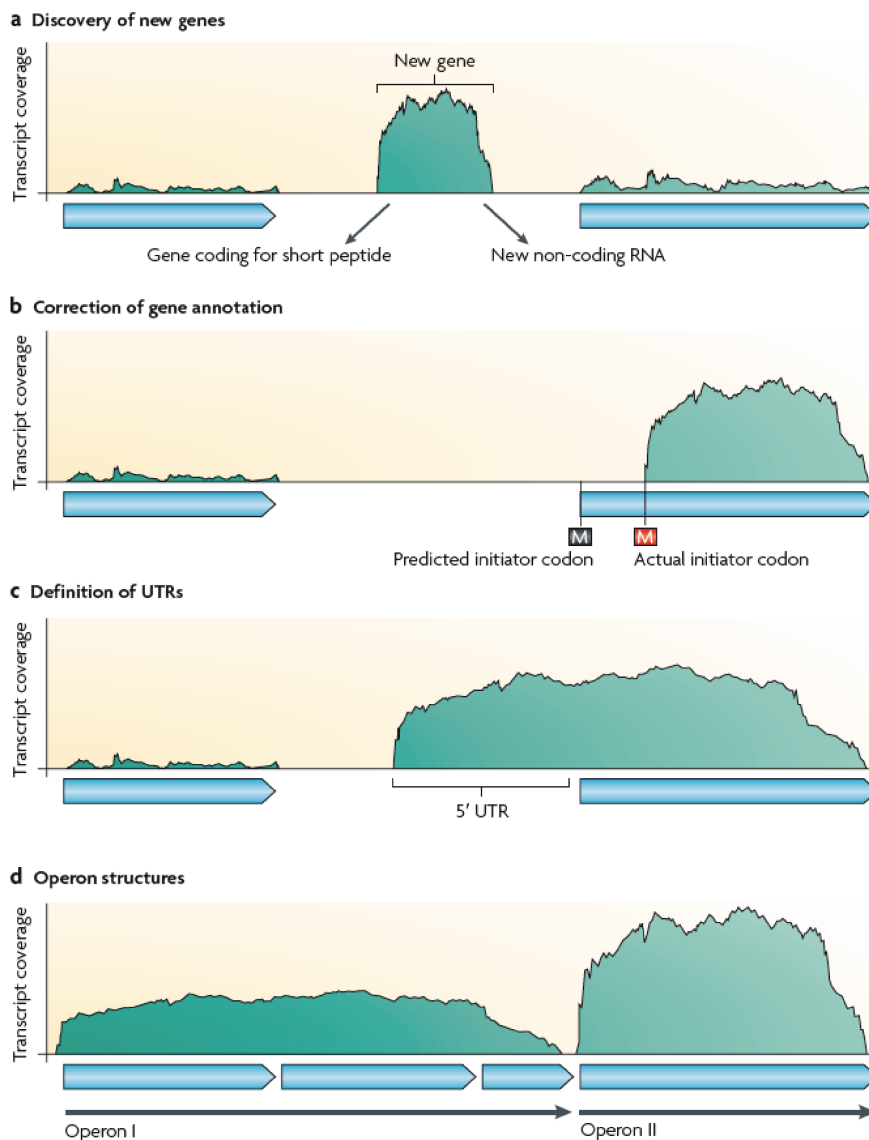


Figure 33. Applications du RNA-seq.

L'alignement des *reads* sur un génome de référence permet d'identifier la présence de nouveaux transcrits (codant des petits peptides non annotés ou non-codants) (a), de corriger des erreurs d'annotation automatique (b), d'identifier la présence de régions transcrites mais non traduites (c), d'identifier des ARN polycistroniques provenant de gènes en opéron (d). D'après Sorek *et al.* [415].

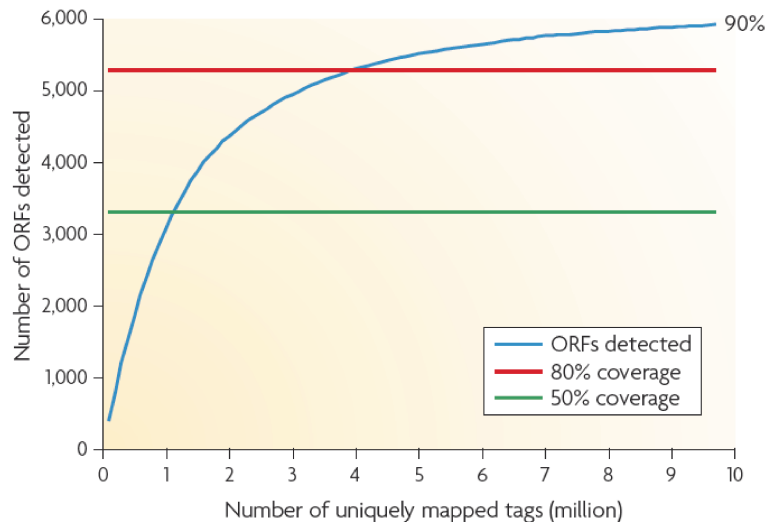


Figure 34. Couverture vs profondeur.

Analyse du % de gènes couverts par des *reads* de RNA-seq en fonction du nombre de *reads* alignés sur des régions uniques du génome (hors gènes codant les ARN ribosomiques notamment). Dans ce cas, 80% des gènes d'un génome de levure sont détectés avec 4 millions de *reads*. A partir de 8-10 millions de *reads*, un plateau est atteint, ne permettant pas de couvrir davantage de gènes. D'après Wang *et al.* [418].

2. Analyse différentielle

Il est possible de comparer les niveaux d'expression des gènes dans différentes conditions biologiques. A condition de disposer de réplicats biologiques, DESeq2 et EdgeR sont deux outils permettant d'identifier les gènes « différentiellement exprimés » entre 2 transcriptomes réalisés dans des conditions différentes. Ils fonctionnent selon le postulat que la majorité des gènes ne seront pas différentiellement exprimés. Pour l'analyse différentielle, il est conseillé de favoriser le plus grand nombre de réplicats biologiques de chaque condition testée au détriment d'une grande profondeur au sein d'un échantillon. L'augmentation de nombre de réplicats biologiques permet d'augmenter la puissance du test statistique utilisé pour analyser la significativité de la différence observée. Il est ainsi possible d'obtenir pour chaque gène le facteur de modification d'expression par rapport à la condition de référence (Fold-Change aussi exprimé en \log_2), et la valeur statistique p attribuée au test.

3. Identification de petits ARN non codants

Les petits ARN bactériens non codants sont typiquement compris entre 50 à 500 nucléotides. Chez les procaryotes, ils jouent un rôle régulateur dans de nombreuses

cascades impliquées dans la réponse à de nombreux stress et dans la virulence [419]. En interagissant avec l'extrémité 5'-UTR d'un transcrit, la plupart des petits ARN induisent une diminution de l'expression du gène en question, par inhibition de la traduction ou en favorisant la dégradation par les RNAses [420].

De nombreuses études par RNA-seq ont permis d'identifier de nouveaux petits ARN bactériens [421]. Certaines ont ciblé particulièrement les petits ARN en utilisant des techniques d'enrichissement par immunoprécipitation avec des protéines capables de s'y lier spécifiquement (protéine chaperone Hfq par exemple). Par cette technique, Vogel *et al.* ont caractérisé la moitié des 64 petits ARN identifiés chez *Salmonella Typhimurium* [415].

4. Séquençage de l'extrémité 5' des ARN – Identification des TSS

Il n'est pas chose aisée de clairement établir une carte des démarrages de transcription. Le TSS, pour *transcriptional start site*, correspond au +1 de transcription d'un gène, c'est à dire le premier nucléotide de l'ADN qui est transcrit en ARN. Ce TSS est localisé, chez les procaryotes, dans l'environnement immédiat du promoteur (boîtes -10 et -35). La séquence qui sépare le TSS et le codon START est appelée région 5'-UTR pour *5'-Untranslated Region* et permet la fixation du ribosome pour l'étape de traduction. La taille des séquences 5'-UTR est très variable, de zéro à plusieurs centaines de nucléotides. Lorsque cette séquence est longue, elle peut être impliquée dans la régulation de l'expression du gène, en modifiant la stabilité de l'ARN, ou sa traduction [415,422]. La présence de riboswitch au niveau de la région 5'-UTR peut également entraîner une diminution d'expression d'un gène en formant une boucle de terminaison de la transcription, ou en changeant la conformation de l'ARN menant à la séquestration du site de fixation du ribosome (RBS) [423,424].

Plusieurs TSS peuvent parfois être identifiés pour un même gène. On parle alors de TSS alternatifs issus de la présence de promoteurs alternatifs, dont la force module l'expression du gène en question. La taille de la région 5'-UTR aura également un impact sur la stabilité et la traduction de l'ARN. La présence de promoteurs et TSS alternatifs permet la régulation de l'expression des gènes dans des conditions très spécifiques et joue un rôle probablement dans l'adaptation des bactéries à des environnements différents [422].

Une détermination précise des TSS permet donc d'identifier par déduction les séquences promotrices et la présence de régions 5'-UTR impliquées dans la régulation de l'expression du gène en aval. Les techniques de 5'RNA-seq permettent d'obtenir des cartographies de TSS en séquençant uniquement l'extrémité 5' des transcrits [425].

Par ailleurs, afin d'identifier correctement les TSS, il est important de différencier les ARN natifs, issus directement de l'ARN polymérase, des ARN issus du clivage par des endonucléases (on parle aussi de site de *processing* ou PSS pour *Processing Start Site*). Cette différenciation des ARN natifs et maturés se fait grâce à leur extrémité : un ARN natif possède à son extrémité un groupement triphosphate (5'-PPP) tandis qu'un ARN clivé par une RNase possède une extrémité monophosphate (5'-P). Sans cette distinction, il n'est pas possible de différencier un ARN maturé ou dégradé, d'un ARN natif issu d'un TSS interne par exemple (Figure 35). Plusieurs protocoles existent afin d'enrichir la proportion en ARN natifs ; l'un d'entre eux repose sur l'utilisation d'une exonucléase, la TEX, capable de cliver uniquement les ARN maturés 5'-P (Figure 35) [425].

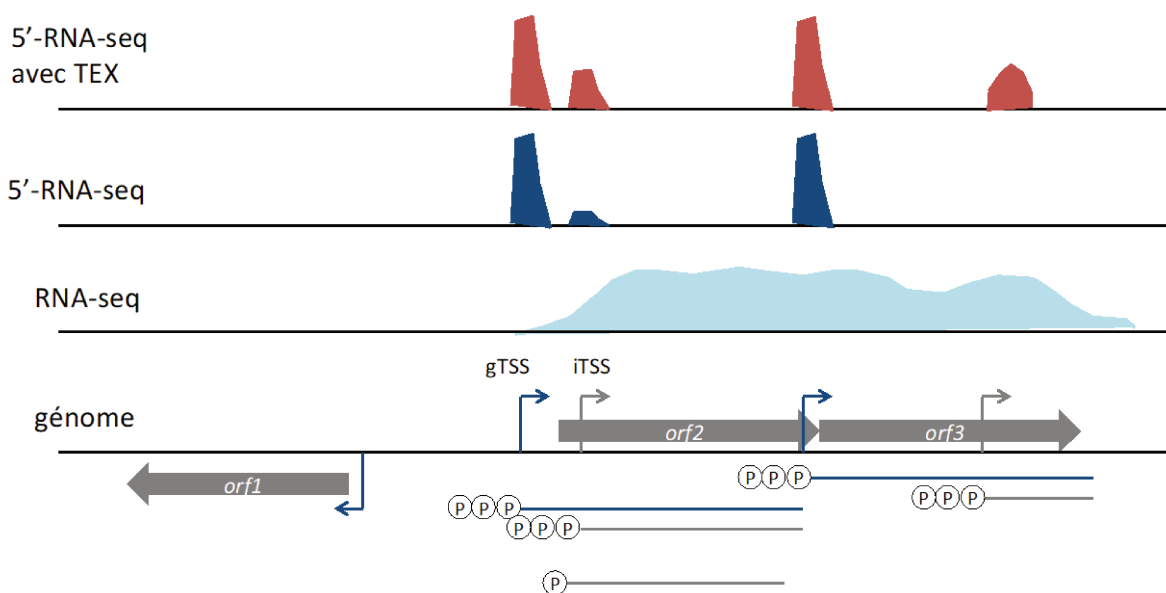


Figure 35. Détermination des TSS par RNA-seq.

Les techniques de RNA-seq « classiques » ne permettent pas de déterminer précisément les extrémités des transcrits. Le 5' RNA-seq pallie à ce défaut.

Un pré-traitement des ARN avec une exonucléase, la TEX, permet d'enrichir en ARN natifs qui sont insensibles à l'action de l'enzyme grâce à leur extrémité 5'-PPP. Un RNA-seq différentiel, avec et sans pré-traitement par la TEX, permet ainsi de visualiser l'enrichissement en ARN natifs et ainsi identifier des TSS internes aux gènes (iTSS).

5. Dual RNA-seq

La technique du Dual RNA-seq permet l'étude de l'interaction entre 2 types de cellules (typiquement bactéries-cellules eucaryotes) (Figure 36). Cette technique a longtemps été limitée par le fait que la quantité d'ARN eucaryote excède largement la quantité d'ARN procaryote qui correspond alors à une fraction minime des *reads*. Cependant, en alliant une ribodéplétion efficace et un séquençage profond atteignant plus de 25 millions de *reads*, certaines études ont montré leur capacité à identifier la majorité des ARN eucaryotes et procaryotes [426,427]. Le Dual RNA-seq fournit des informations sur les changements induits par le processus d'infection à la fois sur le métabolisme bactérien mais également eucaryote. A titre d'exemple, l'équipe de Westermann *et al.* a démontré le rôle d'un petit ARN de 80 pb appelé PinT dans la virulence de Salmonella [427]. PinT est surexprimé lorsque la bactérie est intracellulaire. De façon surprenante, 10% du transcriptome des cellules eucaryotes infectées par un mutant $\Delta pinT$ est modifié par rapport aux mêmes cellules infectées par la souche sauvage. PinT a un rôle de régulateur post-transcriptionnel pour des gènes associés à la virulence et la survie intracellulaire. Dans cette étude, sur les 25 millions de *reads* obtenus, 98,2% correspondaient aux transcrits de cellules humaines contre 1,4% pour les transcrits bactériens.

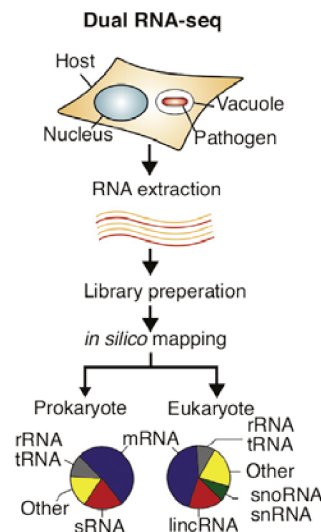


Figure 36. Principe du Dual RNA-seq.

L'extraction d'ARN total est réalisée à partir de cellules eucaryotes infectées par une bactérie. L'ensemble des ARN est séquençé. Les *reads* sont alignés séparément sur le génome eucaryote et procaryote. D'après Saliba *et al.* [421].

Objectifs scientifiques

Depuis la description de la première Entérobactérie Productrice de Carbapénèmase (EPC) en 1993 [428], ces souches hautement résistantes aux antibiotiques ont été décrites sur l'ensemble des régions du globe. Alors qu'il existe plusieurs centaines de carbapénèmases décrites, quelques familles ont particulièrement diffusé chez les entérobactéries. Il s'agit des enzymes de type KPC, OXA-48-like et NDM. L'une des spécificités de la carbapénèmase KPC est son étroite association avec un clone de *K. pneumoniae* appartenant au *sequence-type* 258 (ST258). Ce clone et ses variants proches (dont les ST11, ST340, ST437 et ST512), formant le groupe clonal GC258, semblent particulièrement adaptés à l'environnement hospitalier. Le gène *bla*_{KPC} est présent dans un transposon appelé Tn4401, lui-même porté par différents types de plasmides. Cependant, au sein des souches de *K. pneumoniae* ST258, les plasmides de type IncFII_K sont majoritairement retrouvés. Les raisons de cette étroite association entre *K. pneumoniae* ST258, plasmides de type IncFII_K et carbapénèmase KPC, ainsi que leur succès dans l'environnement hospitalier, ne sont pas encore élucidées.

Par ailleurs, les souches produisant une carbapénèmase de type KPC présentent des niveaux de sensibilité variables aux carbapénèmes. Les études sur l'expression du gène *bla*_{KPC} n'ont pas permis d'identifier une corrélation entre la quantité de transcrits, le nombre de copies du gène, la présence de certains promoteurs et les CMI_s des souches [140,149]. Ainsi, des échecs cliniques ont été rapportés suite à un traitement par imipénème chez des souches produisant KPC possédant pourtant des CMI_s basses aux carbapénèmes [429,430]. L'une des explications pourrait être liée au phénomène d'hétérorésistance, particulièrement marqué chez les souches de *K. pneumoniae* produisant KPC. Un défaut de perméabilité pour les carbapénèmes lié à la modification de l'expression de certaines porines ne semble pas être la cause unique de ce phénomène. Le mécanisme et les conséquences cliniques de ce phénomène observé *in vitro* ne sont pas encore connus.

Les objectifs de cette thèse sont d'étudier les facteurs génétiques associés à la diffusion de certains clones multi-résistants ainsi que l'analyse de l'expression des β -lactamases associées.

Le projet s'articule autour de deux axes :

L'axe principal concerne la carbapénèmase KPC et le clone de *K. pneumoniae* ST258.

Dans ce premier axe de recherche, nous avons pour objectifs :

- D'étudier l'évolution *in vivo* du génome d'une souche de *K. pneumoniae* ST258 ayant persisté chez un patient pendant près de 5 ans.
- D'identifier les éléments de régulation associés à l'expression du gène *bla_{KPC}* dans plusieurs fonds génétiques.
- De comprendre le succès de certains plasmides portant le gène *bla_{KPC}* en analysant leurs transcriptomes.

Les outils mis en place dans la première partie seront appliqués à l'étude d'autres clones multi-résistants et d'autres carbapénèmases. Dans cet axe secondaire, il sera notamment question de :

- Caractériser un clone d'*Enterobacter kobei* appartenant au ST125 dont la céphalosporinase naturelle possède une activité d'hydrolyse accrue vis-à-vis de l'imipénème.
- Caractériser la première espèce de *Shewanella* sp. produisant une BLSE plasmidique et un nouveau variant oxacillinase chromosomique possédant activité carbapénèmase.

Résultats

Chapitre 1 : A 4.5 years within-patient evolution of a colistin resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258

Ce premier article aborde le cas d'un patient ayant été colonisé et infecté par une souche de *K. pneumoniae* ST258 produisant KPC-2 à la suite d'une gastroscopie effectuée à l'aide d'un endoscope contaminé. Cette souche était résistante à de nombreux antibiotiques dont la colistine et restait sensible uniquement à la gentamicine. Ce patient, souffrant de comorbidités multiples, était fréquemment hospitalisé pour des épisodes de cholangites récidivantes, et recevait de multiples cures d'antibiothérapie. De nombreux facteurs étaient donc réunis pour permettre à cette bactérie hautement résistante de persister dans le tube digestif de ce patient.

Sur une période de 5 ans (2009 à 2014), nous avons collecté chez ce patient 17 isolats provenant de dépistages rectaux ou de prélèvements cliniques (urine, bile, sang, prélèvement pulmonaire). Tous ces isolats ont été séquencés par la technologie Illumina, tandis que la souche initiale provenant de l'endoscope (BIC-1) a également séquencée par la technologie PacBio afin permettre l'assemblage complet du chromosome et des 3 plasmides contenus dans cette souche. Nous avons ensuite analysé les SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) apparus dans les isolats cliniques, en utilisant la souche BIC-1 isolée de l'endoscope comme référence. 22 SNPs ont été détectés entre la souche BIC-1 et le dernier isolat clinique S17, tandis qu'un maximum de 39 SNPs a été observé chez l'isolat S15. L'analyse évolutive a permis d'établir un taux moyen de mutations à 7,5 mutations/an chez cette souche de *K. pneumoniae* ST258 productrice de KPC-2.

De façon intéressante, des mutations convergentes sont apparues dans plusieurs voies métaboliques (chaîne respiratoire, respiration anaérobie, composants de la paroi bactérienne...). Par ailleurs, l'analyse de la sensibilité aux antibiotiques de l'ensemble des isolats a permis d'observer des variations de phénotype vis-à-vis de la sensibilité à la colistine et aux aminosides. En effet, les isolats S1 à S12 étaient tous résistants à la colistine suite à l'inactivation du gène *mgrB*, impliqué de la cascade de modification du lipopolysaccharide (LPS) bactérien. Après 3 ans de portage, tous les isolats sont redevenus sensibles à la colistine. Le gène *mgrB* était toujours inactivé, mais des mutations compensatrices dans d'autres gènes impliqués dans la cascade de biosynthèse du LPS, *arnC* et *phoP*, sont apparues uniquement dans les isolats sensibles à la colistine

(S12 à S17). Des expériences de RT-PCR et de clonage ont permis de démontrer l'implication de ces mutations dans la restauration de la sensibilité à la colistine. Ce phénomène de réversion n'avait pas encore été décrit chez *K. pneumoniae*. Le coût important de la modification du LPS sur le fitness de la souche pourrait expliquer ces phénomènes de réversion de phénotype, mais cette hypothèse reste à être démontrée.

Certaines mutations apparues dans le temps ont pu également modifier la virulence de la souche. Des expériences de production de biofilm ont révélé que l'isolat S7 était capable de produire plus de biofilm que les autres. Dans le génome de cette souche, nous avons pu observer une inversion de l'élément *fim* présent au niveau de la région promotrice de l'opéron de synthèse des fimbriae. Ce changement de conformation « OFF » vers « ON » est responsable d'une augmentation de l'expression du gène *fimH* présent dans l'opéron.

Enfin, la réalisation de courbes de croissance en présence de sérum a révélé que tous les isolats étaient incapables de croître dans ces conditions, à l'exception de l'isolat S15 qui s'y multipliait. Malgré l'absence de mutations des systèmes associés au phénotype hypermutateur, ce génome diffère significativement des autres et forme une branche à part dans l'arbre phylogénétique. En effet, 35 mutations uniques à cet isolat sont présentes. Cependant, nous n'avons pas pu identifier celle(s) responsable(s) de cette résistance vis-à-vis du sérum humain.

Cette étude a permis de mettre en évidence la capacité évolutive d'une souche de *K. pneumoniae* ST258 lors d'un portage sur une longue période. La pression de sélection n'a pas été constante car le patient a subi plusieurs cures d'antibiothérapie pendant cette période. Nous avons observé une majorité de mutations non synonymes dans des voies métaboliques importantes et des systèmes de régulation modifiant la sensibilité aux antibiotiques et la virulence. Cette analyse ne traduit donc pas l'évolution « naturelle » de la souche, mais plutôt sa capacité à s'adapter à son hôte. L'arbre phylogénétique met en évidence la présence de plusieurs sous-populations apparues dans le temps. Cette diversité génétique est probablement sous-évaluée dans notre étude, car un seul isolat a été conservé à chaque prélèvement. Le séquençage de plusieurs colonies permettrait probablement d'apprécier plus finement la diversité des souches qui résident au sein de l'hôte.

A 4.5-Year Within-Patient Evolution of a Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–Producing *K. pneumoniae* Sequence Type 258

Agnès B. Jousset,^{1,2,3,4} Rémy A. Bonnin,^{2,3,4} Isabelle Rosinski-Chupin,^{4,5} Delphine Girlich,^{3,4} Gaëlle Cuzon,^{1,2,3,4} Nicolas Cabanel,^{4,5} Hélène Frech,⁶ Eric Farfour,⁷ Laurent Dortet,^{1,2,3,4} Philippe Glaser,^{4,5,a} and Thierry Naas^{1,2,3,4,a}

¹Department of Bacteriology-Parasitology-Hygiene, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP), ²Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance, and ³Faculty of Medicine, Paris-Sud University, Le Kremlin-Bicêtre, ⁴Joint Research Unit Evolution and Ecology of Resistance to Antibiotics, Institut Pasteur, AP-HP, University Paris Sud, ⁵Centre de la Recherche Scientifique, Unité mixte de recherche 3525, Paris, ⁶Department of Biology, Hôpital de Poissy–Saint-Germain-en-Laye, Poissy, and ⁷Department of Microbiology, Hôpital Foch, Suresnes, France

Background. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)–producing *K. pneumoniae* (KPC-Kp) has emerged globally over the last decade as a major nosocomial pathogen that threatens patient care. These highly resistant bacteria are mostly associated with a single Kp clonal group, CG258, but the reasons for its host and hospital adaptation remain largely unknown.

Methods. We analyzed the in vivo evolution of a colistin-resistant KPC-Kp CG258 strain that contaminated a patient following an endoscopy and was responsible for a fatal bacteremia 4.5 years later. Whole-genome sequencing was performed on 17 KPC-Kp isolates from this patient; single-nucleotide polymorphisms were analyzed and their implication in antimicrobial resistance and bacterial host adaptation investigated.

Results. The patient KPC-Kp strain diversified over 4.5 years at a rate of 7.5 substitutions per genome per year, resulting in broad phenotypic modifications. After 2 years of carriage, all isolates restored susceptibility to colistin. Higher expression of the fimbriae conferred the ability to produce more biofilm, and the isolate responsible for a bacteremia grew in human serum. The convergent mutations occurring in specific pathways, such as the respiratory chain and the cell envelope, revealed a complex long-term adaptation of KPC-Kp.

Conclusions. Broad genomic and phenotypic diversification and the parallel selection of pathoadaptive mutations might contribute to long-term carriage and virulence of KPC-Kp CG258 strains and to the dissemination of this clone.

Keywords. KPC; carrier; within-host evolution; NGS; phylogeny.

The increasing incidence of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* (Kp) in healthcare facilities is a cause of global concern. In several countries including Greece, Italy, Israel, and the United States, the rate of infections with Kp resistant to all commercially available antibiotics is worryingly growing [1–5]. Most of these isolates are resistant to all β -lactams due to the production of a class A carbapenemase named KPC and can also be resistant to other antibiotics of last resort such as tigecyclin [6] and colistin [7]. The worldwide dissemination of KPC-Kp is mainly associated with the spread of a single clonal group designated CG258 [1, 8, 9]. The evolutionary success of CG258 in combination with KPC is not yet fully understood. Several factors might have an impact on the global dissemination of a clone, such as increased pathogenicity, high transmissibility, and/or increased

duration of colonization [9]. Analysis of KPC-Kp sequence type (ST) 258 outbreaks indicated that this clone can be easily transmitted between patients for several months following the identification of the initial index case [8]. However, little is known about the outcome of KPC-Kp fecal carriers and the duration of carriage, which are determining transmission factors. Some studies indicate that patients can exhibit spontaneous decolonization within 6 months after KPC-Kp acquisition [10]. In contrast, there have been reports of carriage >1 year [8, 10, 11].

Here we analyzed the evolution of a KPC-Kp ST258 strain that colonized a patient over 4.5 years. This strain underwent considerable genetic and phenotypic diversification to adapt to antibiotic treatments and to promote virulence. These results highlight the capacity of adaptation of a KPC-Kp ST258 strain that may contribute to its propensity to sustainably colonize patients and persist in healthcare institutions.

MATERIALS AND METHODS

Accession Numbers

Kp BIC-1 sequences have been submitted to GenBank under the accession numbers CP022573 (chromosome), CP022574 (pBIC1-a), CP022575 (pBIC-1b), and CP022576 (pBIC-1c).

Received 13 November 2017; editorial decision 30 March 2018; accepted 9 April 2018.

^aP. G. and T. N. contributed equally to this work.

Correspondence: T. Naas, Service de Bactériologie, Hôpital de Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France (thierry.naas@aphp.fr).

Clinical Infectious Diseases® 2018;XX(00):1–7

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/cid/ciy293

Bacterial Strains

Strain Kp BIC-1 transmitted to the patient was recovered from a contaminated endoscope [12, 13]. Strains S1–S17 were isolated from different body sites and are summarized in Table 1. Kp CIP 53153, YC2004 (KPC-Kp ST258) [14], and KN633 (KPC-Kp ST338) [14] are isolates susceptible to colistin used as control in quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) experiments. Kp LM21 was used as positive control in biofilm formation [15]. Electrocompetent *Escherichia coli* TOP10 (ThermoFisher, Villebon Sur Yvette, France) was used as a recipient in electroporation experiments.

Antimicrobial Susceptibility Testing

Minimum inhibitory concentrations (MICs) for carbapenems (imipenem, ertapenem, and meropenem), aminoglycosides (gentamicin, amikacin, tobramycin, and netilmicin), and tigecycline were determined using Etest strips (bioMérieux) on Mueller-Hinton agar plates (Bio-Rad). The MICs for colistin were determined by broth culture microdilution in triplicate. Results were interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines (www.eucast.org).

Whole-Genome Sequencing and Bioinformatics Analysis

The genome of Kp BIC-1 was sequenced using PacBio RS technology (GATC Biotech AG, Mulhouse, France). Illumina whole-genome sequencing (WGS) was performed on Kp isolates BIC-1 and S1–S17. DNA libraries were prepared using the

Nextera XT version 3 kit (Illumina, Essex, United Kingdom) and run on a MiSeq system to generate paired-end 75- or 150-bp reads. Kp BIC-1 genome was used as reference for detecting mutations using BRESEQ [16]. Acquisition of genetic material was assessed by analyzing unmapped reads following their de novo assembly by using Velvet [17]. Phylogeny of the 18 Kp isolates was constructed by considering the 85 identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among their genomes by maximum parsimony using MEGA software [18], refined manually and rooted by considering the direction of each SNP as described previously [19]. Evolutionary rate of the patient strain was determined based on the linear association between the root-to-tip number of mutations and year of strain isolation. The core genome phylogeny of the 18 Kp isolates together with ST258 published sequences and with the ST11 strain HS11286 as an outgroup was performed using the Parsnp program from the Harvest suite [20].

Quantification of Biofilm Formation

Biofilm formation capacity was measured by microtiter plate as previously described [21]. In brief, 2.10^7 colony-forming units (CFU)/mL of an overnight culture was inoculated into 180 μ L of medium M63B1–0.4% glucose in a 96-well polyvinyl chloride microtiter plate (Falcon). After 18 hours of incubation at 37°C, culture medium was removed, bacteria were fixed by adding 100 μ L of Boin solution (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), and rinsed once with distilled water. Bacterial cells were stained for 10 minutes at room temperature by adding 50 μ L of

Table 1. Antimicrobial Susceptibility Testing of the 18 Isolates

Name	Date	Origin	Susceptibility Testing, MIC, mg/L ^a					
			ERT ^b	IMI ^b	MER ^b	COL ^c	TGC ^b	GM ^b
Kp BIC-1	25 Sept 2009	Endoscope	6	1.5	4	32	1.5	1.5
S1	29 Sept 2009	Stool	12	1.5	4	128	2	1.5
S2	12 Oct 2009	Stool	12	1.5	4	64	1.5	1.5
S3	13 Oct 2009	Unknown	16	1.5	6	64	2	2
S4	14 Oct 2009	Unknown	12	1.5	4	64	1.5	1.5
S5	16 Oct 2009	Bile	12	1.5	4	32	1.5	1.5
S6	3 Nov 2009	Stool	12	1.5	4	32	2	2
S7	3 Nov 2009	Stool	8	1	4	32	2	12
S8	11 Nov 2009	Urine	12	1	4	32	2	12
S9	16 Nov 2009	Stool	12	1	4	64	2	12
S10	21 Nov 2009	Urine	12	1	4	64	1.5	12
S11	23 Nov 2009	Unknown	12	1	4	64	1.5	8
S12	15 Jan 2010	Stool	16	1	4	64	1.5	2
S13	29 July 2011	Stool	16	1	4	0.5	2	1.5
S14	29 July 2011	Bile	24	2	8	0.5	2	1.5
S15	23 Aug 2012	Blood culture	8	0.75	3	0.25	1.5	12
S16	4 June 2013	Stool	24	1.5	6	0.5	2	1.5
S17	29 Apr 2014	BAL fluid	12	1.5	6	0.5	2	1.5

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; COL, colistin; ERT, ertapenem; GM, gentamicin; IMI, imipenem; MER, meropenem; MIC, minimum inhibitory concentration; TGC, tigecycline.

^aResistant MIC values are noted in bold, and intermediate MIC values are indicated in italics.

^bPerformed with Etest.

^cPerformed with broth microdilution.

0.5% (wt/vol) aqueous solution of crystal violet in each well and washed twice with distilled water and dried at room temperature. The bound dye was released from stained cells using 80/20 ethanol/acetone solution and measured by absorbance at 595 nm.

Serum Resistance Assay

The serum resistance of isolates S1, S11, S13, S15, S17, and Kp CIP53153 as reference were determined according to the method of Siu et al [22]. In brief, bacterial suspensions were collected from mid-log phase cultures (approximately 5.10^7 CFU/mL) and mixed at a 1:3 (vol/vol) ratio with pooled human serum (sterile and filtered human male AB plasma from Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C with agitation. Colony counts were determined at time 0 and after 30, 60, 120, and 180 minutes of incubation. Serum susceptibility was assessed by plotting the average survival percentage against the incubation time. Each strain was tested 4 times.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed on ≥ 3 independent experiments using GraphPad Prism version 6 software. Data were

compared 2-by-2 using unpaired Student *t* test with Welch correction. *P* values $<.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Clinical Case

In 2009, a nosocomial outbreak of KPC-Kp isolates mediated by a contaminated endoscope occurred in a French tertiary care hospital [12]. Seventeen patients who underwent gastroscopy were contaminated with an endoscope-borne KPC-Kp strain (Kp BIC-1). One of them suffered from recurrent cholangitis due to repetitive lithiasis (Figure 1A). In September 2009, he underwent sphincterotomy with the contaminated endoscope. Until April 2014, 17 KPC-Kp isolates were collected from this patient (S1–S17) (Table 1). In 2013, a prostatic adenocarcinoma and a bladder cancer were diagnosed. In 2014, infectious complications occurred a week after a cystoprostatectomy, with peritonitis secondary to a breach in the Bricker anastomosis. Sepsis secondary to a polymicrobial infection with intestinal bacteria including KPC-Kp was followed by multivisceral failure and death.

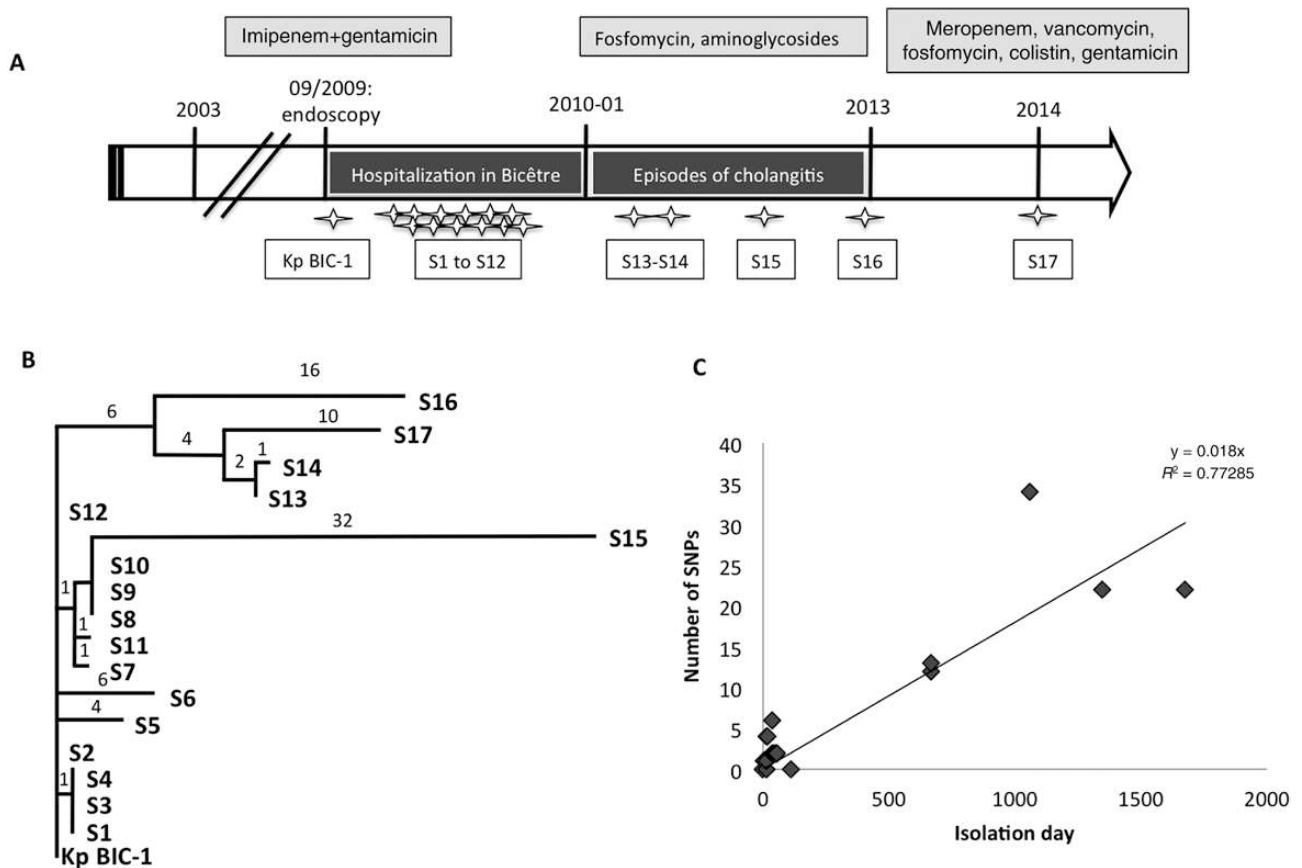


Figure 1. Clinical and microbiological history of a patient colonized with a unique strain of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (Kp) ST258 for 4.5 years. *A*, Seventeen isolates were collected at different moments of the patient's medical life. Kp BIC-1 designates the isolate collected from the endoscope. Known antimicrobial treatments are indicated in light gray boxes. *B*, Phylogenetic analysis of the 18 isolates. Numbers indicate the number of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the corresponding branch. *C*, Molecular clock rate based on the linear association between the root-to-tip number of mutations and year of strain isolation.

Genetic Diversification of a Single KPC-Kp Strain

To demonstrate whether the patient was colonized by a single KPC-Kp strain, we performed Illumina WGS of the 17 isolates and determined the complete genome sequence of Kp BIC-1 strain by combining PacBio and Illumina sequencing data. Kp BIC-1 carries a circular chromosome of 5 394 314 bp containing 5189 predicted coding sequences and 3 plasmids: pBIC-1a (a 170 415-bp IncFIIK2 family), pBIC-1b (a 43 380-bp IncX3 plasmid), and pBIC-1c (a 138 41-bp ColE1 plasmid). Multiple antimicrobial, heavy metal, and arsenic resistance markers were carried by the chromosome and the 3 plasmids (Supplementary Table 1). Phylogenetic analysis with representative KPC-Kp ST258 isolates showed that this strain belongs to clade I of ST258 (Supplementary Figure 1) [2, 23, 24]. SNP-based phylogeny of the 18 isolates showed that they represent a monophyletic clade (Figure 1B). Therefore, all the patients' isolates derived from Kp BIC-1.

Within-host colonization of this strain over 4.5 years led to the accumulation of mutations (deletions, tandem duplications, and SNPs) in up to 39, 24, and 22 loci for the last 3 isolates (S15, S16, and S17, respectively) (Figure 1B). Assembly of unmapped reads revealed no gene acquisition and a remarkably stable plasmid content over 4.5 years of carriage. A total of 98 genetic events occurred (Supplementary Table 2), with most of them in the chromosome ($n = 91$). From this longitudinal study, we estimated that the average evolutionary rate of this KPC strain was of 7.5 SNPs per year per genome (Figure 1C).

Most significantly, the functions affected showed convergence toward specific pathways (Supplementary Table 2): (i) the respiratory chain: with 3 independent mutations in complex 1, heme biosynthesis, and in the *sucC* gene; (ii) anaerobic respiration with mutations in nitrate reductase genes, in the promoter region of the *fnr* gene encoding a regulator of anaerobic metabolism and in the *narL* regulatory gene; (iii) the metabolism of different carbon sources; and (iv) the cell envelope with mutations in porin genes (2 independent mutations in the ferric enterobactin receptor precursor, *pfeA* and an *ompF*-like gene), capsular polysaccharides (the glycosyl transferase *epsJ*, the colanic acid biosynthesis gene *wcaJ*, and the sensor histidine kinase *rcsC*), and the *rfaH* antiterminator.

Restoring Colistin Susceptibility

The patient received during these 4.5 years numerous antimicrobial treatments, including carbapenems and gentamicin (Figure 1A). Accordingly, we observed changes in the antibiotic susceptibility during colonization (Table 1). Kp BIC-1 isolated from the endoscope and the first 12 isolates from the patient (S1–S12) were resistant to colistin with MICs ≥ 64 mg/L (Table 1). This high level of resistance resulted from the insertion of ISKpn25 between nucleotides 141 and 142 of the *mgrB* gene. MgrB plays a prominent role in colistin resistance in Kp by repressing the PhoP-PhoQ regulatory pathway [25, 26]. PhoP indirectly activates the PmrA-PmrB 2-component system,

which results in the overexpression of the *arnBCADTEF* operon leading to addition of the cationic groups (4-amino-4-deoxy-L-arabinose) on the phosphate groups of lipid A. This modification results in a decrease of the electronegative charge of the bacterial surface and resistance to cationic peptides [27]. After 2 years of carriage without any colistin treatment, all isolates (S13–S17) were susceptible to colistin (Table 1). We identified 2 mutations in 2 partners of the colistin resistance pathway that may explain this phenotypic reversion. In 4 isolates (S13, S14, S16, and S17), we identified a mutation in *arnC*, leading to a nonconservative amino acid change, C161Y. ArnC is a lipid-A glycosyltransferase encoded by the *arnBCADTEF* operon. Isolate S15 is mutated in *phoP* (I201N). To investigate the effect of this SNP in PhoP, we quantified the expression of *arnC*, *phoP*, and *phoQ* genes (indirect and direct targets of PhoP) by qRT-PCR on strain S1 resistant to colistin, S15 (PhoP I201N), S17 (ArnC C161Y), and on 3 colistin-susceptible Kp strains used as reference (CIP 53153, YC2004, KN533). Compared to the reference strains, isolates S1 and S17 showed a significantly higher expression of *arnC*, confirming the effect of the *mgrB* disruption (Supplementary Figure 2). In the S15 isolate mutated in PhoP, the expression of *arnC*, *phoP*, and *phoQ* was restored at the level of the reference colistin-susceptible strains (Supplementary Figure 2). Regarding the S17 isolate, no change in the expression of *arnC*, *phoP*, and *phoQ* was observed as compared to S1. We therefore hypothesized that the mutation in *arnC* led to a decrease of the glycosyltransferase activity of the modified ArnC protein. To confirm the role of the SNPs in *phoP* and *arnC* in colistin susceptibility reversion, we complemented the phenotype of S15 and S17, respectively, by cloning the unmutated gene into a modified pUC19 vector (Supplementary Methods). Both complemented isolates S15-pUC19-*phoP* (wild-type [WT]) and S17-pUC19-*arnC* (WT) were resistant to colistin with MICs ≥ 32 μ g/mL (Table 2).

Variation of Aminoglycoside Susceptibility

Kp BIC-1 and the first 6 isolates were susceptible to gentamicin, whereas 6 later isolates (S7–S11 and S15) shifted to gentamicin resistance and an increased susceptibility to amikacin (Table 1 and Supplementary Table 3). SNP analysis revealed the presence of a point mutation in the *aac(6')*-Ib gene carried by pBIC-1c, leading to a L119S amino acid change of the AAC(6')-Ib enzyme in all the gentamicin-resistant isolates. Casin et al showed that this substitution led similarly to an 8-fold decrease in amikacin MICs and to an 8-fold increase in gentamicin MICs [28]. By cloning the 2 *aac(6')*-Ib variants in *Escherichia coli*, the involvement of this SNP for the gentamicin resistance switch was demonstrated (Supplementary Table 3).

Strain Adaptation to Promote Virulence

Specific adaptation that could promote bacterial virulence during long-term carriage was investigated. A feature of KPC-Kp ST258

Table 2. Effect of Single-Nucleotide Polymorphisms in *phoP* and *arnC* on Colistin Susceptibility

Strain	Colistin Susceptibility Testing ^a , MIC, mg/L
Kp BIC-1	32
S15 ^b	0.25
S15 ^b -pUC19	0.25
S15 ^b -pUC19- <i>phoP</i> (WT)	64
S17 ^c	0.5
S17 ^c -pUC19	0.5
S17 ^c -pUC19- <i>arnC</i> (WT)	32

Abbreviations: Kp, *Klebsiella pneumoniae*; MIC, minimum inhibitory concentration; WT, wild-type.

^aDetermined by broth microdilution. Resistant MIC values are highlighted in bold.

^bWith the mutation PhoP I201N.

^cWith the mutation ArnC C161Y.

isolates is their ability to cause bacteremia, especially in immunocompromised patients [29]. Among the 17 isolates, S15 was responsible for a bloodstream infection. To assess if some polymorphisms in S15 might have contributed to its ability to grow in blood, we performed serum resistance assay on 5 isolates from the patient and on the non-ST258 Kp CIP 53153 strain as reference. Isolates S1, S11, S13, S17, and CIP 53153 were highly sensitive to serum, but isolate S15 was not only resistant to human serum but also grew rapidly (Figure 2). An SNP responsible for a nonsense mutation was present in the *gmlC* gene only in this isolate. The *gml* operon is present in the vast majority of KPC-Kp ST258 strains and is known to confer improved survival in the presence of human serum [30]. However, cloning experiment of a WT copy of *gmlC* in S15 could not restore susceptibility to human serum (Supplementary Methods). The reasons for S15's peculiar phenotype might reside in 1 or several of the other 35 unique mutations.

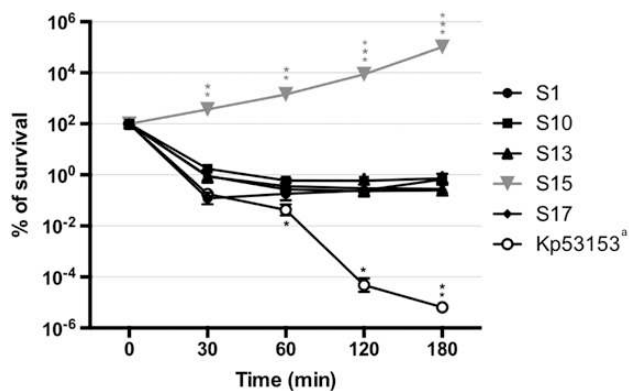


Figure 2. Serum bactericidal assay. The average of survival (%) of each strain in human serum is plotted against the incubation time (n = 4, mean ± standard error of the mean).^a*Klebsiella pneumoniae* (Kp) 53153 is a non-*K. pneumoniae* carbapenemase non-ST258 strain. All strains were compared to the strain S17. **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001, all Student *t* test.

A second common feature of KPC-Kp ST258 is its low capacity to produce biofilm [31]. However, mutations in type 1 fimbriae operon potentially implicated in biofilm production [32] were detected in several isolates. Indeed, whereas the Kp BIC-1 strain and 16 isolates were poor biofilm producers, the isolate S7 produced significantly more biofilm (Figure 3A). We have detected 3 differences in the genome of S7 compared to Kp BIC-1 (Supplementary Table 2), including an inversion of the *fim* element in the promoter region switching from off to on the expression of the type 1 fimbriae operon (Figure 1C) and a nonsynonymous SNP (P180T) in the *fimH* gene encoding the fimbriae adhesin.

Isolates S6, S8, S9, S10, S15, and S17 possess also an insertion of an adenosine in the *fim* element (Figure 3B) but no significant difference in biofilm formation (Figure 3A). To investigate the effect of these genomic modifications on the expression of the type 1 fimbriae, we performed qRT-PCR on isolates Kp BIC-1, S6, and S7 (Supplementary Materials). Compared to Kp BIC-1, we observed 11- and 71-fold increase in the expression of the *fimH* gene in S6 and in S7, respectively (Figure 3C). Although the 11-fold increase in *fimH* expression has no detectable effect on biofilm production under laboratory conditions, it might increase adhesion to host cells and contribute to virulence or colonization [33].

DISCUSSION

Here, we deciphered by WGS the within-patient evolution of a single strain of KPC-Kp over 4.5 years. The study begins with a rare but dramatic case of nosocomial transmission of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae due to a contaminated endoscope, and ends prematurely with the patient's death secondary to a sepsis with the same KPC-Kp. The evolutionary rate was calculated at 7.5 SNPs per year per genome, but this value needs to be considered with caution as the patient received several courses of antimicrobial treatments and, thus, the selective pressure was not constant. This value is between the rate of 3.8 SNPs per year observed in a study of multidrug-resistant (MDR) Kp in Ireland and the United Kingdom [34] and a rate of 10 mutations per genome per year determined in KPC-Kp from a single institution [35].

We therefore analyzed the phenotypic diversification related to antimicrobial pressure. Regarding aminoglycoside susceptibility, we reported a *in vivo* mutation in the *aac(6′)-Ib* gene that conferred resistance to gentamicin. It appeared subsequent to a 10-day treatment with imipenem and gentamicin, and was stable over time. This highlights the risk of rapid change in the specificity of AAC(6′)-Ib and its possible implication in treatment failures. Strikingly, the contaminating strain was colistin resistant but after 2 years of carriage, all isolates became susceptible to colistin. The *in vivo* reversion from a resistant to a susceptible phenotype has been reported in *Acinetobacter baumannii* and in *Pseudomonas aeruginosa* but not yet in Kp [27]. Colistin is currently one of

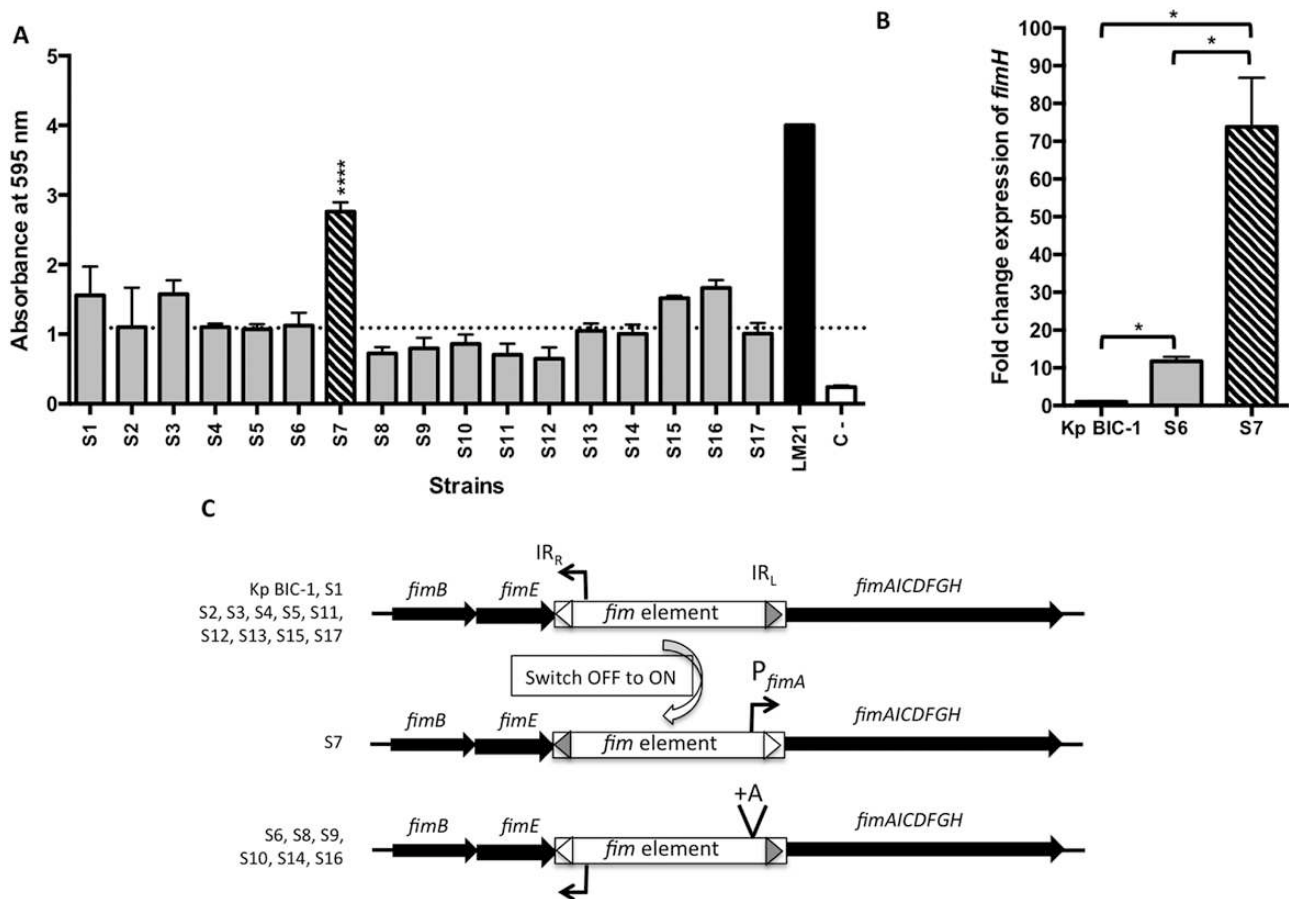


Figure 3. A, Biofilm formation quantification using crystal violet staining. Absorbance values (n = 4, mean ± standard error of the mean [SEM]) are indicated. The dotted line corresponds to the mean absorbance of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (KPC-Kp) strains S1–S6 and S8–S17. Only the absorbance of the S7 strain is significantly increased compared to the other KPC-Kp strains. ****P < .0001, Student *t* test. LM21 was used as a control positive strain [37]. In C-, no bacteria were added in the well. B, Analysis of *fimH* expression using quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (n = 3, mean of fold change expression ± SEM) *P < .05 Student *t* test. C, Schematic representation of the *fim* locus in the 18 isolates. The white and gray arrows indicate right and left inverted repeats, respectively.

the last-resort treatments for severe human infections caused by MDR bacteria, particularly carbapenemase-producing Enterobacteriaceae [7]. Even though plasmid-mediated colistin resistance *mcr* genes have recently been described worldwide [36, 37], high-level colistin resistance in Enterobacteriaceae in human is still mainly due to nontransferable modifications of the lipid A resulting from chromosomal mutations [27]. After 2 years of intestinal carriage without colistin pressure, we identified 2 compensatory mutations in the clinical isolates, highlighting the potential impact of lipid A modifications on bacterial in vivo fitness, similar to what was observed for colistin-resistant *A. baumannii* both in vitro and in vivo [38].

To further explore the long-term adaptation of this clone, mutations that could impact bacterial virulence were searched for. An inversion in the promoter region of the *fim* locus was found in isolate S7 capable to produce significantly more biofilm than others. A search for the orientation of the *fim* element in KPC-Kp CG258 genome sequences available on public repositories revealed that of >500 strains, only 3 were oriented to allow expression of the *fim* operon. Therefore, expression

of the type 1 fimbriae seems extremely rare in KPC-Kp ST258 and might have been selected under long-term colonization. Furthermore, isolate S15 showed a unique evolutionary trajectory in the patient, as it did not share any common SNPs with the previous nor the 2 following isolates and had 39 genomic differences with BIC-1 (Figure 1B and Supplementary Table 2). This isolate is therefore a proof of the genomic diversity that occurred in vivo during persistent carriage, leading to a broad range of adaptive phenotypes contributing to invasive infection. The S15 strain, isolated almost 3 years after infection, acquired the ability to grow in serum, to be resistant to gentamicin, and to reverse the colistin resistance phenotype. The diversity of isolates revealed a complex within-host evolution involving possibly adaptation to specific niches in the gut and leading to a diverse clonal population only partially characterized by the conservation of a single isolate at each sampling.

In summary, our work highlights the importance of leveraging the power of WGS to better understand how clinically important clones are capable to adapt and cause disease in the human host. Currently, no specific clinical guidelines

recommend the typing of >1 isolate per patient, but our findings reveal the need to closely consider within-host variability in future studies of *K. pneumoniae* evolution and transmission.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Clinical Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Notes

Acknowledgments. We thank Alexandre Almeida for fruitful discussion and comments on the manuscript and Dilek Imanci for assistance in Illumina sequencing.

Financial support. This work was supported by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; Université Paris Sud (grant number EA 7361); LabEx Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique, supported by the French National Research Agency (grant number Agence Nationale de la Recherche [ANR]-10-LABX-33); by a project of ANR LabEx Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases; and the Joint Program Initiative on Antimicrobial Resistance (grant number ANR-14-JAMR-0002).

Potential conflicts of interest. All authors: No potential conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59:5873–84.
- Wright MS, Perez F, Brinkac L, et al. Population structure of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from midwestern U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**; 58:4961–5.
- Mavroidi A, Katsiari M, Likousi S, et al. Characterization of ST258 colistin-resistant, blaKPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital. *Microb Drug Resist* **2016**; 22:392–8.
- Rojas LJ, Weinstock GM, De La Cadena E, et al. An analysis of the epidemic of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: convergence of two evolutionary mechanisms creates the “perfect storm.” *J Infect Dis* **2017**; 217:82–92.
- Zowawi HM, Forde BM, Alfaresi M, et al. Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep* **2015**; 5:15082.
- He F, Fu Y, Chen Q, et al. Tigecycline susceptibility and the role of efflux pumps in tigecycline resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One* **2015**; 10:e0119064.
- Rojas LJ, Salim M, Cober E, et al.; Antibacterial Resistance Leadership Group. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: laboratory detection and impact on mortality. *Clin Infect Dis* **2017**; 64:711–8.
- Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* **2015**; 28:565–91.
- Dautzenberg MJ, Haverkate MR, Bonten MJ, Bootsma MC. Epidemic potential of *Escherichia coli* ST131 and *Klebsiella pneumoniae* ST258: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* **2016**; 6:e009971.
- Feldman N, Adler A, Molshatzki N, et al. Gastrointestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* following hospital discharge: duration of carriage and risk factors for persistent carriage. *Clin Microbiol Infect* **2013**; 19:E190–6.
- Conlan S, Park M, Deming C, et al. Plasmid dynamics in KPC-positive *Klebsiella pneumoniae* during long-term patient colonization. *mBio* **2016**; 7:e00742–16.
- Naas T, Cuzon G, Babics A, et al. Endoscopy-associated transmission of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* **2010**; 65:1305–6.
- Dortet L, Naas T, Boytchev I, Fortineau N. Endoscopy-associated transmission of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: return of 5 years' experience. *Endoscopy* **2015**; 47:561.

- Cuzon G, Naas T, Truong H, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg Infect Dis* **2010**; 16:1349–56.
- Favre-Bonte S, Joly B, Forestier C. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. *Infect Immun* **1999**; 67:554–61.
- Deathage DE, Barrick JE. Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods Mol Biol* **2014**; 1151:165–88.
- Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* **2008**; 18:821–9.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* **2016**; 33:1870–4.
- Almeida A, Villain A, Joubrel C, et al. Whole-genome comparison uncovers genomic mutations between group B streptococci sampled from infected newborns and their mothers. *J Bacteriol* **2015**; 197:3354–66.
- Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, Phillippy AM. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol* **2014**; 15:524.
- O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **1998**; 28:449–61.
- Siu LK, Fung CP, Chang FY, et al. Molecular typing and virulence analysis of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from liver abscess patients and stool samples from noninfected subjects in Hong Kong, Singapore, and Taiwan. *J Clin Microbiol* **2011**; 49:3761–5.
- Deleo FR, Chen L, Porcella SF, et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**; 111:4988–93.
- Chen L, Mathema B, Pitout JD, DeLeo FR, Kreiswirth BN. Epidemic *Klebsiella pneumoniae* ST258 is a hybrid strain. *MBio* **2014**; 5:e01355–14.
- Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, et al.; COLGRIT Study Group. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**; 58:5696–703.
- Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**; 57:5521–6.
- Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* **2014**; 5:643.
- Casin I, Hanau-Berçot B, Podglajen I, Vahaboglu H, Collatz E. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bla(PEP-1)-carrying plasmid pST11 encodes an extended-spectrum aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of type Ib. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47:697–703.
- Tzouveleki LS, Miriagou V, Kotsakis SD, et al. KPC-producing, multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 as a typical opportunistic pathogen. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**; 57:5144–6.
- Szjártó V, Guachalla LM, Hartl K, et al. Both clades of the epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clone ST258 share a modified galactan O-antigen type. *Int J Med Microbiol* **2016**; 306:89–98.
- Naparstek L, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Banin E, Navon-Venezia S. Reduced susceptibility to chlorhexidine among extremely-drug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect* **2012**; 81:15–9.
- Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol* **2010**; 10:179.
- Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence* **2013**; 4:129–38.
- Moradigaravand D, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. Evolution and epidemiology of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *mBio* **2017**; 8. doi:10.1128/mBio.01976-16.
- Mathers AJ, Stoesser N, Sheppard AE, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* at a single institution: insights into endemicity from whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59:1656–63.
- Arcilla MS, van Hattem JM, Matamoros S, et al.; COMBAT Consortium. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* **2016**; 16:147–9.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, 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* **2016**; 16:161–8.
- López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, McConnell MJ, et al. Impaired virulence and in vivo fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis* **2011**; 203:545–8.

Chapitre 2 : Promoter characterization and expression of the *bla*_{KPC-2} gene in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*

Les études menées jusqu'à présent indiquent que la sensibilité aux carbapénèmes d'une souche de *K. pneumoniae* produisant KPC-2 n'est pas strictement corrélée au niveau d'expression du gène *bla*_{KPC-2}. Certains isolats possèdent parfois des CMI vis-à-vis des carbapénèmes relativement basses permettant même une catégorisation « sensible » de la souche.

De nombreuses structures génétiques portant le gène *bla*_{KPC} ont été décrites, certains dérivent du transposon Tn4401 tandis que d'autres sont appelées NTE_{KPC} pour « Non-Tn4401 Element ». Certaines structures sont plus prévalentes chez certaines espèces bactériennes. Ainsi, chez les entérobactéries, on retrouve majoritairement les isoformes a et b du Tn4401. Ces isoformes diffèrent principalement par des courtes délétions au niveau des régions promotrices. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, c'est l'isoforme b, sans délétion, (appelé structure A ici), qui est retrouvé dans la plupart des souches produisant KPC, ainsi que différentes structures NTE_{KPC}. Trois promoteurs ont été déjà identifiés dans le Tn4401b. Dans la souche de *P. aeruginosa* PA-2 originaire de Colombie, on retrouve en amont du gène *bla*_{KPC-2}, une partie du transposon Tn3, lui-même tronqué au niveau du gène *bla*_{TEM-1} par l'insertion d'une séquence d'insertion IS26 (Structure B). Une autre organisation a été décrite dans la souche de *P. aeruginosa* PR280 de Porto Rico avec la présence, en amont du gène *bla*_{KPC-5}, d'une séquence du transposon Tn5563 dont la région répétée terminale contient une région promotrice putative (Structure C).

L'objectif de ce travail est (i) d'identifier les différents promoteurs des structures génétiques A, B, et C portant *bla*_{KPC}, (ii) d'identifier les promoteurs préférentiels ou alternatifs utilisés dans différentes espèces bactériennes (*E. coli*, *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*), et (iii) d'identifier si certaines structures génétiques sont associées à une expression plus importante du gène *bla*_{KPC} et des CMI plus élevées pour les carbapénèmes.

Les trois structures génétiques (A, B, C détaillées ci-dessous) ont été clonées dans deux vecteurs navettes pour permettre l'expression, d'une part, chez *E. coli* et *P. aeruginosa* (vecteur pBBR1MCS.3) et, d'autre part, chez *E. coli* et *A. baumannii* (vecteur pIM-arr-2). Les sites de démarrage de transcription ont été déterminés par 5' RACE. L'expression du gène *bla_{KPC}* a été mesurée par RT-PCR quantitative. La sensibilité aux carbapénèmes a été évaluée pour chaque transformant par des CMI.

Les expériences de 5'-RACE ont permis d'identifier que pour une même structure génétique, le promoteur préférentiel diffère en fonction de l'espèce bactérienne (Tableau 13). Deux nouveaux sites de démarrage de transcription et leurs promoteurs putatifs ont été identifiés pour la structure B, permettant l'expression du gène *bla_{KPC-2}* chez *E. coli* (P2b) et *P. aeruginosa* (P3b). Ces promoteurs sont apportés par la séquence tronquée du transposon Tn3.

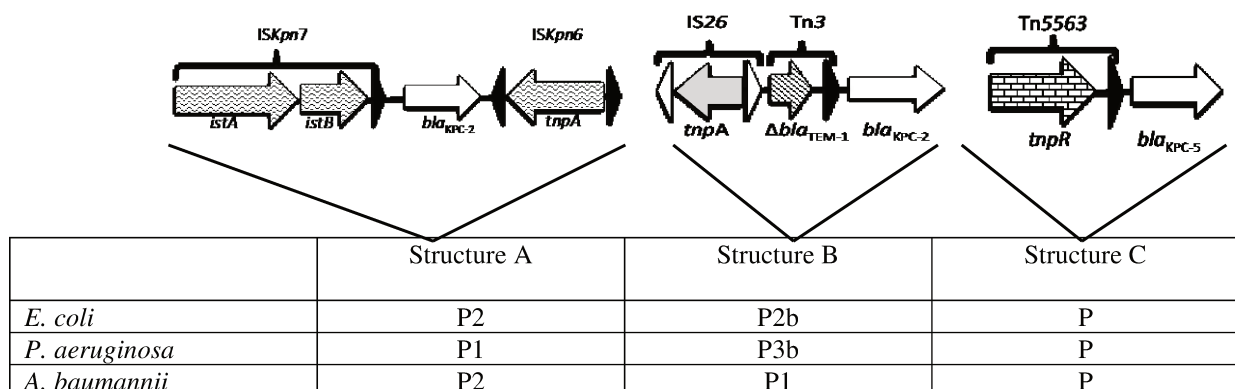


Tableau 13. Récapitulatif des promoteurs préférentiels pour chaque structure génétique dans chaque espèce.

La position de chacune des séquences promotrices est précisée sur la Figure 1 de la publication.

Chez *E. coli*, les CMI aux carbapénèmes les plus élevées sont observées chez les transformants possédant la structure A. Nous avons pu mettre en évidence une corrélation entre le niveau d'expression du gène *bla_{KPC}* et les CMI présentées par les souches uniquement dans le cas des transformants *E. coli*. Les souches de *A. baumannii* présentent des CMI élevées pour l'ensemble des carbapénèmes, quelle que soit la structure génétique clonée, et malgré une faible quantité de transcrits du gène *bla_{KPC}*. Malgré l'utilisation de souches non cliniques pour les techniques de transformation, il semblerait que d'autres facteurs comme des phénomènes d'efflux ou d'imperméabilité

jouent un rôle primordial sur la sensibilité vis-à-vis des carbapénèmes chez *P. aeruginosa* et *A. baumannii*. Des phénomènes de régulations post-transcriptionnelles peuvent aussi être responsables de cette absence de corrélation entre quantité de transcrits et CMI.

Par ailleurs, ce travail met en évidence l'impact du choix d'un vecteur de clonage sur la quantification de l'expression d'un gène. En prenant l'exemple de la structure A clonée dans les 2 vecteurs différents chez *E. coli* et malgré un clonage en anti-sens par rapport au promoteur *Plac*, les CMI et la quantification de transcrits varient d'un facteur 8 et 12 respectivement.

Cette étude confirme la complexité des phénomènes qui régulent l'expression du gène *bla_{KPC}*. La présence de multiples promoteurs au sein d'une même structure permet au gène de s'exprimer dans différents fonds génétiques. Il est tentant de penser que les structures responsables d'une meilleure expression du gène *bla_{KPC}* et des CMI les plus élevées vis-à-vis carbapénèmes diffuseront particulièrement chez certaines espèces, à l'instar de l'isoforme *Tn4401b* chez les entérobactéries. La réalité semble cependant plus complexe. La présence de promoteurs alternatifs pourrait permettre l'expression du gène de résistance dans des situations cliniques bien précises, non évaluées par les techniques de laboratoire classiques.

Promoter characterization and expression of the *bla*_{KPC-2} gene in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*

Delphine Girlich^{1,2}, Rémy A. Bonnin^{1,2}, Agnes Jousset^{1,2} and Thierry Naas^{1,2*}

¹EA7361, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance ‘Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae’, LabEx Lermite, Bacteriology-Hygiene Unit, APHP, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France; ²EERA ‘Evolution and Ecology of Resistance to Antibiotics’ Unit, Institut Pasteur-APHP-Université Paris-Sud, Paris, France

*Corresponding author. Service de Bactériologie-Hygiène, Hôpital Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre cedex, France. Tel: +33-1-45-21-20-19; Fax: +33-1-45-21-63-40; E-mail: thierry.naas@bct.aphp.fr

Received 22 July 2016; returned 19 September 2016; revised 24 January 2017; accepted 24 January 2017

Objectives: KPC-producing pathogens exhibit variable carbapenem susceptibility levels, which is probably the result of the genetic environment of the *bla*_{KPC} genes. Here we determined the transcriptional start sites (TSSs) and the expression of the *bla*_{KPC-2} gene in various genetic contexts and in different hosts (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*).

Methods: The *bla*_{KPC-2} genes along with the upstream sequences derived from Tn4401b (structure A), Tn4401b interrupted by Tn3/IS26 (structure B) and Tn4401b interrupted by Tn5563 (structure C) were cloned in two *E. coli* shuttle vectors (pBBR1MCS.3 for expression studies in *P. aeruginosa* and pIM-arr2 for expression studies in *A. baumannii*). MICs were determined by Etests. 5' RACE (where RACE stands for rapid amplification of cDNA ends) and quantitative RT-PCR experiments were performed to determine TSSs and transcription levels, respectively.

Results: Depending on the bacterial host, different promoters were used for *bla*_{KPC-2} gene expression. The highest transcriptional level was obtained in *P. aeruginosa* with structure C, described only in *P. aeruginosa*. Tn4401b (structure A), harbouring two promoters (P1 and P2), was the most efficient in *E. coli* and *A. baumannii*. This structure was also efficient in *P. aeruginosa*, although the same deduced promoter was not used (P1, instead of P2 used by *E. coli* and *A. baumannii*). Two novel TSSs and putative promoters (P2b and P3b) were identified in structure B. In this structure, P2b and P3b were preferably used in *E. coli* and in *P. aeruginosa*, respectively, whereas P1 was used in *A. baumannii*.

Conclusions: We determined the preferred TSSs of the *bla*_{KPC} gene in each species and described two novel deduced promoters in structure B.

Introduction

The KPC carbapenem-hydrolysing β -lactamases belong to the Ambler class A serine β -lactamases. Initially reported from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*,^{1,2} they have now spread in Enterobacteriaceae and to a lesser extent in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*.^{3–6} The *bla*_{KPC-like} genes are most commonly harboured on a Tn3-family transposon, namely Tn4401, which is located on transferable plasmids of different sizes and structures.⁷ Previous work identified two efficient promoter sequences (P1 and P2) and a putative promoter sequence (P3) forming a stem loop upstream of the *bla*_{KPC} gene (Figure 1a).^{8,9} KPC-producing *P. aeruginosa* were initially reported in 2006 from Colombia and were subsequently increasingly isolated from the Americas, the Caribbean region and China.^{7,10,11} In *P. aeruginosa*, the *bla*_{KPC-2} gene may be chromosome- or

plasmid-located and associated with different genetic structures derived from Tn4401. In *P. aeruginosa* isolates from Colombia, the *bla*_{KPC} gene was inserted in a truncated form of Tn4401, which was interrupted by a Tn3 transposon, itself interrupted by IS26, inserted within the *bla*_{TEM-1} gene. Tn3 insertion occurred immediately upstream of the –35 box of the P1 promoter (Figure 1b).¹² In this previous study the *bla*_{KPC} gene was likely to have been expressed from its native P1 promoter as well as by the outward-directed pOUT promoter of Tn3.¹³ In 2009, Wolter *et al.*³ identified a third genetic environment for the *bla*_{KPC-5} gene in a *P. aeruginosa* clinical isolate from Puerto Rico (Figure 1c). The immediate sequence upstream of the *bla*_{KPC-5} gene was identical to Tn5563 with a 39 bp terminal repeat region, containing a putative –35 promoter element (TTGCTC), and a 65 bp sequence showing identity with a truncated form of the *kluAB* gene (putative post-segregational killing genes),

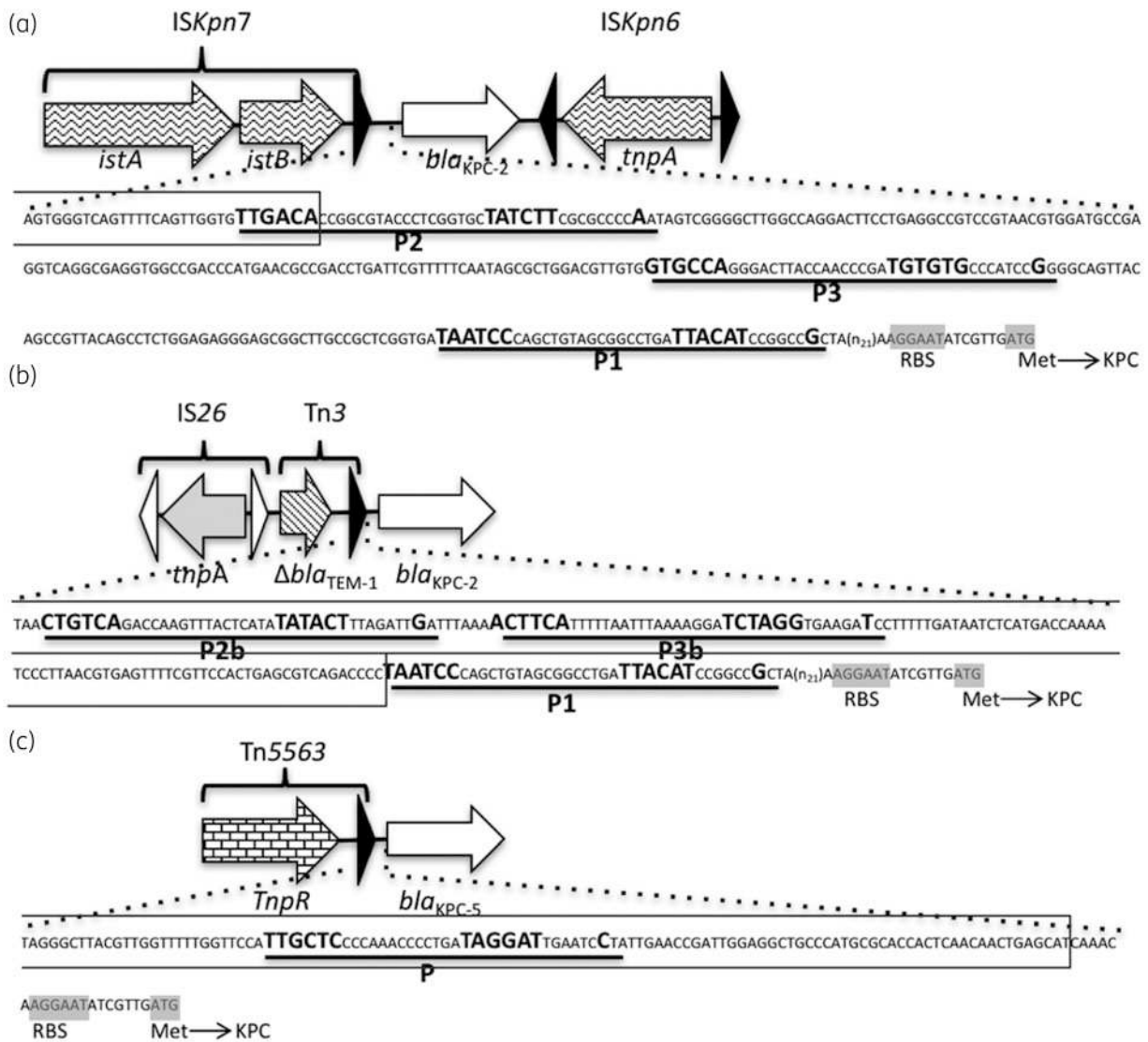


Figure 1. Genetic organization of the upstream region of the *bla*_{KPC-2} gene and mapping of its TSSs. Black triangles represent the inverted repeats. The nucleotides immediately upstream of the *bla*_{KPC-2} translational start codon are shown in the three structures. The +1 and putative -10 and -35 promoter elements are shown in bold: P1, P2 and P3 in structure A (a);^{2,8,9} P1,² P2b (present study) and P3b (present study) in structure B (b); and P in structure C, initially described for *bla*_{KPC-5} (c).³ IS or transposon extremities are framed.

containing a putative -10 promoter element (TAGGAT) for transcription and a ribosomal binding site.³

The aim of our study was to identify the putative promoter sequences involved in *bla*_{KPC} gene expression in *E. coli*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii*.

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids

K. pneumoniae KN2303 (Tn4401b) was used to amplify the entire *bla*_{KPC-2} gene and its upstream region containing P1, P2 and P3 sequences and named ‘structure A’ in the present study.⁹ *P. aeruginosa* PA-2, from Colombia, was used to amplify the entire *bla*_{KPC-2} gene and its upstream region containing P1 and pOUT from Tn3 and named ‘structure B’.¹² The nucleotide

sequence available in the GenBank database under accession number EU400222 was used to construct the *bla*_{KPC-2} gene with an upstream sequence identical to the Tn5563-like structure and named ‘structure C’.³ *E. coli* DH10B, *P. aeruginosa* KG2505 and *A. baumannii* CIP 70.10 (Pasteur Institute, Paris, France) were used as hosts for cloning (*E. coli* only) and for expression experiments as previously described.^{14,15} The tetracycline-resistant pBBR1MCS.3 plasmid and the rifampicin-resistant pIM-arr2 plasmid were used as vectors for expression experiments in *E. coli* and *P. aeruginosa*, and in *E. coli* and *A. baumannii*, respectively.^{12,14} Bacterial cultures were grown in trypticase soy (TS) broth at 37°C for 18 h unless indicated.

MIC determinations

MICs were determined by Etests and results were interpreted following CLSI guidelines.¹⁶

Table 1. Comparison of MICs of β -lactams and bla_{KPC} RNA transcription among transformants in *E. coli* TOP10, *P. aeruginosa* KG2505 and *A. baumannii* BM4547 with the three promoter structures (A, B and C) upstream of the bla_{KPC} gene

Strain	β -Lactam MIC (mg/L)				bla_{KPC} copy number	bla_{KPC} transcript level ($\times 10^3$) \pm SD ^a
	CAZ	IPM	ETP	MEM		
<i>E. coli</i> TOP10						
none	0.12	0.12	0.03	0.02	NA	NA
pBBR1MCS.3 (structure A, deduced promoter P2) ^b	16	3	0.38	1	2	503 \pm 57
pBBR1MCS.3 (structure B, deduced promoter P2b)	2	0.5	0.125	0.125	2	28 \pm 1
pBBR1MCS.3 (structure C, deduced promoter P)	2	0.75	0.125	0.19	2	53 \pm 29
<i>P. aeruginosa</i> KG2505						
none	0.25	0.38	0.094	0.023	NA	NA
pBBR1MCS.3 (structure A, deduced promoter P1)	64	>32	>32	>32	6	40 \pm 3
pBBR1MCS.3 (structure B, deduced promoter P3b)	0.5	1	3	0.38	6	45 \pm 18
pBBR1MCS.3 (structure C, deduced promoter P)	24	>32	>32	>32	6	2840 \pm 73
<i>E. coli</i> TOP10						
none	0.12	0.12	0.03	0.02	NA	NA
pIM-arr2 (structure A, deduced promoter P2)	2	1	0.09	0.125	4	76 \pm 11
pIM-arr2 (structure B, deduced promoter P2b)	0.75	0.19	0.012	0.016	4	3 \pm 2
pIM-arr2 (structure C, deduced promoter P)	1.5	0.38	0.016	0.032	4	12 \pm 5
<i>A. baumannii</i> BM4547						
none	4	0.25	>32	0.5	NA	NA
pIM-arr2 (structure A, deduced promoter P2)	>32	>32	>32	>32	3	0.5 \pm 0.002
pIM-arr2 (structure B, deduced promoter P1)	16	8	>32	>32	3	0.1 \pm 0.01
pIM-arr2 (structure C, deduced promoter P)	8	>32	>32	>32	3	0.1 \pm 0.001

CAZ, ceftazidime; IPM, imipenem; ETP, ertapenem, MEM, meropenem; NA, not applicable.

^aAmount of KPC mRNA transcripts. The results were normalized using the 16 rRNA gene as a standard. The results shown are the means \pm SD of three separate experiments.

^bPreferred deduced promoters are indicated for each strain (see Figure 1 for details).

Cloning experiments and PCR experiments

The In-Fusion HD cloning kit (Clontech, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) was used as recommended by the manufacturer for cloning of the different bla_{KPC} gene-containing structures. Primer sequences are listed in Table S1 (available as Supplementary data at JAC Online). The plasmids pBBR1MCS.3 and pIM-arr2 were restricted using XbaI/SpeI and XbaI/EcoRI, respectively. The bla_{KPC-2} genes were inserted in an antisense direction relative to the plasmid-borne Plac promoter.

Structure A was amplified using primers 6560U and 8848L⁹ for cloning into the pBBR1MCS.3 plasmid and primers ApIMXbaI and KPCpIMEcoRI for In-Fusion cloning into the pIM-arr2 plasmid. Structure B was amplified using primers BpBBXbaI and KPCSpeI for cloning into the pBBR1MCS.3 plasmid and primers BpIMXbaI and KPCpIMEcoRI for cloning into the pIM-arr2 plasmid. Structure C was amplified using primers CpBBXbaI and KPCSpeI for cloning into the pBBR1MCS.3 plasmid and primers CpIMXbaI and KPCpIMEcoRI for cloning into the pIM-arr2 plasmid.

Mapping of the bla_{KPC} gene transcriptional start sites (TSSs)

Reverse transcription and rapid amplification of cDNA ends (RACE; Invitrogen) were performed as previously described.⁹

Quantitative PCR and RT-PCR experiments

In order to quantify transcription of the bla_{KPC} gene in *E. coli*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* one-step quantitative RT-PCR (SYBR Green RotorGene

Qiagen, France) was used as previously described.⁹ Transcriptional levels were standardized relative to the transcriptional level of the constitutive 16S rRNA. 16S rRNA amplification was performed with primers previously described for *E. coli* and *P. aeruginosa*, whereas specific primers were used for *A. baumannii* (Ab16S-F and Ab16S-R; Table S1). The transcriptional levels, determined by quantitative RT-PCR, were interpreted using $2^{-\Delta\Delta CT}$ as previously described.^{9,17} Relative plasmid copy number was measured for each transformant by quantitative PCR experiments performed on total DNA as previously described.⁸ It was calculated as the number of bla_{KPC} genes, representing the plasmid target, divided by the number of *rpoB* genes, representing the chromosomal target (Table S1).

Results and discussion

Susceptibility testing

Among the transformants, β -lactam MICs varied with respect to the genetic structure encompassing the bla_{KPC-2} gene (Table 1). In *E. coli*, structure A conferred the highest level of resistance to ceftazidime and carbapenems as compared with structures B and C. The rapid spread of KPC enzymes in Enterobacteriaceae is associated with Tn4401b.⁹ As our results are in line with the observed high prevalence of structure A among enterobacterial isolates, it is tempting to speculate that it might have been selected for its better activity. In *P. aeruginosa*, structures A and C conferred high-level resistance to β -lactams, whereas structure B conferred only

reduced susceptibility to carbapenems. In *A. baumannii*, MICs of ceftazidime and carbapenems were high, irrespective of the promoter structure used.

Quantitative RT-PCR analysis

The transcriptional level of the *bla*_{KPC-2} gene was determined and compared in the three genetic contexts. Using pBBR1MCS.3 as vector, in *E. coli*, the most efficient genetic structure was structure A, for which an 18- and 10-fold higher transcriptional level was observed as compared with structure B and structure C, respectively (Table 1). In *P. aeruginosa*, structure C was the most efficient, 71- and 63-fold higher than with structures A and B, respectively (Table 1). These results are in accordance with the epidemiology of this carbapenemase, structure A being mostly prevalent in Enterobacteriaceae and structure C only identified in *P. aeruginosa*.

For *A. baumannii* the shuttle vector pIM-arr2 was used as it can efficiently replicate in this species and in *E. coli*. The levels of transcription conferred by each structure were compared with those observed in *E. coli*. Similarly to *E. coli*, the higher levels of transcription were conferred by structure A in *A. baumannii* (Table 1). It is noteworthy that transcriptional differences could be observed in *E. coli* depending on the vector used (pBBR1MCS.3 and pIM-arr2; Table 1).

In order to determine whether the plasmid copy number was correlated with *bla*_{KPC} gene transcription, quantitative PCR experiments were performed. The plasmid copy number of pBBR1MCS.3 was 2 per genomic DNA target, whereas that of pIM-arr2 was 4 in *E. coli*. In *P. aeruginosa* the plasmid copy number of pBBR1MCS.3 was 6 per genomic DNA target. In *A. baumannii* the plasmid copy number of pIM-arr2 was 3 per genomic DNA target (data not shown). Similarly to the previous study by Roth et al.,⁸ no link could be evidenced between the gene copy number, the levels of transcription of the *bla*_{KPC} gene and the susceptibility testing results.

Mapping of the *bla*_{KPC} TSSs

In order to determine the TSSs of the *bla*_{KPC} gene, 5' RACE experiments were performed using total RNAs extracted from recombinant *E. coli*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* harbouring structures A, B and C. In *E. coli* and in *A. baumannii*, the TSS of the *bla*_{KPC} gene of structure A was located 288 bp upstream from the translational start codon. The deduced promoter corresponds to the previously described P2 promoter (Figure 1).⁹ In *P. aeruginosa*, the *bla*_{KPC} gene TSS in structure A was located 39 bp upstream of the translational start codon. The deduced promoter sequence corresponded to the previously described P1 promoter.² The use of P1 resulted in a lower transcriptional efficiency of structure A as compared with structure C in *P. aeruginosa*. Nevertheless, high MICs of carbapenems obtained with structure A in *P. aeruginosa* were not correlated with this result. In structure B, two different TSSs were identified: (i) one located at 185 bp (guanine) and (ii) one located at 142 bp (thymidine) upstream of the translational start codon (Figure 1b). The deduced promoters were named P2b, preferentially used in *E. coli*, and P3b, preferentially used in *P. aeruginosa*. This latest TSS was located 103 bp upstream from that of the previously described P1 promoter.¹² The P1 promoter was that used for *bla*_{KPC} gene expression in *A. baumannii*. The TSS of structure C

was the same irrespective of the host (*E. coli*, *P. aeruginosa* or *A. baumannii*) and similar to that described previously (Figure 1).³

Conclusions

Some studies suggested that higher levels of transcription of *bla*_{KPC} genes were associated with increased carbapenem MICs.^{18,19} However, our study suggests that elevated mRNA transcription and higher plasmid copy number were not systematically correlated with decreased susceptibility patterns. Although well correlated in *E. coli*, the levels of transcription of the *bla*_{KPC} gene were not correlated with the carbapenem MICs in *A. baumannii* or in *P. aeruginosa* (Table 1). Post-transcriptional or translational regulation and other mechanisms, such as porin down-regulation and as yet unidentified mechanisms, have to be investigated.

Beyond the relationship between *bla*_{KPC} gene expression and its impact on MICs, this study highlights the use of different promoters depending on the species in which the gene was expressed. The variability in *bla*_{KPC} gene expression in the same species following exposure to sub-inhibitory levels of antibiotics, as observed by Roth et al.,²⁰ may also be correlated with a differential usage of the promoters.

Funding

This work was funded by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche (EA7361), Université Paris Sud and by a grant from the European Community (MAGIC-BULLET, FP7/HEALTH-F3-2001-27823). D. G., R. A. B., A. J. and T. N. are members of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online.

References

- 1 Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; **9**: 228–36.
- 2 Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1151–61.
- 3 Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N et al. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 557–62.
- 4 Cuzon G, Naas T, Villegas M-V et al. Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing β -lactamase *bla*_{KPC-2} gene in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 5350–3.
- 5 Davies TA, Marie Queenan A, Morrow BJ et al. Longitudinal survey of carbapenem resistance and resistance mechanisms in Enterobacteriaceae and non-fermenters from the USA in 2007–09. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2298–307.
- 6 Robledo IE, Aquino EE, Santé MI et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 1354–7.

- 7** Naas T, Cuzon G, Villegas M-V *et al.* Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1257–63.
- 8** Roth AL, Kurpiel PM, Lister PD *et al.* *bla*_{KPC} RNA expression correlates with two transcriptional start sites but not always with gene copy number in four genera of Gram-negative pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3936–8.
- 9** Naas T, Cuzon G, Truong H-V *et al.* Role of ISKpn7 and deletions in *bla*_{KPC} gene expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4753–9.
- 10** Villegas MV, Lolans K, Correa A *et al.* First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1553–5.
- 11** Ge C, Wei Z, Jiang Y *et al.* Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1184–6.
- 12** Naas T, Bonnin RA, Cuzon G *et al.* Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1757–62.
- 13** Jung JS, Lee HY, Chung JH. Increased expression of the gentamicin resistance gene by a Tn3 sequence located at the upstream region. *Mol Cells* 1998; **8**: 201–4.
- 14** Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2043–8.
- 15** Héritier C, Poiriel L, Lambert T *et al.* Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3198–202.
- 16** Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2013.
- 17** Yuan JS, Reed A, Chen F *et al.* Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 2006; **7**: 85.
- 18** Pournaras S, Vrioni G, Neou E *et al.* Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae strains by time-kill assay. *Int J Antimicrob Agents* 2011; **37**: 244–7.
- 19** Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A *et al.* Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4201–7.
- 20** Roth AL, Lister PD, Hanson ND. Effect of drug treatment options on the mobility and expression of *bla*_{KPC}. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 2779–85.

Chapitre 3 : Transcriptional landscape of a *bla*_{KPC-2} plasmid and response to imipenem exposure in *Escherichia coli* TOP10

Après l'étude de l'impact de la présence de plusieurs promoteurs sur l'expression du gène *bla*_{KPC}, nous avons voulu élargir le champ de l'analyse en étudiant l'ensemble du transcriptome d'un plasmide de type IncFII_K portant du gène *bla*_{KPC-2} par RNA-seq. L'objectif ultime de cette étude est d'identifier les éléments génétiques impliqués dans le succès de ces plasmides et leur association avec le clone de *K. pneumoniae* ST258.

Pour cela, nous nous sommes placés dans un modèle simple, en transformant la souche de laboratoire *E. coli* TOP10 avec un plasmide multi-réplicon IncFII_K-IncFII_B (pBIC1a) provenant de la souche clinique *K. pneumoniae* BIC-1. Nous avons également voulu analyser l'impact de la présence d'une forte concentration d'imipénème dans le milieu de culture sur le transcriptome de la souche *E. coli* TOP10(pBIC1a), afin de mimer les conditions d'une mise sous traitement d'un patient par cette molécule.

La première partie de ce travail a consisté en l'analyse de la structure génétique du plasmide pBIC1a. Il s'agit d'un plasmide « mosaïque » issu de la recombinaison de trois types de plasmides pouvant coexister chez *K. pneumoniae*, pKPN3, pKpQIL et pKpQIL-IT. Le plasmide pKPN3 représente la plus grande partie du plasmide pBIC1a dans lequel des fragments de plasmide pKpQIL-like se sont insérés. La réplicase IncFII_B du plasmide pKPN3 est présente ainsi que l'opéron de transfert et d'autres gènes accessoires. Un fragment possédant une deuxième réplicase de type IncFII_K issue du plasmide pKpQIL est présent. Ce fragment contient le transposon Tn4401a portant le gène *bla*_{KPC-2}. L'analyse des plasmides disponibles dans les banques de données indique que d'autres plasmides multi-réplicons proches de pBIC1a ont également été séquencés. Il semblerait que les phénomènes de recombinaison entre les plasmides pKPN3 et pKpQIL-like ne soient pas rares chez *K. pneumoniae* et qu'ils ne se produisent pas toujours au même endroit.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé le transcriptome du plasmide pBIC1a dans des conditions standards de laboratoire, c'est à dire après culture de la souche de *E. coli* TOP10(pBIC1a) en milieu riche, jusqu'au milieu de la phase

exponentielle de croissance. L'objectif était d'identifier les gènes importants dans le métabolisme de ce plasmide, de distinguer les gènes fortement et faiblement transcrits. Pour cela, un compte des *reads* alignés sur chacun des cadres ouverts de lecture a été réalisé puis normalisé en fonction de la taille du gène et de la taille de la librairie pour obtenir des valeurs de RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*). Cette analyse a permis de montrer que la majorité des gènes sont peu transcrits dans ces conditions. Les gènes les plus exprimés sont les gènes de résistance aux antibiotiques (*bla_{KPC-2}*, *bla_{TEM-1}*, *aph(3')-Ia*), les régulateurs des opérons de résistance aux métaux lourds (*arsR* et *cusR*), les gènes associés à la réplication du plasmide et certains gènes de transfert (*traALMTS*, *finO*).

L'ajout d'une forte concentration d'imipénème dans le milieu de culture (10 fois la CMI de la souche TOP10(pBIC1a) soit 5 µg/ml, pendant 10 minutes) a peu d'impact sur la transcription des gènes du plasmide, avec 14% des gènes (28/193) différentiellement exprimés (p-value ajustée < 0,05) et des niveaux de variation d'expression assez faibles. Parmi les gènes faiblement induits, on note la présence de plusieurs gènes de l'opéron de résistance au cuivre et d'une muréine DD-endopeptidase. Par ailleurs, aucune modification de l'expression du gène *bla_{KPC-2}* n'a été identifiée en présence d'imipénème.

A l'inverse, l'ajout d'imipénème a eu un effet majeur sur la transcription des gènes du chromosome de *E. coli* avec 35% des gènes (1535/4357) différentiellement exprimés. L'activation des régulateurs SoxRS et OxyR (réponse au stress oxydatif), du régulateur IscR (pour la synthèse des clusters Fer-Soufre) et du régulateur Fur (pour l'homéostasie du Fer) traduit une réponse à un stress oxydatif important. Kohanski *et al.* ont proposé un modèle expliquant comment les antibiotiques bactéricides (β -lactamines, aminosides et fluoroquinolones) étaient capables de générer des espèces réactives de l'oxygène [431]. C'est l'activation de la chaîne respiratoire dépendante du cycle de Krebs qui aboutit à la formation d'ions superoxyde (O_2^-). La superoxyde dismutase est rapidement saturée et ne permet plus la détoxification de ces ions O_2^- qui s'accumulent et aboutissent à l'oxydation des clusters Fe-S employés par de nombreuses enzymes à activité deshydratase. Les ions ferreux Fe^{2+} libérés des clusters contribuent à la formation de radicaux hydroxyls (OH^\cdot) par la réaction de Fenton. Ces radicaux hautement toxiques sont capables d'induire des lésions irréversibles sur l'ensemble des composants

cellulaires (ADN, lipides et protéines) et conduire ainsi à la mort bactérienne. En accord avec ce modèle, après l'ajout d'imipénème dans le milieu de culture, nous avons observé l'augmentation de la transcription de nombreux gènes impliqués dans la chaîne respiratoire, le cycle de Krebs, le transport des cations Fe^{2+}/Mn^{2+} et la biosynthèse des protéines à cluster Fe-S. La transcription de 14 petits ARN est également modifiée. Le rôle de certains d'entre eux dans la réponse au stress oxydatif est déjà bien établi, tandis que d'autres pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression de porines, de l'opéron de résistance au cuivre, le métabolisme du carbone, ou encore dans la formation de biofilm.

Cette étude constitue l'une des premières analyses transcriptomique d'un plasmide portant le gène *bla_{KPC-2}*. Nous avons fourni des éléments de réponse pour la compréhension de la biologie des plasmides multi-résistants, afin d'identifier les mécanismes qui aboutissent à la dissémination de certains plasmides à succès. Par ailleurs, malgré la présence du gène *bla_{KPC-2}* fortement transcrit, l'ajout de fortes doses d'imipénème a essentiellement induit un stress oxydatif majeur chez la bactérie hôte. D'autres études sont nécessaires afin de comprendre les facteurs conduisant au succès ou à l'échec d'un traitement par un carbapénème d'une infection par une souche productrice de KPC.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

Transcriptional landscape of a *bla*_{KPC-2} plasmid and response to imipenem exposure in *Escherichia coli* TOP10

Agnès B. Jousset¹⁻⁴, Isabelle Rosinski-Chupin^{4,5}, Julie Takissian^{3,4}, Philippe Glaser^{4,5}, Rémy A. Bonnin^{2-4*} & Thierry Naas^{1-4*}

¹ Department of Bacteriology-Parasitology-Hygiene, Bicêtre Hospital, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris. Le Kremlin-Bicêtre, France

² Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance, Le Kremlin-Bicêtre, France

³ EA7361 “Structure, dynamic, function and expression of broad spectrum β -lactamases”, Paris-Sud University, Faculty of Medicine, Le Kremlin-Bicêtre, France

⁴ Joint research Unit EERA « Evolution and Ecology of Resistance to Antibiotics », Institut Pasteur-APHP-University Paris Sud, Paris, France

⁵ CNRS, UMRS 3525, Paris, France

Running title: Transcriptome of KPC-producing *E. coli* (5 words)

Abstract: 235

Main text: 6242

Figures/tables: 5 figures, 2 tables

Supplementary Material: 4 figures, 6 tables

Keywords: carbapenemase; KPC-producing plasmids; transcriptome; RNA-seq, oxidative-stress (5)

* Co-corresponding authors:

Address: Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital de Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc 94275 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France.

e-mail: thierry.naas@aphp.fr; remy.bonnin@u-psud.fr

34 **ABSTRACT (229)**

35

36 The diffusion of KPC-2 carbapenemase is closely related to the spread of *Klebsiella*
37 *pneumoniae* of the clonal-group 258 and linked to IncFII_K plasmids. Little is known about the
38 biology of multi-drug resistant plasmids and the reasons of their successful dissemination.

39 Using *E. coli* TOP10 strain harbouring a multi-replicon IncFII_K-IncFI *bla*_{KPC-2}-gene carrying
40 plasmid pBIC1a from *K. pneumoniae* ST-258 clinical isolate BIC-1, we aimed to identify
41 basal gene expression and the effects of imipenem exposure using whole transcriptome
42 approach by RNA sequencing (RNA-Seq).

43 Independently of the antibiotic pressure, most of the plasmid-backbone genes were expressed
44 at low levels. The most expressed pBIC1a genes were involved in antibiotic resistance
45 (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{TEM} and *aph*(3')-I), in plasmid replication and conjugation, or associated to
46 mobile elements. After antibiotic exposure, 34% of *E. coli* (pBIC1a) genome was
47 differentially expressed. Induction of oxidative stress response was evidenced, with numerous
48 upregulated genes of the *SoxRS/OxyR* oxydative stress regulons, the Fur regulon (for iron
49 uptake machinery), and *IscR* regulon (for iron sulfur cluster synthesis). Nine genes carried by
50 pBIC1a were up-regulated, including the murein DD-endopeptidase *mepM* and the copper
51 resistance operon.

52 Despite the presence of a carbapenemase, we observed a major impact on *E. coli* (pBIC1a)
53 whole transcriptome after imipenem exposure, but no effect on the level of transcription of
54 antimicrobial resistance genes. We describe adaptive responses of *E. coli* to imipenem-
55 induced stress, and identified plasmid-encoded genes that could be involved in resistance to
56 stressful environments.

57

58 **INTRODUCTION**

59

60 *Klebsiella pneumoniae* is a prominent opportunistic pathogen for hospital- and
61 community-acquired infections (Podschun and Ullmann, 1998). The increasing incidence of
62 KPC-producing *K. pneumoniae* (KPC-Kp) in health care facilities is a cause of global
63 concern, especially in countries where the carbapenemase KPC is endemic, *e.g.* the United
64 States, Israel, Greece and Italy (Duin and Doi, 2016; Pitout et al., 2015). The *bla*_{KPC} gene,
65 coding for an Ambler class A carbapenemase is mostly associated with *K. pneumoniae* but
66 has been reported to a lesser extent in other Enterobacteriaceae, in *Pseudomonas* spp. and in
67 *Acinetobacter baumannii* (Cuzon et al., 2011, 2013). KPC confers resistance or decreased
68 susceptibility to almost all β -lactams, and KPC-producing isolates are often resistant to many
69 other non- β -lactam drugs because of the co-occurrence of *bla*_{KPC} gene with resistance genes
70 to other classes of antibiotics. This multidrug resistance leaves only limited therapeutic
71 options for antimicrobial treatment, and thereby results in high mortality rates (Lee and
72 Burgess, 2012).

73

74 The *bla*_{KPC} genes have been identified on several transferable plasmids of different
75 incompatibility groups (IncFII_K, IncA/C, IncF, IncN, IncP, IncR, IncX and ColE1), but
76 IncFII_K-type plasmids are the most common and are involved in their spreading (Chen et al.,
77 2014b). The pKpQIL plasmid was the first characterized IncFII_{K2} *bla*_{KPC}-carrying plasmid in
78 Israel in 2006, and is strongly associated to the *K. pneumoniae* ST258 pandemic clone (Chen
79 et al., 2013). Subsequently, pKpQIL-like plasmids seemed to have played a major role in
80 KPC dissemination with several reports worldwide (Baraniak et al., 2011; Chen et al., 2013,
81 2014a; Doumith et al., 2017; García-Fernández et al., 2012, 3; Hidalgo-Grass et al., 2012;
82 Papagiannitsis et al., 2016). Complete sequencing of KPC-associated plasmids revealed their
83 plasticity with multiple rearrangements that occurred between pKpQIL-like plasmids and
84 pKPN3, a non-KPC-encoding IncFII_{K1}-FIB plasmid described in *K. pneumoniae* MGH78578
85 (also known as ATCC 700721) (Chen et al., 2013; Jousset et al., 2018). However, little is
86 known about their basic biology, and due to the presence of multiple antimicrobial resistance
87 genes on IncFII_K plasmids, their broad host range, and their rapid dissemination, there is a
88 need to understand the mechanisms underlying regulation and maintenance of these plasmids.

89

90 KPC is mostly associated to *K. pneumoniae* but has also been identified in other
91 Enterobacteriaceae such as *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp, *Enterobacter* sp, *Serratia*

92 *marcescens*, *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii*. KPC-producing *E. coli* isolates
93 usually have low MICs for carbapenems and can remain susceptible according to clinical
94 breakpoints (Landman et al., 2010). Regardless the level of carbapenem resistance, options
95 for treatment of infections due to KPC-producing Enterobacteriaceae are limited and current
96 clinical evidence for treatment guidelines are still lacking. Even if novel β -lactamase
97 inhibitors (such as avibactam) are increasingly used with success (van Duin et al., 2017),
98 carbapenem-based regimens remain a therapeutic option in many countries. Imipenem and
99 meropenem remain useful mainly in combination with other classes of antibiotics or even
100 another carbapenem, such as ertapenem (Bonomo et al., 2017). Pharmacokinetic parameters
101 of the used molecule and Minimal Inhibitory Concentration value of the KPC-producing
102 strain are also crucial in patient outcome (Daikos et al., 2014; Tumbarello et al., 2012).
103 Tumbarello et al. showed that patients infected by carbapenemase-producing
104 Enterobacteriaceae with imipenem MIC values ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ had worse outcomes than patients
105 whose isolates had MIC ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$. On the contrary, therapeutic failure with use of
106 carbapenems against KPC-2-producing isolates possessing low MICs were also reported
107 (Daikos and Markogiannakis, 2011; Weisenberg et al., 2009). Previous studies were made to
108 understand the transcriptional regulation of *bla*_{KPC} revealing the versatile expression of this
109 gene (Cheruvanky et al., 2017; Girlich et al., 2017; Naas et al., 2012). Measuring *bla*_{KPC} RNA
110 expression revealed that *bla*_{KPC} gene copy number and the presence of different promoters
111 cannot be strictly correlated with MICs determination and are not sufficient to explain the
112 level of resistance regarding carbapenems (Naas et al., 2012; Roth et al., 2011). These data
113 triggered our interest in the regulation of *bla*_{KPC} gene and in the entire plasmid transcriptome,
114 in particular under antibiotic exposure.

115 Effect of β -lactams on *E. coli* has been characterized using transcriptomic approaches. In
116 addition to interacting with their targets, bactericidal antibiotics induce parallel changes in
117 bacterial metabolism that promote the formation of reactive oxygen species, which play a role
118 in cell death (Dwyer et al., 2014; Kohanski et al., 2007). β -lactams were also shown by Miller
119 and colleagues to trigger the SOS response *via* the activation of the DpiAB two-component
120 system (Miller, 2004). However, the dynamic underlying oxidative and antibiotic-induced
121 SOS stress response activation needs further exploration. In most of these studies, sub-
122 inhibitory doses of ampicillin were used on fully susceptible *E. coli* isolates expressing no β -
123 lactamase.

124

125 To give new insights into the biology of multidrug resistance successful plasmids, the
126 transcriptome of *E. coli* harbouring pBIC1a, an IncFII_{K2}-FIB-type *bla*_{KPC-2} carrying plasmid
127 was performed. To gain more information about the complex regulation of the *bla*_{KPC} gene
128 and all the transcripts of the cell, the transcriptome of *E. coli* harbouring pBIC1a was
129 performed with or without imipenem exposure. Moreover, to mimic physiopathological
130 conditions that occur during a carbapenem-based treatment, we chose to analyse the response
131 of *E. coli* (pBIC1a) to high doses of imipenem (10 times the MIC value of the strain). We
132 described adaptive responses of *E. coli* (pBIC1a) to imipenem-induced stress with disruption
133 of several metabolic pathways.

134

135 RESULTS AND DISCUSSION

136

137 Mosaic structure of pBIC1a plasmid

138

139 Plasmid pBIC1a is a *bla*_{KPC-2}-encoding plasmid of 170,415 bp in-size from a ST258 *K.*
140 *pneumoniae* BIC-1 (Jousset et al., 2018). This isolate was recovered from a contaminated
141 endoscope in France in 2009 (Naas et al., 2010). This plasmid exhibited an average GC
142 content of 53% and 193 predicted open reading frames (ORF). The overall structure of
143 pBIC1a was highly similar (83% query coverage and 99% nucleotide identity by Blast) to the
144 non-KPC carrying plasmid pKPN3 (Figure 1). Plasmids pBIC1a and pKPN3 shares a
145 common region of 120-kb. This region contains genes responsible for plasmid replication,
146 maintenance, transmission, and heavy metal (arsenic, copper, and silver) resistance, and
147 presents the replicase *repA2* of IncFI type.

148 The rest of pBIC1a plasmid matched with pKpQIL-like plasmids such as pKpQIL and
149 pKpQIL-IT (Figure 1). This region contains the end of the *tra* operon, another replicase *repA*
150 of IncFII_K type, making pBIC1a a multi-replicon IncFII_{K2}-IncFIB plasmid. The multi-
151 replicon status can expand plasmid's host range replication (Villa et al., 2010). Like most of
152 the pKpQIL-like plasmids, the variant *bla*_{KPC-2} gene was found as part of the class II
153 transposon *Tn4401a*. Additional antimicrobial resistance genes were present: *bla*_{TEM-1},
154 *bla*_{OXA-9} (disrupted by a frameshift mutation), *aph(3')-I* and partial *aadA1*. Furthermore, when
155 compared to original pKpQIL, pBIC1a had an additional truncated resistance gene carried on
156 a composite transposon-like element, IS26- Δ *aphA1*- Δ IS26, located downstream of *Tn4401a*.
157 This element has been described in pKpQIL-IT, but differed by an inversion of a 3872 nt
158 fragment that occurred downstream (Figure 1).

159 Therefore, pBIC1a seems to be the result of several transpositions and recombination
160 events between pKpQIL, pKpQIL-IT and pKPN3 plasmids (Figure 2). Differently rearranged
161 pKPN3 plasmids have been described in KPC-*Kp* from the USA, Greece and Italy (Chen et
162 al., 2013; Doumith et al., 2017; Papagiannitsis et al., 2016; Wright et al., 2014). pIT-O6C07
163 (LT009688.1), pBK32179 (JX430448) and pGMI16-005_01 (NZ_CP028181.1) are three
164 fully sequenced IncFII_K-IncFI_B plasmids carrying *bla*_{KPC}, resulting from recombination
165 between pKPN3 and pKpQIL-like plasmids (Figure 2). pIT-O6C07 is the closest to pBIC1a
166 with 97% query coverage and 99% nucleotide identity (Papagiannitsis et al., 2016). The two
167 plasmids only differed by a 4695 nt region containing *bla*_{TEM-1} and *bla*_{OXA-9}, that is missing in
168 pIT-O6C07. Alignment of the four KPC-producing plasmids deriving from pKPN3 indicated
169 that recombination did not occur at the same spot precisely (Figure 2). Recombination events
170 between pKpQIL-like and pKPN3-like plasmids seem common, likely due to the presence of
171 highly homologous regions and their frequent coexistence in *K. pneumoniae*.

172

173 **Transcriptome analysis of *E. coli*(pBIC1a)**

174

175 *E. coli* TOP10, transformed with the KPC-carrying plasmid pBIC1a, was grown at
176 mid-log phase in rich media (Brain Heart Infusion (BHI) liquid media). Two conditions in
177 triplicates were studied: liquid exponential growth as control and liquid exponential growth
178 supplemented with imipenem at final concentration of 5 µg/ml (10 times the MIC value of
179 TOP10-pBIC1a for imipenem, which was determined at 0.5 µg/ml using E-Test). This
180 concentration was chosen because it can be achieved in human serum during the treatment of
181 a bacteriemia due to a KPC-producing Enterobacteriaceae after intravenous administration of
182 1000 mg of imipenem-cilastatin (Signs et al., 1992; Singlas, 1990). Imipenem exposure was
183 limited to 10 minutes to evaluate the immediate cellular response and limit bacterial cell
184 death. The viability of bacterial cells was verified by time-kill analysis and no effect on
185 survival was observed after 10 minutes exposure to imipenem (Supplementary Figure S1).

186 After 10 minutes of exposure, extraction of total RNA was performed. Libraries were
187 obtained from ribo-depleted RNA. After sequencing, a mean of 27.9 ± 3.3 million reads per
188 individual library was obtained. Reads were aligned on *E. coli* TOP10 (CP000948.1) and
189 pBIC1a (CP022574.1) DNA sequences, with $97.25\% \pm 0.78\%$ of the reads mapping on non-
190 ribosomal regions (Supplementary Table S1). The principal component analysis (PCA) and
191 the clustering heatmap plots revealed that the samples clustered to their biological replicates
192 (Supplementary Figure S2).

193

194 **Transcriptional landscape of pBIC1a in the absence of imipenem**

195

196 In BHI medium and exponential growth phase, the replicases *repA* IncFII_k, *repA* IncFI
197 and the regulator *repB* IncFII_k genes were expressed with reads per kilobase per million
198 mapped reads (RPKM) values of 127, 224 and 643 respectively. These genes were used for
199 subsequent comparisons as they are involved in plasmid replication and should be expressed
200 consistently during exponential growth due to continuous cell division (Lang et al., 2012).

201 Alignment of reads on pBIC1a sequence was performed and heatmap visualization was used
202 to identify highly or weakly transcribed regions using IGV software (Robinson et al., 2011).

203 Most of the plasmid genes were expressed at low levels or not expressed during exponential
204 phase in BHI medium, with only 34 of predicted CDS (17%) having RPKM values above the
205 *repA* IncFII_k gene RPKM value (Table 1, Figure 3). These results are comparable with those
206 found in a previous transcriptomic analysis of a multidrug resistance-encoding plasmid where
207 most of the backbone was transcriptionally silent in *E. coli* (Lang et al., 2012). Among the
208 plasmid scaffold genes, *higA* antitoxin gene, part of HigA/HigB type II toxin/antitoxin system
209 was highly expressed suggesting a role in pBIC1a maintenance in *E. coli*. Most genes
210 involved in plasmid transfer function were expressed at low levels, except the genes encoding
211 TraM (relaxosome protein), TraA (pilin precursor), TraL (pilus assembly protein), TraT
212 (surface exclusion protein) and TraS (entry exclusion protein) (Figure 3).

213 Transformation of pBIC1a into the *E. coli* background only resulted into a slight
214 increase in the MIC for imipenem (0.5 µg/ml compared to 0.25 µg/ml in *E. coli* TOP10 wild-
215 type strain). However, our RNA-seq experiments showed that *bla*_{KPC-2} gene was the most
216 expressed plasmidic gene (Table 1, Figure 3). Two promoters were previously shown to
217 contribute to *bla*_{KPC-2} gene expression (Naas et al., 2012). Although our RNA-sequencing
218 protocol was not designed to precisely map transcription start sites, the high coverage by
219 sequencing reads upstream the p1 promoter sequence strongly suggests promoter p2 as the
220 main promoter for *bla*_{KPC-2} gene transcription (Supplementary Figure S3). In addition, RNA-
221 seq analysis revealed no clear transcription termination with reads continuously covering
222 more than one kb downstream *bla*_{KPC-2} stop codon (Supplementary Figure S3). In agreement
223 with this observation, no rho-independent termination site could be predicted by bioinformatic
224 tools (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/>). This transcription covered in antisense the
225 transposase gene of IS*Kpn6*. It might therefore act as a repressor for IS*Kpn6* transposition as

226 an antisense RNA, and/or play a role in the regulation of KPC through mRNA stability as
227 observed for other 3'-UTR (Ruiz de los Mozos et al., 2013).

228 Other resistance genes carried by the plasmid, namely *bla*_{TEM-1} and *aph*(3')-Ia genes
229 were also highly expressed (Table 1, Figure 3). The high expression of *aph*(3')-Ia gene is in
230 accordance with the high level resistance to kanamycin observed (MIC > 32 µg/ml). The
231 association of *bla*_{KPC} gene with other antibiotic resistance determinants also highly expressed
232 provides a very simple scenario for a carbapenemase to spread as a hitchhiker gene, especially
233 in the absence of carbapenem selection.

234 Different operons involved in metal resistance were identified on pBIC1a: the *cus*
235 (*cusCFBA*) and *cop* (*copABCDR*) operons involved in copper and other cations efflux, and the
236 *ars* operon (*arsRDABC*) in arsenical resistance. Here, only the regulators genes *cusR* and
237 *arsR* were highly transcribed. CusR is part of the two component system CusRS that activates
238 the transcription of *cusCFBA* genes in the presence of Cu/Ag (Xiao et al., 2017). pKPN3-like
239 plasmids carrying the highly similar *sil* or *cus* operons are known to confer resistance to high
240 silver concentration in *K. pneumoniae* and in *Enterobacter cloacae* (Finley et al., 2015). On
241 the contrary, ArsR acts as a repressor for the arsenical resistance operon (Ren et al., 2017).

242 Several mobile elements and insertion sequences (IS) were identified on pBIC1a
243 including one copy of IS*Kpn6*, IS*Kpn7*, IS*Kpn26*-like, IS*Kpn28*, IS*Kpn32*, IS1, IS903 and
244 ISE*clI* (Figure 1). In addition to these elements, several fragments of IS26 were identified.
245 These IS were not or weakly expressed that is in accordance with the tight regulation of ISs
246 (Nagy and Chandler, 2004). An interesting feature of IS*Kpn31* was the expression of its
247 passenger gene. Whereas the transposase gene was almost not expressed, its passenger gene
248 (pBIC_0005) belonged to the top expressed genes of the plasmid. This encoded protein is
249 named p019 and has been identified on matrix-assisted laser desorption ionization–time of
250 flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) spectra of *K. pneumoniae* harbouring pKpQIL-
251 like plasmids (Lau et al., 2014; Partridge, 2014). The presence of a peptide signal indicates a
252 probable export but this protein does not share homology with protein with known function.

253 Recently, Buckner *et al.* studied the expression of two *bla*_{KPC}-producing pKpQIL-like
254 plasmids in *K. pneumoniae*, and revealed that 60% of plasmid-encoded genes were expressed.
255 These genes included genes involved in replication, transmission, stability, recombination and
256 toxin-antitoxin systems (Buckner et al., 2018). Comparison of pKpQIL-UK, pKpQIL-D2 and
257 pBIC1a transcripts revealed common expressed genes, including *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *repA*,
258 *traALMTS*, *finO*, *tnp* gene coding for Tn3 transposase. There are growing evidence for the

259 existence of “core” expressed genes associated to pKpQIL-like plasmids, expressed in both *K.*
260 *pneumoniae* and *E. coli* genetic backgrounds.

261

262 **Imipenem-induced response in *E. coli*(pBIC1a): global changes**

263

264 After imipenem exposure, we observed a major impact on *E. coli*(pBIC1a) whole
265 transcriptome with 1563 RNAs being differentially expressed (with adjusted p-values ≤ 0.05)
266 among a total of 4550 (34%). 35% (1535 over 4357) of chromosomally-encoded genes and
267 14% (28 over 193) of pBIC1a genes were affected by imipenem exposure. 765 RNAs were
268 up-regulated and 798 were down-regulated (Supplementary Table S2).. Among differentially
269 expressed genes, 154 RNAs had a Fold-Change (FC) >2 and 329 RNAs had a FC <0.5 .
270 Differential expression of eight selected genes (4 up-regulated and 4 down-regulated genes)
271 was confirmed by RT-qPCR (Supplementary Figure S4).

272

273 **Imipenem-induced response at the plasmid pBIC1a level**

274

275 Effect of imipenem on all pBIC1a transcripts is indicated in supplementary table S3.
276 After imipenem addition in culture medium, 9 predicted CDS of pBIC1a were up-regulated
277 but none with a FC >2 (Table 2). Transcription of copper resistance operon
278 (*copABDRS/pcoE*) was induced after imipenem exposure, with FC values < 2 . With two
279 oxidation states Cu^+ and Cu^{2+} , copper is a cofactor in redox enzymes that uses dioxygen as a
280 substrate (Rademacher and Masepohl, 2012). Bacteria synthesize various cuproenzymes,
281 which play important roles in cellular processes such as energy transduction, iron
282 mobilization and oxidative stress (Rademacher and Masepohl, 2012). In excess, copper
283 becomes toxic as it interacts with free proteinogenic thiol groups, destabilizes iron–sulfur
284 cofactors, and possibly leads to formation of ROS (Chillappagari et al., 2010; Rademacher
285 and Masepohl, 2012). Activation of the copper resistance operon could act as a defense factor
286 to limit toxicity induced by high copper intracellular concentration, hence ROS production
287 (Bondarczuk and Piotrowska-Seget, 2013). The chromosomally-encoded small RybA (also
288 known as MntS) could be involved in this positive regulation. It was up-regulated after
289 imipenem exposure (FC=3.5 p-value = 4.14×10^{-39}). RybA transcripts are stabilized under
290 peroxide stress and members of the CusR regulon are downregulated in a ΔrybA mutant,
291 suggesting that RybA could be a positive regulator of genes involved in copper detoxification
292 (Gerstle et al., 2012).

293

294 Among the membrane associated regulated genes, a plasmid-encoded murein DD-
295 endopeptidase called *mepM* (pBIC_00129) was up-regulated (FC=1.37 p-value=1.9^e-04).
296 Search for conserved domains using the NCBI Database identified MepM as a member of
297 LytM domain containing proteins, that include numerous autolysins involved in
298 peptidoglycan remodelling (Uehara et al., 2009). Bacteria mutated for such enzymes form
299 longer chains due to a default in cell separation (Visweswaran et al., 2013). On the contrary,
300 overexpression of LysM-associated proteins lead to increased autolysis (Uehara et al., 2009;
301 Visweswaran et al., 2013). This small activation of *mepM* could be an indirect consequence of
302 the interaction of imipenem with its Penicillin Binding Proteins (PBP), reflecting an early
303 activation of bacterial lysis, though not observed through time-kill experiments.

304 The chromosomal copy of *mepM* (also known as *yebA*) of *E. coli* MG1655 was previously
305 shown to be up-regulated under oxidative stress (Seo et al., 2015). Here, we only observed the
306 up-regulation of the plasmid-encoded endopeptidase. The two proteins differed by their size
307 and molecular weight, with plasmid-encoded MepM being a 27.08 kDa protein versus 49.04
308 kDa for the chromosomal copy. They shared only 41% of amino-acid identity, suggesting that
309 both enzymes might have different cellular functions.

310 We specifically looked at the level of *bla*_{KPC-2} gene expression that was not modified
311 in the presence of imipenem (FC=1.12, p-value=0.14). There is no genetic argument for an
312 inducible expression of *bla*_{KPC-2} and our results were in agreement with a constitutive
313 expression (Naas et al., 2012).

314 Finally, 19 predicted CDS of pBIC1a were down-regulated with p-values < 0.05, and
315 four of them with FC values <0.5 (Table 2). Six down-regulated genes coded for transposases
316 from various IS. Down-regulation of two helix-turn-helix domain proteins (pBIC_00098 and
317 pBIC_00172) was also observed with p-values of 5.31E-07 and 1.51E-08 respectively. Such
318 proteins may act as global regulators for gene expression (Aravind et al., 2005).

319

320

321 **Imipenem-induced response at the chromosomal level**

322

323 Most of the transcriptomic variations induced by imipenem exposure affected *E. coli*
324 chromosomal genes, with 756 genes (17.4%) being up-regulated and 779 genes (17.9%)
325 down-regulated over 4357 genes.

326 To focused on the most significant changes, as a first step, we analysed global changes
 327 on genes with Fold-Changes values >2 (154 genes) or < 0.5 (325 genes). To identify common
 328 metabolic pathways, genes were analysed for gene ontology (GO) term enrichment using
 329 PANTHER web application. Enriched GO terms from up-regulated genes (adjusted p-values
 330 ranging from $2.23e-4$ to 0.053) and from down-regulated genes (adjusted p-values ranging
 331 from $2.22e-10$ to 0.047) were further explored separately on the REVIGO web application to
 332 visualize relationships and redundancy among GO terms (Supek et al., 2011) (Figure 4). An
 333 activation of the aerobic respiration was observed with enrichment in the pathway of electron
 334 transport chain (p-value= 0.014). Expression of genes involved in cluster Fe-S assembly (p-
 335 value= 0.016) and in ion transport (p-value= 0.015) was also affected. Besides, downregulated
 336 genes were mostly associated to anaerobic respiration (p-value $2.22e-10$) and generation of
 337 precursors of metabolites and energy (p-value $2.55e-10$). Up and down-regulated genes were
 338 enriched in oxydo-reduction process (p-values 0.015 and $1.82e-07$ respectively), suggesting
 339 that oxidative stress might have occurred in bacterial cells after imipenem exposure (Figure
 340 4).

341

342 **Imipenem induces oxidative stress in *E. coli*(pBIC1a)**

343 We searched for genes that could be related to regulons induced by oxidative stress
 344 conditions in *E. coli* (Blanchard et al., 2007; Seo et al., 2015; Zheng et al., 2001). Activation
 345 of 9 genes that belonged to the SoxRS regulon was observed e.g. the superoxide dismutase
 346 *sodA* (FC= 2.1 , adjusted p-value= $4.6e-20$), the fumarate hydratase *fumC* (FC= 2.2 , adjusted p-
 347 value= $8.3e-10$), the aconitate hydratase *acnA* (FC= 1.9 , adjusted p-value= $2.4e-13$), the
 348 paraquat-inducible membrane protein A *pqiA* (FC= 1.4 , adjusted p-value= $3.8e-06$)
 349 (Supplementary Table S4). SoxR is a transcription factor containing [2Fe-2S] clusters, which
 350 is the sensor enhancing the expression of SoxS in response to oxidative stress (Lushchak,
 351 2011). Then, SoxS regulates genes implicated in superoxide scavenging, carbon metabolism,
 352 DNA repair and xenobiotic efflux (Blanchard et al., 2007). Our transcriptomic data revealed
 353 differential gene expression of other regulons linked to oxidative stress response in *E. coli*,
 354 such as the OxyR regulon (*grxA*, *trxC*, ...), the IscR regulon for Iron-Sulfur cluster binding
 355 and assembly (*iscR*, *iscA*, *iscU*, *iscS*, *bfd*, *fdx*...) and the Fur regulon for iron homeostasis and
 356 uptake machinery (*fep*, *fepD*, *fepG*, *fecR*, *efeB*, *efeU*, *yncD*...) (Supplementary Table S4)..

357 Induction of oxidative stress after exposure to β -lactams has been observed in previous
 358 studies (Belenky et al., 2015; Kaldalu et al., 2004). Kohanski et al. in 2007 and Dwyer et al.
 359 in 2014 proposed a model explaining how bactericidal antibiotics were able to generate

360 reactive oxygen species (ROS) in bacterial cells in addition to their main mode of action
361 (Dwyer et al., 2014; Kohanski et al., 2007). According to these studies, interactions between
362 β -lactams and Penicillin-Binding Proteins (PBPs) stimulate the oxidation of NADH through
363 the electron transport chain, which is dependent on the tricarboxylic acid (TCA) cycle.
364 Hyperactivation of the electron transport chain stimulates superoxide ($O_2^{\cdot-}$) formation, which
365 overwhelms superoxide dismutase defences and leads to the oxidation of iron-sulfur clusters
366 ($[4Fe-4S]^{2+}$) employed by numerous dehydratase enzymes. The release of ferrous (Fe^{2+}) ions
367 leads to hydroxyl radicals (OH^*) *via* the Fenton reaction, which damage DNA, lipids and
368 proteins and therefore contributes to antibiotic-induced cell death.

369 Activation of the TCA cycle and new iron-sulfur cluster synthesis have been shown to
370 play critical roles in the initiation of the oxidative stress response after antibiotic exposure
371 (Kohanski et al., 2010). Interestingly, our transcriptomic data revealed an overexpression of
372 almost all TCA enzymes. In addition, we observed up-regulation of numerous Fe-S cluster
373 binding proteins and Fe-S cluster assembly proteins (*iscS*, *iscU*, *iscA*, *yadR* and *gntY*)
374 indicating an activation of the Fe-S cluster biogenesis. Consistent with this, genes encoding
375 proteins related to iron uptake and storage were regulated following imipenem exposure.
376 Several iron permeases were up-regulated such as *efeU* (ferrous iron permease) (validated by
377 RT-qPCR), *efeB* (exogenous heme iron acquisition), *fecI* (minor sigma factor that initiates
378 transcription of ferric citrate transport genes), *fecR*, *fepB*, *fepD*, *fegG* (ferric enterobactin ABC
379 transporter complex), and *yncD* (outer membrane protein involved in iron transport). In
380 parallel, *bfd* gene encoding iron storage protein bacterioferritin-associated ferredoxin was up-
381 regulated but not its partner coding the bacterioferritin Bfr. Bfd and Bfr can store iron as
382 ferric iron to protect cells against ROS resulting from ferrous iron overload (Andrews et al.,
383 2003).

384 The uptaken Fe^{2+} could also be reintegrated into Fe-S clusters to stabilize dehydratases
385 and therefore be a metabolic feedback to counteract antibiotic toxicity (Py and Barras, 2010).
386 YtfE is a protein known to recruit and integrate Fe^{2+} to repair Fe-S cluster damaged proteins
387 (Py and Barras, 2010). Here, *ytfE* was not induced in our conditions (FC=0.816, p-
388 value=0.16), suggesting that no suppression of Fenton reaction occurred through *ytfE*.
389 Therefore, Fe^{2+} uptake could directly fuel Fenton reaction to produce the highly reactive HO^*
390 and contribute to maintain oxidative stress.

391 Another parameter critical to suppress Fenton reaction is the scavenging of H_2O_2
392 generated in bacterial cells by *sodaA*. This can occur through the activation of peroxidases like
393 KatG, KatE, AhpC, AhpF, or the protein complex Hcp-Hcr being a putative hydroxylamine

394 reductase or a peroxidase (Almeida et al., 2006; Wolfe et al., 2002). Here, only the two copies
395 of *ahpF* were slightly up-regulated (with FC values <2). Of note, *katG* and *hcp-hcr* were even
396 down-regulated. Microarray data collected by Dwyer et al. also observed this down-regulation
397 in *E. coli* MG1655 exposed to ampicillin (Dwyer et al., 2014). Nevertheless, in this study,
398 overexpression of *E. coli katG* and *ahpCF* partially protected the bacteria from β -lactams
399 lethality, confirming the protective role these peroxidases.

400 Taken together, these results suggest that neither suppression of Fenton reaction, nor
401 H₂O₂ detoxification were highlighted by RNA-Seq after 10 minutes of imipenem exposure.

402

403 **Genes involved in cell wall**

404 Imipenem is an antibiotic targeting bacterial cell wall biogenesis. Therefore, we
405 looked at cell envelope components that could be implicated in reducing entry of antibiotic or
406 in resistance to osmotic stress.

407 Among the osmotic stress-inducible genes, *ybaY*, *bdm* and *osmY* were up-regulated.

408 YbaY is a lipoprotein associated to various stress responses like the oxidative stress response
409 (Cheung et al., 2003), the RpoS-induced stress (Weber et al., 2005), and the osmotic stress
410 response (Asakura and Kobayashi, 2009). Bdm is involved in flagellar biosynthesis, and its
411 overexpression, regulated by the RcsB transcriptional activator, enhances biofilm formation
412 (Kim et al., 2015; Sim et al., 2010). Here, RcsA/RcsB regulators that belong to the
413 multicomponent RcsF/RcsC/RcsD/RcsA-RcsB phosphorelay system were indeed up-
414 regulated upon imipenem addition (Gottesman and Stout, 1991; Majdalani and Gottesman,
415 2005). Any perturbation of the peptidoglycan activates the Rcs phosphorelay, and RcsB
416 activity enables bacteria to survive in the presence of the antibiotics (Laubacher and Ades,
417 2008), possibly due to a modification of bacterial cell wall through synthesis of the colanic
418 acid capsular exopolysaccharide. Modification of expression of other genes belonging to the
419 Rcs regulon and involved in flagellar biosynthesis was observed, like the downregulation of
420 *flhC/flhD*.

421 Few genes associated to membrane components were down-regulated, like *ompW*
422 coding for an outer-membrane porin. Expression of *ompW* was validated by RT-qPCR
423 (Supplementary Figure S4). OmpW has been implicated in the adaptation to stresses in
424 various species, but its biological function is not yet fully characterized. *ompW* expression
425 was decreased in *E. coli* in response to oxidative stress by an unknown mechanism
426 (Blanchard et al., 2007). Recently, Xia et al. revealed a role in the carbon and energy
427 metabolism in *E. coli* (Xiao et al., 2016). Expression of *ompW* is modulated by various

428 regulators including RybB, a small RNA dependent on the alternative sigma factor σ^E , and the
429 transcriptional regulator FNR (Fumarate and Nitrate Reduction) particularly important during
430 anaerobic transition ((Xiao et al., 2016). Here, both *rybB* and *fnr* were overexpressed after
431 imipenem addition (FC=1.546; p-value=0.023 and FC=2.38; p-value= 1.1e-46 respectively)
432 and thus probably involved in *ompW* regulation.

433 In parallel to *ompW* down-regulation, several efflux pumps were up-regulated, *mdfA*
434 (also known as *cmr*) *mdtK* and *sugE*, with Fold-Change values <2. These proteins are part of
435 multi-drugs efflux pumps and could help bacteria to get rid of carbapenems and/or oxidative
436 compounds.

437

438 **Small RNAs**

439 Bacterial small RNAs are major actors for bacterial adaptation to various stresses and
440 some of them are involved in regulatory circuits controlling antibiotic resistance (Felden and
441 Cattoir, 2018). For instance, sRNA can control antimicrobial intracellular concentration by
442 regulating the expression of several outer membrane proteins and efflux pumps. They can also
443 regulate the expression of bacterial component like the LPS or enzymes involved in cell wall
444 biosynthesis (Felden and Cattoir, 2018).

445 Following imipenem exposure, 14 sRNAs were differentially expressed
446 (Supplementary Table S5): 11 were up-regulated and 3 were down-regulated.

447 IsrB, also known as AzuC, was the most induced sRNA (FC=10.334; p-value=4.26e-
448 80). No target has been clearly identified to date, but hydrogen peroxide treatment could also
449 induce AzuC expression 4-fold in a previous study in *E. coli*, suggesting a role in oxidative
450 stress response (Hemm et al., 2010).

451 *cyar* (also known as *ryeE*) (FC=1.93; p-values=1.33e-12) and *omrA* (also known as
452 *rygA*) (FC=1.88; p-value=6.3e -5) are known to decrease the expression of outer membrane
453 proteins OmpX and OmpT, respectively (Rau et al., 2015; Vogel and Papenfort, 2006).
454 However, it is not clear whether this down-regulation occurs at the translational level or
455 through the decay of the mRNA targets (Vogel and Papenfort, 2006). Here, we could not
456 observe a down-expression of *ompX* and *ompT* suggesting that base-pairing of both sRNAs
457 with their targets does not affect RNA stability but would essentially interfere with the
458 translation of the outer membrane proteins. OmpT belongs to aspartyl proteases, involved in
459 virulence by protecting cells from cationic antimicrobial peptides, activation of the
460 anticoagulation pathway, and inflammatory responses (Hwang et al., 2007). OmpX mediates
461 adhesion to eukaryotic cells and negatively regulates porins involved in β -lactam uptake like

462 OmpK35 and OmpK36 in *Enterobacter aerogenes* (Dupont et al., 2004; Kim et al., 2010). Its
463 expression also increases under high osmolarity conditions (Dupont et al., 2004). Inhibition of
464 *ompX* translation through interaction with CyaR might indirectly increase carbapenem influx
465 in bacterial cells.

466 Another target of OmrA is the transcriptional regulator CsgD that controls biofilm formation
467 (Mika and Hengge, 2014). In biofilms, bacteria survive as persister cells and become more
468 tolerant to antibiotics. By downregulating *csgD* and therefore biofilm formation, the
469 expression of OmrA could increase susceptibility to antimicrobial agents.

470 *csrB* and *csrC* were less expressed in the presence of imipenem. These two sRNA
471 regulate the carbon storage regulator *csrA*, which activates the expression of several
472 metabolic enzymes involved in energy conversion (Weilbacher et al., 2003). One of the
473 targeted enzymes is the Acetyl CoA synthase (FC=1.34 p-value=0.006), which when induced
474 may contribute to fuel the TCA cycle by a secondary pathway.

475 RybA (also known as MntS) was also an up-regulated small RNA during imipenem
476 exposure. As previously mentioned, RybA transcripts could be implicated in the up-regulation
477 of the plasmid copper resistance operon (see section Imipenem-induced response at the
478 plasmid pBIC1a level).

479

480 **Conclusions**

481

482 Taken together, our work showed that imipenem induced an oxidative stress response
483 in *E. coli* TOP10(pBIC1a) and perturbed several regulatory networks and cellular compounds
484 (Figure 5). In particular, treatment with high concentrations resulted in the activation of the
485 TCA cycle, the electron transport chain pathway and iron metabolism. Few enzymes were
486 induced supposedly to limit the damages caused by oxidative stress, such as detoxification by
487 superoxide dismutase SodA, and protein damage repair by thioredoxins and glutaredoxins
488 (Figure 5).

489 β -lactams are also known to trigger a SOS response in Gram-negative bacilli (Michel,
490 2005) but activation of the SOS response was not evidenced here. SOS response can be
491 induced when bacteria are exposed to subinhibitory concentrations of antibiotics. In this
492 study, high doses of imipenem were used instead to reproduce the effect of antibiotic
493 concentrations reached in human serum. Another explanation might be that SOS response
494 depends on the PBPs targeted by the β -lactam (Miller, 2004). After exposure to ampicillin,
495 PBP3 inhibition causes filamentation and is known to stimulate the DpiAB two-component

496 system, which activates the SOS response (Miller, 2004). At the opposite, imipenem
497 preferentially targets PBP2 (Davies et al., 2008). By targeting preferentially some PBP, β -
498 lactams seem to induce different stress responses.

499 Dissemination of KPC-encoding plasmids in Gram-negative bacteria poses a serious
500 threat to medical treatment and patient management. To better understand the plasmid biology
501 of a prototypical successful IncFII_K-IncFI *bla*_{KPC-2}-carrying plasmid, a transcriptomic analysis
502 was performed. Genes involved in antibiotic resistance and basic plasmid function such as
503 replication were highly expressed in broth culture. Carbapenem exposure did not influence
504 the level of transcription of antimicrobial resistance genes. However, despite high
505 transcription of *bla*_{KPC-2} gene, we observed a major impact of imipenem on chromosomal
506 genes and identified adaptive responses of *E. coli* to imipenem-induced oxidative stress.

507

508

509 **METHODS**

510

511 **Bacterial transformation**

512 *K. pneumoniae* BIC-1 is a KPC-producing clinical strain isolated at Bicêtre Hospital in
513 2009 (Naas et al., 2010). This strain has been entirely sequenced using PacBio and Illumina
514 sequencing (Jousset et al., 2018). The natural IncFII_K-IncFI plasmid carrying *bla*_{KPC-2} gene,
515 named pBIC1a was extracted from the BIC-1 strain by using the Kieser extraction method
516 and subsequently analysed by electrophoresis on a 0.7% agarose gel (Kieser, 1984). Plasmid
517 pBIC1a was then introduced by electroporation into electrocompetent *E. coli* TOP10
518 (Invitrogen, Eragny, France) using a Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-
519 Coquette, France). The transformant *E. coli* TOP10-pBIC1a was selected on plates
520 supplemented with ticarcilline 50 mg/L (Sigma-Aldrich). The presence of pBIC1a was
521 verified by PCR and by plasmid extraction followed by electrophoresis on a 0.7% agarose gel.

522

523 **pBIC1a sequence analysis**

524 Annotation of pBIC1a was performed using PROKKA (Seemann, 2014). Mobile
525 element proteins and insertion sequences were annotated with ISFinder ([https://www-
526 is.biotoul.fr/index.php](https://www-is.biotoul.fr/index.php)) (Siguiet et al., 2006). Sequences of plasmids pKPN3 (NC_009649.1),
527 pKpQIL (GU595196.1), pKpQIL-IT (NC_019155.1), pITO6-C07 (LT009688.1), pBK32179
528 (JX430448) and pGMI16-005-01 (NZ_CP028181.1) were used for genomic comparison.

529 Plasmid alignment was performed using BRIG ([Alikhan et al., 2011](#)) and sequence similarity
530 was studied using BLAST software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

531

532 **Time-kill experiments**

533 Time-kill experiments were performed to evaluate bacterial cell death after 10 min of
534 imipenem exposure. Briefly, 10 ml of a log-phase culture (OD₆₀₀ at 0.5) of *E. coli* TOP10-
535 pBIC1a was divided in two tubes of 5 ml. A final concentration of imipenem at 5 µg/ml was
536 added in one tube. After 10 minutes, ten-fold serial dilutions were performed and 100 µl of
537 diluted cultures were plated on agar plates without antibiotic. All these steps were performed
538 in triplicates. The next day, colony-forming units (CFU) were counted.

539

540 **RNA isolation & purification**

541 An overnight culture of *E. coli* TOP10-pBIC1a was diluted 100-fold in fresh BHI
542 broth and allowed to grow to an OD₆₀₀ of 0.5. The culture was then split and imipenem
543 (Imipenem-Cilastatin, Mylan, USA) was added to one of the cultures at a final concentration
544 of 5 µg/ml. Ten minutes later, 2 ml of each culture were taken and mixed with RNA protect
545 (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. Cells were
546 immediately pelleted by a 10 min centrifugation at 5000 g. Biological triplicates were
547 performed.

548 RNA was extracted using GeneJet RNA extraction kit (ThermoScientific,
549 ThermoFisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). DNase treatment was performed with
550 the dsDNase kit (ThermoScientific) according to the manufacturer's protocol. RNA
551 concentration was measured using Qubit RNA BR assay kit (Invitrogen, ThermoFisher
552 Scientific), and RNA quality was evaluated using the Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000
553 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). RIN >9 were obtained for all the RNA
554 samples. Verification of complete removal of any contaminating DNA was performed via
555 PCR amplification of *recA* housekeeping gene. A total of 2.5 µg of total RNA was treated
556 with the Ribo-Zero rRNA Removal kit according to the manufacturer's instructions (Illumina,
557 CA, USA) to remove 16S and 23S rRNAs. rRNA removal efficiency was then analysed via
558 the Bioanalyzer RNA 6000 Nano Kit. Ribodepleted RNA concentration was measured using
559 Qubit™ RNA HS assay kit (Invitrogen).

560

561 **RNA library & sequencing**

562 cDNA libraries were prepared using the NEBNext® Ultra Directional RNA Library

563 Prep Kit for Illumina protocol (New England Biolabs, MA, USA). The quality of the cDNA
564 was validated using the Agilent 2100 Bioanalyzer DNA1000 kit (Agilent Technologies) and
565 quantity was determined with the Qubit dsDNA BR Assay (ThermoFisher Scientific).
566 Sequencing of the library was performed with an Illumina HiSeq 2500 in single-read mode
567 with 50 cycles.

568

569 **RT-qPCR**

570 Eight up and down-regulated genes were selected and expression levels were analysed
571 by quantitative RT-PCR to validate the RNA-Seq data. The primers used are listed in
572 Supplementary Table S6. An input of 100 ng of total RNA, with no contaminating DNA was
573 used. One-step RT-qPCR was performed using One-step RT-PCR kit (Qiagen) according to
574 the manufacturer's protocol, and the reactions were carried out in 96-well plates with CFX96
575 Real-time PCR System (BioRad, USA). All qRT-PCRs included an initial denaturation step
576 of 30 s at 95°C, 35 cycles of denaturation (95°C/1s), annealing (52°C/5s), and extension
577 (72°C/7s). Expression of each gene was normalized using *rpoB*, *idnT* and *yiaJ* genes as
578 previously described (Zhou et al., 2011). Expression of these genes was not influenced by the
579 presence of imipenem according to the RNA-Seq data. All reactions were carried out in
580 triplicates. The relative abundance of gene transcripts among the imipenem treated group was
581 calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

582

583 **RNA-Seq data analysis and differential expression analysis**

584 Reads generated from strand-specific RNA-seq experiments were aligned to the
585 genome of *E. coli* TOP10 genome (CP000948.1) and to that of pBIC1a sequence
586 (CP022574.1) by using the software Bowtie (version 0.12.7) (Langmead et al., 2009). Reads
587 that mapped in more than four different positions on the genome were discarded i. e. reads
588 corresponding to rRNA. RNA-seq data were analysed as described (Rosinski-Chupin et al.,
589 2015) by using Rsamtools (version 1.26.2), GenomicAlignments (version 1.10.1).
590 GenomicFeatures (version 1.26.4) and DESeq2 (version 1.14.1) and SARTools (Varet et al.,
591 2016) in R 3.3.1. Only adjusted p-values were used and were obtained using the Benjamini-
592 Hochberg correction for false discovery rate (Benjamini and Hochberg, 1995). Read count
593 data were visually assessed using the Artemis genome viewer (Carver et al., 2008). The
594 coverage (expressed as the average density of reads over 500 nucleotide fragments) was
595 computed on each strand of pBICa sequence and visualised by using a heatmap representation
596 (IGV software) (Robinson et al., 2011). The gene expression values were quantified in terms

597 of reads per million (RPKM) defined as the total number of reads mapping to the feature
598 divided by feature length (in kbp) normalized by the total number of reads (in millions)
599 (Mortazavi et al., 2008).

600 The significantly up- and downregulated genes were analysed for GO term enrichment
601 separately with PANTHER (<http://pantherdb.org/webservices/go/overrep.jsp>) (Mi et al.,
602 2017) using batch upload, and the significantly enriched terms further explored on the
603 REVIGO web application (<http://revigo.irb.hr/>) to identify and visualize relationships among
604 the GO terms (Supek et al., 2011). The default settings were used on REVIGO. with a list of
605 results of medium size, and *E. coli* GO terms database used as reference.

606 The functions of genes and gene regulons were annotated using the following web databases:
607 EcoCyc (<http://biocyc.org/ECOLI/organism-summary>) (Keseler et al., 2017) and RegulonDB
608 v8.2 (<http://regulondb.ccg.unam.mx/index.jsp>). Regulation for genes in the SoxRS, OxyR,
609 IscR and Fur regulons were identified as annotated in RegulonDB v8.2 (Gama-Castro et al.,
610 2016).

611

612 **Accession numbers**

613 Plasmid pBIC1a has been deposited in NCBI database under accession number CP022574.1,
614 and RNA-Seq data in Array Express under accession number E-MTAB-7190.

615

616

617 **Author contribution statement**

618 ABJ: Study design, library preparations, RNA-seq experiments, data analysis, and writing of
619 manuscript

620 IRC: Statistical analysis, data analysis and proof reading of the manuscript

621 JT: qRT-PCR and Time kill experiments

622 PG: Proof reading of manuscript

623 RB: Study design, data analysis and proof reading of manuscript

624 TN: Study design, and proof reading of manuscript

625

626 **Conflict of interest statement**

627 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or
628 financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

629

630 **Funding statement**

631

632 This work was supported by the Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, by a grant from the
633 Université Paris-Sud (EA7361), by the LabEx LERMIT supported by a grant from the French
634 National Research Agency (ANR-10-LABX-33), and by a project of ANR LabEx IBEID.

635 This work was also funded in part by a grant from Joint Program Initiative on Antimicrobial
636 Resistance (ANR-14-JAMR-0002).

637 **REFERENCES**

638

639 Alikhan, N.-F., Petty, N. K., Ben Zakour, N. L., and Beatson, S. A. (2011). BLAST Ring
640 Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 12,
641 402. doi:10.1186/1471-2164-12-402.

642 Almeida, C. C., Romão, C. V., Lindley, P. F., Teixeira, M., and Saraiva, L. M. (2006). The
643 role of the hybrid cluster protein in oxidative stress defense. *J. Biol. Chem.* 281, 32445–
644 32450. doi:10.1074/jbc.M605888200.

645 Andrews, S. C., Robinson, A. K., and Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron
646 homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215–237.

647 Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M. M., and Iyer, L. M. (2005). The many
648 faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS*
649 *Microbiol. Rev.* 29, 231–262. doi:10.1016/j.femsre.2004.12.008.

650 Asakura, Y., and Kobayashi, I. (2009). From damaged genome to cell surface: transcriptome
651 changes during bacterial cell death triggered by loss of a restriction-modification gene
652 complex. *Nucleic Acids Res.* 37, 3021–3031. doi:10.1093/nar/gkp148.

653 Baraniak, A., Grabowska, A., Izdebski, R., Fiett, J., Herda, M., Bojarska, K., et al. (2011).
654 Molecular characteristics of KPC-producing Enterobacteriaceae at the early stage of their
655 dissemination in Poland, 2008-2009. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5493–5499.
656 doi:10.1128/AAC.05118-11.

657 Belenky, P., Ye, J. D., Porter, C. B. M., Cohen, N. R., Lobritz, M. A., Ferrante, T., et al.
658 (2015). Bactericidal Antibiotics Induce Toxic Metabolic Perturbations that Lead to
659 Cellular Damage. *Cell Rep* 13, 968–980. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.059.

660 Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and
661 powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol.* 289–300.

662 Blanchard, J. L., Wholey, W.-Y., Conlon, E. M., and Pomposiello, P. J. (2007). Rapid
663 Changes in Gene Expression Dynamics in Response to Superoxide Reveal SoxRS-
664 Dependent and Independent Transcriptional Networks. *PLOS ONE* 2, e1186.
665 doi:10.1371/journal.pone.0001186.

666 Bondarczuk, K., and Piotrowska-Seget, Z. (2013). Molecular basis of active copper resistance
667 mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biology and Toxicology* 29, 397–405.
668 doi:10.1007/s10565-013-9262-1.

669 Bonomo, R. A., Burd, E. M., Conly, J., Limbago, B. M., Poirel, L., Segre, J. A., et al. (2017).
670 Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical Infectious Diseases.*

- 671 doi:10.1093/cid/cix893.
- 672 Buckner, M. M. C., Saw, H. T. H., Osagie, R. N., McNally, A., Ricci, V., Wand, M. E., et al.
673 (2018). Clinically Relevant Plasmid-Host Interactions Indicate that Transcriptional and
674 Not Genomic Modifications Ameliorate Fitness Costs of *Klebsiella pneumoniae*
675 Carbapenemase-Carrying Plasmids. *MBio* 9. doi:10.1128/mBio.02303-17.
- 676 Carver, T., Berriman, M., Tivey, A., Patel, C., Böhme, U., Barrell, B. G., et al. (2008).
677 Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational
678 database. *Bioinformatics* 24, 2672–2676. doi:10.1093/bioinformatics/btn529.
- 679 Chen, L., Chavda, K. D., Melano, R. G., Jacobs, M. R., Koll, B., Hong, T., et al. (2014a).
680 Comparative Genomic Analysis of KPC-Encoding pKpQIL-Like Plasmids and Their
681 Distribution in New Jersey and New York Hospitals. *Antimicrobial Agents and*
682 *Chemotherapy* 58, 2871–2877. doi:10.1128/AAC.00120-14.
- 683 Chen, L., Chavda, K. D., Melano, R. G., Jacobs, M. R., Levi, M. H., Bonomo, R. A., et al.
684 (2013). Complete sequence of a bla(KPC-2)-harboring IncFII(K1) plasmid from a
685 *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57,
686 1542–1545. doi:10.1128/AAC.02332-12.
- 687 Chen, L., Mathema, B., Chavda, K. D., DeLeo, F. R., Bonomo, R. A., and Kreiswirth, B. N.
688 (2014b). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic
689 decoding. *Trends in Microbiology* 22, 686–696. doi:10.1016/j.tim.2014.09.003.
- 690 Cheruvanky, A., Stoesser, N., Sheppard, A. E., Crook, D. W., Hoffman, P. S., Weddle, E., et
691 al. (2017). Enhanced *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Expression from a Novel
692 Tn4401 Deletion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61. doi:10.1128/AAC.00025-17.
- 693 Cheung, K. J., Badarinarayana, V., Selinger, D. W., Janse, D., and Church, G. M. (2003). A
694 microarray-based antibiotic screen identifies a regulatory role for supercoiling in the
695 osmotic stress response of *Escherichia coli*. *Genome Res.* 13, 206–215.
696 doi:10.1101/gr.401003.
- 697 Chillappagari, S., Seubert, A., Trip, H., Kuipers, O. P., Marahiel, M. A., and Miethke, M.
698 (2010). Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster
699 formation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 192, 2512–2524. doi:10.1128/JB.00058-10.
- 700 Cuzon, G., Naas, T., Correa, A., Quinn, J. P., Villegas, M.-V., and Nordmann, P. (2013).
701 Dissemination of the KPC-2 carbapenemase in non-*Klebsiella pneumoniae*
702 enterobacterial isolates from Colombia. *International Journal of Antimicrobial Agents*
703 42, 59–62. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.04.002.
- 704 Cuzon, G., Naas, T., Villegas, M.-V., Correa, A., Quinn, J. P., and Nordmann, P. (2011).

- 705 Wide Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing β -Lactamase blaKPC-2 Gene
706 in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 5350–5353.
707 doi:10.1128/AAC.00297-11.
- 708 Daikos, G. L., and Markogiannakis, A. (2011). Carbapenemase-producing *Klebsiella*
709 *pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin. Microbiol.*
710 *Infect.* 17, 1135–1141. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03553.x.
- 711 Daikos, G. L., Tsaousi, S., Tzouveleki, L. S., Anyfantis, I., Psychogiou, M., Argyropoulou,
712 A., et al. (2014). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream
713 infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of
714 carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2322–2328. doi:10.1128/AAC.02166-
715 13.
- 716 Davies, T. A., Shang, W., Bush, K., and Flamm, R. K. (2008). Affinity of Doripenem and
717 Comparators to Penicillin-Binding Proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*
718 *aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 1510–1512.
719 doi:10.1128/AAC.01529-07.
- 720 Doumith, M., Findlay, J., Hirani, H., Hopkins, K. L., Livermore, D. M., Dodgson, A., et al.
721 (2017). Major role of pKpQIL-like plasmids in the early dissemination of KPC-type
722 carbapenemases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
723 doi:10.1093/jac/dkx141.
- 724 Duin, D. van, and Doi, Y. (2016). The global epidemiology of carbapenemase-producing
725 Enterobacteriaceae. *Virulence* 0, 1–10. doi:10.1080/21505594.2016.1222343.
- 726 Dupont, M., Dé, E., Chollet, R., Chevalier, J., and Pagès, J.-M. (2004). Enterobacter
727 aerogenes OmpX, a cation-selective channel mar- and osmo-regulated. *FEBS Lett.* 569,
728 27–30. doi:10.1016/j.febslet.2004.05.047.
- 729 Dwyer, D. J., Belenky, P. A., Yang, J. H., MacDonald, I. C., Martell, J. D., Takahashi, N., et
730 al. (2014). Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their
731 lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E2100-2109. doi:10.1073/pnas.1401876111.
- 732 Felden, B., and Cattoir, V. (2018). Bacterial Adaptation to Antibiotics through Regulatory
733 RNAs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62, e02503-17.
734 doi:10.1128/AAC.02503-17.
- 735 Finley, P. J., Norton, R., Austin, C., Mitchell, A., Zank, S., and Durham, P. (2015).
736 Unprecedented Silver Resistance in Clinically Isolated Enterobacteriaceae: Major
737 Implications for Burn and Wound Management. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59,
738 4734–4741. doi:10.1128/AAC.00026-15.

- 739 Gama-Castro, S., Salgado, H., Santos-Zavaleta, A., Ledezma-Tejeida, D., Muñoz-Rascado, L.,
740 García-Sotelo, J. S., et al. (2016). RegulonDB version 9.0: high-level integration of gene
741 regulation, coexpression, motif clustering and beyond. *Nucleic Acids Res.* 44, D133-143.
742 doi:10.1093/nar/gkv1156.
- 743 García-Fernández, A., Villa, L., Carta, C., Venditti, C., Giordano, A., Venditti, M., et al.
744 (2012). *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel
745 plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56,
746 2143–2145. doi:10.1128/AAC.05308-11.
- 747 Gerstle, K., Klätschke, K., Hahn, U., and Piganeau, N. (2012). The small RNA RybA
748 regulates key-genes in the biosynthesis of aromatic amino acids under peroxide stress in
749 *E. coli*. *RNA Biol* 9, 458–468. doi:10.4161/rna.19065.
- 750 Girlich, D., Bonnin, R. A., Jousset, A., and Naas, T. (2017). Promoter characterization and
751 expression of the blaKPC-2 gene in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and
752 *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 1597–1601.
753 doi:10.1093/jac/dkx044.
- 754 Gottesman, S., and Stout, V. (1991). Regulation of capsular polysaccharide synthesis in
755 *Escherichia coli* K12. *Mol. Microbiol.* 5, 1599–1606.
- 756 Hemm, M. R., Paul, B. J., Miranda-Ríos, J., Zhang, A., Soltanzad, N., and Storz, G. (2010).
757 Small stress response proteins in *Escherichia coli*: proteins missed by classical proteomic
758 studies. *J. Bacteriol.* 192, 46–58. doi:10.1128/JB.00872-09.
- 759 Hidalgo-Grass, C., Warburg, G., Temper, V., Benenson, S., Moses, A. E., Block, C., et al.
760 (2012). KPC-9, a Novel Carbapenemase from Clinical Specimens in Israel. *Antimicrobial*
761 *Agents and Chemotherapy* 56, 6057–6059. doi:10.1128/AAC.01156-12.
- 762 Hwang, B.-Y., Varadarajan, N., Li, H., Rodriguez, S., Iverson, B. L., and Georgiou, G.
763 (2007). Substrate Specificity of the *Escherichia coli* Outer Membrane Protease OmpP.
764 *Journal of Bacteriology* 189, 522–530. doi:10.1128/JB.01493-06.
- 765 Jousset, A. B., Bonnin, R. A., Rosinski-Chupin, I., Girlich, D., Cuzon, G., Cabanel, N., et al.
766 (2018). 4.5 years within-patient evolution of a colistin resistant KPC-producing
767 *Klebsiella pneumoniae* ST258. *Clin. Infect. Dis.* doi:10.1093/cid/ciy293.
- 768 Kaldalu, N., Mei, R., and Lewis, K. (2004). Killing by ampicillin and ofloxacin induces
769 overlapping changes in *Escherichia coli* transcription profile. *Antimicrob. Agents*
770 *Chemother.* 48, 890–896.
- 771 Keseler, I. M., Mackie, A., Santos-Zavaleta, A., Billington, R., Bonavides-Martínez, C.,
772 Caspi, R., et al. (2017). The EcoCyc database: reflecting new knowledge about

- 773 *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* 45, D543–D550.
774 doi:10.1093/nar/gkw1003.
- 775 Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans*
776 and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12, 19–36. doi:10.1016/0147-619X(84)90063-5.
- 777 Kim, J.-S., Kim, Y. J., Seo, S., Seong, M.-J., and Lee, K. (2015). Functional role of *bdm*
778 during flagella biogenesis in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 70, 369–373.
779 doi:10.1007/s00284-014-0729-y.
- 780 Kim, K., Kim, K.-P., Choi, J., Lim, J.-A., Lee, J., Hwang, S., et al. (2010). Outer Membrane
781 Proteins A (OmpA) and X (OmpX) Are Essential for Basolateral Invasion of *Cronobacter*
782 *sakazakii*. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 5188–5198.
783 doi:10.1128/AEM.02498-09.
- 784 Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., and Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from
785 targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 423–435. doi:10.1038/nrmicro2333.
- 786 Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., and Collins, J. J. (2007). A
787 Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell* 130,
788 797–810. doi:10.1016/j.cell.2007.06.049.
- 789 Landman, D., Urban, C., Bäcker, M., Kelly, P., Shah, N., Babu, E., et al. (2010).
790 Susceptibility Profiles, Molecular Epidemiology, and Detection of KPC-Producing
791 *Escherichia coli* Isolates from the New York City Vicinity. *Journal of Clinical*
792 *Microbiology* 48, 4604–4607. doi:10.1128/JCM.01143-10.
- 793 Lang, K. S., Danzeisen, J. L., Xu, W., and Johnson, T. J. (2012). Transcriptome Mapping of
794 pAR060302, a bla_{CMY-2}-Positive Broad-Host-Range IncA/C Plasmid. *Appl Environ*
795 *Microbiol* 78, 3379–3386. doi:10.1128/AEM.07199-11.
- 796 Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-
797 efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10,
798 R25. doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25.
- 799 Lau, A. F., Wang, H., Weingarten, R. A., Drake, S. K., Suffredini, A. F., Garfield, M. K., et
800 al. (2014). A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass
801 spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-
802 resistant Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2804–2812. doi:10.1128/JCM.00694-
803 14.
- 804 Laubacher, M. E., and Ades, S. E. (2008). The Rcs Phosphorelay Is a Cell Envelope Stress
805 Response Activated by Peptidoglycan Stress and Contributes to Intrinsic Antibiotic
806 Resistance. *Journal of Bacteriology* 190, 2065–2074. doi:10.1128/JB.01740-07.

- 807 Lee, G. C., and Burgess, D. S. (2012). Treatment of Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase
808 (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Ann Clin Microbiol*
809 *Antimicrob* 11, 32. doi:10.1186/1476-0711-11-32.
- 810 Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using
811 real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.
812 doi:10.1006/meth.2001.1262.
- 813 Lushchak, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and
814 animals. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 153, 175–190.
815 doi:10.1016/j.cbpc.2010.10.004.
- 816 Majdalani, N., and Gottesman, S. (2005). The Rcs phosphorelay: a complex signal
817 transduction system. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 379–405.
818 doi:10.1146/annurev.micro.59.050405.101230.
- 819 Mi, H., Huang, X., Muruganujan, A., Tang, H., Mills, C., Kang, D., et al. (2017). PANTHER
820 version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and
821 data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Research* 45, D183–D189.
822 doi:10.1093/nar/gkw1138.
- 823 Michel, B. (2005). After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLoS*
824 *Biol.* 3, e255. doi:10.1371/journal.pbio.0030255.
- 825 Mika, F., and Hengge, R. (2014). Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm
826 architecture of Escherichia coli. *RNA Biol* 11, 494–507. doi:10.4161/rna.28867.
- 827 Miller, C. (2004). SOS Response Induction by β -Lactams and Bacterial Defense Against
828 Antibiotic Lethality. *Science* 305, 1629–1631. doi:10.1126/science.1101630.
- 829 Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B. (2008). Mapping and
830 quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5, 621–628.
831 doi:10.1038/nmeth.1226.
- 832 Naas, T., Cuzon, G., Babics, A., Fortineau, N., Boytchev, I., Gayral, F., et al. (2010).
833 Endoscopy-associated transmission of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae
834 producing KPC-2 β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1305–1306.
835 doi:10.1093/jac/dkq117.
- 836 Naas, T., Cuzon, G., Truong, H.-V., and Nordmann, P. (2012). Role of ISKpn7 and Deletions
837 in blaKPC Gene Expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 4753–4759.
838 doi:10.1128/AAC.00334-12.
- 839 Nagy, Z., and Chandler, M. (2004). Regulation of transposition in bacteria. *Res. Microbiol.*
840 155, 387–398. doi:10.1016/j.resmic.2004.01.008.

- 841 Papagiannitsis, C. C., Pilato, V. D., Giani, T., Giakkoupi, P., Riccobono, E., Landini, G., et al.
842 (2016). Characterization of KPC-encoding plasmids from two endemic settings, Greece
843 and Italy. *J. Antimicrob. Chemother.*, dkw227. doi:10.1093/jac/dkw227.
- 844 Partridge, S. R. (2014). Tn4401 carrying blaKPC is inserted within another insertion in
845 pKpQIL and related plasmids. *J. Clin. Microbiol.* 52, 4448–4449.
846 doi:10.1128/JCM.02426-14.
- 847 Pitout, J. D. D., Nordmann, P., and Poirel, L. (2015). Carbapenemase-Producing *Klebsiella*
848 *pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob. Agents*
849 *Chemother.* 59, 5873–5884. doi:10.1128/AAC.01019-15.
- 850 Podschun, R., and Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens:
851 epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol.*
852 *Rev.* 11, 589–603.
- 853 Py, B., and Barras, F. (2010). Building Fe–S proteins: bacterial strategies. *Nature Reviews*
854 *Microbiology* 8, 436–446. doi:10.1038/nrmicro2356.
- 855 Rademacher, C., and Masepohl, B. (2012). Copper-responsive gene regulation in bacteria.
856 *Microbiology* 158, 2451–2464. doi:10.1099/mic.0.058487-0.
- 857 Rau, M. H., Bojanovič, K., Nielsen, A. T., and Long, K. S. (2015). Differential expression of
858 small RNAs under chemical stress and fed-batch fermentation in *E. coli*. *BMC Genomics*
859 16, 1051. doi:10.1186/s12864-015-2231-8.
- 860 Ren, S., Li, Q., Xie, L., and Xie, J. (2017). Molecular Mechanisms Underlying the Function
861 Diversity of ArsR Family Metalloregulator. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 27, 19–35.
862 doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2016018476.
- 863 Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., et
864 al. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 29, 24–26.
865 doi:10.1038/nbt.1754.
- 866 Rosinski-Chupin, I., Sauvage, E., Sismeiro, O., Villain, A., Da Cunha, V., Caliot, M.-E., et al.
867 (2015). Single nucleotide resolution RNA-seq uncovers new regulatory mechanisms in
868 the opportunistic pathogen *Streptococcus agalactiae*. *BMC Genomics* 16, 419.
869 doi:10.1186/s12864-015-1583-4.
- 870 Roth, A. L., Kurpiel, P. M., Lister, P. D., and Hanson, N. D. (2011). *bla*_{KPC} RNA Expression
871 Correlates with Two Transcriptional Start Sites but Not Always with Gene Copy Number
872 in Four Genera of Gram-Negative Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*
873 55, 3936–3938. doi:10.1128/AAC.01509-10.
- 874 Ruiz de los Mozos, I., Vergara-Irigaray, M., Segura, V., Villanueva, M., Bitarte, N.,

- 875 Saramago, M., et al. (2013). Base Pairing Interaction between 5'- and 3'-UTRs Controls
876 icaR mRNA Translation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genetics* 9, e1004001.
877 doi:10.1371/journal.pgen.1004001.
- 878 Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–
879 2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153.
- 880 Seo, S. W., Kim, D., Szubin, R., and Palsson, B. O. (2015). Genome-wide Reconstruction of
881 OxyR and SoxRS Transcriptional Regulatory Networks under Oxidative Stress in
882 *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Cell Reports* 12, 1289–1299.
883 doi:10.1016/j.celrep.2015.07.043.
- 884 Signs, S. A., Tan, J. S., Salstrom, S. J., and File, T. M. (1992). Pharmacokinetics of imipenem
885 in serum and skin window fluid in healthy adults after intramuscular or intravenous
886 administration. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1400–1403.
- 887 Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., and Chandler, M. (2006). ISfinder: the
888 reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, D32–36.
889 doi:10.1093/nar/gkj014.
- 890 Sim, S.-H., Yeom, J.-H., Shin, C., Song, W.-S., Shin, E., Kim, H.-M., et al. (2010).
891 *Escherichia coli* ribonuclease III activity is downregulated by osmotic stress:
892 consequences for the degradation of bdm mRNA in biofilm formation. *Mol. Microbiol.*
893 75, 413–425. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06986.x.
- 894 Singlas, E. (1990). [Clinical pharmacokinetics of an imipenem-cilastatin combination]. *Presse*
895 *Med* 19, 598–605.
- 896 Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., and Šmuc, T. (2011). REVIGO Summarizes and
897 Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS ONE* 6, e21800.
898 doi:10.1371/journal.pone.0021800.
- 899 Tumbarello, M., Viale, P., Viscoli, C., Treccarichi, E. M., Tumietto, F., Marchese, A., et al.
900 (2012). Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella*
901 *pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination
902 therapy. *Clin. Infect. Dis.* 55, 943–950. doi:10.1093/cid/cis588.
- 903 Uehara, T., Dinh, T., and Bernhardt, T. G. (2009). LytM-domain factors are required for
904 daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. *J.*
905 *Bacteriol.* 191, 5094–5107. doi:10.1128/JB.00505-09.
- 906 van Duin, D., Lok, J. J., Earley, M., Cober, E., Richter, S. S., Perez, F., et al. (2017). Colistin
907 vs. Ceftazidime-avibactam in the Treatment of Infections due to Carbapenem-Resistant
908 Enterobacteriaceae. *Clin. Infect. Dis.* doi:10.1093/cid/cix783.

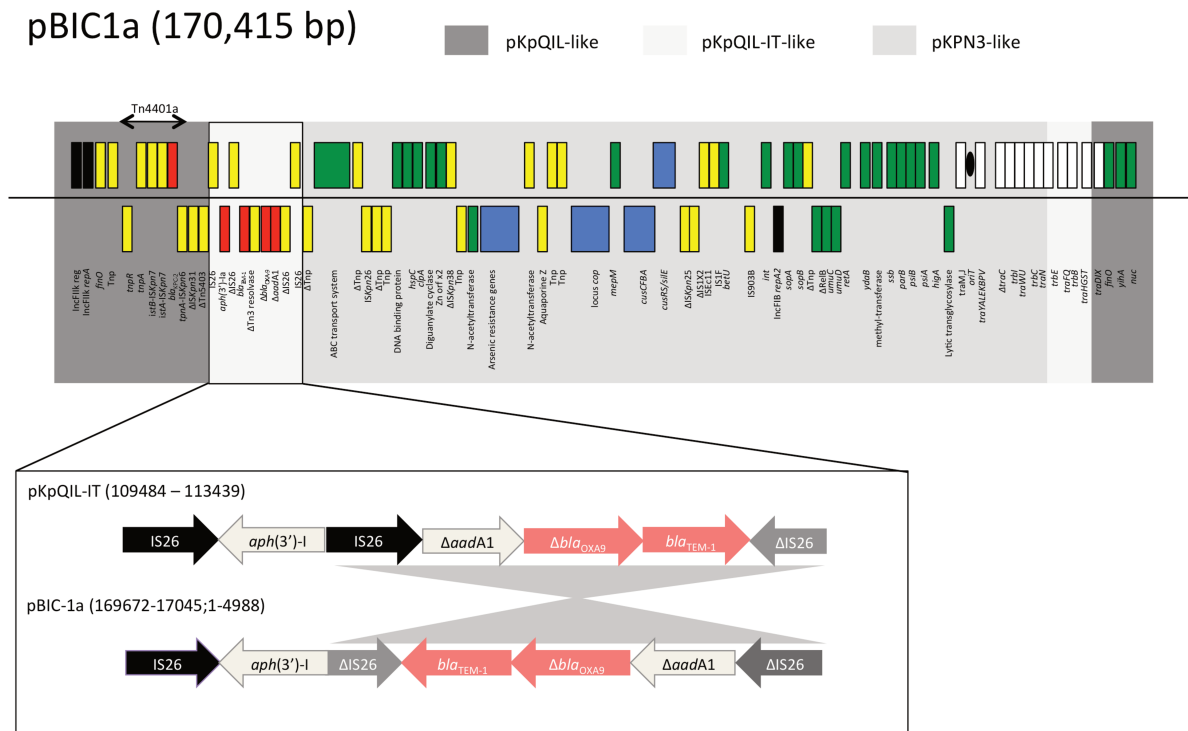
- 909 Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y., and Dillies, M.-A. (2016). SARTools: A
910 DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-
911 Seq Data. *PLOS ONE* 11, e0157022. doi:10.1371/journal.pone.0157022.
- 912 Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., and Carattoli, A. (2010). Replicon sequence
913 typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J. Antimicrob.*
914 *Chemother.* 65, 2518–2529. doi:10.1093/jac/dkq347.
- 915 Visweswaran, G. R. R., Steen, A., Leenhouts, K., Szeliga, M., Ruban, B., Hesselings-
916 Meinders, A., et al. (2013). AcnD, a homolog of the major autolysin AcnA of
917 *Lactococcus lactis*, binds to the cell wall and contributes to cell separation and autolysis.
918 *PLoS ONE* 8, e72167. doi:10.1371/journal.pone.0072167.
- 919 Vogel, J., and Papenfort, K. (2006). Small non-coding RNAs and the bacterial outer
920 membrane. *Current Opinion in Microbiology* 9, 605–611.
921 doi:10.1016/j.mib.2006.10.006.
- 922 Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., and Hengge, R. (2005). Genome-Wide
923 Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia coli*: σ^S -Dependent
924 Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity. *J. Bacteriol.* 187, 1591–1603.
925 doi:10.1128/JB.187.5.1591-1603.2005.
- 926 Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., et al. (2003).
927 A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*.
928 *Mol. Microbiol.* 48, 657–670.
- 929 Weisenberg, S. A., Morgan, D. J., Espinal-Witter, R., and Larone, D. H. (2009). Clinical
930 outcomes of patients with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K.*
931 *pneumoniae* after treatment with imipenem or meropenem. *Diagnostic Microbiology and*
932 *Infectious Disease* 64, 233–235. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.02.004.
- 933 Wolfe, M. T., Heo, J., Garavelli, J. S., and Ludden, P. W. (2002). Hydroxylamine reductase
934 activity of the hybrid cluster protein from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184, 5898–5902.
- 935 Wright, M. S., Perez, F., Brinkac, L., Jacobs, M. R., Kaye, K., Cober, E., et al. (2014).
936 Population Structure of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Midwestern
937 U.S. Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58, 4961–4965.
938 doi:10.1128/AAC.00125-14.
- 939 Xiao, M., Lai, Y., Sun, J., Chen, G., and Yan, A. (2016). Transcriptional Regulation of the
940 Outer Membrane Porin Gene *ompW* Reveals its Physiological Role during the Transition
941 from the Aerobic to the Anaerobic Lifestyle of *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 7, 799.
942 doi:10.3389/fmicb.2016.00799.

- 943 Xiao, M., Zhu, X., Fan, F., Xu, H., Tang, J., Qin, Y., et al. (2017). Osmotolerance in
944 *Escherichia coli* Is Improved by Activation of Copper Efflux Genes or Supplementation
945 with Sulfur-Containing Amino Acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 83.
946 doi:10.1128/AEM.03050-16.
- 947 Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A., and Storz, G. (2001).
948 DNA Microarray-Mediated Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Response to
949 Hydrogen Peroxide. *J. Bacteriol.* 183, 4562–4570. doi:10.1128/JB.183.15.4562-
950 4570.2001.
- 951 Zhou, K., Zhou, L., Lim, Q. 'En, Zou, R., Stephanopoulos, G., and Too, H.-P. (2011). Novel
952 reference genes for quantifying transcriptional responses of *Escherichia coli* to protein
953 overexpression by quantitative PCR. *BMC Molecular Biology* 12, 18. doi:10.1186/1471-
954 2199-12-18.
- 955
- 956
- 957

958 **FIGURE AND LEGENDS**

959

960



961

962

963 **Figure 1. Schematic representation of plasmid pBIC-1a main features**

964 Grey boxes indicate regions with high nucleotide identity (>97%) with pKPN3
 965 (NC_009649.1), pKpQIL (GU595196.1) and pKpQIL-IT (NC_019155.1) plasmids.

966 Genes from the forward strand are represented above the line, and genes from the reverse
 967 strand below.

968 Antimicrobial resistance genes are indicated in red, the replicase genes in black, the heavy
 969 metal resistance operons in blue, the transfer operon in white, the genes involved in genetic
 970 mobile elements in yellow, and other plasmid-located genes in green.

971 Δ indicates a truncated gene. *Tnp*: transposase

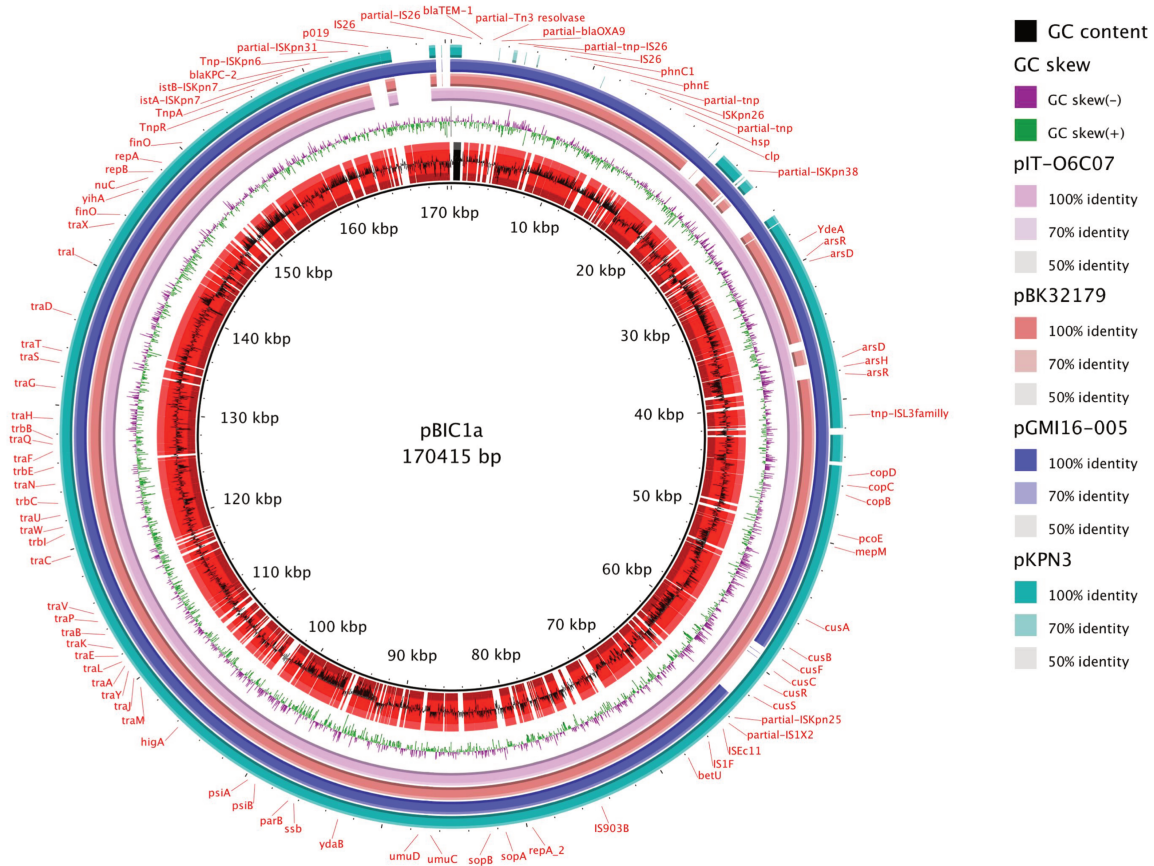
972 As for pKpQIL-IT, pBIC-1a carries an aminoglycoside resistance gene on a putative
 973 composite transposon-like element, IS26-*aph*(3')-Ia-ΔIS26, located downstream of *Tn4401a*.
 974 Unlike in pKpQIL-IT, the IS26 located downstream of *aph*(3')-Ia is truncated. In addition, an
 975 inversion of 3872 nt fragment is observed as compared to pKpQIL-IT.

976

977

978

979



980

981

982 **Figure 2. Nucleotide alignment of *bla*_{KPC}-carrying plasmids deriving from pKPN3.**

983 pKPN3 (NC_009649.1) is a plasmid from *K. pneumoniae* MGH78578 that carries no β -
 984 lactamase. pIT-O6C07 (LT009688.1), pBK32179 (JX430448), pGMI16-005_01
 985 (NZ_CP028181.1) are KPC-producing plasmids deriving from recombination between
 986 pKPN3 and pKpQIL-like plasmids.

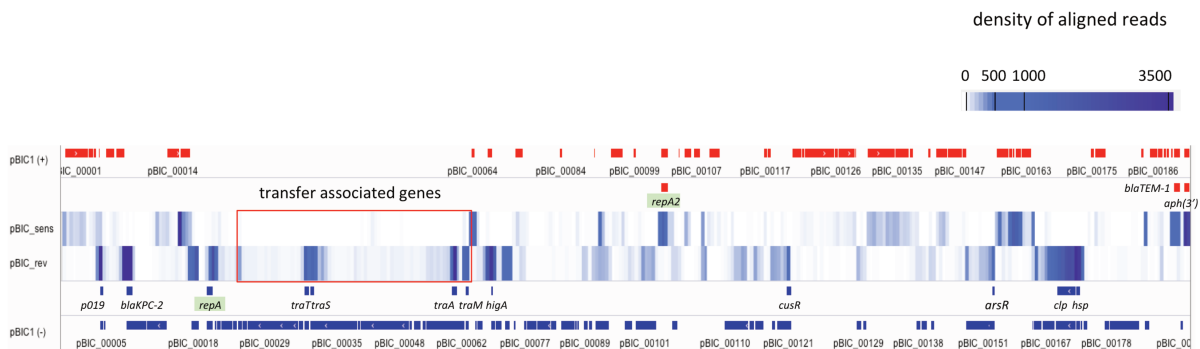
987 From the inside to the outside, the different circles represent: pBIC1a GC content (black) and
 988 open reading frames annotation (red), pBIC1a GC skew (purple and green), alignment with
 989 pIT-O6C07 (pink), alignment with pBK32179 (red), alignment with pGMI16-005 (blue),
 990 alignment with pKPN3 (green).

991 This circular representation was performed using BRIG.

992

993

994
995
996
997
998
999



1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013

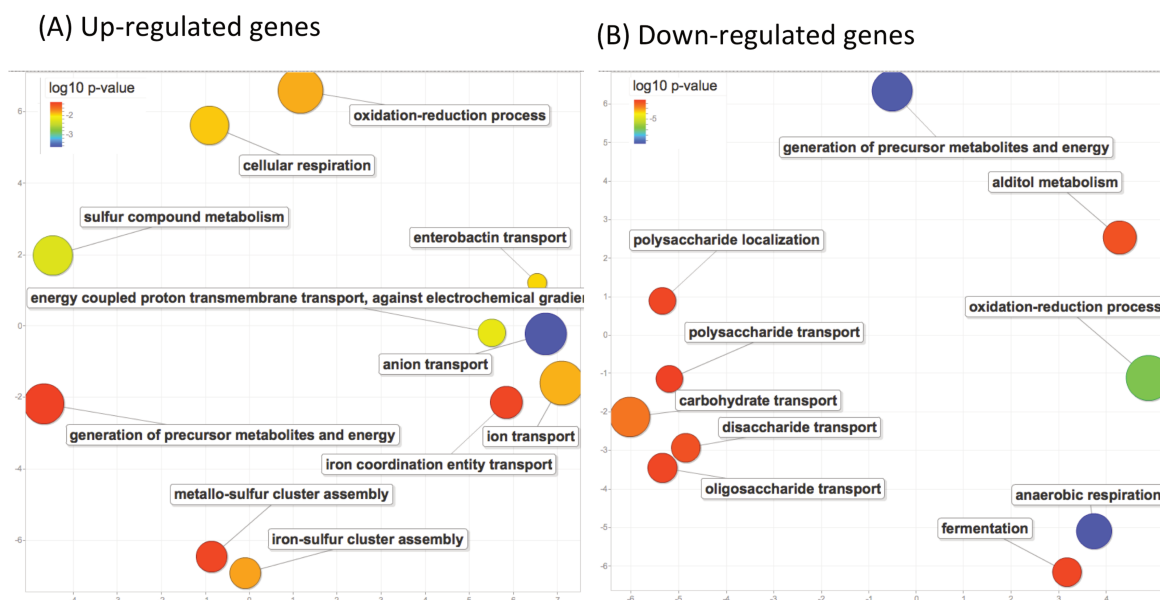
Figure 3. Expression of pBIC1a genes in the absence of antibiotic.

The coverage (expressed as the average density of reads over 500 nt fragments) was computed on each strand of pBIC1a sequence and visualized by using a heatmap representation (IGV software).

Open Reading Frames (ORFs) annotated on the strand (+ or sens) are indicated in red boxes and ORFs annotated on the strand (- or rev) are indicated in blue boxes.

Known annotation of the most expressed genes are mentioned on a supplementary line for both strands. Both replicases (*repA* IncFIIk-type and *repA2* IncFI-type) are highlighted in green. Genes associated to plasmid transfer are boxed in red.

1014
1015
1016
1017



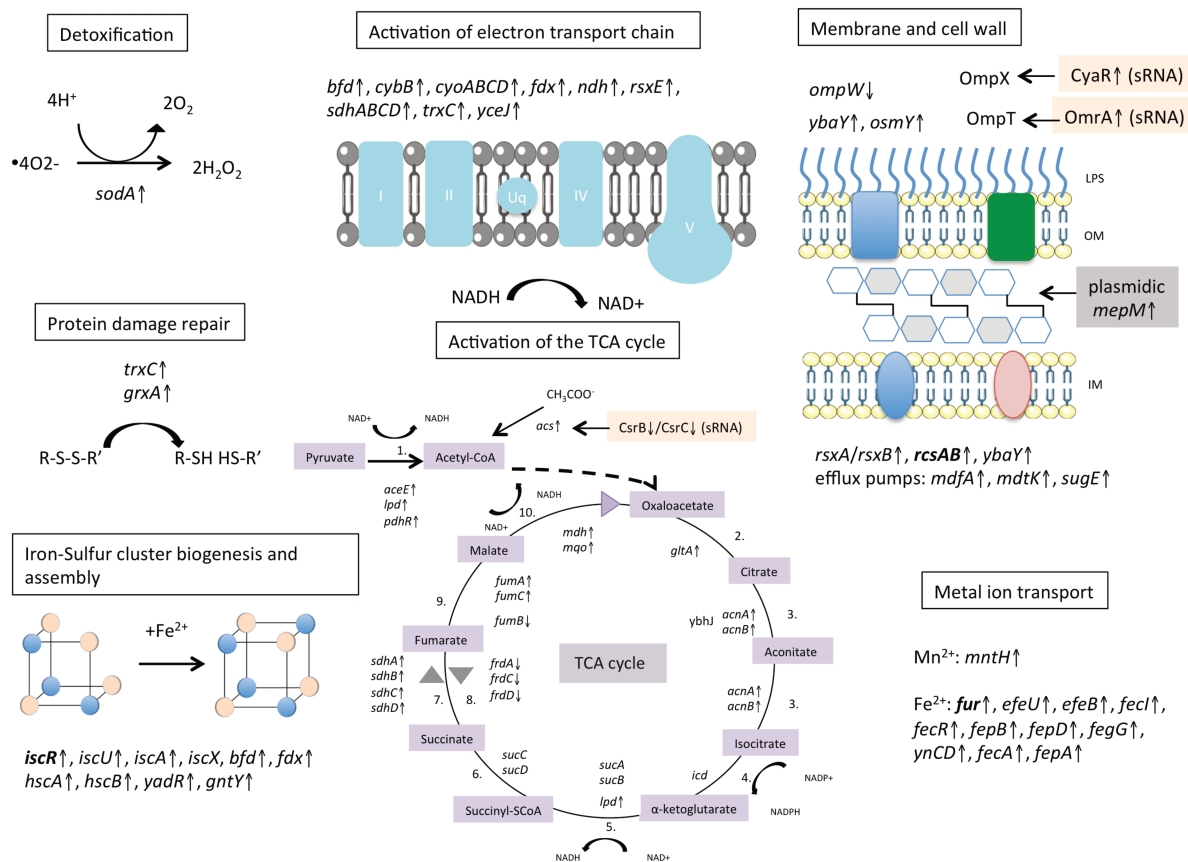
1018
1019
1020

1021 **Figure 4. Biological process GO terms enrichment analysis in response to imipenem in**
1022 ***E. coli* (pBIC-1a).**

1023 Scatterplots showing the non-redundant up (A) and down-regulated (B) GO terms
1024 significantly enriched after imipenem exposure. GO enrichment was determined by
1025 PANTHER web application and GO terms significantly enriched with adjusted p-values
1026 under 0.05 were summarized by using REVIGO. Only chromosomal genes were analyzed.
1027 The axes have no intrinsic meaning, similar GO terms remain close together in the plot. The
1028 bubble size indicates the frequency of the GO term. (A) upregulated genes revealed
1029 enrichment in energy production processes (aerobic respiration and electron transport chain),
1030 in ion transport and in cluster Fe-S assembly. (B) downregulated genes were mostly
1031 associated to anaerobic respiration, generation of precursors of metabolites and energy. Both
1032 up and down-regulated genes summarization revealed an enrichment in oxidoreduction
1033 process.

1034

1035



1036

1037

1038 **Figure 5. Metabolic response of *E. coli* pBIC-1a to imipenem exposure.**

1039 Activation of the electron transport chain pathway dependent on the tricarboxylic acid (TCA)
 1040 cycle was observed, and is thought to generate ROS according to the model proposed by
 1041 Kohanski et al. and Dwyer et al. (Dwyer et al., 2014; Kohanski et al., 2007). We observed an
 1042 up-regulation of most of the TCA cycle enzymes, of many genes involved in Iron-Sulfur
 1043 cluster biogenesis and assembly, and of several metal ions permeases that are assumed to fuel
 1044 the Fenton reaction. Detoxification process occurred to limit protein damages and ROS
 1045 accumulation with up-regulation of superoxide dismutase *sodA*. Several genes involved in
 1046 bacterial cell wall homeostasis were disturbed. Activation of the plasmidic murein
 1047 endopeptidase *mepM* might modify bacterial peptidoglycan and reflect an early activation of
 1048 bacterial lysis.

1049 Transcriptional regulators are written in bold

1050 ↑ means up-regulated and ↓ means down-regulated

1051 LPS: lipopolysaccharide

1052 OM: outer membrane

1053 IM: inner membrane

1054 Reactions of the TCA cycle: 1. Pyruvate dehydrogenase, 2. Citrate synthase, 3. Aconitase, 4.

1055 Isocitrate dehydrogenase, 5. α-ketoglutarate dehydrogenase, 6. SuccinylCoA thiokinase,

1056 7. Succinate dehydrogenase, 8. Fumarate reductase 9. Fumarase, 10. Malate dehydrogenase

1057

1058

1059 **Table 1. Expression analysis of pBIC1a genes without imipenem exposure using RPKM**
 1060 **values**
 1061

pBIC1a	gene name	orientation	Annotation	RPKM value
pBIC_00001		+	Aldehyde dehydrogenase	35
pBIC_00002		+	putative resolvase	12
pBIC_00003		+	hypothetical protein	23
pBIC_00004		+	hypothetical protein	144
pBIC_00005		-	p019 of ISKpn31	1840
pBIC_00006		-	Transposase (ISKpn31)	20
pBIC_00007		+	Mobile element protein	8
pBIC_00008		+	Tnp-ISKpn6	8
pBIC_00009	<i>bla_{KPC-2}</i>	-	KPC-2	2706
pBIC_00010		-	hypothetical protein	294
pBIC_00011	<i>istA</i>	-	ISKpn7	0
pBIC_00012	<i>istB</i>	-	ISKpn7	1
pBIC_00013	<i>TnpA</i>	-	Transposase	4
pBIC_00014	<i>TnpR</i>	+	Resolvase	13
pBIC_00015		+	hypothetical protein	2261
pBIC_00016		+	hypothetical protein	76
pBIC_00017		+	Transposase	65
pBIC_00018		-	hypothetical protein	220
pBIC_00019	<i>finO</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer fertility inhibition protein FinO	328
pBIC_00020	<i>repA</i>	-	DNA replication protein (IncFIIk)	127
pBIC_00021	<i>repB</i>	-	Replication regulatory protein	643
pBIC_00022	<i>nucC</i>	-	Endonuclease	13
pBIC_00023		-	hypothetical protein	35
pBIC_00024	<i>yihA</i>	-	hypothetical protein	13
pBIC_00025		-	hypothetical protein	14
pBIC_00026		-	hypothetical protein	11
pBIC_00027	<i>finO</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer fertility inhibition protein FinO	72
pBIC_00028	<i>traX</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer pilin acetylase TraX	14
pBIC_00029	<i>traI</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer DNA-nicking and unwinding protein TraI	10
pBIC_00030	<i>traD</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer protein TraD	7
pBIC_00031		-	hypothetical protein	8
pBIC_00032	<i>traT</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer surface exclusion protein TraT	282
pBIC_00033	<i>traS</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer surface exclusion protein TraS	231
pBIC_00034	<i>traG</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer protein TraG	56
pBIC_00035	<i>traH</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraH	6
pBIC_00036		-	hypothetical protein	4
pBIC_00037	<i>trbB</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer protein TrbB	7
pBIC_00038	<i>traQ</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer protein TraQ	6
pBIC_00039	<i>traF</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraF	6
pBIC_00040		-	hypothetical protein	19
pBIC_00041		-	hypothetical protein	14
pBIC_00042	<i>trbE</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer protein TrbE	5
pBIC_00043	<i>traN</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer protein TraN	10
pBIC_00044	<i>trbC</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer protein TrbC	7
pBIC_00045	<i>traU</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraU	10
pBIC_00046	<i>traW</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraW	8
pBIC_00047	<i>trbI</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer protein TrbI	9
pBIC_00048	<i>traC</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraC	11
pBIC_00049		-	hypothetical protein	12
pBIC_00050		-	hypothetical protein	11
pBIC_00051		-	hypothetical protein	9
pBIC_00052		-	hypothetical protein	7
pBIC_00053		-	hypothetical protein	14
pBIC_00054	<i>traV</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraV	22
pBIC_00055	<i>traP</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer protein TraP	22
pBIC_00056	<i>traB</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraB	21
pBIC_00057	<i>traK</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraK	25
pBIC_00058	<i>traE</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraE	36
pBIC_00059	<i>traL</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein TraL	433
pBIC_00060	<i>traA</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer pilin protein TraA	656
pBIC_00061	<i>traY</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer regulator TraY	65
pBIC_00062	<i>traJ</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer regulator TraJ	34
pBIC_00063	<i>traM</i>	-	IncF plasmid conjugative transfer mating signal transduction protein TraM	429
pBIC_00064		+	lytic transglycosylase	295
pBIC_00065		-	hypothetical protein	16
pBIC_00066		-	unnamed protein product	20

1062

1063

1064

1065

1066

pBIC_00067	+	hypothetical protein	5
pBIC_00068	<i>higA</i>	antitoxin HigA	223
pBIC_00069	-	hypothetical protein phage-related	400
pBIC_00070	-	hypothetical protein	17
pBIC_00071	-	hypothetical protein	14
pBIC_00072	-	hypothetical protein	23
pBIC_00073	-	hypothetical protein	163
pBIC_00074	-	hypothetical protein	144
pBIC_00075	-	hypothetical protein	15
pBIC_00076	+	Mobile element protein	22
pBIC_00077	-	hypothetical protein	19
pBIC_00078	-	hypothetical protein	2
pBIC_00079	<i>psiA</i>	PsiA protein	2
pBIC_00080	<i>psiB</i>	PsiB protein	3
pBIC_00081	-	hypothetical protein	4
pBIC_00082	<i>parB</i>	ParB	5
pBIC_00083	<i>ssb</i>	Single-stranded DNA-binding protein	7
pBIC_00084	+	hypothetical protein	5
pBIC_00085	-	SAM-dependent methyltransferase	3
pBIC_00086	-	hypothetical protein	3
pBIC_00087	<i>ydaB</i>	YdaB	2
pBIC_00088	-	hypothetical protein	11
pBIC_00089	-	hypothetical protein	53
pBIC_00090	-	DNA polymerase III theta subunit	52
pBIC_00091	-	Antirestriction protein klcA	6
pBIC_00092	+	hypothetical protein	9
pBIC_00093	-	hypothetical protein	47
pBIC_00094	-	Retron-type RNA-directed DNA polymerase;Ontology_term	49
pBIC_00095	<i>umuD</i>	Error-prone repair protein UmuD	17
pBIC_00096	<i>umuC</i>	Error-prone lesion bypass DNA polymerase V (UmuC)	11
pBIC_00097	-	Mobile element protein	15
pBIC_00098	-	Helix-turn-helix domain protein	26
pBIC_00099	+	hypothetical protein	2
pBIC_00100	-	hypothetical protein	13
pBIC_00101	<i>sopB/parB</i>	Chromosome (plasmid) partitioning protein ParB	55
pBIC_00102	<i>sopA/parA</i>	Chromosome (plasmid) partitioning protein ParA	53
pBIC_00103	<i>repA2</i>	replicase (IncFI)	224
pBIC_00104	-	Resolvase/Recombinase	36
pBIC_00105	+	hypothetical protein	3
pBIC_00106	+	sensor domain-containing diguanylate cyclase	43
pBIC_00107	+	Mobile element protein (IS903B)	2
pBIC_00108	+	hypothetical protein	36
pBIC_00109	+	putative membrane protein YjcC	12
pBIC_00110	-	hypothetical protein	4
pBIC_00111	-	hypothetical protein	16
pBIC_00112	-	Secondary glycine betaine transporter BetU	54
pBIC_00113	-	Mobile element protein (IS1F)	10
pBIC_00114	-	Mobile element protein (IS1F)	18
pBIC_00115	-	Mobile element protein (ISEc11)	53
pBIC_00116	-	Mobile element protein (ISEc11)	23
pBIC_00117	+	Mobile element protein	21
pBIC_00118	+	Mobile element protein	4
pBIC_00119	-	Silver-binding protein	107
pBIC_00120	<i>cusS</i>	Osmosensitive K+ channel histidine kinase	48
pBIC_00121	<i>cusR</i>	Copper-sensing two-component system response regulator CusR	139
pBIC_00122	<i>cusC</i>	Cation efflux system protein CusC precursor	5
pBIC_00123	<i>cusF</i>	Cation efflux system protein CusF precursor	17
pBIC_00124	<i>cusB</i>	Cobalt/zinc/cadmium efflux RND transporter membrane fusion protein CzcB family	10
pBIC_00125	<i>cusA</i>	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcAB Cation efflux system protein CusA	7
pBIC_00126	<i>copG</i>	CopG protein	27
pBIC_00127	+	Lead cadmium zinc and mercury transporting ATPase B Copper-translocating P-type ATPase	14
pBIC_00128	+	hypothetical protein	42
pBIC_00129	<i>mepM</i>	Cell wall endopeptidase-family M23/M37	49
pBIC_00130	-	Copper-binding protein PcoE	22
pBIC_00131	+	Multicopper oxidase	51
pBIC_00132	<i>copB</i>	Copper resistance protein B	32
pBIC_00133	<i>copC</i>	Copper resistance protein CopC	53
pBIC_00134	<i>copD</i>	Copper resistance protein D	46

1067

pBIC_00135	+	DNA-binding heavy metal response regulator	57
pBIC_00136	+	Heavy metal sensor histidine kinase	33
pBIC_00137	+	probable copper-binding protein	30
pBIC_00138	-	hypothetical protein	25
pBIC_00139	-	Mobile element protein	18
pBIC_00140	+	Aquaporin Z	13
pBIC_00141	-	N-acetyltransferase	48
pBIC_00142	<i>arsR</i>	Arsenical resistance operon repressor	21
pBIC_00143	<i>arsH</i>	Arsenic resistance protein ArsH	39
pBIC_00144	+	hypothetical protein	47
pBIC_00145	<i>arsD</i>	Arsenical resistance operon trans-acting repressor ArsD	9
pBIC_00146	+	Arsenical pump-driving ATPase	4
pBIC_00147	+	Arsenical pump-driving ATPase	4
pBIC_00148	+	hypothetical protein	12
pBIC_00149	-	Arsenate reductase	91
pBIC_00150	-	Arsenic efflux pump protein	18
pBIC_00151	-	Arsenical pump-driving ATPase	48
pBIC_00152	<i>arsD</i>	Arsenical resistance operon trans-acting repressor ArsD	77
pBIC_00153	<i>arsR</i>	Arsenical resistance operon repressor	163
pBIC_00154	+	hypothetical protein	77
pBIC_00155	<i>ydeA</i>	YdeA protein	85
pBIC_00156	+	DNA binding protein	47
pBIC_00157	+	hypothetical protein	37
pBIC_00158	+	Haemolysin expression modulating protein	87
pBIC_00159	+	hypothetical protein	191
pBIC_00160	+	hypothetical protein	535
pBIC_00161	+	hypothetical protein	269
pBIC_00162	+	N-acetyltransferase	333
pBIC_00163	+	Transposase	28
pBIC_00164	-	hypothetical protein	33
pBIC_00165	-	Mobile element protein	79
pBIC_00166	-	Mobile element protein	28
pBIC_00167	-	Zn-dependent protease	57
pBIC_00168	-	diguanylate cyclase	170
pBIC_00169	-	hypothetical protein	210
pBIC_00170	<i>clp</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	409
pBIC_00171	<i>hsp</i>	Small HspC2 heat shock protein	795
pBIC_00172	-	DNA binding protein	591
pBIC_00173	-	transposase	14
pBIC_00174	-	hypothetical protein	11
pBIC_00175	+	Mobile element protein (ISKpn26)	2
pBIC_00176	+	Mobile element protein (ISKpn26)	15
pBIC_00177	+	hypothetical protein	7
pBIC_00178	-	Mobile element protein	1
pBIC_00179	<i>cbbR</i>	RuBisCO operon transcriptional regulator CbbR	2
pBIC_00180	-	Phosphonate dehydrogenase (NAD-dependent phosphite dehydrogenase)	4
pBIC_00181	<i>phnE</i>	Phosphonate ABC transporter permease protein phnE	5
pBIC_00182	-	Phosphonate ABC transporter phosphate-binding periplasmic component	2
pBIC_00183	<i>phnC1</i>	Phosphonate ABC transporter ATP-binding protein	3
pBIC_00184	+	Mobile element protein	4
pBIC_00185	-	Mobile element protein (IS26)	6
pBIC_00186	+	TnpA transposase (IS26)	8
pBIC_00187	+	Mobile element protein (partial IS26)	22
pBIC_00188	Δbla_{OXA-9}	Beta-lactamase class D (partial OXA-9)	6
pBIC_00189	Δbla_{OXA-9}	Beta-lactamase class D (partial OXA-9)	6
pBIC_00190	+	Mobile element protein ($\Delta Tn3$)	241
pBIC_00191	<i>bla_{TEM-1}</i>	Beta-lactamase TEM-1	175
pBIC_00192	-	Mobile element protein ($\Delta IS26$)	13
pBIC_00193	<i>aph(3')-I</i>	Aminoglycoside phosphotransferase	655

1068

1069

1070 Genes with RPKM values above the RPKM value of IncFII_K replicase *repA* are highlighted in grey.

1071

1072

1073

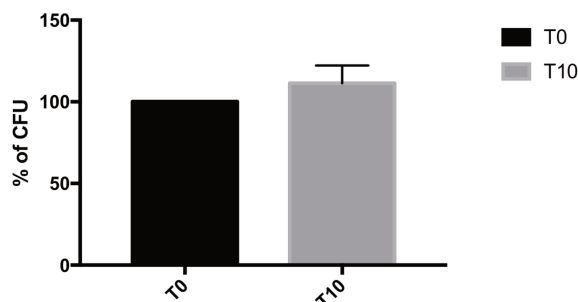
074 **Table 2. Differentially expressed genes carried by pBIC1a**

ld	name	Counts (without imipenem)	Counts (with imipenem)	FoldChange	log2FoldChange	adjusted p-value	annotation
Down-regulated genes							
pBIC_00006	pBIC_00006	110	77	0.697	-0.522	0.0189006744302781	putative transposase
pBIC_00007	pBIC_00007	247	110	0.45	-1.152	5.16261493036125E-12	Transposase DDE domain protein
pBIC_00008	pBIC_00008	256	104	0.412	-1.281	1.20458621618026E-13	Transposase DDE domain protein
pBIC_00034	pBIC_00034	4125	3052	0.741	-0.432	0.0000314693415270694	conjugal transfert protein TraG
pBIC_00064	pBIC_00064	3745	3173	0.848	-0.238	0.0472837770144815	Transglycosylase SLT domain protein
pBIC_00068	higA	4004	3293	0.823	-0.28	0.0137125638446403	Antitoxin HigA
pBIC_00069	pBIC_00069	3600	2784	0.774	-0.369	0.000846588551313737	hypothetical protein
pBIC_00097	pBIC_00097	323	204	0.635	-0.655	6.44119919532729E-06	putative transposase
pBIC_00098	pBIC_00098	190	92	0.491	-1.027	5.31005908392028E-07	Helix-turn-helix domain protein
pBIC_00108	pBIC_00108	119	50	0.43	-1.218	4.93774286137167E-08	hypothetical protein
pBIC_00109	yjcC	450	300	0.669	-0.579	7.65427026997054E-06	putative membrane protein YjcC
pBIC_00168	pBIC_00168	3282	2429	0.741	-0.433	0.000196755780598935	diguanylate cyclase
pBIC_00169	pBIC_00169	1063	840	0.791	-0.338	0.0270661962216076	hypothetical protein
pBIC_00170	clpC	29463	22147	0.753	-0.41	0.000216524062741672	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC
pBIC_00171	hspA	11647	7775	0.669	-0.58	4.35367336479698E-07	Heat shock protein
pBIC_00172	pBIC_00172	4274	2662	0.624	-0.68	1.50935924829896E-08	Helix-turn-helix domain protein
pBIC_00176	pBIC_00176	379	266	0.704	-0.507	0.00179348086730543	Transposase
pBIC_00177	pBIC_00177	108	75	0.695	-0.525	0.0290457754350927	hypothetical protein
pBIC_00186	pBIC_00186	217	165	0.764	-0.388	0.0401679057979344	Transposase
Up-regulated genes							
pBIC_00010	pBIC_00010	1807	2107	1.165	0.22	0.0486466957480775	hypothetical protein
pBIC_00107	pBIC_00107	48	93	1.911	0.935	0.0031555008954884	Transposase
pBIC_00129	mepM	937	1288	1.374	0.458	0.000194448323455471	Murein DD-endopeptidase MepM
pBIC_00131	copA	2404	3018	1.253	0.326	0.00344241153870828	Copper resistance protein A precursor
pBIC_00132	copB	725	939	1.291	0.369	0.0350266106083877	Copper resistance protein B precursor
pBIC_00134	copD	1107	1373	1.239	0.309	0.00834911762599042	Copper resistance protein D
pBIC_00135	copR	1001	1188	1.185	0.245	0.0235431916876475	Transcriptional activator protein CopR
pBIC_00136	copS	1205	1491	1.237	0.307	0.00948183349864894	Sensor kinase CopS
pBIC_00137	pcoE	336	423	1.255	0.328	0.0304861076998324	putative copper-binding protein PcoE precursor

genes with FC values <0.5 are highlighted in grey

1076 SUPPLEMENTARY FIGURES

1077

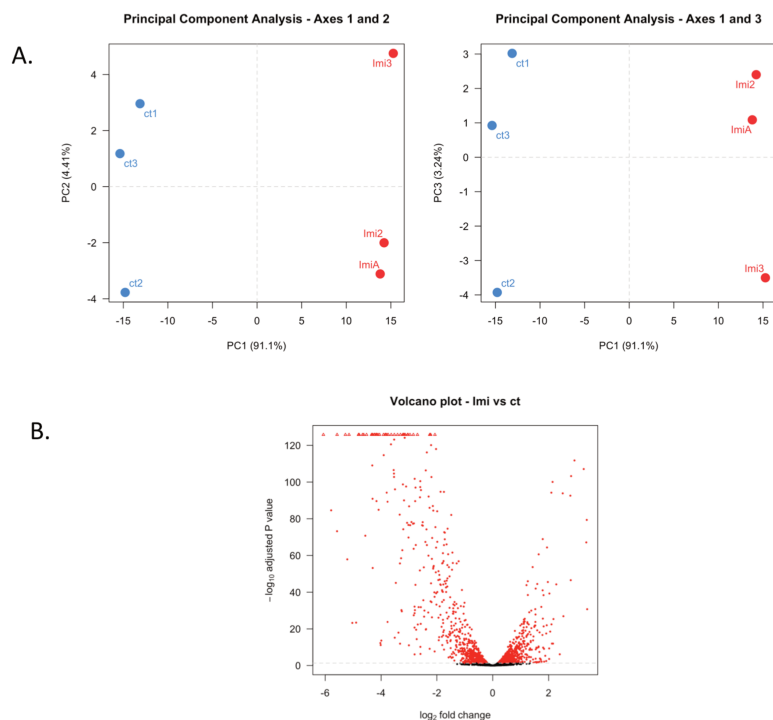


1078

1079 **Figure S1. Time-kill analysis after imipenem exposure.**

1080 Bacteria were diluted using ten-fold serial dilutions and Colony-Forming Units (CFUs) were
 1081 counted before (T0) and 10 minutes after imipenem addition (T10). The percentage of
 1082 surviving bacteria is represented. The experiments were performed in triplicates.

1083



1084

1085 **Figure S2. Differential expression of *E. coli*(pBIC1a) genes in presence of imipenem**
 1086 **(imi).**

1087 Condition without antibiotic was used as control (Ct).

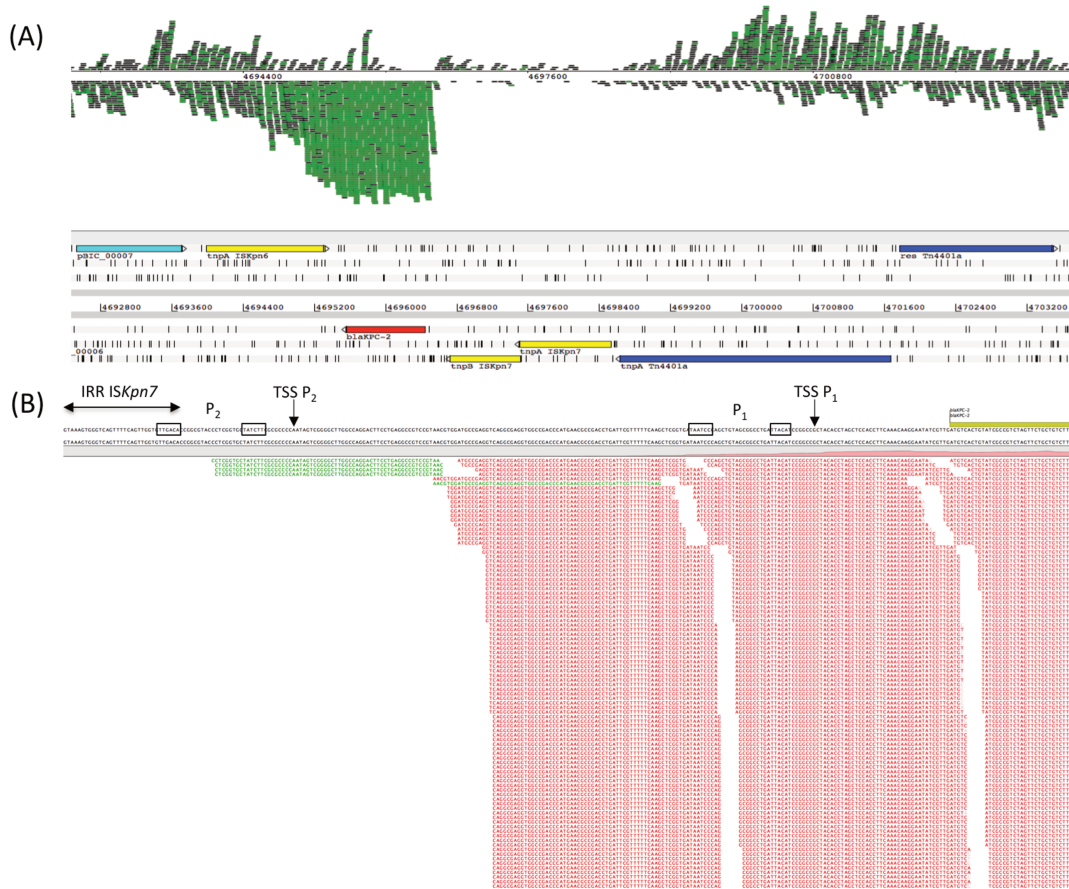
1088 479 significantly differentially expressed genes were found (p-value <0.05).

1089 (A) Plots of the principal component analysis (PCA). All experiments were performed with
 1090 biological triplicates.

1091 (B) Volcano plot with 325 genes with diminished expression and 154 genes with increased
 1092 expression in presence of imipenem are specified.

1093

1094
1095
1096



1097
1098
1099

1100 **Figure S3. Transcriptional landscape of Tn4401a bracketing *bla*_{KPC-2} carbapenemase**
1101 **gene.**

1102 (A) Strand-oriented read mapping of Tn4401a using Artemis software (Carver et al., 2008).
1103 No clear transcription termination of *bla*_{KPC-2} transcripts was observed, and this transcription
1104 covered in antisense the transposase gene of *ISKpn6*.

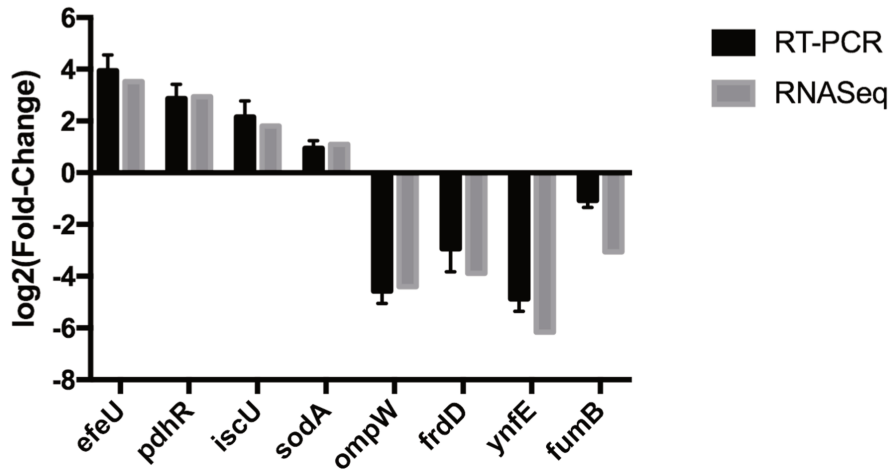
1105 CDS and their orientations are indicated by colored arrows in the lower part. The six reading
1106 frames are indicated with vertical bars representing stop codon. Green reads represent
1107 multiple identical reads merged and black reads represent unique read mapped.

1108 (B) Mapping of the reads indicates promoter p2 as the main promoter.

1109 Promoters are indicated by black boxes and named according to the literature (Girlich et al.,
1110 2017). Inverted repeat right (IRR) of *ISKpn7* is indicated by horizontal black arrow.

1111

1112
1113
1114
1115
1116



1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123
1124
1125
1126
1127

Figure S4. RT-qPCR validation of 8 representative genes with significantly differential expression after imipenem-induced stress.

RT-qPCR data are represented as mean \pm SD from three biological replicates

1128 **SUPPLEMENTARY TABLES**

1129

1130 Supplementary Tables S1 to S6 are available on line by clicking to this link:

1131 <https://drive.google.com/open?id=1NX3-R0GIoBODMr6z6gFQJodrf4zxhICI>

1132

1133

1134

Chapitre 4 : ACT-28, a chromosomally-encoded AmpC with carbapenemase activity from *Enterobacter kobei*

Chez les bactéries du « complexe *Enterobacter cloacae* » (ECC), la résistance aux carbapénèmes est principalement le résultat de la combinaison de l'hyperproduction de la céphalosporinase naturelle associée à de l'imperméabilité membranaire par modification de porines, auxquelles s'ajoute parfois la production d'une BLSE. Sur ces isolats, les tests de détection de la production d'une carbapénémase basés sur l'hydrolyse de l'imipénème sont négatifs du fait de la très faible activité catalytique des céphalosporinases et des BLSE vis-à-vis de l'imipénème.

Dans ce travail, nous avons décrit l'existence d'un clone de *Enterobacter kobei* dont la céphalosporinase naturelle (ACT-28) possède une capacité d'hydrolyse accrue vis-à-vis de l'imipénème.

Sur les 1039 souches d'ECC adressées au CNR entre 2016 et 2017 ne produisant pas de carbapénémase (recherche négative pour KPC, OXA-48, NDM, VIM, IMP, IMI), le test d'hydrolyse de l'imipénème, Carba NP test, était positif pour 8 isolats. Toutes ces souches présentaient une diminution de sensibilité aux carbapénèmes visible autour du disque d'ertapénème, sans résistance associée à d'autres familles d'antibiotiques. Le mécanisme de résistance aux carbapénèmes était compatible avec l'hyperproduction d'une céphalosporinase (restauration de la sensibilité aux carbapénèmes sur une gélose supplémentée en cloxacilline).

Le séquençage des huit génomes a permis de révéler la présence d'un variant du gène bla_{ACT} commun à l'ensemble des isolats, bla_{ACT-28} , codant la céphalosporinase chromosomique des ECC. Par ailleurs, au sein du complexe *E. cloacae*, ces isolats appartiennent à l'espèce *E. kobei*.

Des expériences de clonage des gènes bla_{ACT-28} et bla_{ACT-1} (utilisé comme référence), dans pTOPO et l'expression dans *E. coli* TOP10 ont permis de mettre en évidence qu'une activité carbapénémase était détectable uniquement dans les clones produisant ACT-28. La mesure des paramètres cinétiques indique une meilleure affinité d'ACT-28 pour l'imipénème (diminution du K_m d'un facteur 2 par rapport à ACT-1).

Six génomes supplémentaires d'ECC possédant le variant *bla*_{ACT-28} sont disponibles sur la base de données du NCBI. L'analyse par MLST *in silico* indique que tous ces isolats appartiennent au ST125. L'analyse phylogénomique indique la présence de 131 à 838 SNPs dans le core-génome partagé entre ces souches de *E. kobei* ST125. L'ajout de l'ensemble des autres génomes de *E. kobei* non ST125 disponibles met en évidence la présence d'un minimum de 11 720 SNPs avec les souches ST125. La construction d'un arbre phylogénétique permet d'identifier le clone *E. kobei* ST125 produisant ACT-28 comme une lignée bien individualisée du reste des *E. kobei*.

Par ailleurs, l'analyse de la séquence protéique des porines révèle la présence d'une porine OmpC chimérique présentant seulement 53% d'identité de séquence protéique avec celle de la souche de référence sauvage de *E. cloacae* DSM13645. Cette porine est présente uniquement chez les *E. kobei* ST125. Elle pourrait influencer sur la quantité de carbapénème présente dans l'espace périplasmique ce qui contribuerait également à augmenter l'efficacité catalytique d'ACT-28 et le niveau de résistance aux β -lactamines.

Cette étude souligne l'intérêt des techniques de séquençage haut débit dans la surveillance des clones résistants aux β -lactamines de large spectre, circulant à l'échelle nationale. L'impact clinique d'une infection par une souche de *E. kobei* ACT-28 et d'un traitement par carbapénème n'est pas connu. Cependant, il est important de caractériser ce genre de clone capable de positiver plusieurs techniques de détection de production de carbapénémase, afin d'éviter que les patients porteurs de cette bactérie ne soient « isolés » avec le reste des porteurs d'EPC.

1 **ACT-28, a chromosomally-encoded AmpC with carbapenemase activity**

2 **from *Enterobacter kobei***

3
4 Agnès B. Jousset^{1,2,3,4}, Saoussen Oueslati^{2,4}, Sandrine Bernabeu^{1,2,3,4}, Julie Takissian², Elodie
5 Creton³, Anaïs Vogel³, Aimie Sauvadet,³ Garance Cotellon³, Lauraine Gauthier^{1,2,3,4}, Rémy A.
6 Bonnin^{2,3,4}, Laurent Dortet^{1,2,3,4}, Thierry Naas*^{1,2,3,4}

7
8 ¹ Bacteriology-Hygiene unit, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Bicêtre Hospital, Le
9 Kremlin-Bicêtre, France

10 ² EA 7361 “Structure, dynamic, function and expression of broad spectrum β -lactamases”,
11 Faculty of Medicine University Paris-Sud, University Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre,
12 France

13 ³ French National Reference Center for Antibiotic Resistance: Carbapenemase producing
14 Enterobacteriaceae, Le Kremlin-Bicêtre, France

15 ⁴ Joint research Unit EERA « Evolution and Ecology of Resistance to Antibiotics », Institut
16 Pasteur-APHP-University Paris Sud, Paris, France

17
18 Abstract: 256 ; Text: 3895 words; Figures: 4; Tables: 2 ; Suppl Figures: 1 ; Suppl Tables: 2

19 Running title: Carbapenem-hydrolyzing ACT-28 cephalosporinase (46)

20 Keywords: AmpC, cephalosporinase, dissemination, Carbapenem-hydrolysis

21
22 * Corresponding author:

23 Thierry Naas, Service de Bactériologie, Hôpital de Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, 94275
24 Le Kremlin-Bicêtre, France. Phone: +33 1 45 21 29 86. Fax: +33 1 45 21 63 40; e-mail:
25 thierry.naas@aphp.fr

26

27 **SYNOPSIS (256)**

28

29 **Background:** In *Enterobacter cloacae* complex (ECC), the over-production of chromosome-
30 encoded cephalosporinase (cAmpC) lacking carbapenemase activity associated with
31 decreased outer membrane permeability may result in carbapenem resistance. Here, we have
32 characterized ACT-28, a cAmpC with carbapenemase activity, from a single *Enterobacter*
33 *kobei* lineage.

34 **Methods:** ECC isolates were characterized by whole genome sequencing (WGS),
35 susceptibility testing, minimal inhibitory concentration and carbapenemase activity was
36 monitored using Carba NP-, MALDI-TOF-based-, and rCIM-tests. ACT-28 steady state
37 kinetic parameters were determined.

38 **Results:** ECC MER was resistant to broad-spectrum cephalosporins, showed decreased
39 susceptibility to carbapenems and was categorized as a carbapenemase-producing
40 Enterobacteriaceae (CPE) according to the carbapenemase detection tests used. WGS
41 identified an *E. kobei* ST-125 expressing only *bla*_{ACT-28} gene. This gene was expressed in *E.*
42 *coli* and compared to *bla*_{ACT-1} gene. Carbapenemase activity detection tests were positive only
43 for *E. coli* expressing *bla*_{ACT-28} gene. Kinetic parameters of ACT-28 revealed significant
44 increase in imipenem hydrolysis as compared to ACT-1. Among 1039 non carbapenemase-
45 producing ECC isolates with decreased susceptibility to carbapenems received in 2016-2017
46 at the French National Reference Center for antibiotic resistance, only eight displayed a
47 positive Carba NP test. They were all ACT-28-producing *E. kobei* ST-125. Genomic
48 comparison with *E. kobei* isolates available in public DNA databases revealed that ACT-28-
49 producers formed a distinct subspecies.

50 **Conclusions:** We described a widespread subspecies of *E. kobei* ST-125 producing ACT-28,
51 which has significant carbapenemase activity as revealed by positive biochemical and

52 phenotypic diagnostic tests. As a consequence, patients carrying these isolates may be
53 mistakenly considered as carriers of CPE and even cohorted with true CPE carriers.

54 **INTRODUCTION**

55 *Enterobacter cloacae* complex (ECC) are highly adapted to the hospital environment
56 and are mostly responsible for hospital-acquired infections such as intravenous catheters
57 related bacteraemia, urinary tract infections and pulmonary infections.¹ The ECC shows a
58 genomic heterogeneity with 13 clusters based on their *hsp60* sequences and currently
59 comprises six different species: *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter*
60 *hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii*, and *Enterobacter nimipressuralis*.²

61 *Enterobacter* spp. naturally exhibit resistance to aminopenicillins, first and second
62 generation cephalosporins, by the production of a chromosomally-encoded Ambler class C β -
63 lactamase (cAmpC) characterized by its ability to hydrolyse cephalosporins without being
64 inhibited by clavulanic acid or tazobactam.³ In *Enterobacter* spp. resistance to broad-
65 spectrum cephalosporins can occur through acquisition of extended-spectrum β -lactamase
66 (ESBL) or by mutations that lead to constitutive hyperproduction of the cAmpC. This
67 phenomenon called «derepression» confers resistance to most β -lactam antibiotics, sparing
68 only carbapenems and ‘fourth generation’ cephalosporins (*i.e.* cefepime).⁴ Resistance to
69 carbapenems in *Enterobacter* spp. can arise by acquisition of true carbapenemases (mostly
70 KPC, NDM, VIM, IMP or OXA-48-like). However, alteration or loss of non-specific porins,
71 leading to outer membrane permeability defect, associated with overproduction of the natural
72 AmpC and/or production of an extended spectrum β -lactamase (ESBL) is the most common
73 mechanism.⁵

74 cAmpC β -lactamases, through different genetic elements, may be mobilized on
75 plasmids that may be acquired by Enterobacteriaceae that are not expected to produce an
76 AmpC β -lactamase, such as *Klebsiella pneumoniae* or *Escherichia coli*.⁶ These plasmid-
77 encoded AmpC (pAmpC) can be divided in several clusters: the *Citrobacter freundii* group
78 with LAT types and certain CMY types, the *Enterobacter* group with MIR-1 and ACT-1, the

79 *Morganella morganii* group with DHA-1 and DHA-2 and the *Hafnia alvei* group with ACC-
80 1.^{4,6-9} The level of expression of pAmpC is much higher than that of cAmpC due to high copy
81 number of the plasmid and/or greater promoter strength.⁴ Kinetic studies revealed that some
82 pAmpC variants displayed a slight carbapenemase activity, such as CMY-10, CMY-2 and, to
83 a lesser extent, ACT-1.^{10,11} To date, no cAmpC proved its ability to hydrolyse sufficiently
84 carbapenems.

85 Here, we described a single *E. kobei* lineage capable of hydrolysing imipenem, only
86 due to the expression of a novel cAmpC β -lactamase called ACT-28. Whole-genome
87 sequencing, cloning experiments and enzymatic purification were performed to characterize
88 this clone and this enzyme. Comparative genomic approaches revealed that *E. kobei*
89 producing ACT-28 formed a distinct subgroup that we propose to name *E. kobei* subsp.
90 *bicestrii*.

91

92 MATERIALS AND METHODS

93 Bacterial strains.

94 Eight ACT-28-producing *E. kobei* isolates (MER, 121J9, 145E9, 145F2, 149H5,
95 149H6, 149G8 and 151B8) were addressed to the French associated National Reference
96 Center for antibiotic resistance (F-NRC) between 2016 and 2017 for carbapenemase
97 detection. 19 other ECC clinical isolates addressed to the F-NRC over the same period and
98 used as controls (99B3, 99D9, 99G9, 99G10, 100A9, 103D9, 105A4, 105E9, 105H3, 105H6,
99 105I5, 105I8, 113I7, 131G4, 136E4, 148H3, 152E1, 153C2 and 168A8). These isolates were
100 randomly picked among the 1039 ECC collection isolates with reduced susceptibility to
101 carbapenems but lacking main carbapenemases (OXA-48-like, KPC, NDM, VIM and IMP
102 enzymes) and lacking carbapenemase activity (negative Carba NP test).

103 Identification of ECC was performed using MALDI-TOF MS using Bruker MS
104 System (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), according to the manufacturer's instructions.
105 In addition, analysis of the *hsp60* sequences was performed to distinguish species among the
106 *Enterobacter cloacae complex* (ECC).¹² ACT-1-producing *K. pneumoniae* was used as source
107 of *bla*_{ACT-1} gene for PCR amplification prior to cloning experiments.¹³ Electrocompetent *E.*
108 *coli* TOP10, *E. coli* HB4 (a strain with impaired permeability defect due to OmpC and OmpF
109 major porin deficiency) were used as recipients for electroporation experiments and *E. coli*
110 BL21(DE3) (Invitrogen, Eragny, France) was used for over-expressing ACT-28.¹⁴

111 **Susceptibility testing and MIC determinations.**

112 Susceptibility testing was performed by disc diffusion method on Mueller–Hinton agar
113 plates (BioRad, Marnes la Coquette, France) with or without cloxacillin (bioMérieux, La
114 Balmes les Grottes, France) incubated for 18 h at 37°C and interpreted according to the
115 EUCAST breakpoints, updated in 2018 (<http://www.eucast.org>). MICs for ceftazidime,
116 cefotaxime, cefepime, imipenem, meropenem and ertapenem were determined by E-test
117 (bioMérieux). For *E. coli* HB4 (pTOPO-ACT-1) and *E. coli* HB4 (pTOPO-ACT-28),
118 imipenem MICs were also determined using commercially-available dry-form broth
119 microdilution technique (Sensititre™ Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France).

120 **Plasmid extraction.**

121 Natural plasmids extraction was attempted using the Kieser extraction method and
122 subsequently analysed by electrophoresis on a 0.7% agarose gel as previously described.¹⁵

123 **Biochemical, immunological and molecular carbapenemase confirmatory tests.**

124 Bacterial colonies of ECC isolates were recovered from trypticase soy agar to perform
125 in-house Carba NP test as previously described,¹⁶ β-CARBA™ test (BioRad) and
126 RAPIDEC® CARBA NP (bioMérieux) according to the manufacturer's recommendations.
127 Rapid CIM (rCIM test) was performed as previously described.¹⁷ Imipenem hydrolysis

128 monitored by MALDI-TOF MS was done using the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit (Bruker
129 Daltonics, Bremen, Germany) according to the manufacturer's recommendations.¹⁸ Briefly,
130 50 µl of MBT STAR-BL incubation buffer is added into a ready-to-use tube containing MBT
131 STAR-BL antibiotic reagent. One to five individual bacterial colonies were resuspended in
132 the tube by vortexing. Samples were incubated at 37°C for 30 minutes under agitation (900
133 rpm). The bacteria were pelleted by centrifugation for 2 minutes at 16 000 g. One µl of the
134 supernatant was loaded on the MALDI target, dry under a stream of air (1 min) and overlaid
135 with the MBT STAR-BL Matrix solution. The spots were dried gently under a stream of air
136 (less than one minute). MALDI-TOF MS analysis was performed on the Microflex LT mass
137 spectrometer (Bruker Daltonics). Final spectra were automatically interpreted using the MBT
138 STAR[®]-BL IVD software.

139 Carbapenemase production was investigated by lateral flow immunoassays using the
140 RESIST-4 O.K.N.V kit (CORIS BioConcept, Gembloux, Belgium) for the detection of KPC,
141 NDM, VIM and OXA-48-like enzymes and the NG-CARBA 5 Test (NG Biotech, Guipry,
142 France) for the detection of KPC, NDM, VIM, OXA-48-like and IMP enzymes.¹⁹⁻²¹ Finally
143 genes for KPC, NDM, VIM, OXA-48-like and IMP enzymes was sought using the Xpert[®]
144 Carba-R kit (Cepheid, Sunnyvale, USA).²²

145 **Sequencing, Whole Genome Sequencing & Bioinformatic analysis.**

146 Recombinant plasmids pTOPO-ACT-28, pTOPO-ACT-1, pET41b-ACT1 and
147 pET41b-ACT28 were purified using QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Courtaboeuf,
148 France), and were sequenced using an ABI3130 automated sequencer (Applied Biosystems
149 ThermoFisher, Courtaboeuf, France). The nucleotide and the deduced protein sequences were
150 analysed using software from the National Center for Biotechnology Information
151 (www.ncbi.nlm.nih.gov) and the BLDB (www.dldb.eu).²³

152 The DNA libraries were prepared using the NexteraXT v3 kit (Illumina, San Diego,
153 CA, USA), according to the manufacturer's instructions, and then run on the HiSeq systems
154 (Illumina) for generating paired-end 150-bp reads. Illumina reads *de novo* assembly was
155 performed using CLC genomic workbench 10.0 according the manufacturer's
156 recommendations (Qiagen). The genome was annotated using the RAST tool
157 (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>).¹⁴

158 Resfinder online software (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) was used for the
159 detection resistance determinants other than β -lactamase.²⁴ Sequence-type determination was
160 performed using the *Enterobacter cloacae* MSLT scheme available online at
161 <https://pubmlst.org/ecloacae/>. Average Nucleotide Identity (ANI) was calculated with the
162 online tool <http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>.²⁵ Phylogenetic tree based on *hsp60* or *ampC*
163 sequences were drawn with MEGA7 software using Maximum-Likelihood method based on
164 the Tamura-Nei model.

165 Multiple sequence alignment of ACT variants, AmpD and OmpC were done online
166 using the Clustal Omega program (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Sequence of
167 AmpD from wild-type *E. kobei* 131G4 and *E. kobei* DSM 13645 (CP017181.1) were used as
168 reference for molecular analysis of AmpC derepression. Sequences of OmpC and OmpF from
169 *E. kobei* DSM13645 were used as reference for porin analysis.

170 The draft genomes of six ACT-28-producing ECC available online were included in
171 bioinformatic analyses: *E. kobei* ICBEaBL-III-03(2) (NIHL01000275.1), *E. kobei* GN02825
172 (LEDC01000001.1), *E. cloacae* 1323 (JVTR01000062.1), *E. cloacae* e1425
173 (FJYX01000004.1), *Enterobacter* sp. MGH 37 (JCLI01000015.1), and *Enterobacter* sp.
174 MGH 25 (AYJF01000016.1). All these strains were identified as *E. kobei* after *hsp60* and
175 phylogenomic analyses.

176 CSI Phylogeny 1.4 was used for phylogenomic analysis based on SNPs calling among
177 the core genome of the 14 ACT-28-producing *E. kobei*.²⁷ The 18 reference genomes of
178 Chavda's classification (A to R) and 24 non ACT-28 producing *E. kobei* genomes available in
179 NCBI database were added to the analysis
180 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>).^{26,27} All accession numbers of genomes used
181 in the study are listed in table S2.

182 Cloning experiments.

183 The *bla*_{ACT-28} and *bla*_{ACT-1} genes were amplified using ACT-28F (5'-
184 ATGAAGACAAAATCCCTTTGC-3') and ACT-28R (5'-CAGGCAACCA-
185 CTA AAAACGC-3') primers and using ACT-1F (5'-
186 ATGATGATGACTAAATCCCTTTGC-3') and ACT-1R (5'-
187 CTACAGCGCGCTCAA AATACG-3') primers, respectively, and were subsequently cloned
188 into pTOPO (Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit, Invitrogen, Courtaboeuf, France)
189 resulting in plasmids pTOPO-ACT-28 and pTOPO-ACT-1, respectively. These plasmids
190 were electroporated into *E. coli* TOP10 and *E. coli* HB4.

191 For β-lactamase production and purification, the *bla*_{ACT-28} and *bla*_{ACT-1} genes corresponding to
192 the mature β-lactamase were PCR amplified using the primers ACT28-cloningpET41-For (5'-
193 cttaagaaggagatatacaTATGgcgccgatgtcagagaaacagc-3'), ACT28-cloningpET41-Rev (5'-
194 gtggtggtggtggtgctcgaGctgcagagcgctcagaatacg), ACT1-cloningpET41-For (5'-
195 cttaagaaggagatatacaTATGgctaccccgatgtcagaaaaacagc-3') and ACT1-cloningpET41-Rev (5'-
196 ggtggtggtggtggtgctcgaGcagcgcgctcaaatacggatgc-3') respectively, and cloned into the
197 expression vector pET-41b(+) (Novagen, VWR International, Fontenay-sous-Bois, France)
198 using, the NEBuilder® HiFiDNA Assembly Cloning Kit (New England BioLabs®Inc, United
199 Kingdom), following the manufacturer's instructions. Recombinant plasmids pET41b-ACT1
200 and pET41b-ACT28 were transformed into electrocompetent *E. coli* BL21 (DE3).¹⁴

201 **β -lactamases purification and Steady state kinetics.**

202 An overnight culture of *E. coli* strain BL21 (DE3) harbouring pET41b-ACT-28 or
203 pET41b-ACT-1 recombinant plasmid were used to inoculate 2 L of BHI broth supplemented
204 with kanamycin at 50 mg/L. Bacteria were cultured at 37°C until reaching an OD₆₀₀ of 0.6.
205 Then, expression of the β -lactamase genes was carried out overnight at 25°C with 0.2 mM
206 IPTG as inducer. Cultures were centrifuged at 6000 g for 15 min and then the pellets were
207 resuspended with 10 mL of Buffer A (20 mM PBS, 175 mM K₂SO₄, 40mM Imidazol, pH
208 7.4).¹⁴ Bacterial cells were disrupted by sonication, the bacterial pellet was removed by two
209 consecutive centrifugation steps at 10.000 g for 1h at 4°C. The supernatant was further
210 centrifuged at 48.000 g for 1h at 4°C. β -lactamases were purified using a one-step pseudo-
211 affinity chromatography NTA-Nickel column (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Protein
212 purity was estimated by SDS-PAGE, pure fractions were pooled and dialyzed against 20mM
213 Hepes-K₂SO₄ 50mM (pH 7) and concentrated by using Vivaspin® columns (GE Healthcare).
214 Protein concentration was determined using Bradford Protein assay (Bio-Rad).¹⁴

215 Purified β -lactamases were used to determine the kinetic parameters (K_m and k_{cat}) of
216 benzylpenicillin, cefalotin, cefotaxime, ceftazidime and imipenem in 100 mM sodium
217 phosphate (pH 7.4). For imipenem, three experiments were performed to calculate the mean
218 and the standard deviation. The rates of hydrolysis were determined with an ULTROSPEC
219 2100 spectrophotometer and were analysed using the SWIFT II software (GE Healthcare,
220 Velizy-Villacoublay, France). K_m and k_{cat} values were determined by analysing the β -lactam
221 hydrolysis under initial rate conditions using the Eadie–Hofstee linearization of the
222 Michaelis–Menten equation as previously described.²⁸

223 **Nucleotide sequence accession numbers**

224 All of the genomes determined in this study are available at NCBI under BioProject
225 no. PRJNA472443. All genomes used in this study are listed in Table S2. New ACT and

226 CMH alleles described in this study have been deposited at Genbank; ACT-55 (MH469274),
227 ACT-56 (MH469275), ACT-57 (MH469278), ACT-58 (MH469279), ACT-59 (MH469280),
228 ACT-60 (MH469281), ACT-61 (MH469283), ACT-62 (MH469270), ACT-63 (MH469271),
229 ACT-64 (MH469272), CMH-4 (MH469276) and CMH-5 (MH469277).

230

231 **RESULTS AND DISCUSSION**

232 **ECC isolate MER with AmpC derepressed and carbapenemase activity.**

233 In 2016 the ECC isolate MER with decreased susceptibility to carbapenems was
234 received at the French associated National Reference Center for Antibiotics Resistance in
235 Enterobacteriaceae (F-NRC) for expertise. This isolate was resistant or intermediate to
236 penicillins, β -lactamase inhibitor-penicillin combinations, broad-spectrum cephalosporins,
237 aztreonam. Cefepime, imipenem and meropenem were the only active β -lactams (Table 1).
238 No synergy was observed between broad-spectrum cephalosporins and clavulanic acid
239 suggesting AmpC derepression rather than ESBL acquisition. Furthermore, there was no
240 associated resistance to other antimicrobial agents, such as aminoglycosides or
241 fluoroquinolones.

242 Despite susceptibility to carbapenems (Table 1), the disk diffusion susceptibility
243 testing revealed zone inhibition diameters below the screening cut-offs fixed by EUCAST (*ie*
244 ertapenem at 20 mm (< 25 mm), imipenem at 26 mm (< 28 mm)). Accordingly, several
245 complementary tests were performed to detect carbapenemase production (Table 1). Two tests
246 based on imipenem hydrolysis were positive: the Carba NP Test and the commercialized
247 MALDI-TOF based technique called MBT STAR[®]-Carba IVD Kit.¹⁸ The phenotypic test
248 rCIM¹⁷ was also positive. However, the RAPIDEC[®]CARBA NP was doubtful, and the β -
249 CARBA[™] test remained negative (Table 1). In addition, immunochromatographic assays
250 RESIST-4 O.K.N.V kit (CORIS BioConcept) and the NG- CARBA 5 test (NG Biotech) or

251 molecular Xpert[®] Carba-R test (Cepheid) provided negative test results.¹⁹⁻²² Antimicrobial
252 susceptibility testing was also performed on Muller-Hinton agar supplemented with
253 cloxacillin. On this medium, the susceptibility of carbapenems and broad-spectrum
254 cephalosporins was fully restored, suggesting that the observed phenotype might be due to the
255 overexpression of a cephalosporinase. To determine whether a pAmpC was present in these
256 isolates, plasmid extractions and subsequent electroporation into *E. coli* Top10 were
257 performed. Despite repeated attempts, no plasmid could be evidenced by electrophoresis on a
258 0.7% agarose gel and no transfer of cephalosporin-resistance could be evidenced.

259 **Characterization of ACT-28.**

260 Whole-genome sequencing (WGS) was performed to analyse in-depth the resistome of
261 ECC isolate MER in order to determine the origin of the imipenem hydrolysis. Genome
262 annotation indicated that the unique β -lactamase encoding gene was *bla*_{ACT-28} gene, a natural
263 variant of the cAmpC of ECC (Genbank Accession number NG_048614). In addition, no
264 antimicrobial resistance genes were found using Resfinder server, except a chromosomal
265 allele of *fosA* (95.5% nucleotide identity with *fosA*) known to confer resistance to fosfomycin.
266 Of note, the *fosA* gene is known to be widespread in ECC with a distribution in 82.4% in the
267 genomes of *E. cloacae*.²⁹

268 To determine whether the ACT-28 cephalosporinase possess a carbapenemase activity,
269 cloning experiments were performed. To date, 54 ACT variants have been described and
270 among them, no single amino acid mutant of ACT-28.²³ Thus, we have decided to compare
271 the activity of ACT-28 to the well-characterized ACT-1, a pAmpC found in an ertapenem-
272 resistant *K. pneumoniae* with porin deficiency.^{10,13}

273 To compare the β -lactams hydrolysis properties of ACT-28 and ACT-1, the two genes
274 were cloned in pTOPO plasmid under the control of *Plac* promoter and expressed in *E. coli*
275 TOP10. As expected, expression of the *bla*_{ACT-1} and *bla*_{ACT-28} genes conferred resistance to

276 penicillins and to broad-spectrum cephalosporins (Table 1). Surprisingly, despite the same
277 MICs for imipenem being 3-fold increased with both *bla*_{ACT-1}- and *bla*_{ACT-28}-expressing
278 clones, carbapenemase activity monitored by Carba NP test, MALDI-TOF technique (MBT
279 STAR[®]-Carba IVD Kit) and the rCIM test were positive only for *bla*_{ACT-28}-expressing clones
280 (Table 1). To characterize more precisely whether ACT-28 possesses specific catalytic
281 properties towards carbapenems, a kinetic study was conducted. As expected, benzylpenicillin
282 and cefalotin were excellent substrates for ACT-28 and ACT-1, whereas these two enzymes
283 exhibited a lower catalytic activity towards cefotaxime and ceftazidime (Table 2).⁴ Regarding
284 imipenem, ACT-28 showed a 2-fold increase in imipenem affinity (*K_m* at $1.91 \pm 0.39 \mu\text{M}$) as
285 compared to ACT-1 ($4.63 \pm 0.40 \mu\text{M}$) ($p < 0.01$ Student *t*-test) (Table 2). The global catalytic
286 activity of ACT-28 ($13.3 \pm 2.0 \text{ mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$) was 1.5 times higher than that of ACT-1 ($8.81 \pm$
287 $0.02 \text{ mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$). This significant difference ($p < 0.05$, Student *t*-test) in catalytic efficiency
288 towards imipenem between both enzymes was confirmed on several independent
289 measurements.

290 **Identification of a single *E. kobei* ST-125 subgroup.**

291 From January 2016 to December 2017, 1465 ECC isolates with decreased
292 susceptibility to carbapenems were received at the F-NRC for expertise. 426 produced a
293 carbapenemase of OXA-48-like- KPC-, NDM-, VIM- and/or type (data not shown) and
294 among the 1039 were non-carbapenemase producers, only seven isolates, in addition to ECC
295 MER displayed a positive Carba NP test. These seven isolates displayed the same antibiogram
296 as ECC MER (Table 1) and presented the same discrepant biochemical, immunological and
297 molecular test results. WGS of these 7 isolates revealed the presence of *bla*_{ACT-28} gene as the
298 only β -lactamase encoding gene.

299 To date, MALDI-TOF MS-based identification and biochemical tests (e.g. API
300 galleries) are not able to distinguish the different species within the ECC.^{2,12,30} As proposed

301 by Hoffman *et al.*,¹² the construction of the *hsp60*-based Maximum Likelihood tree allowed
302 us to find that all ACT-28 producers clustered within the *hsp60* cluster II, *i.e.* *E. kobei* with
303 100% identity (data not shown). Recently, Chavda *et al.* extended the number of clusters in
304 the ECC to 18 phylogenomic groups (A to R) by analysing core single nucleotide
305 polymorphisms (SNPs) in 390 whole genomes.²⁶ Using the WGS data, the phylogenomic
306 analysis confirmed that the 8 genomes of the ACT-28 producers were distributed within the
307 Q-like group comprising *E. kobei* (Fig. 1A). Average Nucleotide Identity between ECC MER
308 and *E. kobei* DSM 13645 used as reference showed 99,21% of identity.²⁵

309 Multi-locus sequence typing (MLST) analysis revealed that all ACT-28 producers
310 belonged to the sequence type (ST) 125. This ST is not particularly known as a high-risk
311 clone in hospital environment.³¹ To evaluate the genetic diversity among non-carbapenemase
312 ECC isolates with decreased susceptibility to carbapenems, we analysed the genomes of 19
313 ECC isolates addressed to the F-NRC. These clinical isolates were randomly picked in our
314 NRC-collection between 2016 and 2017. Most of them were identified as *E. hormaechei* and
315 *E. xiangfangensis* (Fig. 2). We observed a diversity of natural cAmpC and ST-types but none
316 was of ST-125 (Fig. 2).

317 Phylogenetic analysis of the 19 natural cAmpCs revealed that the AmpC of the isolate
318 131G4 (AmpC-131G4 called ACT-64 newly described here) was closely related to ACT-28
319 (Fig.2). Indeed, ACT-64 shared 97% amino-acids identity with ACT-28 (371/381). Of note
320 isolate 131G4 was identified as *E. kobei* but the Carba NP test was negative, suggesting that
321 ACT-64 lacked detectable carbapenemase activity with this test. Alignment of ACT-28, ACT-
322 64 and ACT-1 revealed the presence of unique residues in ACT-28 that could be responsible
323 for its carbapenemase activity (Fig. 3). Residues conserved between ACT-1 and ACT-64 but
324 mutated in ACT-28 might be involved in the increased carbapenemase activity of ACT-28.
325 These residues are His157, Ala166, Ile229 (Ω loop), Ile247 (Ω loop) and Leu254 (Fig. 3).

326 **ACT-28-producing *E. kobei* ST-125 forms a distinct subspecies of *E. kobei***

327 All ACT-28 producing isolates addressed to F-RNC were isolated from patient with
328 no known travel history. To determine whether *E. kobei* ST-125 was frequently observed
329 around the world, we searched for other genomes in the NCBI database. To date, only 6
330 genomes with their shotgun contigs are deposited in Genbank database and are coming from
331 different countries (USA, Brazil and UK) suggesting that *E. kobei* ST-125 are present at least
332 on three distantly located geographical areas (Fig. 2). These 6 isolates were all ACT-28-
333 producers.

334 To evaluate the genetic diversity between the 14 ACT-28-producing *E. kobei* ST-125,
335 phylogeny based on SNP-calling among the core-genome was performed using CSI
336 Phylogeny.²⁷ These strains differed from 131 to 838 SNPs (Fig. 1B). Only 3 SNPs were
337 detected between MGH25 and MGH37 and 9 SNPs between 149H5 and 149H6 suggesting
338 that in both cases, isolates came from related patients. Of note, the 149H5 and 149H6 ACT-
339 28-producing *E. kobei* were isolated from two patients hospitalized in the same ward
340 suggesting a cross-transmission. Phylogenomic comparison with *E. kobei* genomes available
341 on the NCBI database (n=24) revealed that ACT-28-producing isolates formed a single
342 lineage (Fig 1A, Fig 2). 11 720 to 13 617 SNPs were detected between *E. kobei* MER and
343 other *E. kobei* isolates (Table S1). Thus, we propose to define ACT-28-producers as a single
344 sub-species that we named *E. kobei* subsp. *bicestrii*.

345 **ACT-28 in strains with decreased outer membrane permeability.**

346 Previous studies indicated that AmpC β -lactamases could weakly hydrolyze some
347 substrates (e.g. carbapenems) despite a low *k_{cat}* as long as they possess concomitantly a high
348 affinity (low *K_m*) for the substrate.^{4,32} The concentration of β -lactams in the periplasm is
349 therefore a crucial issue and depends on the number of porin entry channels or the efflux
350 pump overexpression that can extrude molecules and therefore increase enzyme efficiency.

351 To study the impact of ACT-1 and ACT-28 expression in a porin-deficient strain, pTOPO-
352 ACT-1 and pTOPO-ACT-28 were electroporated into *E. coli* HB4 lacking porins OmpF and
353 OmpC.³³ Expression of *bla*_{ACT-1} and *bla*_{ACT-28} genes conferred high level resistance to all β -
354 lactams including carbapenems with MICs of 12 μ g/ml and >32 μ g/ml, respectively (Table
355 1). The higher MICs for imipenem conferred by ACT-28 as compared to ACT-1 are in
356 agreement with our biochemical results (steady state kinetic and Carba NP test results).

357 To evaluate the role of membrane permeability defect in the global resistance
358 phenotype of ACT-28-producing *E. kobei*, *in silico* analysis of porins was performed. Using
359 WGS data, outer membrane protein sequences of *ompF*-type and *ompC*-type were compared
360 to the *E. kobei* DSM13645 reference strain. These porins are homologs of *K. pneumoniae*
361 *ompK35* and *ompK36* porins, respectively. In both species, alterations of these porins are
362 known to be involved in decreased susceptibility to carbapenems and notably ertapenem.⁵ As
363 compared to *E. kobei* DSM13645, *ompF* shared 100% of nucleotide identity. Surprisingly,
364 analysis of *ompC* revealed an allelic replacement of 967-bp that occurred within the gene in
365 all ACT-28-producing *E. kobei* (Fig. 4A). Intriguingly, this allelic replacement was in-phase
366 with the identical 5'end of *ompC* and led to a complete coding sequence. This *ompC*-MER
367 chimera was of 1077-bp in size instead of 1143-bp for *ompC*-DSM13645. All ACT-28
368 producers possessed this peculiar modified OmpC and BLAST analysis revealed that this
369 genetic event was specific of *E. kobei* ST-125. This in-phase allelic replacement, resulting in
370 an OmpC-MER sharing only 53% of amino-acid sequence identity with OmpC-DSM13645,
371 might modify the functionality of the porin (Fig. 4B).

372 WGS data was also used to investigate the molecular mechanism that led to AmpC
373 depression in ACT-28-producing isolates. Most of ECC clinical isolates with AmpC
374 derepressed have mutations in AmpD, a cytosolic amidase involved in cell wall recycling, and
375 less commonly in AmpR.³⁴ Alignment of AmpD proteins of the 8 ACT-28 producers and *E.*

376 *kobei* 131G4 (AmpC not derepressed, data not shown) to *E. kobei* DSM 13645 as reference
377 revealed mutations that led to truncated proteins due to early STOP codon in 3 isolates (MER,
378 145H5, 154H6) (Fig. S1). Only the 48 final amino acids of AmpD were present in isolate
379 145F2, whereas the gene was totally absent in 121J9. In 149G8, the initial Met codon was
380 absent; hence AmpD expression could be decreased. In 145E9 and 151B8, AmpD is strictly
381 identical to the sequence of DSM 13645 (Fig. S1). Otherwise alignment of *ampR* of all ACT-
382 28 producers revealed the presence of 7 SNPs in comparison to *ampR*-131G4, but they do not
383 impact amino acid sequence (data not shown). Therefore, it is unlikely that AmpR might be
384 involved in AmpC derepression. At last, no mutations in *ampC* and *ampD* promoters were
385 observed. Overall, mutations in AmpD were present in the majority of isolates but we cannot
386 exclude that mutations in partners of the AmpC derepression pathway other than AmpD and
387 AmpR might be implicated in the phenotype of ACT-28 producers.³⁴

388

389 CONCLUSIONS

390 We have described a novel subspecies of *E. kobei* ST-125 named *bicestrii* with
391 carbapenemase activity. ACT-28, a specific chromosome-encoded cephalosporinase, was the
392 only β -lactamase detected in this lineage. Kinetic study revealed its high affinity for
393 imipenem, which might result in carbapenem-resistance when associated with outer
394 membrane permeability defect. We showed that ACT-28 led to significant carbapenemase
395 activity as revealed with imipenem hydrolysis-based diagnostic tests (Carba NP test, MALDI-
396 TOF based assay) and phenotypic tests (rCIM tests). As a consequence, patients carrying
397 these isolates may be mistakenly categorized as CPE carriers, and isolated with dedicated
398 staff or even cohorted with true CPE carriers. With cAmpC-producing bacteria, biochemical
399 tests have to be interpreted with susceptibility testing on a cloxacillin plate. Indeed, in a strain
400 with a cephalosporinase overproduced and impaired permeability, diameters around the β -

401 lactam disks will increase, whereas with true carbapenemase-producers, diameters around
402 imipenem will change only slightly, if at all.³⁵

403

404 **FUNDING**

405 This work was supported by the Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, by a grant from the
406 Université Paris-Sud (EA 7361), and by the LabEx LERMIT supported by a grant from the
407 French National Research Agency (ANR-10-LABX-33). This work was also funded in part
408 by a grant from Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance (ANR-14-JAMR-
409 0002).

410

411 **CONFLICT OF INTERESTS**

412 LD is co-inventor of the Carba NP Test, which patent has been licenced to bioMérieux (La
413 Balme les Grottes, France).

414

415 **REFERENCES**

416

- 417 1. Sanders WE, Sanders CC. Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the
418 century. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:220-241.
- 419 2. Paauw A, Caspers MPM, Schuren FHJ, *et al.* Genomic diversity within the Enterobacter
420 cloacae complex. *PloS One* 2008; 3:e3018.
- 421 3. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases
422 and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211.
- 423 4. Jacoby GA. AmpC -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:161-182.
- 424 5. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, *et al.* Molecular mechanisms disrupting porin
425 expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from
426 the UK. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:659-667.

- 427 6. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases.
428 *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1-11.
- 429 7. Rottman M, Benzerara Y, Hanau-Berçot B, *et al.* Chromosomal ampC genes in
430 *Enterobacter* species other than *Enterobacter cloacae*, and ancestral association of the
431 ACT-1 plasmid-encoded cephalosporinase to *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiol Lett*
432 2002; 210:87-92.
- 433 8. Girlich D, Naas T, Bellais S, *et al.* Biochemical-genetic characterization and regulation of
434 expression of an ACC-1-like chromosome-borne cephalosporinase from *Hafnia alvei*.
435 *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1470-1478.
- 436 9. Poirel L, Guibert M, Girlich D, *et al.* Cloning, sequence analyses, expression, and
437 distribution of ampC-ampR from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob*
438 *Agents Chemother* 1999; 43:769-776.
- 439 10. Mammeri H, Guillon H, Eb F, *et al.* Phenotypic and Biochemical Comparison of the
440 Carbapenem-Hydrolyzing Activities of Five Plasmid-Borne AmpC β -Lactamases.
441 *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4556-4560.
- 442 11. Kim JY, Jung HI, An YJ, *et al.* Structural basis for the extended substrate spectrum of
443 CMY-10, a plasmid-encoded class C β -lactamase. *Mol Microbiol* 2006; 60:907-916.
- 444 12. Hoffmann H, Roggenkamp A. Population Genetics of the Nomenclature *Enterobacter*
445 *cloacae*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:5306-5318.
- 446 13. Bradford PA, Urban C, Mariano N, *et al.* Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*
447 is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase,
448 and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:563-
449 569.

- 450 14. Dabos L, Bogaerts P, Bonnin RA, *et al.* Genetic and Biochemical characterization of
451 OXA-519, a novel OXA-48-like β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; pii:
452 AAC.00469-18.
- 453 15. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and
454 *Escherichia coli*. *Plasmid* 1984; 12:19-36.
- 455 16. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of Carbapenemase-producing
456 Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:1503-1507.
- 457 17. Muntean M-M, Muntean A-A, Gauthier L, *et al.* Evaluation of the rapid carbapenem
458 inactivation method (rCIM): a phenotypic screening test for carbapenemase-producing
459 Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73:900-908.
- 460 18. Dortet L, Tandé D, de Briel D, *et al.* MALDI-TOF for the rapid detection of
461 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: comparison of the commercialized MBT
462 STAR®-Carba IVD Kit with two in-house MALDI-TOF techniques and the RAPIDEC®
463 CARBA NP. *J Antimicrob Chemother*-2018; (doi: 10.1093/jac/dky209)
- 464 19. Sağıroğlu P, Hasdemir U, Altınkanat Gelmez G, *et al.* Performance of “RESIST-3 O.K.N.
465 K-SeT” immunochromatographic assay for the detection of OXA-48 like, KPC, and NDM
466 carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *Braz J Microbiol Publ Braz Soc*
467 *Microbiol.* 2018; pii: S1517-8382(17)30417-3.
- 468 20. Glupczynski Y, Jousset A, Evrard S, *et al.* Prospective evaluation of the OKN K-SeT
469 assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-
470 like, KPC and NDM carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72:1955-1960.
- 471 21. Boutal H, Vogel A, Bernabeu S, *et al.* A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid
472 identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-
473 producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73:909-915.

- 474 22. Dortet L, Fusaro M, Naas T. Improvement of the Xpert Carba-R Kit for the Detection of
475 Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;
476 60:3832-3837.
- 477 23. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, *et al.* Beta-lactamase database (BLDB) - structure and
478 function. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017; 32:917-919.
- 479 24. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, *et al.* Identification of acquired antimicrobial
480 resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67 (11): 2640-4.
- 481 25. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, *et al.* DNA-DNA hybridization values and
482 their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;
483 57:81-91.
- 484 26. Chavda KD, Chen L, Fouts DE, *et al.* Comprehensive Genome Analysis of
485 Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp.: New Insights into Phylogeny, Population
486 Structure, and Resistance Mechanisms. *mBio* 2016; 7:e02093-16.
- 487 27. Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, *et al.* Solving the Problem of Comparing
488 Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. *PLoS ONE* 2014 ;
489 9:e104984.
- 490 28. Cornish-Bowden A. *Fundamentals of enzyme kinetics*. 1995. Portland Press, Seattle, WA.
- 491 29. Ito R, Mustapha MM, Tomich AD, *et al.* Widespread Fosfomycin Resistance in Gram-
492 Negative Bacteria Attributable to the Chromosomal *fosA* Gene. *mBio* 2017; 8: e00749-17.
- 493 30. Jamal W, Albert MJ, Rotimi VO. Real-time comparative evaluation of bioMerieux
494 VITEK MS versus Bruker Microflex MS, two matrix-assisted laser desorption-ionization
495 time-of-flight mass spectrometry systems, for identification of clinically significant
496 bacteria. *BMC Microbiol* 2014; 14: 289.
- 497 31. Izdebski R, Baraniak A, Herda M, *et al.* MLST reveals potentially high-risk international
498 clones of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 48-56.

- 499 32. Vu H, Nikaido H. Role of beta-lactam hydrolysis in the mechanism of resistance of a
500 beta-lactamase-constitutive *Enterobacter cloacae* strain to expanded-spectrum beta-
501 lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27:393-398.
- 502 33. Mammeri H, Nordmann P, Berkani A, *et al.* Contribution of extended-spectrum AmpC
503 (ESAC) beta-lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol*
504 *Lett* 2008; 282:238-240.
- 505 34. Guérin F, Isnard C, Cattoir V, *et al.* Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated β -
506 Lactam Resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;
507 59:7753-7761.
- 508 35. Dortet L, Cuzon G, Plésiat P, *et al.* Prospective evaluation of an algorithm for the
509 phenotypic screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob*
510 *Chemother* 2016 ; 71:135-140.
- 511

512

513

514 **Table 1. MICs of β -lactams for *E. kobei* MER and transformants**

515

516

	<i>E. kobei</i> (ACT-28 chr)	<i>E. coli</i> TOP10 (pTOPO-ACT-28)	<i>E. coli</i> TOP10 (pTOPO-ACT-1)	<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> HB4- (pTOPO-ACT-28)	<i>E. coli</i> HB4- (pTOPO-ACT-1)	<i>E. coli</i> HB4
MICs ($\mu\text{g/mL}$)							
Cefotaxime	>32	>32	>32	0.06	>32	>32	0.38
Ceftazidime	>256	>256	>256	0.12	>256	>256	4
Cefepime	0.5	0.25	0.25	0.06	6	2	0.75
Ertapenem	0.5	0.125	0.125	0.003	>32	>32	1
Meropenem	0.25	0.047	0.06	0.016	>32	>32	0.25
Imipenem (Etest)	0.75	0.38	0.5	0.25	>32	12	0.25
Imipenem (BMD)	ND	ND	ND	ND	>128	64	ND
Detection of carbapenem-hydrolytic activity							
In-house Carba NP test	+	+	-	-	ND	ND	ND
RAPIDEC [®] CARBA NP	Doubtful	Doubtful	Doubtful	-	ND	ND	ND
β -CARBA [™] test	-	-	-	-	ND	ND	ND
MALDI-TOF	+	+	-	-	ND	ND	ND
MBT STAR [®] -Carba IVD Kit	+	+	-	-	ND	ND	ND
rCIM test	+	+	-	-			

517

518 BMD, Broth microdilution

519 ND, not determined

520 +, positive result

521 -, negative result

522

523
524
525
526
527
528
529**Table 2. Kinetic parameter values for ACT-28 and ACT-1**

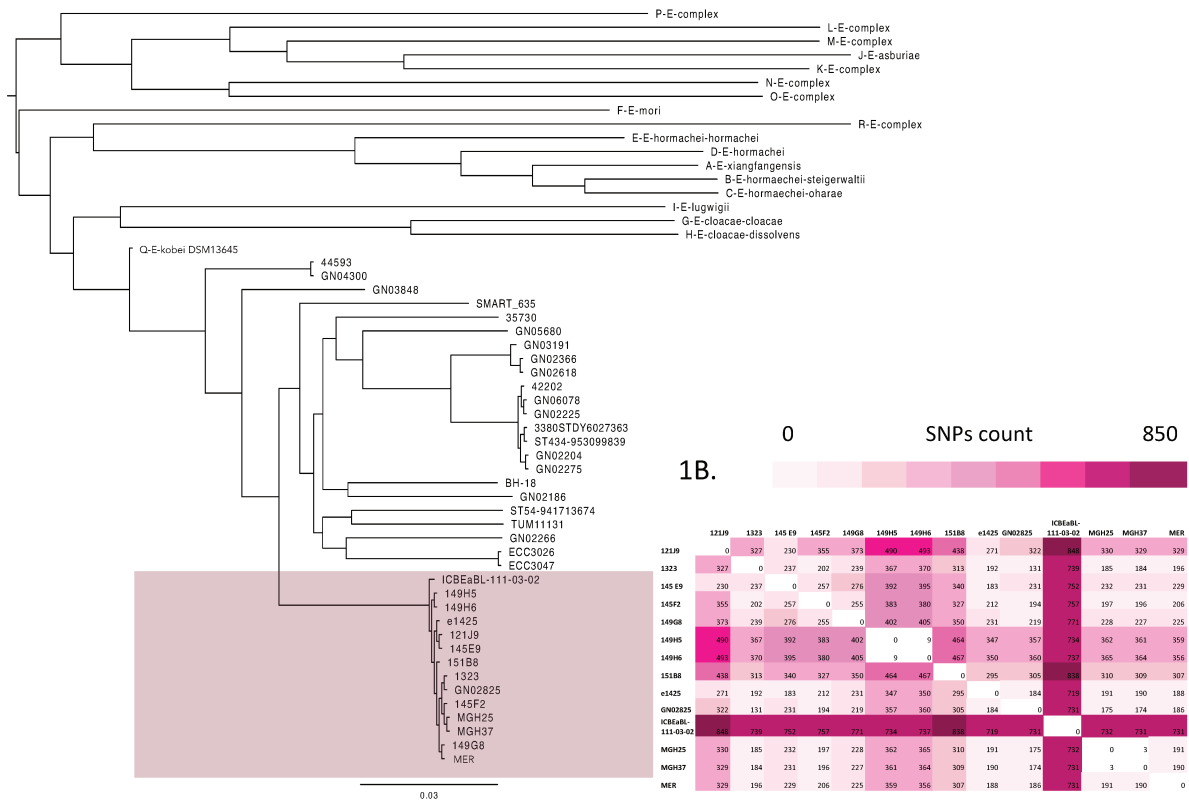
	K_m (μM)		k_{cat} (s^{-1})		k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$)	
	ACT-28	ACT-1	ACT-28	ACT-1	ACT-28	ACT-1
Penicillin G	36.55	44.80	70.27	48.89	1922.7	1091
Cefalotin	138	110	383.58	325.45	2779.6	2958.7
Cefotaxime	3.75	4.32	0.0716	0.0471	19.1	10.9
Ceftazidime	305.90	32.26	0.1023	0.0299	0.33	0.927
Imipenem ^a	1.91 ± 0.39	4.63 \pm 0.40	0.0249 \pm 0.0014	0.0408 \pm 0.0003	13.3 ± 2.0	8.81 ± 0.02

530
531
532
533^a K_m and k_{cat} were determined using three independent experiments.

534 **FIGURES AND LEGENDS**

535

Fig. 1A



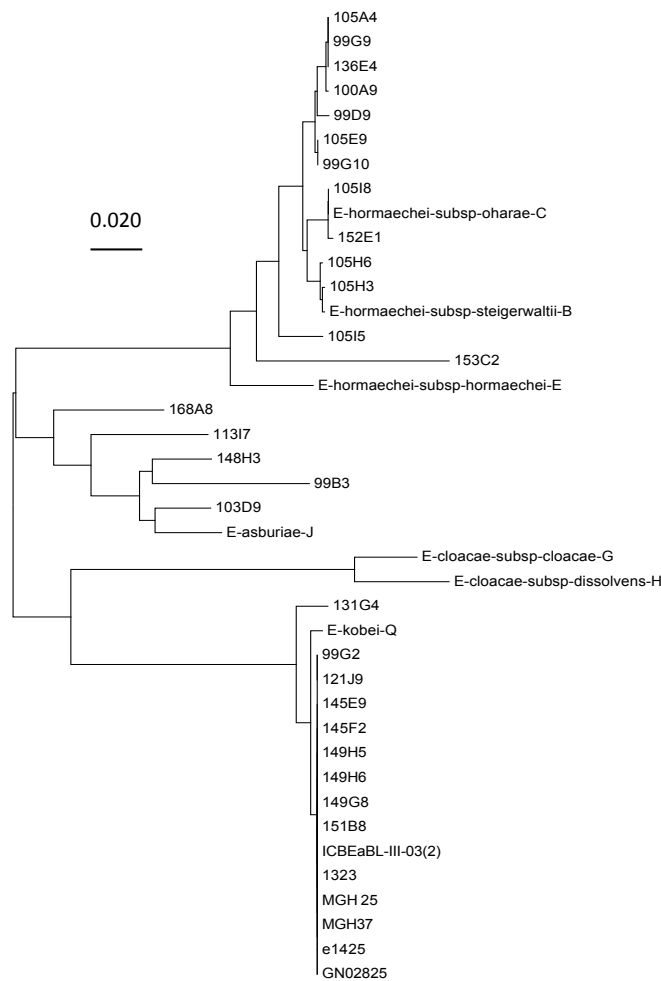
536

537 **Figure 1. ECC ACT-28-producers belong to *E. kobei*.** (A) Phylogeny based on SNP-calling
 538 among the core-genome of ECC isolates. All ACT-28 producers belonged to Chavda's
 539 phylogenomic group Q,²⁶ as well as all *E. kobei* genomes publicly available online (n=30).
 540 Among *E. kobei*, ACT-28 producers form a single subgroup called *E. kobei* subsp. *bicestrii*,
 541 highlighted in pink. (B) Heatmap representing SNPs counts among the core-genome of ACT-
 542 28 producing isolates: 8 strains were addressed to the F-NRC and 6 genomes were
 543 downloaded from the NCBI database (1323, e1425, MGH25, MGH37, ICBEaBL-111-03-02,
 544 GN02825). Analysis was performed using CSI Phylogeny.²⁷

545

546

Fig. 2



Carba NP test	AmpC Variant	Species, subspecies, complex	Chavda's phylogenomic group	Sequence-type	Source	Location
-	ACT-45	<i>E. xiangfangensis</i>	A	ST66	urine	France
-	ACT-45	<i>E. xiangfangensis</i>	A	ST66	urine	France
-	ACT-45	<i>E. xiangfangensis</i>	A	ST66	blood	France
-	ACT-61	<i>E. xiangfangensis</i>	A	ST1069	urine	France
-	ACT-16	<i>E. xiangfangensis</i>	A	ST114	lung	France
-	ACT-16	<i>E. xiangfangensis</i>	A	ST136	urine	France
-	ACT-16	<i>E. xiangfangensis</i>	A	ST136	blood	France
-	ACT-55	<i>E. hormaechei subsp. oharae</i>	C	ST108	urine	France
NR	ACT-55	<i>E. hormaechei subsp. oharae</i>	C	ST108	unknown	Germany
-	ACT-60	<i>E. hormaechei subsp. oharae</i>	C	ST1067	urine	France
-	ACT-27	<i>E. hormaechei subsp. steigerwaltii</i>	B	ST-110	unknown	France
-	ACT-15	<i>E. hormaechei subsp. steigerwaltii</i>	B	ST-153	urine	France
NR	ACT-56	<i>E. hormaechei subsp. steigerwaltii</i>	B	ST906	wound	Belgium
-	ACT-15	<i>E. hormaechei</i>	D	ST153	urine	France
-	ACT-59	<i>E. hormaechei</i>	D	ST487	blood	France
NR	ACT-37	<i>E. hormaechei subsp. hormaechei</i>	E	ST269	lung	USA
-	MIR-20	<i>E. cloacae</i> complex	M	ST595	rectal swab	France
-	ACT-62	<i>E. cloacae</i> complex	M	ST1066	rectal swab	France
-	ACT-58	<i>E. cloacae</i> complex	M	ST1067	rectal swab	France
-	ACT-63	<i>E. cloacae</i> complex	L	ST1065	rectal swab	France
-	ACT-57	<i>E. asburiae</i>	J	ST-25	rectal swab	France
NR	ACT-4	<i>E. asburiae</i>	J	ST807	unknown	unknown
NR	CMH-4	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	G	ST1	unknown	unknown
NR	CMH-5	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	H	ST674	cutaneous	Malaysia
-	ACT-64	<i>E. kobei</i>	Q	ST-54	rectal swab	France
NR	ACT-9	<i>E. kobei</i>	Q	ST806	blood	Japan
+	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	unknown	France
+	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	urine	France
+	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	rectal swab	France
+	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	urine	France
+	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	urine	France
+	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	urine	France
+	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	urine	France
+	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	urine	France
NR	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	Stool	Brazil
NR	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	unknown	USA
NR	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	urine	USA
NR	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	blood	UK
NR	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	Urine	unknown
NR	ACT-28	<i>E. kobei</i>	Q	ST-125	unknown	USA

547

548 **Figure 2. Phylogenetic analysis of AmpC β-lactamases of ECC isolates addressed to the French National Reference Center for carbapenemase detection.** This
 549 unrooted tree was constructed based on *ampC* genes using Maximum-Likelihood method with Tamura-Nei model using MEGA program (MEGA 7.0) The tree is drawn
 550 to scale with branch lengths representing the evolutionary distances. ACT-28 producing ECC isolates from NCBI database (1323, e1425, MGH25, MGH37, ICBEaBL-
 551 111-03-02, GN02825) and *ampC* of ECC genomes of Chavda's phylogenomic groups B, C, E, J, G, H, Q were added to the analysis.²⁶ NR: not realized.

552

553

554

555

556

557

558

559

Fig. 3



560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

Figure 3. Amino acids alignment of ACT-28, ACT-1 and AmpC-131G4. To highlight the differences, amino acids in common with ACT-28 have been replaced by dashes (-). Amino acids conserved within serine β-lactamases are bold. The two loops (Ω and R2) are highlighted in grey. Helix H-9, H-10, and H-11 are boxed.

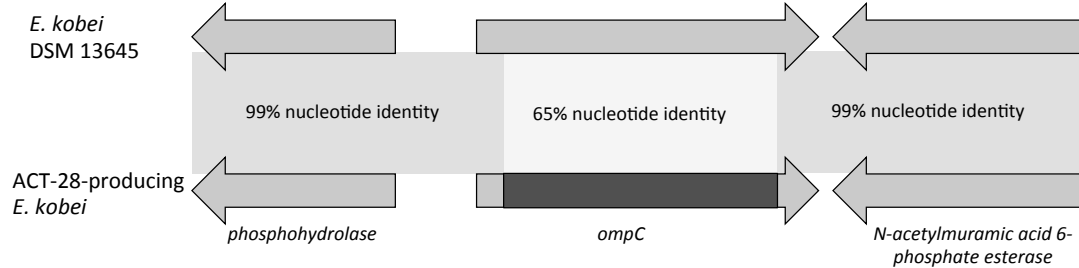
573

574

575

576

Fig. 4A



4B

OmpC-DSM13645	MKVKVLSLLVPALLVAGAANAAEIYNKDGKLDLYGKVDGLHYFSDDKS---ADGDQTYM	57
OmpC-MER	MKRKVALILVPALLMAGAANAAEIYNKGNKVDYFKMVERIWSDDTTSNSENKDTSYA	60
	** *:::*****:*****:***:***: * : : ** .: : * : *	
OmpC-DSM13645	RLGFKGETQVNDQLTGYGQWEYQIQGNTTESDNQAWTRVAFAGLKFABAGSFDYGRNYGV	117
OmpC-MER	RFGVKGETQINNQLTGYGQFEYNIDASAPEGDQDESTRLAFSGLKMSDYGSDYGRNYGV	120
	:.*****:***:***:***:***: * : : ** .: : * : *	
OmpC-DSM13645	IYDVTSWTDVLPFEGGDTYGA-DNFLQSRANGVATYRNQDFGLVDGLNFALQYQGKNGS	176
OmpC-MER	AYDGAAYTDLVEWGGDSWAATDNFMTQRTNGVATYRNTDFFGMVDGLNFAVQYQGKGD-	179
	** : : : ** : * * : ** : . * * * : . * : ***** * * * : * * * : * * * : .	
OmpC-DSM13645	VSGENDTGRSTLQNGDGYGASLTYNLGEFSGIGGAMSSSKRTADQNNTANPALKGEGDH	236
OmpC-MER	-----DRDRFKANGDGYGSMVNYNVD-GFGFVGVYKSDR-----TDLQTLDGYGDN	225
	. * . : * * * * * . * : . * : . * * : * * . : * . . . * * * : * * . * * * :	
OmpC-DSM13645	AEVYTGGLKYDANNIYLAAQYSQTYNATRFGNSQSSDIYGFANKAQNFEVVAQYQDFDG	296
OmpC-MER	AEVWALSARYDANSVYAAMVYGETRNTKAGS-----NRGFANKTQNEAVVQYQDFDG	279
	** * : . * * * * . * * . * : * * * : * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * :	
OmpC-DSM13645	LRPSVAYLQSKGKDIIEYGV-----DQDLLKYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLVDENEF	351
OmpC-MER	LRPSLGYVYSQAKDFGATNGYEGVNADRVNIELGTYVYFNKNMNVYTAIKFNLLDEEDG	339
	***:.*: * : . * * : . . : * : * : * : * : * : * * * * * . * . * * * * * * * :	
OmpC-DSM13645	TRQAGICTDDIVALGLVYQF	371
OmpC-MER	AI-TGNVTDDQFANGIVYQF	358
	: : * * * * . * : * :	

577

578

579 **Figure 4. An allelic replacement of *ompC* occurred in ACT-28-producing *E. kobei*. (A)**
 580 Schematic representation of the *ompC* region found in all ACT-28-producing *E. kobei* isolates
 581 and *E. kobei* DSM13645 used as reference. **(B)** Amino-acid alignment of OmpC of ACT-28-
 582 producing *E. kobei* and *E. kobei* DSM13456. The two proteins shared only 53% of amino
 583 acids identity.
 584

585

586 **SUPPLEMENTARY DATA**

587

```

DSM13645 M L L E N G W L V D A R R V P S P H H D C R P E D E K P T L L V V H N I S L P P G E F G G P W I D A L F T G T I D P N A 60
131G4 ----- 60
MER ----- 60
145F2 ////////////////////////////////////// 0
149H5 ----- 60
149H6 ----- 60
145E9 ----- 60
151B8 ----- 60
149G8 /----- 59

DSM13645 H P F F A E I A H L R V S A H C L I R R D G E V V Q Y V P F D K R A W H A G V S M Y H G R E R C N D F S I G I E L E G T 120
131G4 ----- 120
MER -----ANGATISPLGSSWKAR 120
145F2 ////////////////////////////////////// 0
149H5 ----- 120
149H6 ----- 120
145E9 ----- 120
151B8 ----- 120
149G8 ----- 119

DSM13645 D T T P Y T D S Q Y Q Q L A A V T R T L I G L Y P A I A D N I T G H S D I A P A R K T D P G P A F D W P R F R A M L T A 180
131G4 -----K----- 180
MER I L R P T P T H S I N S * ////////////////////////////////////// 132
145F2 //////////////////////////////////M----- 45
149H5 -----*//////// 170
149H6 -----*//////// 170
145E9 ----- 180
151B8 ----- 180
149G8 ----- 179

DSM13645 SSE 183
131G4 --- 183
MER /// 132
145F2 --- 48
149H5 /// 170
149H6 /// 170
145E9 --- 183
151B8 --- 183
149G8 --- 182

```

588

589

590 **Figure S1. Amino acid alignments of AmpD of the 8 *E. kobei* with *bla*_{ACT-28} derepression**
591 A premature STOP codon is present in *E. kobei* MER (deletion of a nucleotide at position 312
592 that led to a frameshift), 145H5 and 145H6. Only the C-terminal part of AmpD is present in
593 145F2. AmpD is totally absent from 121J9. In *E. kobei* 131G4, AmpC is not derepressed. The
594 sequence of AmpD of *E. kobei* DSM13645 was used as reference. * means that a stop-codon
595 is present; / is used to report missing amino-acids.
596

	3380STDY6 027363	35730	42202	44593	MER	A-E- xiangfangensis	B-E- hormaechei- steigerwaltii	BH-18	C-E- hormaechei- oharae	D-E- hormaechei	ECC3026	ECC3047	E-E- hormaechei- hormaechei	F-E-mori	G-E-cloacae- cloacae	GN02186	GN02204	GN02225	GN02266	GN02275	GN02366
3380STDY6027363	0	13253	483	12907	13343	36014	36044	13490	36266	35987	13474	13486	36242	38129	37460	13900	563	472	13349	569	6273
35730	13253	0	13222	12974	13207	35904	35923	13111	36150	35837	13233	13241	36107	38016	37282	13588	13271	13212	13328	13307	13062
42202	483	13222	0	12894	13319	35994	36026	13468	36245	35972	13449	13461	36233	38115	37447	13876	532	109	13325	522	6219
44593	12907	12974	12894	0	12632	31975	32034	12678	32276	31927	12875	12885	32255	34248	33436	13367	12907	12877	12947	12966	13080
MER	13343	13207	13319	12632	0	35011	35039	13112	35241	34998	13261	13269	35229	37203	36469	13617	13362	13302	13485	13398	13269
A-E-xiangfangensis	36014	35904	35994	31975	35011	0	13913	35755	13910	18893	35913	35927	22881	41277	42237	36415	36007	35975	35957	36065	35881
B-E-hormaechei-steigerwaltii	36044	35923	36026	32034	35039	13913	0	35803	11518	18847	35916	35930	21878	41010	42166	36416	36039	36008	35958	36096	35890
BH-18	13490	13111	13468	12678	13112	35755	35803	0	36028	35752	13082	13090	36030	37948	37157	13523	13507	13451	13289	13545	13397
C-E-hormaechei-oharae	36266	36150	36245	32276	35241	13910	11518	36028	0	18844	36136	36150	21745	41279	42248	36644	36254	36227	36178	36310	36107
D-E-hormaechei	35987	35837	35972	31927	34998	18893	18847	35752	18844	0	35904	35918	24079	41254	42195	36376	35986	35956	35939	36040	35887
ECC3026	13474	13233	13449	12875	13261	35913	35916	13082	36136	35904	0	24	36190	38060	37295	13673	13493	13432	13245	13530	13388
ECC3047	13486	13241	13461	12885	13269	35927	35930	13090	36150	35918	24	0	36204	38073	37309	13683	13505	13444	13257	13542	13396
E-E-hormaechei-hormaechei	36242	36107	36233	32255	35229	22881	21878	36030	21745	24079	36190	36204	0	41194	42370	36559	36249	36215	36143	36305	36119
F-E-mori	38129	38016	38115	34248	37203	41277	41010	37948	41279	41254	38060	38073	41194	0	43280	38482	38129	38093	38026	38187	38000
G-E-cloacae-cloacae	37460	37282	37447	33436	36469	42237	42166	37157	42248	42195	37295	37309	42370	43280	0	37780	37454	37428	37358	37518	37321
GN02186	13900	13588	13876	13367	13617	36415	36416	13523	36644	36376	13673	13683	36559	38482	37780	0	13932	13864	13712	13952	13769
GN02204	563	13271	532	12907	13362	36007	36039	13507	36254	35986	13493	13505	36249	38129	37454	13932	0	515	13352	160	6320
GN02225	472	13212	109	12877	13302	35975	36008	13451	36227	35956	13432	13444	36215	38093	37428	13864	515	0	13312	509	6203
GN02266	13349	13328	13325	12947	13485	35957	35958	13289	36178	35939	13245	13257	36143	38026	37358	13712	13352	13312	0	13399	13323
GN02275	569	13307	522	12966	13398	36065	36096	13545	36310	36040	13530	13542	36305	38187	37518	13952	160	509	13399	0	6312
GN02366	6273	13062	6219	13080	13269	35881	35890	13397	36107	35887	13388	13396	36119	38000	37321	13769	6320	6203	13323	6312	0
GN02618	6295	13062	6241	13070	13275	35853	35862	13399	36079	35857	13390	13398	36089	37966	37289	13769	6342	6225	13323	6334	38
GN03191	6064	13061	6012	13050	13319	35888	35893	13402	36106	35880	13435	13445	36116	38006	37317	13778	6111	5996	13317	6103	674
GN03848	13114	13192	13092	10922	12627	32907	32930	12747	33179	32841	12955	12961	33152	35114	34334	13692	13136	13078	13152	13167	13123
GN04300	12907	12963	12894	58	12624	31967	32026	12677	32268	31917	12869	12879	32245	34240	33426	13361	12907	12875	12945	12966	13076
GN05680	12741	12991	12710	12949	13149	35626	35650	12886	35836	35566	13083	13091	35821	37739	36961	13591	12769	12697	13398	12790	12059
GN06078	499	13207	136	12860	13307	35947	35979	13444	36198	35927	13425	13437	36185	38068	37397	13854	538	121	13303	536	6222
H-E-cloacae-dissolvens	37545	37339	37523	33531	36535	42449	42365	37260	42560	42472	37376	37390	42617	43177	22018	37829	37535	37504	37405	37599	37405
I-E-lugwigii	36827	36763	36806	32802	35910	42717	42657	36607	42908	42802	36768	36782	42927	43864	41419	37248	36816	36788	36760	36878	36727
J-E-asburiae	42812	42685	42804	39236	41959	47027	47059	42560	47390	47305	42617	42629	47265	43296	47737	43065	42812	42781	42774	42869	42644
K-E-complex	42871	42798	42871	39275	42021	47043	47092	42682	47294	47328	42809	42821	47400	44207	47627	43097	42868	42850	42790	42921	42739
L-E-complex	42715	42491	42722	39053	41816	47404	47471	42430	47635	47696	42590	42604	47698	46203	48445	42961	42725	42698	42590	42771	42575
M-E-complex	42629	42529	42618	38971	41719	46310	46832	42401	46935	46937	42486	42500	46920	45568	46996	42886	42626	42597	42451	42688	42417
N-E-complex	40837	40736	40837	37047	39981	46231	46176	40647	46316	46351	40720	40734	46439	45874	44454	41237	40838	40814	40753	40903	40666
O-E-complex	42331	42233	42334	38709	41546	47111	47053	42120	47255	47281	42251	42265	47268	44668	46546	42650	42335	42312	42266	42396	42242
P-E-complex	39008	38895	39005	35187	38145	44885	44800	38828	44960	44911	38876	38890	44902	44634	44290	39384	39010	38984	39017	39068	38876
R-E-complex	43613	43441	43598	40076	42762	46316	46508	43411	46364	46718	43574	43588	46383	47744	49289	43946	43600	43577	43532	43661	43473
Q-E-kobei-DSM13645	12814	12651	12804	8150	11720	24908	24918	12558	25189	24791	12653	12667	25135	27387	26344	13164	12804	12786	12674	12871	12656
SMART_635	13569	13388	13567	13041	13353	36026	36032	13405	36275	35994	13403	13411	36259	38212	37460	13800	13602	13551	13436	13644	13604
ST434-953099839	169	13253	460	12912	13341	36014	36047	13423	36266	35991	13477	13489	36250	38131	37465	13913	542	449	13355	548	6256
ST54-941713674	13491	13449	13460	13129	13446	36061	36109	13260	36294	36063	13303	13311	36279	38178	37415	13741	13504	13443	13409	13544	13426
TUM11131	13469	13492	13435	13151	13289	36008	36053	13273	36245	36007	13392	13402	36264	38142	37381	13905	13474	13414	13404	13514	13326

min: 24 max: 50167



597
598
599

Table S1. SNPs count between *E. kobei* MER genome and other *E. kobei* genomes available on NCBI database (Part 1)

GN02618	GN03191	GN03848	GN04300	GN05680	GN06078	H-E-cloacae- dissolvens	I-E-lugwigii	J-E-asburiae	K-E-complex	L-E-complex	M-E-complex	N-E-complex	O-E-complex	P-E-complex	R-E-complex	Q-E-kobei- DSM13645	SMART_635	ST434- 953098839	ST54- 941713674	TUM11131
6295	6064	13114	12907	12741	499	37545	36827	42812	42871	42715	42629	40837	42331	39008	43613	12814	13569	169	13491	13469
13062	13061	13192	12963	12991	13207	37339	36763	42685	42798	42491	42529	40736	42233	38895	43441	12651	13388	13253	13449	13492
6241	6012	13092	12894	12710	136	37523	36806	42804	42871	42722	42618	40837	42334	39005	43598	12804	13567	460	13460	13435
13070	13050	10922	58	12949	12860	33531	32802	39236	39275	39053	38971	37047	38709	35187	40076	8150	13041	12912	13129	13151
13275	13319	12627	12624	13149	13307	36535	35910	41959	42021	41816	41719	39981	41546	38145	42762	11720	13353	13341	13446	13289
35853	35888	32907	31967	35626	35947	42449	42717	47027	47043	47404	46310	46231	47111	44885	46316	24908	36026	36014	36061	36008
35862	35893	32930	32026	35650	35979	42365	42657	47059	47092	47471	46832	46176	47053	44800	46508	24918	36032	36047	36109	36053
13399	13402	12747	12677	12886	13444	37260	36607	42560	42682	42430	42401	40647	42120	38828	43411	12558	13405	13493	13260	13273
36079	36106	33179	32268	35836	36198	42560	42908	47390	47294	47635	46935	46316	47255	44960	46364	25189	36275	36266	36294	36245
35857	35880	32841	31917	35566	35927	42472	42802	47305	47328	47696	46937	46351	47281	44911	46718	24791	35994	35991	36063	36007
13390	13435	12955	12869	13083	13425	37376	36768	42617	42809	42590	42486	40720	42251	38876	43574	12653	13403	13477	13303	13392
13398	13445	12961	12879	13091	13437	37390	36782	42629	42821	42604	42500	40734	42265	38890	43588	12667	13411	13489	13311	13402
36089	36116	33152	32245	35821	36185	42617	42927	47265	47400	47698	46920	46439	47268	44902	46383	25135	36259	36250	36279	36264
37966	38006	35114	34240	37739	38068	43177	43864	44207	46203	45568	45874	44668	44634	47744	27387	27387	38212	38131	38178	38142
37289	37317	34334	33426	36961	37397	22018	41419	47737	47627	48445	46996	44454	46546	44290	49289	26344	37460	37465	37415	37381
13769	13778	13692	13361	13591	13854	37829	37248	43065	43097	42961	42886	41237	42650	39384	43946	13164	13800	13913	13741	13905
6342	6111	13136	12907	12769	538	37535	36816	42812	42868	42725	42626	40838	42335	39010	43600	12804	13602	542	13504	13474
6225	5996	13078	12875	12697	121	37504	36788	42781	42850	42698	42597	40814	42312	38984	43577	12786	13551	449	13443	13414
13323	13317	13152	12945	13398	13303	37405	36760	42774	42790	42590	42451	40753	42266	39017	43532	12674	13436	13355	13409	13404
6334	6103	13167	12966	12790	536	37599	36878	42869	42921	42771	42688	40903	42396	39068	43661	12871	13644	548	13544	13514
38	674	13123	13076	12059	6222	37405	36727	42644	42739	42575	42417	40666	42242	38876	43473	12656	13604	6256	13426	13326
0	712	13101	13062	12049	6222	37373	36697	42618	42712	42545	42384	40638	42216	38848	43444	12622	13608	6278	13430	13330
712	0	13151	13046	11999	6015	37399	36723	42667	42764	42598	42425	40679	42255	38881	43487	12657	13598	6047	13421	13362
13101	13151	0	10914	12658	13055	34455	33811	40016	40127	39903	39782	37970	39534	36038	40897	9265	13229	13123	13363	13073
13062	13046	10914	0	12941	12856	33523	32792	39229	39265	39043	38957	37037	38703	35179	40068	8138	13035	12912	13121	13145
12049	11999	12658	12941	0	12680	37078	36420	42328	42437	42291	42206	40353	41966	38629	43247	12337	13441	12743	13220	13205
6222	6015	13055	12856	12680	0	37479	36762	42763	42828	42675	42573	40789	42290	38965	43554	12755	13550	476	13436	13413
37373	37399	34455	33523	37078	37479	0	41240	47694	47480	48474	47047	44415	46443	44123	49469	26469	37505	37546	37523	37508
36697	36723	33811	32792	36420	36762	41240	0	47386	47457	48395	47484	45439	46461	43434	49939	25702	36934	36831	36905	36821
42618	42667	40016	39229	42328	42763	47694	47386	0	33318	39906	40061	44748	41068	44740	48159	32918	42903	42818	42861	42789
42712	42764	40127	39265	42437	42828	47480	47457	33318	0	39885	35737	44055	41735	44816	48405	32905	42914	42884	42960	42911
42545	42598	39903	39043	42291	42675	48474	48395	39906	39885	0	41288	46470	44694	47430	49606	32662	42751	42731	42773	42672
42384	42425	39782	38957	42206	42573	47047	47484	40061	35737	41288	0	43268	42511	45761	47750	32530	42653	42641	42702	42629
40638	40679	37970	37037	40353	40789	44415	45439	44748	44055	46470	43268	0	40279	44949	50167	30379	40902	40849	40956	40832
42216	42255	39534	38703	41966	42290	46443	46461	41068	41735	44694	42511	40279	0	44771	49783	32190	42412	42341	42459	42374
38848	38881	36038	35179	38629	38965	44123	43434	44740	44816	47430	45761	44949	44771	0	50149	28214	39012	39023	39100	39062
43444	43487	40897	40068	43247	43554	49469	49939	48159	48405	49606	47750	50167	49783	50149	0	33730	43673	43614	43700	43605
12622	12657	9265	8138	12337	12755	26469	25702	32918	32905	32662	32530	30379	32190	28214	33730	0	12833	12823	12794	12718
13608	13598	13229	13035	13441	13550	37505	36934	42914	42751	42653	40902	42412	39012	43673	12833	0	13586	13518	13606	13606
6278	6047	13123	12912	12743	476	37546	36831	42818	42884	42731	42641	40849	42341	39023	43614	12823	13586	0	13486	13464
13430	13421	13363	13121	13220	13436	37523	36905	42861	42960	42773	42702	40956	42459	39100	43700	12794	13518	13486	0	13021
13330	13362	13073	13145	13205	13413	37508	36821	42789	42911	42672	42629	40832	42374	39062	43605	12718	13606	13464	13021	0

600

601 Table S1. SNPs count between *E. kobei* MER genome and other *E. kobei* genomes available on NCBI database (Part 2)

602

	Accession number	Biosample	Bioproject
ECC genomes with no carbapenemase activity			
99B3	QMDH00000000	SAMN09435809	PRJNA472443
99D9	QMDG00000000	SAMN09435810	PRJNA472443
99G9	QMDF00000000	SAMN09435811	PRJNA472443
99G10	QMDE00000000	SAMN09435812	PRJNA472443
100A9	QMDD00000000	SAMN09435813	PRJNA472443
103D9	QMDC00000000	SAMN09435814	PRJNA472443
105A4	QMDB00000000	SAMN09435815	PRJNA472443
105 E9	QMDA00000000	SAMN09435816	PRJNA472443
105H3	QMCZ00000000	SAMN09435817	PRJNA472443
105H6	QMCY00000000	SAMN09435818	PRJNA472443
105I5	QMCX00000000	SAMN09435819	PRJNA472443
105I8	QMCW00000000	SAMN09435820	PRJNA472443
113I7	QMCV00000000	SAMN09435821	PRJNA472443
131G4	QMCU00000000	SAMN09435822	PRJNA472443
136 E4	QMCT00000000	SAMN09435823	PRJNA472443
148H3	QMCS00000000	SAMN09435824	PRJNA472443
152 E1	QMCR00000000	SAMN09435825	PRJNA472443
153C2	QMCQ00000000	SAMN09435826	PRJNA472443
168A8	QMCPO00000000	SAMN09435827	PRJNA472443
<i>E. kobei</i> ACT-28 producers			
MER	QGLV00000000	SAMN09235818	PRJNA472443
121 J9	QMCO00000000	SAMN09435828	PRJNA472443
145 E9	QMCN00000000	SAMN09435829	PRJNA472443
145 F2	QMCM00000000	SAMN09435830	PRJNA472443
149 H5	QMCL00000000	SAMN09435831	PRJNA472443
149 H6	QMCK00000000	SAMN09435832	PRJNA472443
149 G8	QMCJ00000000	SAMN09435833	PRJNA472443
151 B8	QMCIO00000000	SAMN09435834	PRJNA472443
ECC genomes from Chavda's phylogenomic classification			
A	CP017183.1	SAMN05581746	PRJNA259658
B	CP017179.1	SAMN05581751	PRJNA259658
C	CP017180.1	SAMN05581749	PRJNA259658
D	CP017186.1	SAMN05581748	PRJNA259658
E	CP010377.1	SAMN03067416	PRJNA259658
F	AEXB01000001.1	SAMN02471025	PRJNA62277
G	CP001918.1	SAMN02603901	PRJNA45793
H	JSWY01000001.1	SAMN03145044	PRJNA265013
I	JTLO01000001.1	SAMN03246119	PRJNA268890
J	CP011863.1	SAMN03742638	PRJNA285282
K	JWCB01000001.1	SAMN03197085	PRJNA267549
L	JZX01000001.1	SAMN03283679	PRJNA259658
M	CP017184.1	SAMN05581750	PRJNA259658
N	JZYX01000001.1	SAMN03283666	PRJNA259658
O	LECZ01000001.1	SAMN03732732	PRJNA259658
P	JUZJ01000001.1	SAMN03197831	PRJNA267549
Q	CP017181.1	SAMN05581747	PRJNA259658
R	JZZB01000001.1	SAMN03283644	PRJNA259658
<i>E. kobei</i> genomes from Genbank			
35730	JZYS01000001.1	SAMN03283662	PRJNA259658
42202	JZYH01000001.1	SAMN03283656	PRJNA259658
44593	JZXR01000001.1	SAMN03283676	PRJNA259658
3380STDY6027363	FKLS01000001.1	SAMEA3181516	PRJEB7657

603

604

BH-18	JSVH01000001.1	SAMN03135879	PRJNA218840
DSM 13645	CP017181.1	SAMN05581747	PRJNA259658
ECC3026	LYUS01000001.1	SAMN05173313	PRJNA322832
ECC3047	LYUT01000001.1	SAMN05176179	PRJNA322832
EkBL-II-14(1)	NEWG01000001.1	SAMN06887675	PRJNA361484
GN02186	LDCI01000001.1	SAMN03495973	PRJNA259658
GN02204	LEEQ01000001.1	SAMN03495974	PRJNA259658
GN02225	LDCL01000001.1	SAMN03495976	PRJNA259658
GN02266	LEEL01000001.1	SAMN03732691	PRJNA259658
GN02275	LEEK01000001.1	SAMN03732692	PRJNA259658
GN02366	LEEC01000001.1	SAMN03732700	PRJNA259658
GN02454	LEDW02000001.1	SAMN03732707	PRJNA259658
GN02618	LRBY01000001.1	SAMN04407765	PRJNA259658
GN03191	LECY01000001.1	SAMN03732733	PRJNA259658
GN03848	LRCM01000001.1	SAMN04407783	PRJNA259658
GN04300	LRCP01000001.1	SAMN04407786	PRJNA259658
GN05680	LVUM01000001.1	SAMN04572688	PRJNA259658
GN06078	LVUX01000001.1	SAMN04572699	PRJNA259658
PECIMP	QHMI01000001.1	SAMN09269477	PRJNA473255
SMART_635	LPPL01000001.1	SAMN04252923	PRJNA259658
ST434:953099839	LJEW02000001.1	SAMN04011456	PRJNA287968
ST54:941713674	LJED02000001.1	SAMN04011437	PRJNA287968
TUM11131	BEGI01000001.1	SAMD00089514	PRJDB6127
<i>E. kobe</i> i ACT-28 producers from Genbank			
ICBEaBL-III-03(2)	NIHL01000275.1	SAMN07195210	PRJNA361484
1323	JVTR01000062.1	SAMN03197303	PRJNA267549
MGH 37	JCLI01000015.1	SAMN02138577	PRJNA201952
MGH 25	AYJF01000016.1	SAMN02138565	PRJNA201940
e1425	FJYX01000004.1	SAMEA2273353	PRJEB5065
GN02825	LEDC01000001.1	SAMN03732729	PRJNA259658

605

606 **Table S2. Accession numbers used in the study.**

607

Chapitre 5 : CTX-M-15-producing *Shewanella* sp. clinical isolate expressing OXA-535, a chromosome-encoded OXA-48 variant, putative progenitor of the plasmid-encoded OXA-436

De nombreux gènes codant des oxacillines à propriétés carbapénèmase ont été identifiés au niveau du chromosome des bactéries du genre *Shewanella*, suggérant qu'elles puissent constituer un réservoir de ce type de gènes. Ces bactéries, présentes majoritairement dans l'eau, sont rarement impliquées en pathologie humaine.

Dans cet article, nous décrivons la première souche de *Shewanella* sp. (JAB-1) produisant (i) la BLSE CTX-M-15 et (ii) un nouveau variant oxacilline (OXA-535) à activité carbapénèmase.

Cette souche a été isolée d'un prélèvement biliaire réalisé chez une enfant atteinte d'angiocholite. L'association d'un séquençage du génome total par PacBio et Illumina a permis l'assemblage du chromosome, ainsi que du plasmide portant le gène *bla*_{CTX-M-15} (pSHE-CTX-M, 193 kb). Ce plasmide appartient à la famille IncA/C et porte de nombreux gènes de résistance : *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-2a}, *bla*_{OXA-1}, 4 gènes de résistance aux aminosides (*aph*(6')-Id, *aph*(3'')-Ib, *aac*(3')-IIa et *aac*(6')-Ib-cr), *tetA* et *catB3*, conférant la résistance à la tétracycline et au chloramphénicol respectivement.

Par ailleurs, d'autres bactéries étaient présentes dans le même prélèvement de bile, dont deux souches de *E. coli* et de *K. pneumoniae* produisant également une BLSE. Le séquençage et l'assemblage des deux plasmides (pECO-CTX-M et pKP-CTX-M) indiquent des groupes d'incompatibilité et des organisations génétiques différentes ce qui exclut l'hypothèse d'un transfert de plasmide entre *Shewanella* sp. JAB-1 et les deux entérobactéries.




D'autre part, l'analyse de l'ensemble du résistome de la *Shewanella* sp. JAB-1 a permis de révéler la présence d'un nouveau variant oxacilline, appelé *bla*_{OXA-535}, dont la localisation est chromosomique. OXA-535 possède 91,3% d'identité de séquence protéique avec OXA-48 et diffère par 3 acides aminés d'OXA-436, un autre variant à activité carbapénèmase décrit chez les entérobactéries et dont le support génétique était plasmidique. Des expériences de clonage dans pTOPO puis d'expression dans *E. coli*

TOP10 du gène *bla*_{OXA-535} ont permis d'établir que OXA-535 confère une diminution de sensibilité vis-à-vis des carbapénèmes. Par ailleurs, la mesure de l'activité spécifique d'OXA-535 démontre bien sa capacité à hydrolyser l'imipénème, d'une façon similaire à celle d'OXA-48.

La production d'une oxacillinase à activité carbapénémase n'avait pas été évoquée sur l'antibiogramme de *Shewanella* sp. JAB-1 qui ne présentait pas de diminution de sensibilité aux carbapénèmes, ni de résistance à la témocilline. Par ailleurs, le Carba NP test était négatif. Cependant, la recherche de la protéine par un test immuno-chromatographique très sensible (OXA-48-Kset) a bien permis de détecter la présence d'OXA-535. Cette étude démontre l'intérêt des techniques de séquençage haut débit dans l'identification de nouveaux mécanismes de résistance.



CTX-M-15-Producing *Shewanella* Species Clinical Isolate Expressing OXA-535, a Chromosome-Encoded OXA-48 Variant, Putative Progenitor of the Plasmid-Encoded OXA-436

Agnès B. Jousset,^{a,b,c,d} Laura Dabos,^{c,d} Rémy A. Bonnin,^{b,c,d} Delphine Girlich,^{c,d} Anaïs Potron,^e Nicolas Cabanel,^d
 Laurent Dortet,^{a,b,c,d}  Philippe Glaser,^{d,f}  Thierry Naas^{a,b,c,d}

^aDepartment of Bacteriology-Parasitology-Hygiene, Bicêtre Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, France

^bAssociated French National Reference Center for Antibiotic Resistance, Le Kremlin-Bicêtre, France

^cEA7361 Structure, dynamic, function and expression of broad spectrum β -lactamases, Paris-Sud University, Faculty of Medicine, Le Kremlin-Bicêtre, France

^dJoint Research Unit Evolution and Ecology of Resistance to Antibiotics (EERA), Institut Pasteur-APHP-University Paris Sud, Paris, France

^eDepartment of Bacteriology-Parasitology-Hygiene, CHU Besançon, Besançon, France

^fCNRS, UMR3525, Paris, France

ABSTRACT *Shewanella* spp. constitute a reservoir of antibiotic resistance determinants. In a bile sample, we identified three extended-spectrum- β -lactamase (ESBL)-producing bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Shewanella* sp. strain JAB-1) isolated from a child suffering from cholangitis. Our objectives were to characterize the genome and the resistome of the first ESBL-producing isolate of the genus *Shewanella* and determine whether plasmidic exchange occurred between the three bacterial species. Bacterial isolates were characterized using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), standard biochemical tools, and antimicrobial susceptibility testing. *Shewanella* sp. JAB-1 and ESBL gene-encoding plasmids were characterized using PacBio and Illumina whole-genome sequencing, respectively. The *Shewanella* sp. JAB-1 chromosome-encoded OXA-48 variant was cloned and functionally characterized. Whole-genome sequencing (WGS) of the *Shewanella* sp. clinical isolate JAB-1 revealed the presence of a 193-kb plasmid belonging to the IncA/C incompatibility group and harboring two ESBL genes, *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{SHV-2a}. *bla*_{CTX-M-15} gene-carrying plasmids belonging to the IncY and IncR incompatibility groups were also found in the *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates from the same patient, respectively. A comparison of the *bla*_{CTX-M-15} genetic environment indicated the independent origin of these plasmids and dismissed *in vivo* transfers. Furthermore, characterization of the resistome of *Shewanella* sp. JAB-1 revealed the presence of a chromosome-carried *bla*_{OXA-535} gene, likely the progenitor of the plasmid-carried *bla*_{OXA-436} gene, a novel *bla*_{OXA-48}-like gene. The expression of *bla*_{OXA-535} in *E. coli* showed the carbapenem-hydrolyzing activity of OXA-535. The production of OXA-535 in *Shewanella* sp. JAB-1 could be evidenced using molecular and immunoenzymatic tests, but not with biochemical tests that monitor carbapenem hydrolysis. In this study, we have identified a CTX-M-15-producing *Shewanella* species that was responsible for a hepatobiliary infection and that is likely the progenitor of OXA-436, a novel plasmid-encoded OXA-48-like class D carbapenemase.

KEYWORDS CTX-M-15, OXA carbapenemase, WGS, plasmids, progenitor

Shewanella spp. are nonfermentative Gram-negative bacilli that are widely distributed throughout the world. They are found mainly in seawater in areas with warm climates (1, 2). Although *Shewanella* spp. are an unusual cause of infections in humans,

Received 10 September 2017 Returned for modification 2 October 2017 Accepted 11 October 2017

Accepted manuscript posted online 16 October 2017

Citation Jousset AB, Dabos L, Bonnin RA, Girlich D, Potron A, Cabanel N, Dortet L, Glaser P, Naas T. 2018. CTX-M-15-producing *Shewanella* species clinical isolate expressing OXA-535, a chromosome-encoded OXA-48 variant, putative progenitor of the plasmid-encoded OXA-436. Antimicrob Agents Chemother 62:e01879-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01879-17>.

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Thierry Naas, thierry.naas@aphp.fr.

the number of cases reported is increasing (1, 3–5). In most cases, this organism is cultured from samples of immunocompromised patients suffering from soft tissue infections after seawater exposure (3, 6). More recently, several cases of *Shewanella* infections have been reported in patients suffering from hepatobiliary diseases (3–5, 7). Human infections are most often caused by *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens* (3). However, it is often difficult to identify the bacteria at the species level using conventional culture-based and biochemical tests. 16S rRNA gene sequencing improved the identification of *Shewanella* species as pathogenic organisms (3, 5).

Most *Shewanella* spp. are susceptible to piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, and ciprofloxacin, but susceptibility to penicillins is more varied (3, 7). Several naturally occurring β -lactamases have been identified in *Shewanella* spp., especially class D β -lactamases (8–11), also known as oxacillinases. For instance, *Shewanella oneidensis* strain MR-1 was found to naturally harbor the bla_{OXA-54} gene, which is related to the bla_{OXA-48} gene, a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase (CHDL) gene involved in carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae* (10). Moreover, OXA-55 was identified in *S. algae* and possesses biochemical properties similar to those of OXA-54, in particular the ability to hydrolyze carbapenems (11). *Shewanella xiamenensis* has been identified as the source of the $bla_{OXA-181}$ gene encoding another OXA-48-like variant with carbapenemase activity that is highly prevalent on the Indian subcontinent and increasingly reported in France (9, 12). Recently, next-generation sequencing enabled the identification of several bla_{OXA-48} -like genes, such as $bla_{OXA-199}$, $bla_{OXA-252}$, $bla_{OXA-514}$, and $bla_{OXA-515}$, in different *Shewanella* species isolates, in food-producing animals, and in water samples (2). Furthermore, analysis of publicly available *Shewanella* species genomes revealed the presence of several uncharacterized bla_{OXA-48} like genes, confirming the importance of *Shewanella* spp. as a OXA-48-like class D β -lactamase reservoir (13, 14).

Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) are being increasingly reported worldwide in *Enterobacteriaceae* (15) but have never been described in *Shewanella* species. ESBLs belong to the Ambler class A β -lactamases (16). ESBLs are usually described as acquired β -lactamases that are encoded mostly by plasmid-located genes. There are three major types of ESBLs: TEM, SHV, and CTX-M (16). CTX-Ms are now the most prevalent ESBLs worldwide (17). CTX-M-producing *Enterobacteriaceae* are not only responsible for nosocomial infections and hospital outbreaks, but they are now also considered to be true community pathogens (15).

In this study, we have characterized three CTX-M15-producing bacteria, including a *Shewanella* sp. isolate, obtained from a child suffering from cholangitis. Using antimicrobial susceptibility testing and whole-genome sequencing, we have characterized this *Shewanella* strain, investigated its resistome, and characterized the plasmids carrying the CTX-M15 determinant. Furthermore, we have cloned and expressed the naturally carried OXA-48-like gene ($bla_{OXA-535}$) and demonstrated its carbapenemase activity.

RESULTS

Case report. A female child was directly transferred from a hospital in central Africa to a hospital pediatric department in France for biliary surgery. During her previous hospitalization, she underwent a cholecystectomy that was complicated with a leak from the common bile duct forming an abdominal effusion. A drain was then introduced to constitute an external bypass. Upon admission at the hospital, she had fever with abdominal pain, and cholangitis was diagnosed. The liquid collected from the drain was addressed to the microbiology laboratory, and antibiotic treatment with piperacillin and tazobactam was started. The culture revealed a polymicrobial infection due to numerous Gram-negative bacteria (*Pseudomonas putida*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and a *Shewanella* sp.) and to *Enterococcus avium*. Antimicrobial susceptibility testing revealed the presence of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in *Shewanella* sp., *E. coli*, and *K.*

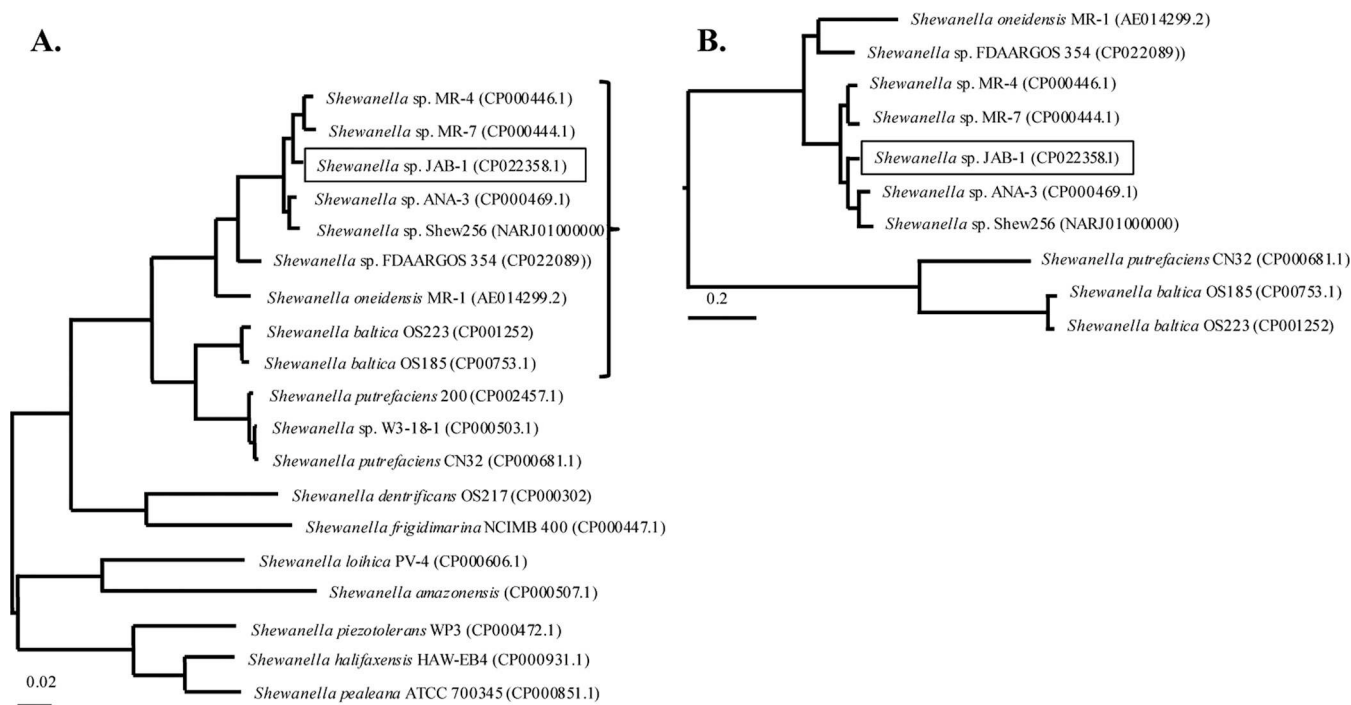


FIG 1 Phylogenetic analysis of representative *Shewanella* spp. (A) Unrooted phylogenetic tree based on *gyrB* and *rpoB* genes. The tree was constructed by maximum likelihood method with Tamura-Nei model using MEGA program (MEGA7.0). The tree is drawn to scale, with branch lengths representing the evolutionary distances. (B) A focus on *Shewanella* spp. close to *Shewanella* sp. JAB-1 was made, and the phylogenetic tree was based on whole-genome sequences. It was constructed by maximum likelihood method with Jukes-Cantor model, using the Parsnp software. The tree is drawn to scale based on the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the alignment. Accession numbers are shown in parentheses next to each organism name.

pneumoniae isolates. One week after admission, the patient underwent a laparotomy to perform a Roux-en-Y biliary bypass procedure and to introduce an internal-external biliary drain to protect the anastomosis. Five days after the surgery, the patient became feverish. A blood sample and a bile sample collected from the drain revealed the presence of an ESBL-producing *K. pneumoniae* isolate. Antibiotic therapy was switched to imipenem for 15 days. The biliary drain was withdrawn 1 month after the surgery, and no other complications occurred.

Identification of *Shewanella* sp. JAB-1. After 24 h of growth on a blood agar plate, the *Shewanella* sp. JAB-1 colonies were small, smooth, and oxidase and catalase positive. The API32GN system was unable to identify *Shewanella* sp. even at the genus level. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was used for species identification, yielding *S. putrefaciens*, with a best score value of 2.0, *Shewanella profunda* with a score of 1.7, and *Shewanella baltica* with a score of 1.5. Since MALDI-TOF MS discrepancies for the identification of *Shewanella* spp. are known, sequencing of 16S rRNA gene was performed. The 1,406-bp 16S rRNA gene sequence was 98% identical to *Shewanella seohaensis* S7-3T [GU944672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16111111/), making this strain the closest relative based on patristic distances (18). As the 16S rRNA gene sequence may not be discriminatory enough to differentiate closely related *Shewanella* species (9), we used whole-genome sequencing (WGS) data to dive deeper into the identification of this isolate. Genomes of representative *Shewanella* species were collected, and *rpoB-gyrB* concatemer sequences were extracted for phylogenetic analysis (Fig. 1A). The analysis revealed that *Shewanella* sp. JAB-1 did not belong to any known *Shewanella* species. Phylogeny based on the whole genome revealed that *Shewanella* sp. JAB-1 was closely related to four other isolates, namely, MR-4, MR-7, ANA-3, and Shew256, with average nucleotide identity (ANI) values of 94.6%, 94.35%, 94.32% and 93.90%, respectively (Fig. 1B).

Genomic characteristics of *Shewanella* sp. JAB-1. To reconstruct the genome of *Shewanella* sp. JAB-1, long-read PacBio-based sequencing was performed. The genome

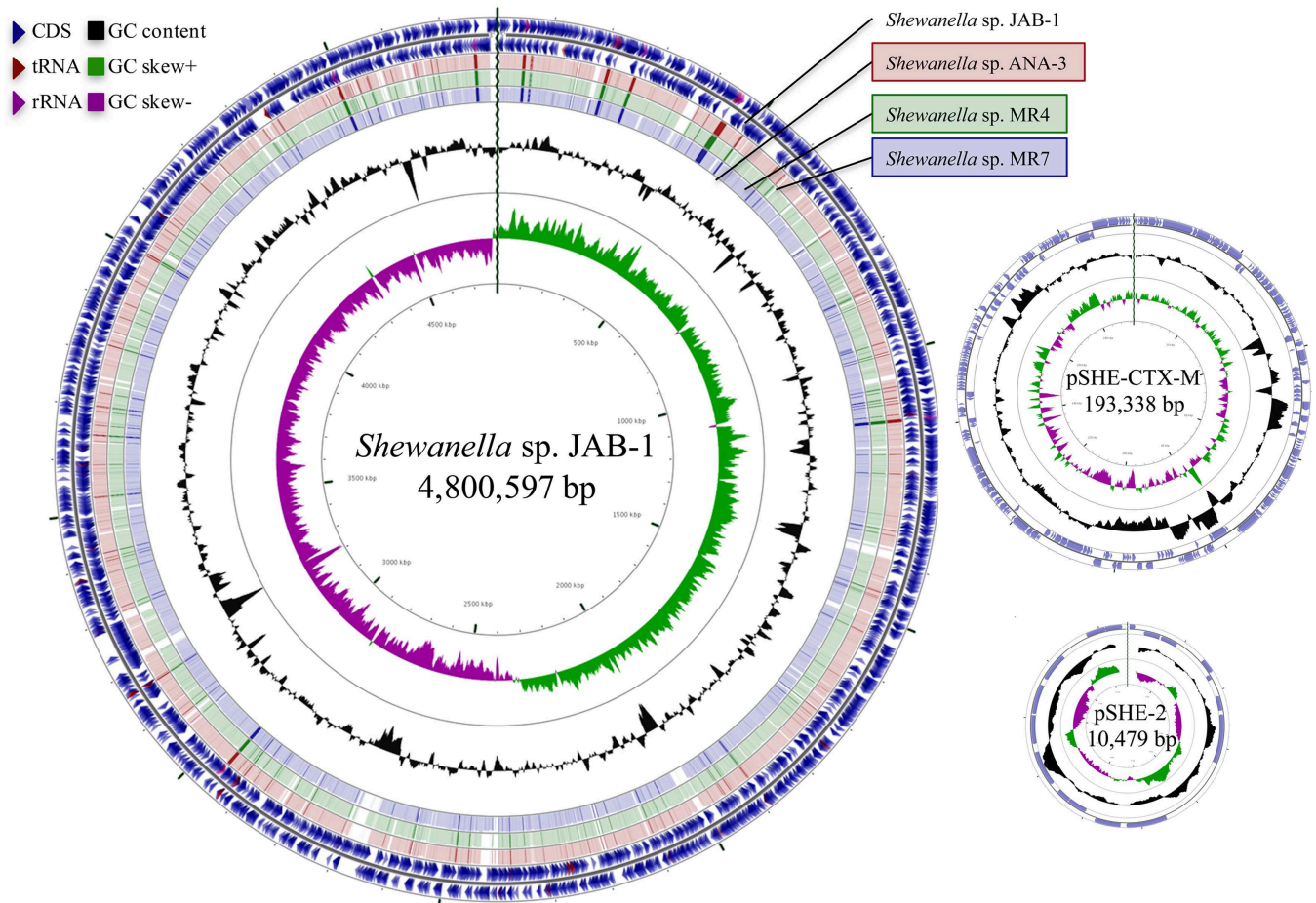


FIG 2 Genome representation of *Shewanella* sp. JAB-1 and its plasmids. The representation was performed using the CGview server. The outermost two rings show features extracted from the *Shewanella* sp. JAB-1 genome. The next three rings show the positions of BLAST hits detected through BLASTn comparisons of *Shewanella* sp. JAB-1 genome against the three closest genomes of *Shewanella* (MR-4, MR-7, and ANA-3, represented by red, green, and blue circles, respectively). Darker arc indicates high percent identity of the hit. The black circle displays the GC content, and inner circles display GC skew.

was 4,800,597 bp, with an average G+C content of 48%. It was composed of 4,161 coding sequences (CDS), 9 copies of rRNA operons, and 102 tRNA genes (Fig. 2). PacBio assembly revealed the presence of two plasmids of 10.5 and 193 kb in size (Fig. 2).

A function-based comparison using the RAST server revealed unique features in *Shewanella* sp. JAB-1, with 90 and 100 unique CDS with known functions compared to MR-4 and MR-7, respectively. These CDS include widely distributed functions notably involved in amino acid and carbohydrate metabolism, gene regulation, and resistance to antibiotic compounds (Fig. 2).

Susceptibility testing and detection of resistance genes. *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *Shewanella* sp. JAB-1 shared the same phenotype regarding susceptibility to β -lactams. They were resistant to all penicillins tested, and association with clavulanic acid did not fully restore penicillin activity. They were resistant to expanded-spectrum cephalosporins but susceptible to ceftioxin and to a piperacillin-tazobactam combination. Finally, double-disk synergy tests revealed ESBL activity in the three strains.

In agreement with this phenotype, we identified in the genome of *Shewanella* sp. four β -lactamase genes: two ESBL genes, *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{SHV-2a}; the narrow-spectrum oxacillinase gene *bla*_{OXA-1}; and a novel *bla*_{OXA-535} gene. The *bla*_{OXA-535} gene codes for an oxacillinase that is 91.3% identical to the carbapenem-hydrolyzing class D (CHDL) β -lactamase OXA-48, 98% identical to OXA-436 and OXA-48-like of *Shewanella* sp. strain ANA-3 (3 amino acids difference), and 99% to OXA-48-like in *Shewanella* sp. strains MR-4 and MR-7 (1 and 2 amino acids difference, respectively). OXA-436 is a

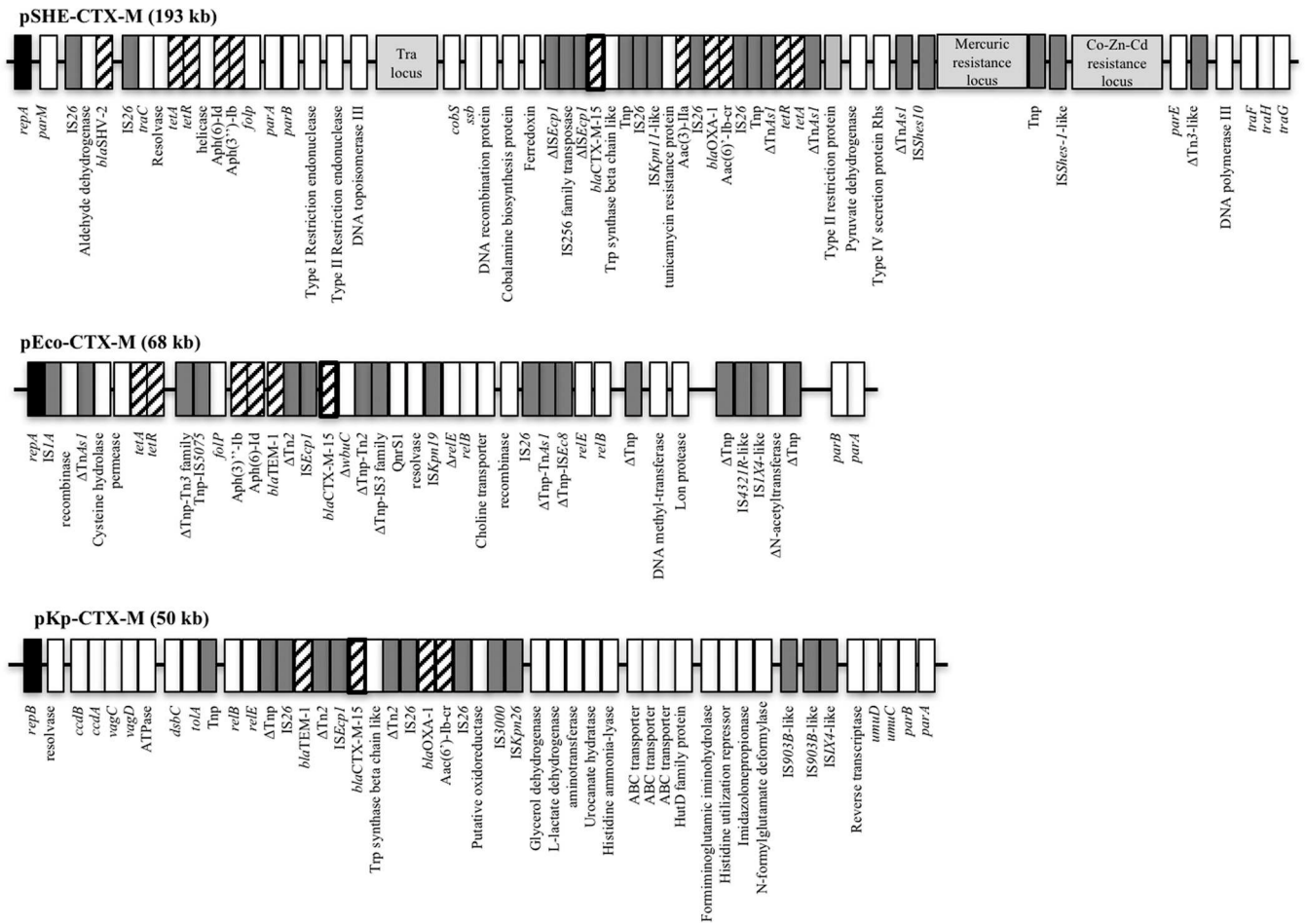


FIG 3 Schematic representation of the three ESBL-encoding plasmids. Main features are represented. Antimicrobial resistance-associated genes are indicated by hatched boxes. Transposon-related genes and insertion sequences are indicated by dark grey boxes. Replicase genes are indicated by black boxes. *tra* locus and heavy-metal resistance loci are indicated with light grey boxes. Δ indicates a partial protein. Tnp, transposase.

plasmid-encoded OXA-48 variant detected in several species responsible for an outbreak in Denmark (O. Samuelsen, F. Hansen, B. Aasnaes, L. Jakobsen, P. Littauer, L. M. Soes, B. J. Holzknacht, L. P. Andersen, M. Stegger, A. S. Paal, and A. M. Hammerum, unpublished data; GenBank BioProject [PRJNA297498](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA297498)). This outbreak involved OXA-436-producing *Citrobacter freundii*, *K. pneumoniae*, and *Enterobacter asburiae*.

Shewanella sp. JAB-1 is resistant to aminoglycosides (gentamicin, tobramycin, and netilmicin) due to the production of two acetyltransferase genes [*aac(6')-Ib-cr* and *aac(3)-IIa*] and two phosphotransferase genes [*aph(3'')-Ib* and *aph(6)-Id*]. The resistance to ciprofloxacin is likely due to the acquisition of the *aac(6')-Ib-cr*, known to confer reduced susceptibility to this fluoroquinolone by *N*-acetylation of its piperazinyl amine (19). Amikacin and co-trimoxazole are two antibiotics that remained active *in vitro*.

Plasmid characterization and genetic context of *bla*_{CTX-M-15} genes in the three ESBL-producing isolates. Plasmid extraction of *Shewanella* sp. JAB-1 and subsequent electroporation and mating-out assay into *E. coli* TOP10 conferred resistance to penicillin and expanded-spectrum cephalosporins, with double-disk synergy images consistent with an ESBL phenotype. Amplification of the *bla*_{CTX-M-15} gene on the *E. coli* transformants and transconjugants, as well as coresistance to aminoglycosides, indicated that both the *bla*_{CTX-M-15} gene and *aac(6')-Ib-cr* gene were located on the largest plasmid, namely, pSHE-CTX-M, of ca. 193 kb. pSHE-CTX-M was fully sequenced using PacBio technologies. The overall structure of the plasmid indicated that it belonged to the InCA/C incompatibility group (Fig. 3). The plasmid backbone shares features of

IncA/C-type plasmid, i.e., partitioning, replication, and conjugation apparatus. In the variable region, several antibiotic resistance genes have been identified in addition to *bla*_{CTX-M-15'}, *bla*_{SHV-2a'} and *bla*_{OXA-1} β -lactamase genes, the four aminoglycoside-modifying enzyme genes [*aph*(3'')-Ib, *aph*(6)-Id, *aac*(6')-Ib-cr, and *aac*(3)-IIa], the tetracycline resistance gene (*tetA*), the sulfonamide resistance gene (*sul2*), and the chloramphenicol resistance gene (*catB3*).

E. coli JAB-1 carried three plasmids, as observed following Kieser extraction (data not shown). Electroporation in *E. coli* TOP10 and selection on ticarcillin conferred an ESBL phenotype as well as resistance to co-trimoxazole. The transformant carried a plasmid of 68 kb, namely, pECO-CTX-M, which was fully sequenced. Several antibiotic resistance genes were found on this IncY plasmid (Fig. 3). The ESBL-encoding *bla*_{CTX-M-15} gene and the narrow-spectrum β -lactamase-encoding *bla*_{TEM-1} gene, *dfrA14*, encoding a trimethoprim-insensitive dihydrofolate reductase variant, *sul2*, encoding a dihydropyrimidate synthase that is not inhibited by sulfonamide, *tetA* (tetracycline efflux protein) and aminoglycoside resistance genes [*aph*(6)-Id and *aph*(3'')-Ib] were present on the plasmid. Finally, the plasmid-carried fluoroquinolone resistance gene *qnrS1* was responsible for reduced susceptibility to ciprofloxacin.

Kieser extraction showed that *K. pneumoniae* JAB-1 carries three plasmids (data not shown). Electroporation into *E. coli* TOP10 and selection on ticarcillin conferred an ESBL phenotype, and the transformant carried a plasmid of 60 kb, called pKP-CTX-M, which belonged to the IncR incompatibility group and was fully sequenced (Fig. 3). We identified in this plasmid five resistance genes encoding three β -lactamases (*bla*_{CTX-M-15'}, *bla*_{TEM-1b'} and *bla*_{OXA-1}), an aminoglycoside acetyltransferase gene [*aac*(6')-Ib-cr], and the chloramphenicol resistance gene *catB3*.

A comparison of the three *bla*_{CTX-M-15} gene-harboring plasmids revealed major differences in size, backbone, and incompatibility group, thus ruling out *in vivo* plasmid exchanges between these three species (Fig. 3). There was no plasmid deposited in the NCBI database that shared the same structure as pSHE-CTX-M and pKP-CTX-M, but we found one plasmid called tig00003056 (accession no. [CP021681.1](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2616811/)) very close to pECO-CTX-M (A. Jousset, personal communication). To gain further insights into the acquisition of the *bla*_{CTX-M-15} gene by these plasmids, we analyzed the genetic environment of the ESBL gene (Fig. 4). It revealed that the *bla*_{CTX-M-15} gene was part of an *ISEcp1*-borne transposon, as previously described (20). In pKP-CTX-M and pECO-CTX-M, the *ISEcp1*-borne transposon was inserted in the transposase *tnpA* gene of Tn2, generating the same target site duplication (TSD; TCACA; Fig. 4A and B). This is in favor of the idea of the acquisition of *bla*_{CTX-M-15} gene occurs by homologous recombination of this region rather than by a transposition event. This structure was also identified in other *bla*_{CTX-M-15} gene-harboring plasmids, such as the archetypal IncFII-type plasmid pC15-1A circulating in Canada in the early 2000s (21). In pSHE-CTX-M, *ISEcp1*-*bla*_{CTX-M-15} is also inserted within the Tn2 transposase gene, but this insertion differs by two different features: (i) the DNA fragment upstream of Tn2 transposase is missing and (ii) an insertion sequence (IS) belonging to the IS256 family with a TSD of 8 bp was identified (CATTTTGG) within the *ISEcp1* transposase gene. Our data suggest a common ancestor for these structures, but they have evolved differently and are carried on different plasmids. Despite the insertion of an IS256-like gene in *ISEcp1* in pSHE-CTX-M, the expression of CTX-M-15 did not seem to be impacted based on the MICs measured for third-generation cephalosporins (Table 1). Accordingly, the promoter sequences provided by *ISEcp1* (−35 TTGAAA and −10 TACAAT) remained intact.

Characterization of OXA-535. To determine whether OXA-535 can hydrolyze carbapenems, the *bla*_{OXA-535} gene was cloned into pTOPO together with its surrounding regions. *E. coli* TOP10 expressing the recombinant plasmid (pTOPO-OXA-535) displayed a class D carbapenemase phenotype with resistance to temocillin, resistance to penicillins that was not restored by the addition of clavulanic acid, and susceptibility to third-generation cephalosporins (Table 1). In addition, *E. coli* TOP10(pTOPO-OXA-535) had reduced susceptibility to carbapenems compared to *E. coli* TOP10. The Carba

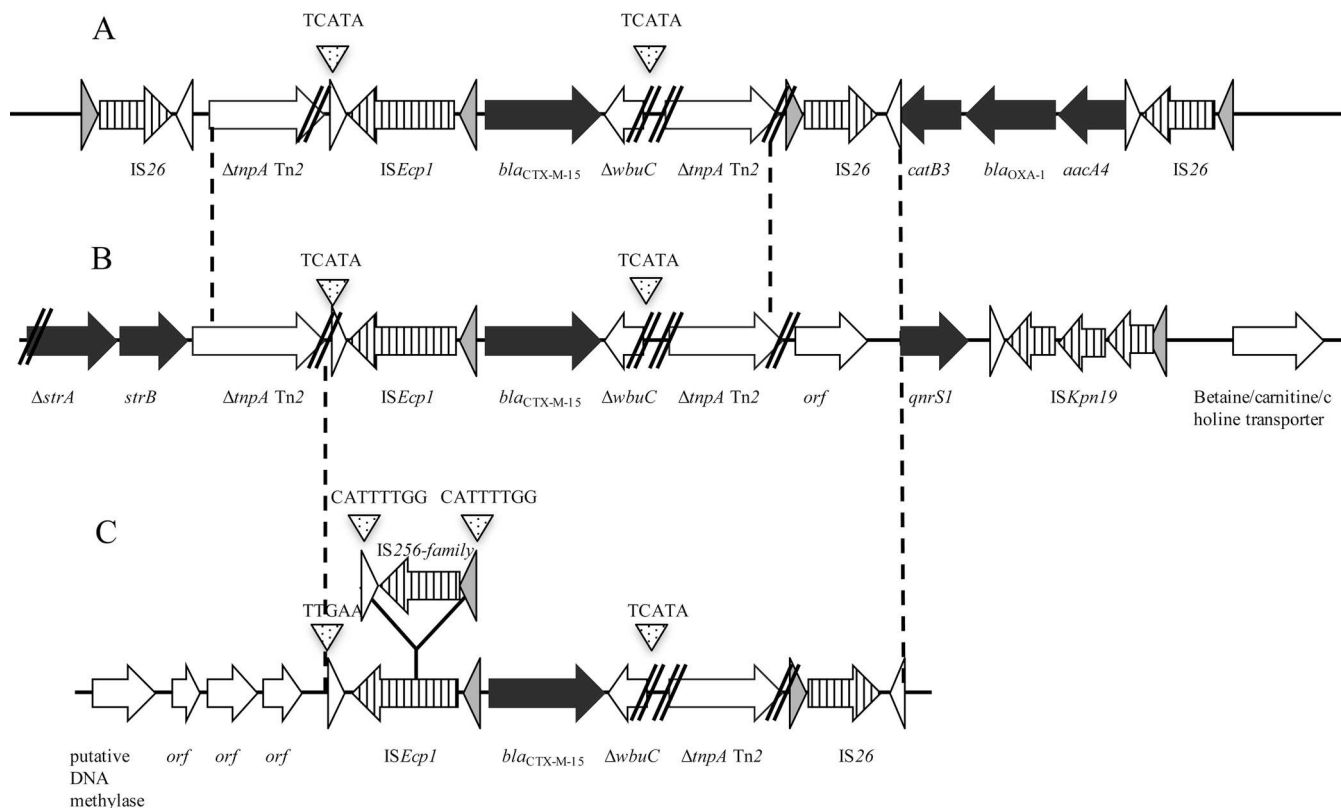


FIG 4 Genetic environment of the *bla*_{CTX-M-15} gene of *K. pneumoniae* JAB-1 (A), *E. coli* JAB-1 (B), and *Shewanella* sp. JAB-1 (C). Antimicrobial resistance genes are indicated with black arrows. Open reading frames within insertion sequences (IS) are represented with striped arrows. Target site duplications are indicated with small dotted triangle. Inverted repeats IR_R and IR_L are represented by white and light gray arrows, respectively. Parallel lines indicate truncated genes.

NP test performed on the recombinant strain was positive, suggesting that the OXA-535 enzyme hydrolyzes carbapenems. Furthermore, specific activity (SA) measured with a culture extract of *E. coli* TOP10(pTOPO-preOXA-535) showed that this strain hydrolyzes imipenem significantly (SA = 270 mU · mg · liter of protein), similar to that of *E. coli* TOP10(pTOPO-OXA-48), which was used as a control (SA = 130 mU · mg · liter of protein). The MICs for β-lactams for OXA-535 and OXA-48 were similar, confirming that these enzymes possessed similar resistance patterns (Table 1).

Interestingly, when performed directly on the *Shewanella* sp. JAB-1, the Carba NP test and the β Carba test were negative. Since tests based on carbapenem hydrolysis can lack sensitivity to detect isolates expressing β-lactamase with low carbapenemase activity, such as OXA-48-like enzymes, an immunochromatographic test known to detect OXA-48-like enzymes with high sensitivity was performed (22). Indeed, the OXA-48 K-SeT gave a positive result on colonies of *Shewanella*. Therefore, it seems that

TABLE 1 MIC values of *Shewanella* spp. and transformants

Antibiotic	MIC (μg/ml) ^a						
	<i>S. putrefaciens</i> (OXA-181 chr)	<i>S. xiamenensis</i> CIP 67.65	<i>S. algae</i> CIP 103562	<i>Shewanella</i> sp. JAB-1 (OXA-535 chr)	<i>E. coli</i> TOP10(pTOPO-OXA-535)	<i>E. coli</i> TOP10(pTOPO-OXA-48)	<i>E. coli</i> TOP10
Temocillin	0.38	0.75	0.19	0.25	>1,024	>1,024	4
Cefotaxime	0.094	0.064	0.032	>32	0.064	0.75	0.06
Ceftazidime	0.125	0.125	0.064	1.5	0.19	0.19	0.12
Imipenem	4	0.75	0.5	0.38	1	0.75	0.25
Ertapenem	0.064	1	0.023	1	0.25	0.25	0.003
Meropenem	0.125	0.5	0.023	0.38	0.19	0.25	0.016

^achr indicates the presence of a natural oxacillinase in the chromosome.

the OXA-535 enzyme is expressed at a low level but sufficiently to be detected by the immunochromatographic test. At last, a molecular test routinely used in clinical microbiology lab, the Xpert Carba-R test, was performed directly on the *Shewanella* sp. JAB-1 colonies and yielded a positive PCR for OXA-48-like carbapenemase.

DISCUSSION

We report the case of a biliary infection that occurred in a child with a novel *Shewanella* sp. belonging to an uncharacterized species. MALDI-TOF MS identified this isolate at the genus level, whereas WGS provided high resolution to identify this isolate as closely related to *Shewanella* sp. MR-4, MR-7, ANA-3, and Shew256 (Fig. 2). Phylogenetic analyses revealed that these strains belong to a unique lineage that likely constitutes a novel species.

Shewanella spp. are increasingly reported as pathogens, especially in patients with underlying hepatobiliary diseases. In a case series performed by Chen et al., all patients with bacteremia had underlying hepatobiliary disorders (23). Here, bacterial culture from the bile of the patient identified in addition to the *Shewanella* sp. JAB-1 six other clinically relevant bacteria. In a case series performed by To et al., bile samples whose cultures were positive for *Shewanella* were also polymicrobial, along with other enteric bacteria (7). Since *Shewanella* spp. are often isolated with other pathogens in clinical specimens, their clinical significance might be difficult to assess (4).

Next-generation sequencing enabled us to study the complete resistome of the *Shewanella* sp. JAB-1 as well as the features of the three ESBL-encoding plasmids (pSHE-CTX-M, pECO-CTX-M, and pKP-CTX-M). Even if the three strains shared the same clinical environment, they did not share their plasmid, since they belong to different incompatibility groups. Plasmid continuous sequences allowed us to determine the genetic environment of *bla*_{CTX-M-15}. Indeed, distinct episodes of homologous recombination and of transpositions seem to have occurred rather than direct plasmid conjugation between strains in the patient.

The *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{SHV-2a} genes are two ESBL genes present on an IncA/C plasmid of 193 kb in *Shewanella* sp. JAB-1. ESBL production has, to date, never been reported in any *Shewanella* species. IncA/C plasmids are known to efficiently spread many resistance genes, in particular, *bla*_{CMY-like} Ambler class C β -lactamase genes (24). They have been detected worldwide, and carbapenemase genes, such as *bla*_{NDM-1} and *bla*_{VIM-4r} have been identified on that plasmid scaffold (25, 26). Recently, characterization of ESBL-encoding plasmids in clinical isolates of *K. pneumoniae* in Taiwan revealed that the most common replicon type was incompatibility group IncA/C (27). Coexpression of *bla*_{CTX-M} and *bla*_{SHV} is not rare on this scaffold (27). Therefore, IncA/C plasmids seem to efficiently spread ESBL genes among *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae*.

By sequencing the *Shewanella* sp. JAB-1 genome, we identified a new oxacillinase variant called OXA-535. According to the enzymatic activities, OXA-535 can be considered a new carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. OXA-535 presented only 3 amino acids difference with the plasmidic carbapenemase OXA-436. Moreover, we could identify a 7.3-kb fragment in the chromosome of *Shewanella* sp. JAB-1 including the *bla*_{OXA-535} gene, which presented 96% nucleotide identity with the plasmid-carried *bla*_{OXA-436} gene region. Considering the high similarities between these structures, we can speculate that this 7.3-kb fragment has been mobilized on a plasmid and that the *bla*_{OXA-535} gene is likely the precursor of the plasmid-carried *bla*_{OXA-436} gene.

Interestingly, antimicrobial susceptibility testing, the Carba NP test, the β Carba test, and OXA-48 K-SeT indicated that *bla*_{OXA-535} gene is barely expressed in *Shewanella* sp. JAB-1. Accordingly, we did not identify any insertion element (IS) upstream of the *bla*_{OXA-535} gene that could provide strong promoter sequences, unlike the plasmid-encoded OXA-181 and OXA-48, where *ISEcp1* and *IS1999*, respectively, allow strong carbapenemase expression. Like in other sequenced *Shewanella* spp., we identify a gene coding for a peptidase C15 family upstream of *bla*_{OXA-535} and a *lysR* gene coding for a putative LysR transcriptional regulator downstream (13).

The Xpert Carba-R test performed on the colonies could amplify the *bla*_{OXA-535} gene (data not shown). We can speculate that if this test would have been performed directly on a rectal swab of this patient, as is recommended for screening of high-risk patients (28), it might have been falsely positive for the detection of a carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. A false-positive molecular screening test has already been reported by Antonelli et al., likely due to the presence in the human gut of *S. xiamenensis* carrying *bla*_{OXA-416} in its chromosome (29). The rate of fecal carriage of *Shewanella* spp. in the general population is currently unknown, as well as the bacterial concentration sufficient to yield a positive molecular test result. Nevertheless, the analytical limit of detection of the Xpert Carba-R assay is quite low (ranging from 1.1×10^2 to 1.2×10^3 CFU/swab depending on the carbapenemase gene [30]). Given these data, false-positive molecular test results remain troublesome, since hepatobiliary diseases have been proposed as a risk factor for infections (or colonization) due to *Shewanella* spp. and can therefore contribute to regularly inoculate the gastrointestinal tract.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. *Shewanella* sp. JAB-1, *Escherichia coli* JAB-1, and *Klebsiella pneumoniae* JAB-1 clinical isolates were from the Bicêtre Hospital, Le Kremlin-Bicêtre, France. They have been identified with MALDI-TOF MS using the Bruker MS system (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), according to the manufacturer's instructions. In addition, sequencing of 16S rRNA using universal primers 16S 8-27 and 16S 1512-1491 was performed for the *Shewanella* isolate, as described previously (9). Biochemical features were studied using API32GN and API20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), according to the manufacturer's instructions. Electrocompetent *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Éragny, France) was used as a recipient for electroporation experiments. *E. coli* J53 RIF^r, which is resistant to azide and rifampin (RIF^r), was used for conjugation experiments. *E. coli* 50192 was used as a reference strain for plasmid extraction (31). *S. algae* CIP 103562, *S. putrefaciens* CIP 67.65, and *S. xiamenensis* S12 (9) were used as references for susceptibility testing and determination of biochemical features.

Susceptibility testing and MIC determinations. Susceptibility testing was performed by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar plates (Bio-Rad) incubated for 18 h at 37°C. There are no recognized Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) MIC interpretative standards specified for the *Shewanella* genus. We used the MIC breakpoints of CLSI approved standard M100-S24 categories for other non-*Enterobacteriaceae*, in accordance with previous reports (3). The MICs of carbapenems were determined using the Etest (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France).

Resistance gene detection. Genes coding for Ambler class A β -lactamases were sought by PCR using primers specific for the *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{CTX-M} genes, as previously described (32). PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Courtabœuf, France) and sequenced on both strands with an automated sequencer (ABI 3100; Applied Biosystems, Foster City, CA).

Cloning experiments. Genomic DNA of the *Shewanella* sp. JAB-1 isolate extracted using the Qiagen DNAamp kit (Qiagen) was used as the template for amplification of the *bla*_{OXA-535} gene with its surrounding region (290 nucleotides [nt] before the ATG and 181 nt after the stop codon) and was performed with pre-OXA-535-For (5'-CGTTGGGTTGCTTCAT-3') and pre-OXA-535-Rev (5'-GACTAGGCTTTTTCGTT-3') primers, and the PCR product was inserted into pTOPO (Invitrogen, Éragny, France), resulting in pTOPO-preOXA-535. *E. coli* TOP10 carrying recombinant plasmid pTOPO-preOXA-535 was selected using a Trypticase soy (TS) agar plate containing ticarcillin (50 mg/liter) and kanamycin (50 mg/liter). The inserted DNA fragment was verified by Sanger sequencing.

Plasmid extraction, electroporation, and mating-out assay. Natural plasmids were extracted using the Kieser extraction method (33) and subsequently analyzed by electrophoresis on a 0.7% agarose gel. ESBL-encoding plasmid DNA of *Shewanella* sp. JAB-1 (pSHE-CTX-M), *E. coli* (pECO-CTX-M), and *K. pneumoniae* (pKP-CTX-M) isolates were extracted using the Qiagen plasmid maxikit (Qiagen, Courtabœuf, France) and analyzed by agarose gel electrophoresis (Invitrogen, Paris, France).

Transfer of the β -lactam resistance markers from *Shewanella* sp. JAB-1 was performed by liquid mating-out assays at 37°C using *E. coli* J53 RIF^r as the recipient strain (31).

Recombinant plasmids (pTOPO-preOXA-48 and pTOPO-preOXA-535) were introduced by electroporation into *E. coli* TOP10 using a Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories) (31).

Detection of carbapenemase presence. Bacterial colonies of *Shewanella* sp. JAB-1 recovered from Trypticase soy agar were used to perform Xpert Carba-R test version 2 (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), OXA-48 K-SeT assay (Coris BioConcept, Gembloux, Belgium), the Carba NP test, and the β Carba test, according to the manufacturer's recommendations (22, 34, 35) or updated guidelines (36). The Carba NP test was also performed on recombinant *E. coli* TOP10 carrying pTOPO-preOXA-535.

Enzymatic activities. The specific activities of the OXA-48 and OXA-535 β -lactamases were determined using the supernatant of a whole-cell crude extract obtained from an overnight culture of *E. coli* clones expressing those two β -lactamases (pTOPO-preOXA-48 and pTOPO-preOXA-535 in *E. coli* TOP10) with an Ultrospec 2000 UV spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech), as previously described (37). Imipenem was used as the substrate at a concentration of 100 μ M.

Whole-genome sequencing and bioinformatic analysis. Total DNA of *Shewanella* sp. JAB-1 was extracted using the UltraClean microbial DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Total DNA and plasmid DNA (pSHE-CTX-M, pECO-CTX-M, and pKP-CTX-M) concentrations were measured using the Qubit double-stranded DNA (dsDNA) BR assay kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The DNA libraries were prepared using the Nextera XT version 3 kit (Illumina, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, and then run on the HiSeq or MiSeq system (Illumina) to generate paired-end 150-bp reads. Total *Shewanella* DNA was also sequenced using PacBio long-read technology (Macrogen, Seoul, South Korea).

Illumina read *de novo* assembly was performed using CLC Genomics Workbench 9.0, according to the manufacturer's recommendations (Qiagen, Courtabœuf, France). PacBio subreads were assembled with both Canu (38) and the RS_HGAP_Assembly.3 protocol from the SMRT Analysis toolkit version 2.3, while consensus accuracy was further polished using Quiver (39), as was previously described (40). PCR sequencing was used to complete the assembly of pECO-CTX-M and pKP-CTX-M plasmids. A phylogenetic tree based on the *gyrB-rpoB* concatemer was drawn with the MEGA7 software using the maximum likelihood method based on the Tamura-Nei model (41). Phylogenetic analysis based on whole-genome sequences of *Shewanella* spp. close to *Shewanella* sp. JAB-1 was done using the Parsnp program from the Harvest Suite (42). tRNAs were detected by ARAGORN (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/ARAGORN/>) (43). Circular representation was performed by CGview (44). *Shewanella* sp. JAB-1 was compared with three closely related strains: *Shewanella* MR-4 (accession no. CP000446.1), MR-7 (accession no. CP000444.1), and ANA-3 (accession no. CP000469.1).

Accession number(s). The nucleotide sequence of the *bla*_{OXA-535} gene of the assembled chromosome sequence of *Shewanella* sp. JAB-1 and of its 10.5-kb plasmid, with no antibiotic resistance features, have been deposited at the EMBL/GenBank nucleotide sequence database under the accession numbers KX828709, CP022358, and CP022360, respectively. The three assembled ESBL-encoding plasmids (pSHE-CTX-M, pECO-CTX-M, and pKP-CTX-M) have been deposited at the EMBL/GenBank nucleotide sequence database under the accession numbers CP022359, MF510423, and MF510424, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Institut Pasteur Collection (<https://www.pasteur.fr/fr/crbip>) for providing strains *S. algae* CIP 103562 and *S. putrefaciens* CIP 67.65.

This work was supported by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, by a grant from the Université Paris Sud (EA 7361), and by the LabEx LERMIT supported by a grant from the French National Research Agency (ANR-10-LABX-33) and by the LabEx IBEID. This work was also funded in part by a grant from the Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance (ANR-14-JAMR-0002).

L.D. is coinventor of the Carba NP test, the patent for which has been licensed to bioMérieux (La Balme-les-Grottes, France).

REFERENCES

- Holt HM, Gahrn-Hansen B, Bruun B. 2005. *Shewanella* algae and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. *Clin Microbiol Infect* 11:347–352. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01108.x>.
- Ceccarelli D, van Essen-Zandbergen A, Veldman KT, Tafro N, Haenen O, Mevius DJ. 2017. Chromosome-based *bla*_{OXA-48}-like variants in *Shewanella* species isolates from food-producing animals, fish, and the aquatic environment. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e01013-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01013-16>.
- Liu P-Y, Lin C-F, Tung K-C, Shyu C-L, Wu M-J, Liu J-W, Chang C-S, Chan K-W, Huang J-A, Shi Z-Y. 2013. Clinical and microbiological features of *Shewanella* bacteremia in patients with hepatobiliary disease. *Intern Med* 52:431–438. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.52.8152>.
- Otsuka T, Noda T, Noguchi A, Nakamura H, Ibaraki K, Yamaoka K. 2007. *Shewanella* infection in decompensated liver disease: a septic case. *J Gastroenterol* 42:87–90. <https://doi.org/10.1007/s00535-006-1957-0>.
- Muñoz-Gallego I, Chaves F, Orellana MA. 2016. Epidemiological and clinical characteristics of *Shewanella* spp. infections in a tertiary hospital in Madrid. *Infect Dis (Lond)* 48:760–762. <https://doi.org/10.3109/23744235.2016.1169554>.
- Domínguez H, Vogel BF, Gram L, Hoffmann S, Schaebel S. 1996. *Shewanella* alga bacteremia in two patients with lower leg ulcers. *Clin Infect Dis* 22:1036–1039. <https://doi.org/10.1093/clinids/22.6.1036>.
- To KKW, Wong SSY, Cheng VCC, Tang BSF, Li IWS, Chan JFW, Seto W-K, Tse H, Yuen K-Y. 2010. Epidemiology and clinical features of *Shewanella* infection over an eight-year period. *Scand J Infect Dis* 42:757–762. <https://doi.org/10.3109/00365548.2010.490562>.
- Poirel L, Naas T, Nordmann P. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54:24–38. <https://doi.org/10.1128/AAC.01512-08>.
- Potron A, Poirel L, Nordmann P. 2011. Origin of OXA-181, an emerging carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, as a chromosomal gene in *Shewanella xiamenensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4405–4407. <https://doi.org/10.1128/AAC.00681-11>.
- Poirel L, Héritier C, Nordmann P. 2004. Chromosome-encoded Ambler class D β -lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. *Antimicrob Agents Chemother* 48:348–351. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.348-351.2004>.
- Héritier C, Poirel L, Nordmann P. 2004. Genetic and Biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing Ambler class D β -lactamase from *Shewanella algae*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1670–1675. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1670-1675.2004>.
- Dortet L, Cuzon G, Ponties V, Nordmann P. 2017. Trends in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, France, 2012 to 2014. *Euro Surveill* 22:pil=30461. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.6.30461>.
- Tacão M, Araújo S, Vendas M, Alves A, Henriques I. 2017. *Shewanella* species as the origin of *bla*_{OXA-48} genes: insights into gene diversity, associated phenotypes and possible transfer mechanisms. *Int J Antimicrob Agents* 17:30222–30224. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.014>.
- Almuzara M, Montaña S, Lazzaro T, Uong S, Parmeciano Di Noto G, Traglia G, Bakai R, Centrón D, Iriarte A, Quiroga C, Ramirez MS. 2017. Genetic analysis of a PER-2-producing *Shewanella* sp. strain harbouring a variety of mobile genetic elements and antibiotic resistant determi-

- nants. *J Glob Antimicrob Resist* 11:81–86. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.06.005>.
15. Pitout JD, Laupland KB. 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 8:159–166. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70041-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70041-0).
 16. Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18:657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>.
 17. Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* 7:459–469. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.08.003>.
 18. Flandrois J-P, Perrière G, Gouy M. 2015. leBIBIQBPP: a set of databases and a webtool for automatic phylogenetic analysis of prokaryotic sequences. *BMC Bioinformatics* 16:251. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0692-z>.
 19. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Hye Park C, Bush K, Hooper DC. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12:83–88. <https://doi.org/10.1038/nm1347>.
 20. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. 2012. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infect Genet Evol* 12:883–893.
 21. Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, Bryce E, Gardam M, Nordmann P, Mulvey MR. 2004. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3758–3764. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3758-3764.2004>.
 22. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang T-D, Leclipteux T, Bogaerts P. 2016. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* 71:1217–1222. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv472>.
 23. Chen YS, Liu YC, Yen MY, Wang JH, Wang JH, Wann SR, Cheng DL. 1997. Skin and soft-tissue manifestations of *Shewanella putrefaciens* infection. *Clin Infect Dis* 25:225–229. <https://doi.org/10.1086/514537>.
 24. Call DR, Singer RS, Meng D, Broschat SL, Orfe LH, Anderson JM, Herndon DR, Kappmeyer LS, Daniels JB, Besser TE. 2010. *bla*_{CMY-2}-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 54:590–596. <https://doi.org/10.1128/AAC.00055-09>.
 25. Potron A, Nordmann P, Poirel L. 2013. Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:633–636. <https://doi.org/10.1128/AAC.01034-12>.
 26. Carattoli A, Villa L, Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. 2012. Evolution of IncA/C *bla*_{CMY-2}-carrying plasmids by acquisition of the *bla*_{NDM-1} Carbapenemase Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 56:783–786.
 27. Chang C-Y, Lin H-J, Chang L-L, Ma L, Siu LK, Tung Y-C, Lu P-L. 2017. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-carrying plasmids on clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Taiwan. *Microb Drug Resist* 23:98–106. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0212>.
 28. Hoyos-Mallecot Y, Ouzani S, Dortet L, Fortineau N, Naas T. 2017. Performance of the Xpert Carba-R v2 in the daily workflow of a hygiene unit in a country with a low prevalence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents* 49:774–777. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.025>.
 29. Antonelli A, Di Palo DM, Galano A, Becciani S, Montagnani C, Pecile P, Galli L, Rossolini GM. 2015. Intestinal carriage of *Shewanella xiamenensis* simulating carriage of OXA-48–producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 82:1–3. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.02.008>.
 30. Tato M, Ruiz-Garbajosa P, Traczewski M, Dodgson A, McEwan A, Humphries R, Hindler J, Veltman J, Wang H, Cantón R. 2016. Multisite evaluation of Cepheid Xpert Carba-R assay for detection of carbapenemase-producing organisms in rectal swabs. *J Clin Microbiol* 54:1814–1819. <https://doi.org/10.1128/JCM.00341-16>.
 31. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas M-V, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Navon-Venezia S, Quinn JP, Nordmann P. 2010. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce β -lactamase *bla*_{KPC-2} gene. *Emerg Infect Dis* 16:1349–1356. <https://doi.org/10.3201/eid1609.091389>.
 32. Cao V, Lambert T, Nhu DQ, Loan HK, Hoang NK, Arlet G, Courvalin P. 2002. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3739–3743. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.3739-3743.2002>.
 33. Kieser T. 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12:19–36. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(84\)90063-5](https://doi.org/10.1016/0147-619X(84)90063-5).
 34. Dortet L, Fusaro M, Naas T. 2016. Improvement of the Xpert Carba-R kit for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:3832–3837. <https://doi.org/10.1128/AAC.00517-16>.
 35. Bernabeu S, Dortet L, Naas T. 2017. Evaluation of the β Carba test, a colorimetric test for the rapid detection of carbapenemase activity in Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* 72:1646–1658. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx061>.
 36. Dortet L, Brechard L, Poirel L, Nordmann P. 2014. Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* using an updated version of the Carba NP test. *J Med Microbiol* 63:772–776. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.071340-0>.
 37. Dortet L, Oueslati S, Jeannot K, Tandé D, Naas T, Nordmann P. 2015. Genetic and biochemical characterization of OXA-405, an OXA-48-type extended-spectrum β -lactamase without significant carbapenemase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 59:3823–3828. <https://doi.org/10.1128/AAC.05058-14>.
 38. Berlin K, Koren S, Chin C-S, Drake JP, Landolin JM, Phillippy AM. 2015. Assembling large genomes with single-molecule sequencing and locality-sensitive hashing. *Nat Biotechnol* 33:623–630. <https://doi.org/10.1038/nbt.3238>.
 39. Chin C-S, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Clum A, Copeland A, Huddleston J, Eichler EE, Turner SW, Korlach J. 2013. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods* 10:563–569. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2474>.
 40. Almeida A, Alves-Barroco C, Sauvage E, Bexiga R, Albuquerque P, Tavares F, Santos-Sanches I, Glaser P. 2016. Persistence of a dominant bovine lineage of group B *Streptococcus* reveals genomic signatures of host adaptation. *Environ Microbiol* 18:4216–4229. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13550>.
 41. Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
 42. Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, Phillippy AM. 2014. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol* 15:524. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0524-x>.
 43. Laslett D. 2004. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* 32:11–16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh152>.
 44. Stothard P, Wishart DS. 2005. Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics* 21:537–539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti054>.

Chapitre 6 : Genetic and biochemical characterization of OXA-535, a distantly-related OXA-48-like β -lactamase.

Cet article, dans la continuité du précédent, s'est attaché à étudier les paramètres cinétiques d'OXA-535 d'une part et à analyser l'environnement génétique du gène *bla*_{OXA-535} d'autre part.

La mesure des constantes cinétiques (*k*_{cat} et *K*_m) d'OXA-535 indique que cette enzyme hydrolyse la témocilline, la céfalotine, la céfoxitine, la ceftazidime et le céfépime de façon similaire à OXA-48. Concernant l'hydrolyse des carbapénèmes, OXA-535 possède une activité catalytique 5 fois moindre vis-à-vis de l'imipénème comparé à OXA-48, en raison d'une moins bonne affinité (*K*_m diminué d'un facteur 8). La faible affinité pour l'imipénème pourrait expliquer le résultat négatif du Carba NP test réalisé à partir de la souche *Shewanella* sp. JAB-1. A l'inverse, l'hydrolyse due à OXA-535 est supérieure à celle due à OXA-48 pour le méropénème (facteur 11) et surtout pour l'ertapénème (facteur 1800, en raison d'une affinité 1160 fois supérieure). Une modélisation de la liaison de l'ertapénème à l'enzyme montre la présence d'un acide aminé clé en position 104. Il s'agit d'une alanine chez OXA-535 en lieu et place d'une thréonine chez OXA-48, ce qui induit un raccourcissement de la boucle 94-106 permettant à la molécule d'ertapénème de se lier plus facilement à cette région. Cette structure particulière pourrait expliquer la capacité d'OXA-535 à hydrolyser plus facilement l'ertapénème. Cependant, les enzymes OXA-181 et OXA-436 qui possèdent également la mutation Thr104Ala présentent une activité bien moindre pour l'ertapénème qu'OXA-535 et similaire à OXA-48 [432]. Une combinaison de différentes mutations dont Thr104Ala pourrait être responsable de l'affinité accrue d'OXA-535 pour l'ertapénème.

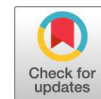
L'analyse de l'environnement génétique du gène *bla*_{OXA-535} retrouve l'organisation classique décrite chez différentes *Shewanella* sp. avec notamment, la présence en aval du gène *bla*_{OXA-48-like}, du gène *lysR* codant pour un régulateur transcriptionnel.

De part leur grande similitude de séquences protéique et nucléotidique, nous avons émis l'hypothèse que le gène *bla*_{OXA-535} puisse être le précurseur du gène *bla*_{OXA-436} porté

par un plasmide de type IncHI2 (pOXA436) et présent chez plusieurs espèces d'entérobactéries [432].

La comparaison de l'environnement génétique des gènes *bla*_{OXA-535} et *bla*_{OXA-436} indique la présence d'une région commune de 7,3 kb comprenant le gène codant l'oxacillinase. Cette région est également présente dans les génomes des souches de *Shewanella* sp. MR-4, MR-7 et ANA-3 avec une forte homologie de séquence. Une séquence d'insertion de type *ISCR1* est retrouvée en amont du gène *bla*_{OXA-436} uniquement. Cet élément pourrait être responsable de la mobilisation du fragment de 7,3 kb provenant du chromosome d'une *Shewanella* sp. sur le plasmide pOXA436 par un mécanisme de type *rolling-circle*.

Cette étude renforce l'idée que les bactéries du genre *Shewanella* constituent un réservoir de gènes capables de diffuser ensuite chez les entérobactéries. Par ailleurs, l'hypothèse de la mobilisation d'un gène *bla*_{OXA-48-like} par *ISCR1* illustre la complexité des structures génétiques associées à la dissémination des carbapénèmases de type OXA-48.



Genetic and Biochemical Characterization of OXA-535, a Distantly Related OXA-48-Like β -Lactamase

L. Dabos,^{a,b} A. B. Jousset,^{a,b,c,d} R. A. Bonnin,^{a,b,d} N. Fortineau,^{a,b,c,d} A. Zavala,^e P. Retailleau,^e B. I. Iorga,^e  T. Naas^{a,b,c,d}

^aEA7361 "Structure, Dynamic, Function and Expression of Broad Spectrum β -Lactamases," Paris-Sud University, Faculty of Medicine, Le Kremlin-Bicêtre, France

^bJoint Research Unit EERA Evolution and Ecology of Resistance to Antibiotics, Institut Pasteur-APHP-University Paris Sud, Paris, France

^cDepartment of Bacteriology-Parasitology-Hygiene, Bicêtre Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, France

^dAssociated French National Reference Center for Antibiotic Resistance, Le Kremlin-Bicêtre, France

^eInstitut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR 2301, Université Paris-Saclay, Labex LERMIT, Gif-sur-Yvette, France

ABSTRACT OXA-535 is a chromosome-encoded carbapenemase of *Shewanella bicestria* JAB-1 that shares only 91.3% amino acid sequence identity with OXA-48. Catalytic efficiencies are similar to those of OXA-48 for most β -lactams, except for ertapenem, where a 2,000-fold-higher efficiency was observed with OXA-535. OXA-535 and OXA-436, a plasmid-encoded variant of OXA-535 differing by three amino acids, form a novel cluster of distantly related OXA-48-like carbapenemases. Comparison of *bla*_{OXA-535} and *bla*_{OXA-436} genetic environments suggests that an *ISCR1* may be responsible for *bla*_{OXA-436} gene mobilization from the chromosome of *Shewanella* spp. to plasmids.

KEYWORDS OXA-48-like, carbapenemase, progenitor, OXA-48, *Shewanella*

OXA-48, a carbapenemase, has become a major public health threat because of its rapid spread worldwide (1–3). Along with this rapid dispersion, several OXA-48 variants have been reported (4–6). For a complete list of variants, see the β -lactamase database (<http://bldb.eu/BLDB.php?class=D#OXA>) (4). Analysis of the genetic context of *bla*_{OXA-48-like} genes in *Enterobacteriaceae* has shown their association with insertion sequences (*IS1999*, *ISEcp1*, and *IS4321*) and with various plasmids (7–10). *Shewanella* spp. constitute the reservoir of *bla*_{OXA-48-like} genes. So far, the gene variants *bla*_{OXA-48r}, *bla*_{OXA-199r}, *bla*_{OXA-204r} and *bla*_{OXA-416} genes have been reported in *Shewanella xiamenensis*, although some researchers have identified *bla*_{OXA-48-like} genes in other *Shewanella* spp. (11–17). OXA-535, the naturally occurring oxacillinase of *Shewanella bicestria* JAB-1, share only 91.3% and 98.9% amino acid sequence identities with OXA-48 and the plasmid-borne OXA-436, respectively (5, 18) (Fig. 1A). The aim of this study was to characterize the biochemical properties of OXA-535 and investigate its genetic environment in *S. bicestria* JAB-1.

MIC values were determined as previously described (18). *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Saint-Aubin, France) expressing OXA-535 from the pTOPO plasmid was resistant to penicillins, including temocillin, and reduced susceptibility to carbapenems; whereas the expanded-spectrum cephalosporins remained in the susceptibility range, in a manner similar to that of *E. coli* TOP10 expressing OXA-48 from a pTOPO plasmid (6, 18) (Table 1).

A DNA fragment corresponding to the mature OXA-535, generated with the primers INF-OXA-48Fw (5'-AAGGAGATATACATATGGTAGCAAAGGAATGGCAAG-3') and INF-OXA-48Rv (5'-GGTGGTGGTCTCGAAGGGAATAATTTTTCTGTGGAG-3'), was cloned into

Received 5 June 2018 Returned for modification 5 July 2018 Accepted 30 July 2018

Accepted manuscript posted online 6 August 2018

Citation Dabos L, Jousset AB, Bonnin RA, Fortineau N, Zavala A, Retailleau P, Iorga BI, Naas T. 2018. Genetic and biochemical characterization of OXA-535, a distantly related OXA-48-like β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01198-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01198-18>.

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to T. Naas, thierry.naas@aphp.fr.

TABLE 1 MIC of β -lactams for *Shewanella* spp. JAB-1 and *E. coli* TOP10 pTOPO-OXA-535, TOP10 pTOPO-OXA-48, and TOP10

Antibiotic	MIC (mg/liter)			
	<i>Shewanella</i> sp. JAB-1	<i>E. coli</i> TOP10		<i>E. coli</i> TOP10
		pTOPO-OXA-535	pTOPO-OXA-48	
Amoxicillin	>256	>256	>256	2
Amoxicillin + CLA ^a	8	128	>256	2
Piperacillin	>256	>256	>256	1.5
Temocillin ^b	0.25	>1,024	>1,024	4
Cefotaxime ^b	>32	0.06	0.75	0.06
Ceftazidime ^b	2	0.19	0.19	0.12
Cefepime	8	0.023	0.19	0.023
Imipenem ^b	0.38	1	0.75	0.25
Ertapenem ^b	1	0.25	0.25	0.003
Meropenem ^b	0.38	0.19	0.25	0.016

^aCLA, clavulanic acid (2 mg/liter).^bMIC data for these antibiotics were retested in this work but are similar to those presented by Jousset et al. (18).

the expression vector pET41b (+) (Novagen, VWR International, Fontenay-sous-Bois, France), and recombinant plasmid pET41-OXA-535 was electroporated into the electrocompetent *E. coli* strain BL21(DE3) (Novagen). OXA-535 was overexpressed and purified, and steady-state kinetic parameters were determined and compared with those of OXA-48 as previously described (6, 19).

Initial hydrolysis tests using pure undiluted OXA-535 revealed an absence of hydrolysis of penicillins (ampicillin, oxacillin, piperacillin, amoxicillin, and benzylpenicillin), whereas the other β -lactams tested were rapidly hydrolyzed by OXA-535 in a manner similar to that of OXA-48 (Table 2). The addition of 50 mM sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃) as a source of CO₂ did not modify the rates of penicillin hydrolysis, suggesting that the absence of penicillinase activity with concentrated OXA-535 may not be due to Lys73 decarboxylation (20). When using 100-fold-diluted OXA-535 preparations, penicillin hydrolysis was restored in a manner similar to that of OXA-48. This peculiar behavior of OXA-535 in respect to penicillin hydrolysis may be the result of two mechanisms: (i) an alteration in the affinity of the enzyme for penicillins at high enzymatic concentrations and/or (ii) a modification in the hydrolysis mechanism that may involve an alternative catalytic process specific for penicillins, active only with low concentrations of the enzyme, which may be a result of enzyme concentration-dependent conformational changes. Structural analyses should be performed to explain this peculiar OXA-535 behavior.

Steady-state kinetic parameters for penicillins were determined by using diluted

TABLE 2 Comparison of the steady-state kinetic parameters of OXA-48 and OXA-535 β -lactamases

Substrate	K_m (μ M)		k_{cat} (s ⁻¹)		k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ /s ⁻¹)	
	OXA-48	OXA-535	OXA-48	OXA-535	OXA-48	OXA-535
Ampicillin	395	67	955	41	2,418	615
Oxacillin	95	53	130	64	1,368	1,210
Temocillin	45	357	0.30	1.8	6.6	5.1
Cefalotin	195	197	44	15	226	74
Cefoxitin	>200	268	>0.05	0.07	0.26	0.27
Ceftazidime	NH ^a	>1,000	NH	>0.01	NH	0.01
Cefotaxime	>900	>1,000	>9.0	>3.9	10	3.9
Cefepime	>550	>1,000	>0.60	>0.34	1.1	0.34
Imipenem	13	105	4.8	7.1	369	67
Meropenem	11	3.0	0.07	0.20	6.2	68
Ertapenem	100	0.06	0.13	0.17	1.3	2,646

^aNH, hydrolysis was not detected with concentrations of substrate and enzymes up to 1,000 and 400 nM, respectively.

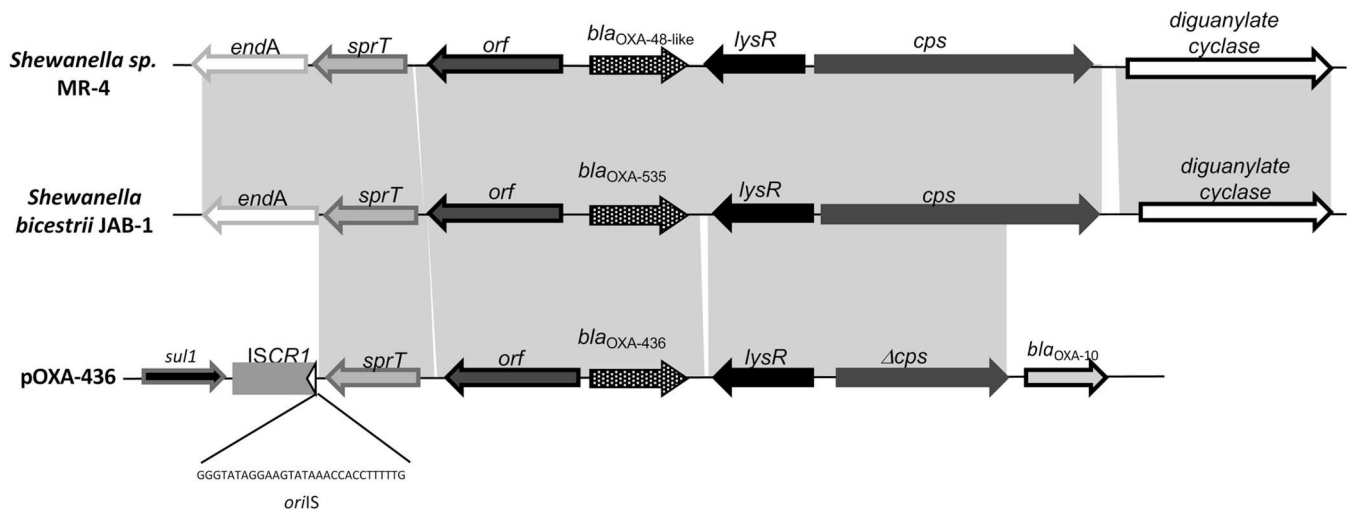


FIG 2 Genetic contexts of the *bla*_{OXA-535} gene. Major genetic features of the environment of the different *bla*_{OXA-48-like} genes in *Shewanella* spp., i.e., MR-4 (accession no. CP000446.1) and *S. bicestii* JAB-1 (accession no. NZ_CP022358.1), and of plasmid pOXA-436 (accession no. KY863418.1) isolated from *Enterobacter asburiae* strain AMA 497. Common features are highlighted in gray. *sprT* codes for a SprT-like protein of unknown function, *endA* encodes an endonuclease I, *lysR* encodes a putative *lysR*-type transcriptional regulator gene, and *cps* encodes a carbamoyl-phosphate synthase.

OXA-535 preparations. OXA-535 and OXA-48 presented similar catalytic efficiencies for oxacillin and temocillin (Table 2) (6). Compared with OXA-48, OXA-535 catalytic efficiency was (i) ~4-fold lower for ampicillin due to a lower turnover number; (ii) 3-fold lower for cephalothin due to a lower k_{cat} ; (iii) 5-fold lower for imipenem as a result of a lower affinity (8-fold increased k_m); (iv) 11-fold higher for meropenem as a result of better affinity and turnover values; and, most surprisingly, (v) ~1,800-fold higher for ertapenem, because of a 1,660-fold-higher affinity, with similar velocity of hydrolysis to that of OXA-48 (Table 2). This reduced activity against imipenem of OXA-535 may explain the negative results observed by Jousset et al. (18), who used Carba NP tests. The fact that OXA-535-like enzymes are difficult to detect with biochemical tests, such as Carba NP, may lead to the silent spread of this type of enzyme, in a manner similar to that of OXA-244 (18, 21).

Suitable conditions for the crystallization of OXA-535 were found at facilities of the Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC, Gif-sur-Yvette, France), and the resulting crystals were used for acquisition of X-ray diffraction data at the SOLEIL synchrotron (Saclay, France). A preliminary crystallographic study (data not shown) showed that the structures of OXA-535 and OXA-48 are very similar, with the exception of three regions situated relatively far from the binding site, i.e., 49 to 55, 94 to 106, and 252 to 261 (class D β -lactamase [DBL] numbering system) (Fig. 1B) (1). Covalent docking of ertapenem using GOLD and the GoldScore scoring function showed a strong ionic interaction between the terminal carboxylate group of the ligand and the side chain of Arg107 and a C-H... π interaction between the side chain of Tyr185 and the terminal aromatic group of ertapenem (Fig. 1C) (22). Comparison with the OXA-48 structure showed that the residue in position 104 plays a key role in ertapenem binding, thus explaining the huge difference in affinity between OXA-48 and OXA-535 determined for this substrate. Indeed, Ala104 in OXA-535 is compatible with ertapenem binding, given the small size of the side chain and the modified conformation of loop 94 to 106 (Fig. 1D), whereas Thr104 in OXA-48 is bulkier and completely blocks ertapenem binding in this region (Fig. 1E). These differences may have led to the observed 1,800-fold difference in catalytic efficiency.

Upstream of the *bla*_{OXA-535} gene, we identified *sprT* and *endA* genes encoding an SprT-like protein of unknown function and endonuclease I, respectively. The same genetic organization was described for closely related chromosomally encoded *bla*_{OXA-48-like} genes, such as the *bla*_{OXA-48-like-MR-4} gene (Fig. 2). The downstream

sequence of the *bla*_{OXA-535} gene is commonly present downstream of *bla*_{OXA-48-like} genes on the chromosomes of *Shewanella* spp. (11, 12). The 2,394-bp upstream and 4,074-bp downstream sequences of the *bla*_{OXA-535} gene were identical to those of *bla*_{OXA-436}, further supporting that the chromosomally encoded *bla*_{OXA-535} gene may be the progenitor of the plasmid-encoded *bla*_{OXA-436} gene (5). An *ISCR1* element found upstream of the *bla*_{OXA-436} gene but absent upstream of the *bla*_{OXA-535} gene may be responsible for the *bla*_{OXA-535-like} gene mobilization from the chromosome of *Shewanella* spp. to plasmids (Fig. 2). *ISCR1* carries a single *orf* that is responsible for a rolling-circle type of transposition mechanism (24). Flanking gene acquisition is thought to occur when the termination mechanism fails and rolling-circle replication extends into neighboring DNA, where it may encounter a second surrogate end (24). In the case of the *bla*_{OXA-436} gene, the DNA sequence putatively mobilized by *ISCR1*-mediated rolling-circle transposition corresponded to an ~6.5-kb fragment present also in *S. bicestris* JAB-1 and surrounding the *bla*_{OXA-535} gene. Our findings illustrate the increasing complexity of genetic vehicles at the origin of OXA-48-type carbapenemase spread (7–10). The finding of *ISCR1* upstream of *bla*_{OXA-48-like} genes is worrisome, because this *ISCR1* plays an important role in the assembly and transmission of multiple antibiotic resistance genes (5, 18, 24).

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities (proposal ID BAG20160782) for use of Proxima beamlines.

This work was supported by Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Université Paris Sud, the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT), by a grant from the French National Research Agency (ANR-10-LABX-33), and by DIM Malinf, Ile de France.

We have no competing interests to declare.

REFERENCES

- Poirel P, Naas T, Nordmann P. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54:24–38. <https://doi.org/10.1128/AAC.01512-08>.
- Van Duin D, Doi Y. 2017. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence* 8:460–469. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>.
- Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:15–22. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004>.
- Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, Retailliau P, Iorga BI. 2017. Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem* 32:917–919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>.
- Samuelsen Ø, Hansen F, Aasnæs B, Hasman H, Lund BA, Leiros HS, Lilje B, Janice J, Jakobsen L, Littauer P, Søres LM, Holzknacht BJ, Andersen LP, Stegger M, Andersen PS, Hammerum AM. 2018. Dissemination and characteristics of a novel plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase, OXA-436, found in isolates from four patients at six different hospitals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01260–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01260-17>.
- Oueslati S, Nordmann P, Poirel L. 2015. Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 70:1059–1063.
- Aubert D, Naas T, Heritier C, Poirel L, Nordmann P. 2006. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of β -lactam resistance genes. *J Bacteriol* 188:6506–6514. <https://doi.org/10.1128/JB.00375-06>.
- Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. 2012. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* 56:559–562. <https://doi.org/10.1128/AAC.05289-11>.
- Sidjabat HE, Kennedy K, Silvey A, Collignon P, Paterson D. 2013. Emergence of blaOXA-181-carrying ColE plasmid in *Klebsiella pneumoniae* in Australia. *Int J Antimicrob Agents* 41:294–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.11.003>.
- Poirel L, Castanheira M, Carrer A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, Nordmann P. 2011. OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 55:2546–2551. <https://doi.org/10.1128/AAC.00022-11>.
- Poirel L, Heritier C, Nordmann P. 2004. Chromosome-encoded ambler class D β -lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. *Antimicrob Agents Chemother* 48:348–351. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.348-351.2004>.
- Tacão M, Araújo S, Vendas M, Alves A, Henriques I. 2018. *Shewanella* species as the origin of blaOXA-48 genes: insights into gene diversity, associated phenotypes and possible transfer mechanisms. *Int J Antimicrob Agents* 51:340–348. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.014>.
- Zong Z. 2012. Discovery of blaOXA-199 a chromosome-based blaOXA-48-like variant in *Shewanella xiamenensis*. *PLoS One* 7:e48280. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048280>.
- Antonelli A, Di Palo DM, Galano A, Becciani S, Montagnani C, Pecile P, Galli L, Rossolini GM. 2015. Intestinal carriage of *Shewanella xiamenensis* simulating carriage of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 82:1–3. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.02.008>.
- Potron A, Poirel L, Nordmann P. 2011. Origin of OXA-181, an emerging carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, as a chromosomal gene in *Shewanella xiamenensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4405–4407. <https://doi.org/10.1128/AAC.00681-11>.
- Tacão M, Correia A, Henriques I. 2013. Environmental *Shewanella xiamenensis* strains that carry bla_{OXA-48} or bla_{OXA-204} genes: additional proof for bla_{OXA-48-like} gene origin. *Antimicrob Agents Chemother* 57:6399–6400. <https://doi.org/10.1128/AAC.00771-13>.
- Kim DM, Kang CI, Lee CS, Kim HB, Kim EC, Kim NJ, Oh MD, Choe KW. 2006. Treatment failure due to emergence of resistance to carbapenem during therapy for *Shewanella algae* bacteremia. *J Clin Microbiol* 44:1172–1174. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.1172-1174.2006>.
- Jousset AB, Dabos L, Bonnin RA, Girlich D, Potron A, Cabanel N, Dortet L,

- Glaser P, Naas T. 2018. CTX-M-15-producing *Shewanella* sp. clinical isolate expressing OXA-535, a chromosome-encoded OXA-48 variant, putative progenitor of the plasmid-encoded OXA-436. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01879-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01879-17>.
19. Dabos L, Bogaerts P, Bonnin RA, Zavala A, Sacré P, Iorga BI, Huang DT, Glupczynski Y, Naas T. 2018. Genetic and biochemical characterization of OXA-519, a novel OXA-48-like β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e00469-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00469-18>.
20. Meziane-Cherif D, Bonnet R, Haouz A, Courvalin P. 2016. Structural insights into the loss of penicillinase and the gain of ceftazidimase activities by OXA-145 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 71:395–402. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv375>.
21. Hoyos-Mallecot Y, Naas T, Bonnin RA, Patino R, Glaser P, Fortineau N, Laurent Dortet L. 2017. OXA-244-producing *Escherichia coli* isolates, a challenge for clinical microbiology laboratories. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00818-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00818-17>.
22. Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD. 2003. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* 52:609–623. <https://doi.org/10.1002/prot.10465>.
23. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2014. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612.
24. Toleman MA, Walsh TR. 2011. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 35:912–935. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00294.x>.

Discussion et Perspectives

La première partie de ce travail a été dédiée à l'étude génomique et transcriptomique des entérobactéries produisant la carbapénémase KPC. L'étude de l'évolution et de l'adaptation bactérienne *in vivo* reste énigmatique. Dans une première étude, nous avons analysé l'évolution du génome d'une souche de *K. pneumoniae* ST258 productrice de la carbapénémase KPC-2 sous l'effet de l'interaction avec son hôte sur près de 5 ans. Nous avons mis en évidence une diversification génétique « importante » de l'isolat de départ avec l'apparition de mutations modifiant la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques et certaines capacités de virulence. L'isolat S15 possédant des mutations bien particulières et n'ayant pas suivi le même « chemin » évolutif illustre bien ce phénomène. Le fait de n'avoir conservé qu'un seul isolat par prélèvement est cependant une limite importante à notre étude et nous n'avons pas pu mettre en évidence toute la diversité génétique de cette souche.

Les raisons qui permettent à un clone multi-résistant de persister chez l'homme ne sont pas encore totalement identifiées. Certains patients sont capables de se « décoloniser » spontanément après quelques semaines ou mois, tandis que d'autres restent « porteurs » pendant plusieurs années. Il faut noter cependant que le terme décolonisation doit être apprécié avec prudence. En effet, il n'existe actuellement aucune recommandation officielle quant aux modalités d'études pour établir qu'un patient est décolonisé (nombre de prélèvements à effectuer, recherche par culture et/ou biologie moléculaire...). Ainsi, certains patients peuvent toujours être porteurs mais avec une charge bactérienne non détectable car située sous le seuil de détection des techniques utilisées.

Certains facteurs ont été identifiés comme favorisant la persistance d'une bactérie multi-résistante chez son hôte ; il s'agit d'hospitalisations multiples [316], de l'usage d'antibiotiques [433], et de l'usage de cathéter invasifs [317] principalement. Notre patient, aux comorbidités multiples, présentait plusieurs de ces facteurs de risque.

Par ailleurs, il a été montré que les souches produisant KPC étaient capables de persister davantage dans le tube digestif des patients colonisés en comparaison aux souches produisant NDM par exemple [319]. Il s'agit peut-être d'une propriété spécifique du clone de *K. pneumoniae* ST258, comme une capacité à adhérer plus facilement à la muqueuse digestive, à échapper au système immunitaire de l'hôte, à interagir avec les autres composants du microbiote même si les arguments génétiques et phénotypiques

en lien avec ces idées manquent encore largement. Ce qui est plus largement admis, c'est que les patients porteurs sur le long terme d'EPC sont de réels réservoirs pour la dissémination de ces bactéries.

Dans notre étude, le taux de mutations de la souche de *K. pneumoniae* BIC-1 est en moyenne de 7,5 mutations/génome/an. Ce taux est comparable aux valeurs observées dans d'autres études réalisées chez *K. pneumoniae*. L'étude évolutive de 250 *K. pneumoniae* multirésistantes menée par Moradigaravand *et al.* a permis d'établir un taux moyen plus faible à 3,8 mutations/génome/an [434]. Cependant, leur collection de souches comprenait une majorité de *K. pneumoniae* du ST15 et peu de souches du GC258 (ST11, ST258, ST307). L'étude menée par Mathers *et al.* concernait uniquement des souches de *K. pneumoniae* produisant KPC et retrouvait un taux de 10 mutations/génome/an [435]. Dans ces deux études, il s'agit de souches cliniques, isolées de patients ayant possiblement reçu des antibiotiques. Les phénomènes de sélection conduisent à un biais majeur car, bien que n'induisant pas de mutation *stricto sensu*, ils sélectionnent les bactéries les plus adaptées. Tout phénomène de sélection conduit donc à surévaluer le taux de mutations dans une population bactérienne. Il faut aussi noter que l'horloge moléculaire dépend de l'espèce étudiée et que l'adaptation et la sélection ne sont pas uniquement dues à la présence d'antibiotiques mais également à l'ensemble de la composition de la niche écologique et des pressions de sélection inter- et intra-espèces qui peuvent résider. L'étude de Ghalayini *et al.* avait pour objectif d'étudier l'évolution *in vivo* du génome d'une souche de *E. coli* multi-sensible, connue pour son caractère non pathogène et sa capacité à persister dans le tube digestif humain [436]. Cette bactérie a persisté pendant toute la durée de l'étude chez un patient sain et sans histoire médicale particulière, en quantité suffisante pour permettre sa détection par les techniques de bactériologie classique. L'analyse évolutive a permis d'établir à 3,32 le nombre moyen de mutations/génome/an. De ce taux relativement faible, on peut penser que cette souche de *E. coli* était particulièrement adaptée à son environnement et qu'aucun phénomène de sélection n'a interféré sur son évolution.

Il est tentant de penser que le taux de mutation annuel pourrait être supérieur chez les membres du GC258 et pourrait être corrélé à cette capacité à se diversifier *in vivo* et aboutir à l'apparition de plusieurs sous-populations possédant chacune un avantage sélectif à un instant donné (à l'instar des isolats identifiés chez notre patient, dont

certaines sont résistantes à la gentamicine, capables de former plus de biofilm, ou de se multiplier dans le sérum). La comparaison de l'horloge moléculaire de souches de *K. pneumoniae* appartenant à différents ST pourrait permettre de répondre à cette question. Par ailleurs, l'utilisation d'un modèle animal permettant d'étudier la cinétique de colonisation de souches de *K. pneumoniae* de différents ST pourrait fournir des éléments de réponse quant à la capacité des souches de ST258 à persister dans le tube digestif.

Parmi les 17 isolats dérivant de la souche BIC-1, la souche S15 était la seule capable de se multiplier dans le sérum humain et présentait le plus de mutations par rapport à la souche originelle. Parmi les 36 gènes candidats, nous avons identifié le gène *gmlC*, qui en opéron avec les gènes *gmlA* et *gmlB*, codent une glycosyltransférase capable de modifier la composition du LPS bactérien. La modification de l'antigène O du LPS serait associée à une plus grande résistance à l'action bactéricide du sérum. De façon intéressante, l'opéron *gml* n'est pas présent dans tous les génomes de *K. pneumoniae* mais est particulièrement associé aux *K. pneumoniae* ST258 (>80% des génomes sont *gml+*) [437]. Concernant l'isolat S15, notre hypothèse était que l'inactivation du gène *gmlC* par apparition d'un codon stop aurait pu conduire à une modification de l'activité de la glycosyltransférase et un changement dans la composition du LPS conférant une meilleure survie en présence de sérum. Cependant, la surexpression de la copie « sauvage » provenant de l'isolat BIC-1 n'a pas permis de restaurer la sensibilité au sérum. Compte-tenu de la capacité des souches de *K. pneumoniae* ST258 à causer des bactériémies, ce phénotype observé chez S15 nous semble particulièrement intéressant à investiguer. Des mutations dans des gènes régulateurs et dans des gènes codant des protéines associées à la membrane externe sont également présentes dans le génome de la souche S15 et sont des cibles potentielles à explorer. Pour cela, il serait utile de pouvoir inactiver ces gènes chromosomiques entièrement ou d'introduire la mutation d'intérêt dans la souche BIC-1 par recombinaison homologe. Le défi sera donc d'adapter les outils moléculaires développés actuellement pour cet usage chez des souches de *E. coli* sensibles, à l'utilisation chez une souche de *K. pneumoniae* multi-résistante. Il serait également intéressant de réaliser des expériences de RNA-seq sur les mutants d'intérêt en les comparant au transcriptome de la souche BIC-1. Une seule

mutation dans un régulateur pléiotropique pourrait avoir un impact majeur sur de nombreuses voies de régulation.

Dans cette première partie consacrée à KPC, il a également été question d'analyser les mécanismes régulant l'expression du gène *bla_{KPC}*.

Le gène *bla_{KPC}* est porté par un nombre important de structures génétiques différentes, plus ou moins proches du transposon Tn4401 décrit initialement. Les isoformes Tn4401a et Tn4401b ont particulièrement diffusé chez les entérobactéries. Chez les bacilles à Gram négatif non fermentants comme *P. aeruginosa*, on retrouve principalement le Tn4401b et des structures génétiques ayant perdu la capacité de transposition appelées NTE_{KPC}. La diversité des structures génétiques existantes ainsi que leur association avec certaines espèces bactériennes nous a conduit à nous demander si le succès de certaines structures n'était pas lié à une meilleure expression du gène *bla_{KPC}* et à une plus grande résistance conférée vis-à-vis des carbapénèmes.

Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de promoteurs multiples pour 2 des 3 structures analysées, et de démontrer que l'utilisation d'un promoteur préférentiel dépendait de l'espèce bactérienne. Cependant, comme évoqué dans des études précédentes, aucune corrélation stricte entre le niveau d'expression du gène *bla_{KPC}* et le niveau de résistance aux carbapénèmes n'a pu être établie [140,149].

La présence de plusieurs séquences promotrices permet au gène *bla_{KPC}* de s'exprimer dans plusieurs espèces différentes et pourrait expliquer le succès de cette carbapénémase. Alors que la carbapénémase OXA-48 n'a été décrite que chez les entérobactéries, KPC a été capable de franchir la barrière vers les bacilles à Gram négatif non fermentants. La faible fréquence de transposition du transposon Tn1999, véhiculant *bla_{OXA-48}*, et sa présence sur un plasmide ayant des difficultés de répllication dans les non-fermentants peuvent expliquer cette différence de spectre d'hôte mais il est possible que le caractère versatile de l'expression du gène *bla_{KPC}* ait également contribué au succès de sa diffusion.

L'analyse du transcriptome du plasmide pBIC1a par RNA-seq a permis de caractériser la transcription du gène *bla_{KPC-2}* et de son environnement proche. Même si notre protocole expérimental n'était pas conçu pour déterminer précisément les extrémités des transcrits, nous n'avons pas observé d'arrêt net de la transcription à la

fin de la séquence codante du gène *bla*_{KPC-2} mais un alignement des transcrits sur plus de 1 kb après le codon STOP, pouvant constituer une longue séquence 3'-UTR (*Untranslated region*) qui n'avait encore jamais été observée. Cette région pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'expression de la protéine comme cela a déjà été décrit pour d'autres régions 3'-UTR modifiant la stabilité de l'ARNm [414,415].

Afin d'établir plus précisément le début et la fin du transcrit du gène *bla*_{KPC-2} associé au plasmide pBIC1a dans *E. coli* TOP10, des expériences 5' et 3'-RACE pourraient être réalisées, notamment après enrichissement en transcrits natifs par pré-traitement à l'aide d'une exonucléase type TEX pour une détermination précise du TSS.

La présence de promoteurs multiples et de régions régulatrices 5'- et 3'-UTR pourraient également avoir un rôle dans l'expression du gène *bla*_{KPC} dans des situations physiopathologiques précises. Des résultats préliminaires d'analyses transcriptomiques réalisées sur la souche *K. pneumoniae* BIC-1 en présence de sérum, de bile et d'urine indiquent que l'expression du gène *bla*_{KPC-2} est augmentée d'un facteur 7 uniquement en présence de sérum et urine. Cette différence d'expression du gène codant la carbapénémase dans certaines conditions cliniques pourrait expliquer la variabilité des CMI aux carbapénèmes présentées par les 17 isolats dérivant de BIC-1. Ces CMI varient de 0,75 à 2 µg/ml pour l'imipénème, 3 à 8 µg/ml pour le méropénème et 8 à 24 µg/ml pour l'ertapénème. Cependant, l'isolat le plus résistant (S14) provient d'un prélèvement biliaire. Il est probable que la variabilité des CMI entre les isolats soit le résultat d'une combinaison de phénomènes, associant des modifications de l'expression du gène *bla*_{KPC} et des modifications de perméabilité ou d'efflux modifiant la quantité de carbapénèmes dans l'espace périplasmique.

Après avoir analysé l'expression de *bla*_{KPC} à l'échelle du gène et du transposon, nous avons voulu analyser le transcriptome entier d'un plasmide typique portant *bla*_{KPC}. La diffusion de *bla*_{KPC} est particulièrement associée à la diffusion de certains plasmides de la famille IncFII_K, dérivant de pKpQIL, premier plasmide porteur de *bla*_{KPC} à avoir été séquencé. Ces plasmides semblent particulièrement adaptés à leur hôte, le clone *K. pneumoniae* ST258.

Afin de mieux comprendre les raisons du succès de ces plasmides, nous avons étudié le transcriptome de *E. coli* TOP10 transformée par le plasmide pBIC1a. pBIC1a est un plasmide multi-réplicon IncFII_K-IncFI_B, issu de la recombinaison de plusieurs plasmides

pKpQIL-like et pKPN3. Cette analyse a permis d'identifier les gènes faiblement et fortement transcrits dans les conditions de laboratoire. Par ailleurs, l'ajout d'une forte concentration d'imipénème a eu un impact limité sur la transcription de gènes de pBIC1a alors que l'effet sur le chromosome de *E. coli* était majeur. Cette étude pose les bases de l'analyse de la biologie des plasmides multi-résistants.

Des questions persistent :

- le transcriptome du plasmide varie-t-il en fonction du fond génétique de la bactérie qui l'héberge ?
- existe-t-il des interactions et des phénomènes de régulation entre les gènes chromosomiques et plasmidiques ?

Pour tenter de répondre à ces questions, il sera intéressant d'étudier le transcriptome de pBIC1a dans son hôte préférentiel, *K. pneumoniae* BIC-1. Par ailleurs, afin d'identifier les interactions entre les gènes plasmidiques et les gènes chromosomiques, nous disposons de 2 isolats de *K. pneumoniae* ST512 (CG258) dont l'un est dépourvu du plasmide portant *bla_{KPC}*. Ce modèle est particulièrement intéressant pour explorer l'impact de la présence d'un plasmide *bla_{KPC}* positif sur le fitness des souches CG258 et les raisons de l'association CG258 et plasmides IncFII_K.

Dans la deuxième partie de cette thèse, les outils mis en place pour l'étude des entérobactéries produisant KPC ont été appliqués à l'analyse d'autres bactéries productrices de carbapénèmases.

Nous avons caractérisé la présence d'un clone de *Enterobacter kobei* appartenant au ST125 dont la céphalosporinase naturelle, ACT-28, possède une activité carbapénémase détectable par plusieurs tests de détection (Carba NP test, MalDI-TOF, rCIM), réalisés à la fois sur la souche clinique et sur les transformants *E. coli* (pTOPO-ACT28). L'étude des paramètres cinétiques de l'enzyme a mis en évidence une activité d'hydrolyse quasiment similaire à ACT-1, variant non détecté par les tests d'hydrolyse (Rapport k_{cat}/K_m pour l'imipénème augmenté d'un facteur 1,5). L'affinité d'ACT-28 pour l'imipénème semble être légèrement supérieure à celle d'ACT-1 (K_m diminué d'un facteur 2), mais cette petite différence pourrait suffire à positiver les tests de détection d'une activité carbapénémase.

Il est important de rappeler qu'il n'existe pas de critères précis et admis de tous pour établir la définition d'une carbapénèmase. Dans la classification fonctionnelle de Bush et Jacoby [36], les enzymes de la classe 2be sont considérées comme des BLSE si l'hydrolyse d'une oxyimino β -lactamine (Cefotaxime ou ceftazidime) ou de l'aztréonam atteint au minimum 10% de la capacité d'hydrolyse de la pénicilline G. Il n'est pas précisé si cette définition peut être étendue aux carbapénèmases, avec une activité catalytique pour l'un des carbapénèmes qui devrait être supérieure à 10% de l'activité vis-à-vis de la pénicilline G. En appliquant cette définition, les enzymes OXA-204, OXA-232 ne seraient plus considérées comme des carbapénèmases [62]. A l'inverse, GES-11 et GES-12 pourtant considérées comme des simples BLSE seraient des carbapénèmases [438].

Par ailleurs, hormis pour le traitement des infections causées par des souches productrices d'une carbapénèmase de type KPC, il existe peu de données sur l'efficacité clinique d'un traitement par carbapénèmes sur des souches productrices d'enzymes dont l'activité carbapénèmase est plus faible (OXA-48 et ses variants, GES...). Des échecs cliniques sont également rapportés lors de traitements de souches hyperproductrices de céphalosporinases (chromosomique ou plasmidique) par un carbapénème souvent à cause d'un défaut de perméabilité associé [439–441].

De la même façon, même si le pouvoir épidémiogène des EPC « classiques » est reconnu, les épidémies hospitalières causées par des souches du complexe *Enterobacter cloacae*, quelque soit leur phénotype de résistance aux β -lactamines, ne sont pas rares [442–444].

Pris un à un, les critères enzymologiques, cliniques et épidémiologiques ne semblent pas appropriés pour établir une définition précise d'une entérobactérie productrice de carbapénèmase. C'est la combinaison de ces critères qui pourrait être à l'origine du succès de certains clones.

Pour rappel, les EPC sont catégorisées comme des Bactéries Hautement Résistantes émergentes (BHRe) par Santé Publique France et des mesures très strictes d'hygiène doivent être mises en place afin de limiter leur diffusion aux autres patients et dans l'environnement. Il semble prématuré de considérer les souches de *E. kobei* produisant ACT-28 comme des BHRe avec la mise en place des mesures d'hygiène inhérentes à cette classification. Le développement des techniques de séquençage haut débit, devenues de plus en plus accessibles, et le suivi de l'épidémiologie des souches circulant à l'échelle

nationale et internationale permettra de conclure quant à l'émergence de certains clones. Cependant, le NGS seul ne permettra pas de statuer sur la définition commune d'une carbapénèmase.

Dans cette étude, nous avons également investigué les données de séquençage afin d'identifier le mécanisme ayant abouti à l'hyperproduction de la céphalosporinase, observée sur l'antibiogramme. Dans 5 isolats, la protéine AmpD semblait absente ou non fonctionnelle. Les mutations dans *ampD* sont les mécanismes les plus fréquemment associés à l'hyperproduction de la céphalosporinase chez les entérobactéries du groupe III [63]. Dans les génomes des 3 autres isolats, nous n'avons pas pu identifier le mécanisme moléculaire responsable de ce phénotype. Ceci souligne les limites actuelles de la mise au point de l'antibiogramme *in silico*, concept qui vise à déduire de la séquence du génome d'une bactérie sa sensibilité aux antibiotiques. Alors qu'il est plutôt facile de prédire la résistance à l'amoxicilline dans des isolats producteurs de la pénicillinase TEM-1, prédire l'effet de mutations dans des régulateurs est beaucoup plus complexe. Le polymorphisme des gènes *ampR* et *ampD* est fort et très associé au ST des souches. Il est indispensable de caractériser phénotypiquement les mutations associées au phénotype d'hyperproduction d'AmpC afin de pouvoir mettre en application les principes de l'antibiogramme *in silico*.

Le dernier objet de travail dans le cadre de cette thèse a été de caractériser une *Shewanella* sp. (souche JAB-1) productrice d'une BLSE à support génétique plasmidique et d'un nouveau variant oxacillinase codé par un gène de localisation chromosomique. L'antibiogramme réalisé sur cette souche clinique a permis d'identifier la présence d'une BLSE. Dans un deuxième temps, le séquençage a permis de reconstruire un plasmide de type IncA/C portant à la fois le gène *bla_{CTX-M-15}* et le gène *bla_{SHV-2}*. Il s'agit de la première description d'une souche de *Shewanella* sp. productrice de BLSE. Etant donné la rareté de ce phénotype, notre première hypothèse avait été que ce plasmide provenait probablement d'un échange avec l'une des entérobactéries présentes dans le même prélèvement de bile également productrices de BLSE (*E. coli* et *K. pneumoniae*). Le séquençage des 3 plasmides a finalement permis d'exclure l'hypothèse d'un transfert de plasmide entre ces 3 espèces. Comme classiquement observé chez les entérobactéries, le gène *bla_{CTX-M-15}* est associé à *ISEcp1*, mais l'analyse de l'environnement génétique dans la

Shewanella sp. JAB-1 révèle que la séquence d'insertion *ISEcp1* est tronquée par l'insertion d'une autre IS de la famille IS256. Le transposon n'est donc plus fonctionnel. L'antibiogramme n'avait pas permis de suspecter la présence d'une oxacillinase à activité carbapénèmase. C'est l'analyse du résistome de la souche qui a permis l'identification de ce nouveau variant.

Ce nouveau variant appelé OXA-535 possède une efficacité catalytique très importante vis-à-vis de l'ertapénème, mais les raisons de cette particularité par rapport aux autres variants OXA-48 sont encore à élucider. Une analyse fonctionnelle, par la création d'un mutant Ala104Thr, et une analyse structurale par cristallographie permettraient probablement d'obtenir des éléments de réponse quant aux spécificités d'hydrolyse de ce variant.

OXA-535 diffère par 3 acides aminés de OXA-436, un variant carbapénèmase codé par un gène localisé sur un plasmide (pOXA436) ayant disséminé chez quelques espèces d'entérobactéries [432]. La comparaison de l'environnement génétique des gènes *bla*_{OXA-535} et *bla*_{OXA-436} révèle la présence d'une région commune de 7,3 kb. Dans *Shewanella* sp. JAB-1, le gène *bla*_{OXA-535} semble peu exprimé, alors que les entérobactéries produisant OXA-436 possèdent des CMI élevées aux carbapénèmes, tout comme le transconjugant *E. coli* J53(pOXA436) (CMI au méropénème, à l'imipénème et à l'ertapénème de 1, 2 et 4 µg/ml respectivement) [432]. Par ailleurs, les tests de détection biochimiques (Carba NP) réalisés sur les souches cliniques produisant OXA-436 sont positifs [432]. Dans le cas des plasmides portant OXA-48 et OXA-181, c'est l'apport de séquences promotrices par des séquences d'insertion type IS1999 ou *ISEcp1* qui contribuent à la forte expression des gènes associés. Dans le cas de pOXA436, aucune IS n'est présente dans l'environnement immédiat du gène *bla*_{OXA-436}. Le phénotype de résistance aux carbapénèmes observé chez les entérobactéries produisant OXA-436 pourrait être la conséquence (i) d'une meilleure expression de la carbapénèmase due à un nombre élevé de copies du plasmide par bactérie, même si cela paraît peu probable avec un plasmide de 300kb (ii) de l'association avec d'autres mécanismes de résistance (gènes *bla*_{SHV-12}, *bla*_{OXA-10} et *bla*_{TEM-1} également présents sur pOXA-436), (iii) de la différence de promoteur liée à la présence de polymorphismes entre les deux environnements génétiques et/ou (iv) d'une meilleure efficacité catalytique d'OXA-436.

Le fragment de 7,3 kb comprenant le gène *bla*_{OXA-436} est délimité à son extrémité 5' par la présence d'une séquence d'insertion de type *ISCR1*. Un nombre croissant d'études rapporte la présence d'*ISCR* adjacentes à des gènes de résistance, renforçant l'hypothèse selon laquelle ces éléments permettent l'acquisition de résistances par mobilisation de gènes, même si ce phénomène n'a pas été démontré expérimentalement.

En reconnaissant une séquence *terIS* éloignée de sa séquence initiale, la réplication de l'*ISCR1* selon un mécanisme de type *rolling-circle* peut aboutir à la mobilisation de la séquence adjacente. Ici, un fragment de 7,3 kb provenant du chromosome d'une *Shewanella* sp. pourrait avoir été mobilisé par l'*ISCR1* sur le plasmide pOXA436. Par ailleurs, la présence de plusieurs copies d'*ISCR* dans la région du gène *bla*_{OXA-436}, est compatible avec la survenue d'événements de recombinaison homologue qui ont pu modifier l'organisation de l'environnement du gène.

Enfin, l'analyse phylogénétique des génomes de *Shewanella* spp. a permis d'identifier les souches *Shewanella* sp. MR-4, MR-7, ANA-3 et Shew256 comme très proches de *Shewanella* sp. JAB-1. Leur disposition sur l'arbre phylogénétique laisse à penser que ces 5 souches pourraient former une nouvelle espèce de *Shewanella*. La détermination de l'ANI (*Average Nucleotide Identity*) indique une identité de séquence nucléotidique allant de 93,9% à 94,6% entre les core-génomes de *Shewanella* sp. JAB-1 et des souches les plus proches. Cependant, une caractérisation biochimique poussée (détermination du profil de composition lipidique, assimilation de différentes sources de carbone...) et des analyses d'hybridation ADN-ADN manquent actuellement pour pouvoir démontrer formellement l'existence de cette nouvelle espèce.

En conclusion, au cours de cette thèse nous avons tenté de répondre à plusieurs questions sur le succès épidémique de certains clones et de certains gènes de résistance. Le premier objectif était d'analyser l'évolution d'un clone *in vivo* et de mieux comprendre son adaptation à l'hôte. L'utilisation du séquençage haut débit a permis de grandes avancées sur l'étude de la composition du microbiote digestif et sa diversité mais ce travail montre également son intérêt pour suivre l'histoire d'une population bactérienne.

Concernant l'analyse des mécanismes impliqués dans l'expression et la régulation des β -lactamases, nous nous sommes particulièrement intéressés à la carbapénémase KPC, en

raison de la complexité des structures génétiques associées et du caractère hétérogène des phénotypes de résistance. Les expériences de 5'RACE et de RNA-seq menées ont permis d'identifier la présence de plusieurs promoteurs dont le rôle diffère selon l'espèce bactérienne, et la présence d'une région non traduite pouvant être impliquée dans la régulation de l'expression du gène. Les outils développés pour KPC pourront être appliqués à l'étude d'autres β -lactamases.

Enfin, l'utilisation du séquençage haut débit nous a permis également d'identifier ACT-28 comme source de résistance aux carbapénèmes chez *E. kobei* et de comprendre l'acquisition de la BLSE CTX-M-15 dans une souche de *Shewanella* sp.

A l'heure actuelle, le NGS ne peut pas encore tout à fait remplacer les tests de sensibilité aux antibiotiques, mais il constitue un outil puissant pour la compréhension des mécanismes d'acquisition des gènes de résistance, de leur expression ainsi que pour l'étude de l'évolution bactérienne.

Références

1. Fleming A. Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* by Alexander Fleming, Reprinted from the British Journal of Experimental Pathology 10:226-236, 1929. *Rev Infect Dis* **1980**; 2:129-139.
2. Aminov R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology* **2017**; 133:4-19.
3. Rolinson GN. Forty years of beta-lactam research. *J Antimicrob Chemother* **1998**; 41:589-603.
4. Klein NC, Cunha BA. The selection and use of cephalosporins: a review. *Adv Ther* **1995**; 12:83-101.
5. Duplessis C, Crum-Cianflone NF. Ceftaroline: A New Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Clin Med Rev Ther* **2011**; 3.
6. Wright H, Bonomo RA, Paterson DL. New agents for the treatment of infections with Gram-negative bacteria: restoring the miracle or false dawn? *Clin Microbiol Infect* **2017**; 23:704-712.
7. Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am J Med* **1985**; 78:3-21.
8. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, et al. Comparative review of the carbapenems. *Drugs* **2007**; 67:1027-1052.
9. Edwards SJ, Emmas CE, Campbell HE. Systematic review comparing meropenem with imipenem plus cilastatin in the treatment of severe infections. *Curr Med Res Opin* **2005**; 21:785-794.
10. Jacoby GA, Carreras I. Activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **1990**; 34:858-862.
11. Martínez-Martínez L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect* **2008**; 14 Suppl 1:82-89.
12. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* **2002**; 34:634-640.
13. Chia JH, Siu LK, Su LH, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Taiwan: resistance due to combined CMY-2 production and porin deficiency. *J Chemother* **2009**; 21:621-626.
14. Adler M, Anjum M, Andersson DI, Sandegren L. Influence of acquired β -lactamases on the evolution of spontaneous carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **2013**; 68:51-59.
15. Bradford PA. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* **2001**; 14:933-951.
16. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother* **2009**; 63:659-667.
17. Majewski P, Wiczorek P, Ojdana D, et al. Altered Outer Membrane Transcriptome Balance with AmpC Overexpression in Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae*. *Front Microbiol* **2016**; 7:2054.
18. Wang XD, Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen G-X. Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated beta-lactamase production and OmpK36 porin deficiency. *J Med Microbiol* **2009**; 58:1196-1202.
19. Yılmaz Ç, Özcengiz G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. *Biochemical Pharmacology* **2017**; 133:43-62.
20. Cattoir V. [Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria]. *Pathol Biol* **2004**; 52:607-616.
21. Nikaido H, Takatsuka Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta* **2009**; 1794:769-781.
22. Nikaido H, Pagès J-M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **2012**; 36:340-363.
23. Ariza RR, Cohen SP, Bachhawat N, Levy SB, Demple B. Repressor mutations in the marRAB operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **1994**; 176:143-148.
24. Bialek-Davenet S, Lavigne J-P, Guyot K, et al. Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **2015**; 70:81-88.
25. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:177-183.

26. Srinivasan VB, Singh BB, Priyadarshi N, Chauhan NK, Rajamohan G. Role of Novel Multidrug Efflux Pump Involved in Drug Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *PLOS ONE* **2014**; 9:e96288.
27. Neuwirth C, Siébor E, Duez JM, Péchinot A, Kazmierczak A. Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J Antimicrob Chemother* **1995**; 36:335–342.
28. Aissa N, Mayer N, Bert F, Labia R, Lozniewski A, Nicolas-Chanoine M-H. A new mechanism to render clinical isolates of *Escherichia coli* non-susceptible to imipenem: substitutions in the PBP2 penicillin-binding domain. *J Antimicrob Chemother* **2016**; 71:76–79.
29. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis* **1988**; 10:677–678.
30. Jacoby GA. AmpC -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* **2009**; 22:161–182.
31. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet infectious diseases* **2008**; 8:159–166.
32. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46:1–11.
33. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine* **2012**; 18:263–272.
34. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, et al. Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2017**; 32:917–919.
35. Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* **1991**; 276 (Pt 1):269–270.
36. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:969–976.
37. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis* **2011**; 11:381–393.
38. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:24–38.
39. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **1989**; 33:259–263.
40. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1995**; 39:1211.
41. Joris B, Ledent P, Dideberg O, et al. Comparison of the sequences of class A beta-lactamases and of the secondary structure elements of penicillin-recognizing proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**; 35:2294–2301.
42. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* **1983**; 11:315–317.
43. Doi Y, Iovleva A, Bonomo RA. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. *J Travel Med* **2017**; 24:S44–S51.
44. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **1985**; 28:302–307.
45. Robin F, Beyrouthy R, Bonacorsi S, et al. Inventory of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in France as Assessed by a Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61.
46. Birgy A, Levy C, Bidet P, et al. ESBL-producing *Escherichia coli* ST131 versus non-ST131: evolution and risk factors of carriage among French children in the community between 2010 and 2015. *J Antimicrob Chemother* **2016**; 71:2949–2956.
47. Nicolas-Chanoine M-H, Jarlier V. Extended-spectrum β -lactamases in long-term-care facilities. *Clinical Microbiology and Infection* **2008**; 14, Supplement 1:111–116.
48. Woerther P-L, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev* **2013**; 26:744–758.
49. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* **2015**; 28:565–591.
50. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44:622–632.
51. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*

- 1993**; 37:962–969.
52. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43:573–581.
 53. Matsumoto Y, Inoue M. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43:307–313.
 54. Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, et al. A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44:3061–3068.
 55. Poirel L, Brinas L, Verlinde A, Ide L, Nordmann P. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49:3743–3748.
 56. Silva J, Aguilar C, Ayala G, et al. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44:997–1003.
 57. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **1990**; 34:2200–2209.
 58. Lee C-R, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol* **2016**; :895.
 59. Mammeri H, Guillon H, Eb F, Nordmann P. Phenotypic and Biochemical Comparison of the Carbapenem-Hydrolyzing Activities of Five Plasmid-Borne AmpC β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:4556–4560.
 60. Jeon JH, Hong MK, Lee JH, et al. Structure of ADC-68, a novel carbapenem-hydrolyzing class C extended-spectrum β -lactamase isolated from *Acinetobacter baumannii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2014**; 70:2924–2936.
 61. Kim JY, Jung HI, An YJ, et al. Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C β -lactamase. *Molecular Microbiology* **2006**; 60:907–916.
 62. Oueslati S, Nordmann P, Poirel L. Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* **2015**; 70:1059–1063.
 63. Guérin F, Isnard C, Cattoir V, Giard JC. Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated β -Lactam Resistance in *Enterobacter cloacae* Complex. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59:7753–7761.
 64. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* **2009**; 22:582–610.
 65. Hossain A, Reisbig MD, Hanson ND. Plasmid-encoded functions compensate for the biological cost of AmpC overexpression in a clinical isolate of *Salmonella typhimurium*. *J Antimicrob Chemother* **2004**; 53:964–970.
 66. Doloy A, Verdet C, Gautier V, et al. Genetic Environment of Acquired blaACC-1 -Lactamase Gene in Enterobacteriaceae Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2006**; 50:4177–4181.
 67. Song JS, Jang SJ, Lee JJ, et al. Association of the bla(CMY-10) gene with a novel complex class 1 integron carrying an ISCR1 element in clinical isolates from Korea. *Clin Microbiol Infect* **2010**; 16:1013–1017.
 68. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev* **2006**; 70:296–316.
 69. Miriagou V, Tzouveleki LS, Villa L, et al. CMY-13, a novel inducible cephalosporinase encoded by an *Escherichia coli* plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48:3172–3174.
 70. Siu LK, Lu P-L, Chen J-Y, Lin FM, Chang S-C. High-level expression of ampC beta-lactamase due to insertion of nucleotides between -10 and -35 promoter sequences in *Escherichia coli* clinical isolates: cases not responsive to extended-spectrum-cephalosporin treatment. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47:2138–2144.
 71. Jaurin B, Normark S. Insertion of IS2 creates a novel ampC promoter in *Escherichia coli*. *Cell* **1983**; 32:809–816.
 72. Mulvey MR, Bryce E, Boyd DA, et al. Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49:358–365.
 73. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* **2007**; 20:440–458, table of contents.
 74. Felici A, Amicosante G, Oratore A, et al. An overview of the kinetic parameters of class B beta-lactamases. *Biochem J* **1993**; 291 (Pt 1):151–155.
 75. Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **1990**;

- 34:755–758.
76. Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**; 91:7693–7697.
 77. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **1994**; 38:71–78.
 78. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* **2002**; 8:321–331.
 79. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical Infectious Diseases* **2017**; Available at: <http://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/cix893/4554446>. Accessed 30 November 2017.
 80. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45:2598–2603.
 81. Kotsakis SD, Miriagou V, Tzelepi E, Tzouveleki LS. Comparative biochemical and computational study of the role of naturally occurring mutations at Ambler positions 104 and 170 in GES β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:4864–4871.
 82. Moubareck C, Brémont S, Conroy M-C, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53:3579–3581.
 83. Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar J-R, Poirel L. Carbapenem-Hydrolyzing GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55:349–354.
 84. Jeong SH, Bae IK, Kim D, et al. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum beta-lactamases in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49:4809–4810.
 85. Bonnin RA, Jousset AB, Urvoy N, et al. Detection of GES-5 Carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*, a Newcomer in France. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61.
 86. Kim J, Hong SG, Bae IK, et al. Emergence of *Escherichia coli* sequence type ST131 carrying both the blaGES-5 and blaCTX-M-15 genes. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55:2974–2975.
 87. Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53:3908–3913.
 88. Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H, et al. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**; 57:396–401.
 89. Bogaerts P, Naas T, El Garch F, et al. GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:4872–4878.
 90. Labuschagne CDJ, Weldhagen GF, Ehlers MM, Dove MG. Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *Int J Antimicrob Agents* **2008**; 31:527–530.
 91. Manageiro V, Ferreira E, Cougnoux A, Albuquerque L, Caniça M, Bonnet R. Characterization of the inhibitor-resistant SHV β -lactamase SHV-107 in a clinical *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing GES-7 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:1042–1046.
 92. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother* **2002**; 49:561–565.
 93. Viedma E, Juan C, Acosta J, et al. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53:4930–4933.
 94. Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouveleki LS. Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **2004**; 234:209–213.
 95. Wachino J, Doi Y, Yamane K, et al. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A beta-lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48:2905–2910.
 96. Wang J, Zhou J, Qu T, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals. *Int J Antimicrob Agents* **2010**; 35:486–491.
 97. Kanayama A, Kawahara R, Yamagishi T, et al. Successful control of an outbreak of GES-5 extended-spectrum β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a long-term care facility in Japan. *J Hosp*

- Infect **2016**; 93:35–41.
98. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infect Genet Evol* **2012**; 12:883–893.
 99. Kotsakis SD, Papagiannitsis CC, Tzelepi E, Legakis NJ, Miriagou V, Tzouveleki LS. GES-13, a beta-lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:1331–1333.
 100. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, et al. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* **1996**; 40:2080–2086.
 101. Naas T, Dortet L, Iorga BI. Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Curr Drug Targets* **2016**; 17:1006–1028.
 102. Miltgen G, Bonnin RA, Avril C, et al. Outbreak of IMI-1 Carbapenemase-producing colistin-resistant *Enterobacter cloacae* on the French island of Mayotte (Indian Ocean). *Int J Antimicrob Agents* **2018**;
 103. Zhang F, Wang X, Xie L, et al. A novel transposon, Tn 6306, mediates the spread of bla IMI in Enterobacteriaceae in hospitals. *International Journal of Infectious Diseases* **2017**; 65:22–26.
 104. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45:1151–1161.
 105. Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* **2003**; 51:711–714.
 106. Palzkill T. Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases. *Front Mol Biosci* **2018**; 5:16.
 107. Levitt PS, Papp-Wallace KM, Taracila MA, et al. Exploring the role of a conserved class A residue in the Ω -Loop of KPC-2 β -lactamase: a mechanism for ceftazidime hydrolysis. *J Biol Chem* **2012**; 287:31783–31793.
 108. Oueslati S, Iorga BI, Tlili L, et al. Biochemical characterization of KPC-28, a KPC-2 variant without carbapenemase activity but resistant to ceftazidime-avibactam.
 109. Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Goren MG, Ofek I, Navon-Venezia S. Molecular Epidemiology, Sequence Types, and Plasmid Analyses of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:3002–3006.
 110. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53:818–820.
 111. Kontopoulou K, Protonotariou E, Vasilakos K, et al. Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. *J Hosp Infect* **2010**; 76:70–73.
 112. Mavroidi A, Miriagou V, Malli E, et al. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 410 (ST410) with KPC-2 β -lactamase. *Int J Antimicrob Agents* **2012**; 39:247–250.
 113. Bratu S, Brooks S, Burney S, et al. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. *Clin Infect Dis* **2007**; 44:972–975.
 114. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53:3365–3370.
 115. Le J, Castanheira M, Burgess DS, McKee B, Iqbal R, Jones RN. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase KPC-3 in Long Beach, California. *J Clin Microbiol* **2010**; 48:623–625.
 116. Woodford N, Tierno PM, Young K, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48:4793–4799.
 117. Cuzon G, Naas T, Correa A, Quinn JP, Villegas M-V, Nordmann P. Dissemination of the KPC-2 carbapenemase in non-*Klebsiella pneumoniae* enterobacterial isolates from Colombia. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2013**; 42:59–62.
 118. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends in Microbiology* **2014**; 22:686–696.
 119. Gomez SA, Pasteran FG, Faccone D, et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect* **2011**; 17:1520–1524.
 120. Cuzon G, Naas T, Villegas M-V, Correa A, Quinn JP, Nordmann P. Wide Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing β -Lactamase blaKPC-2 Gene in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**; 55:5350–5353.
 121. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, et al. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M)

- among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55:3579–3583.
122. Cuzon G, Naas T, Demachy M-C, Nordmann P. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* harbouring blaKPC-3 in France subsequent to a patient transfer from Italy. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2012**; 39:448–449.
 123. Steinmann J, Kaase M, Gatermann S, et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. *Euro Surveill* **2011**; 16.
 124. Bedenić B, Mazzariol A, Plečko V, et al. First report of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *J Chemother* **2012**; 24:237–239.
 125. Bogaerts P, Montesinos I, Rodriguez-Villalobos H, Blairon L, Deplano A, Glupczynski Y. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Belgium. *J Antimicrob Chemother* **2010**; 65:361–362.
 126. Osterblad M, Kirveskari J, Koskela S, et al. First isolations of KPC-2-carrying ST258 *Klebsiella pneumoniae* strains in Finland, June and August 2009. *Euro Surveill* **2009**; 14.
 127. Mammaia C, Bonura C, Di Bernardo F, et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Euro Surveill* **2012**; 17.
 128. Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S, et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother* **2009**; 63:654–658.
 129. Baraniak A, Izdebski R, Herda M, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53:4565–4567.
 130. Poirel L, Lienhard R, Potron A, Malinverni R, Siegrist HH, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Switzerland. *J Antimicrob Chemother* **2011**; 66:675–676.
 131. Morris D, Boyle F, Morris C, et al. Inter-hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 carbapenemase in Ireland. *J Antimicrob Chemother* **2012**; 67:2367–2372.
 132. Robustillo Rodela A, Díaz-Agero Pérez C, Sanchez Sagrado T, Ruiz-Garbajosa P, Pita López MJ, Monge V. Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: control measures. *Euro Surveill* **2012**; 17.
 133. Potron A, Poirel L, Verdavaine D, Nordmann P. Importation of KPC-2-producing *Escherichia coli* from India. *J Antimicrob Chemother* **2012**; 67:242–243.
 134. Balm MND, Ngan G, Jureen R, Lin RTP, Teo J. Molecular characterization of newly emerged blaKPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. *J Clin Microbiol* **2012**; 50:475–476.
 135. Goldfarb D, Harvey S-B, Jessamine K, Jessamine P, Toye B, Desjardins M. Detection of plasmid-mediated KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ottawa, Canada: evidence of intrahospital transmission. *J Clin Microbiol* **2009**; 47:1920–1922.
 136. Brink AJ, Coetzee J, Clay CG, et al. Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) in South Africa. *J Clin Microbiol* **2012**; 50:525–527.
 137. Findlay J, Hopkins KL, Doumith M, et al. KPC enzymes in the UK: an analysis of the first 160 cases outside the North-West region. *J Antimicrob Chemother* **2016**; 71:1199–1206.
 138. Azimi L, Rastegar Lari A, Alaghebandan R, Alinejad F, Mohammadpoor M, Rahbar M. KPC-producer gram negative bacteria among burned infants in Motahari Hospital, Tehran: first report from Iran. *Ann Burns Fire Disasters* **2012**; 25:74–77.
 139. Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional Characterization of Tn4401, a Tn3-Based Transposon Involved in blaKPC Gene Mobilization. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55:5370–5373.
 140. Naas T, Cuzon G, Truong H-V, Nordmann P. Role of ISKpn7 and Deletions in blaKPC Gene Expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2012**; 56:4753–4759.
 141. Partridge SR. Tn4401 carrying blaKPC is inserted within another insertion in pKpQIL and related plasmids. *J Clin Microbiol* **2014**; 52:4448–4449.
 142. Montaña S, Hernandez M, Fernandez JS, et al. Molecular characterization of KPC-2-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates from a neurosurgical centre in Argentina. *New Microbes and New Infections* **2018**; 24:32–34.
 143. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Diseases* **2009**; 9:228–236.
 144. Cheruvanky A, Stoesser N, Sheppard AE, et al. Enhanced *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Expression from a Novel Tn4401 Deletion. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61.
 145. García-Fernández A, Villa L, Carta C, et al. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:2143–2145.
 146. Chen L, Chavda KD, Melano RG, et al. Comparative Genomic Analysis of KPC-Encoding pKpQIL-Like

- Plasmids and Their Distribution in New Jersey and New York Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2014**; 58:2871–2877.
147. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59:5873–5884.
 148. Leavitt A, Chmelnitsky I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:4493–4496.
 149. Roth AL, Kurpiel PM, Lister PD, Hanson ND. *bla*_{KPC} RNA Expression Correlates with Two Transcriptional Start Sites but Not Always with Gene Copy Number in Four Genera of Gram-Negative Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**; 55:3936–3938.
 150. Adams-Sapper S, Nolen S, Donzelli GF, et al. Rapid induction of high-level carbapenem resistance in heteroresistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; :AAC.05100-14.
 151. Pournaras S, Kristo I, Vrioni G, et al. Characteristics of Meropenem Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Clinical Isolates of *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **2010**; 48:2601–2604.
 152. Deleo FR, Chen L, Porcella SF, et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **2014**; 111:4988–4993.
 153. Chen L, Chavda KD, Mediavilla JR, et al. Multiplex Real-Time PCR for Detection of an Epidemic KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 Clone. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:3444–3447.
 154. Brisse S, Fevre C, Passet V, et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS ONE* **2009**; 4:e4982.
 155. Chen L, Mathema B, Pitout JDD, DeLeo FR, Kreiswirth BN. Epidemic *Klebsiella pneumoniae* ST258 Is a Hybrid Strain. *mBio* **2014**; 5:e01355-14-e01355-14.
 156. Deschamps C, Clermont O, Hipeaux MC, Arlet G, Denamur E, Branger C. Multiple acquisitions of CTX-M plasmids in the rare D2 genotype of *Escherichia coli* provide evidence for convergent evolution. *Microbiology (Reading, Engl)* **2009**; 155:1656–1668.
 157. Tzouveleakis LS, Miriagou V, Kotsakis SD, et al. KPC-Producing, Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 as a Typical Opportunistic Pathogen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2013**; 57:5144–5146.
 158. Croucher NJ, Klugman KP. The Emergence of Bacterial “Hopeful Monsters”. *mBio* **2014**; 5. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4128365/>. Accessed 22 April 2017.
 159. Yu F, Ying Q, Chen C, et al. Outbreak of pulmonary infection caused by *Klebsiella pneumoniae* isolates harbouring *bla*_{IMP-4} and *bla*_{DHA-1} in a neonatal intensive care unit in China. *J Med Microbiol* **2012**; 61:984–989.
 160. Yan J-J, Tsai L-H, Wu J-J. Emergence of the IMP-8 metallo- β -lactamase in the *Escherichia coli* ST131 clone in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* **2012**; 40:281–282.
 161. Shiroto K, Ishii Y, Kimura S, et al. Metallo-beta-lactamase IMP-1 in *Providencia rettgeri* from two different hospitals in Japan. *J Med Microbiol* **2005**; 54:1065–1070.
 162. Hamada Y, Watanabe K, Tada T, et al. Three cases of IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* bloodstream infection in Japan. *J Infect Chemother* **2013**; 19:956–958.
 163. Biendo M, Canarelli B, Thomas D, et al. Successive emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacter aerogenes* isolates in a university hospital. *J Clin Microbiol* **2008**; 46:1037–1044.
 164. Martínez T, Vázquez GJ, Aquino EE, Ramírez-Ronda R, Robledo IE. First report of a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate co-harboring KPC-2 and IMP-18 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents* **2012**; 39:542–543.
 165. Pournaras S, Köck R, Mossialos D, et al. Detection of a phylogenetically distinct IMP-type metallo- β -lactamase, IMP-35, in a CC235 *Pseudomonas aeruginosa* from the Dutch-German border region (Euregio). *J Antimicrob Chemother* **2013**; 68:1271–1276.
 166. Koh TH, Sng L-H, Wang GCY, Hsu L-Y, Zhao Y. IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 59:627–632.
 167. Yamamoto M, Nagao M, Matsumura Y, et al. Interspecies dissemination of a novel class 1 integron carrying *bla*_{IMP-19} among *Acinetobacter* species in Japan. *J Antimicrob Chemother* **2011**; 66:2480–2483.
 168. Yamamoto M, Nagao M, Hotta G, et al. Molecular characterization of IMP-type metallo- β -lactamases among multidrug-resistant *Achromobacter xylosoxidans*. *J Antimicrob Chemother* **2012**; 67:2110–2113.
 169. Shet V, Gouliouris T, Brown NM, Turton JF, Zhang J, Woodford N. IMP metallo- β -lactamase-producing

- clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in the UK. *J Antimicrob Chemother* **2011**; 66:1408–1409.
170. Jeannot K, Poirel L, Robert-Nicoud M, Cholley P, Nordmann P, Plésiat P. IMP-29, a novel IMP-type metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:2187–2190.
 171. Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infect Dis* **2012**; 12:176.
 172. Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla(IMP) allele, bla(IMP-7). *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46:255–258.
 173. Limbago BM, Rasheed JK, Anderson KF, et al. IMP-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States. *J Clin Microbiol* **2011**; 49:4239–4245.
 174. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* **2005**; 41:1549–1556.
 175. Sekyere JO, Govinden U, Essack S. The Molecular Epidemiology and Genetic Environment of Carbapenemases Detected in Africa. *Microb Drug Resist* **2016**; 22:59–68.
 176. Pagani L, Colinon C, Migliavacca R, et al. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo-beta-lactamase. *J Clin Microbiol* **2005**; 43:3824–3828.
 177. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, et al. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**; 39:1612–1615.
 178. Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* **2002**; 3:117–127.
 179. Toleman MA, Biedenbach D, Bennett DMC, Jones RN, Walsh TR. Italian metallo-beta-lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* **2005**; 55:61–70.
 180. Espedido BA, Partridge SR, Iredell JR. bla(IMP-4) in different genetic contexts in Enterobacteriaceae isolates from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52:2984–2987.
 181. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43:1584–1590.
 182. Poirel L, Naas T, Nicolas D, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44:891–897.
 183. Loli A, Tzouveleki LS, Gianneli D, Tzelepi E, Miriagou V. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* with chromosomally encoded VIM-1 undetectable by imipenem-EDTA synergy tests. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52:1894–1896.
 184. Tsakris A, Poulou A, Markou F, et al. Dissemination of clinical isolates of *Klebsiella oxytoca* harboring CMY-31, VIM-1, and a New OXY-2-type variant in the community. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55:3164–3168.
 185. Sianou E, Kristo I, Petridis M, et al. A cautionary case of microbial solidarity: concurrent isolation of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* from an infected wound. *J Antimicrob Chemother* **2012**; 67:244–246.
 186. Galani I, Souli M, Koratzanis E, Koratzanis G, Chryssouli Z, Giamarellou H. Emerging bacterial pathogens: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis* clinical isolates harbouring the same transferable plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1 in Greece. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 59:578–579.
 187. Miriagou V, Tzouveleki LS, Flevari K, Tsakiri M, Douzinas EE. *Providencia stuartii* with VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 60:183–184.
 188. Nastro M, Monge R, Zintgraff J, et al. First nosocomial outbreak of VIM-16-producing *Serratia marcescens* in Argentina. *Clin Microbiol Infect* **2013**; 19:617–619.
 189. Zioga A, Miriagou V, Tzelepi E, et al. The ongoing challenge of acquired carbapenemases: a hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* simultaneously producing VIM-1 and KPC-2. *Int J Antimicrob Agents* **2010**; 36:190–191.
 190. Sánchez-Romero I, Asensio A, Oteo J, et al. Nosocomial outbreak of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of multilocus sequence type 15: molecular basis, clinical risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:420–427.
 191. Santos C, Caetano T, Ferreira S, Mendo S. Tn5090-like class 1 integron carrying bla(VIM-2) in a *Pseudomonas putida* strain from Portugal. *Clin Microbiol Infect* **2010**; 16:1558–1561.
 192. Kamali-Moghaddam M, Sundström L. Arrayed transposase-binding sequences on the ends of transposon Tn5090/Tn402. *Nucleic Acids Res* **2001**; 29:1005–1011.

193. Lagatolla C, Edalucci E, Dolzani L, et al. Molecular evolution of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a nosocomial setting of high-level endemicity. *J Clin Microbiol* **2006**; 44:2348–2353.
194. Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R. Dispersal of carbapenemase blaVIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:320–327.
195. Tseng S-P, Hsueh P-R, Tsai J-C, Teng L-J. Tn6001, a transposon-like element containing the blaVIM-3-harboring integron In450. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51:4187–4190.
196. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53:5046–5054.
197. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* **2010**; 10:597–602.
198. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* **2011**; 19:588–595.
199. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Diseases* **2011**; 11:355–362.
200. Savard P, Gopinath R, Zhu W, et al. First NDM-positive *Salmonella* sp. strain identified in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55:5957–5958.
201. Darley E, Weeks J, Jones L, et al. NDM-1 polymicrobial infections including *Vibrio cholerae*. *Lancet* **2012**; 380:1358.
202. Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N. Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis* **2011**; 11:164.
203. Kieffer N, Nordmann P, Aires-de-Sousa M, Poirel L. High Prevalence of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae among Hospitalized Children in Luanda, Angola. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**; 60:6189–6192.
204. Singh-Moodley A, Perovic O. Antimicrobial susceptibility testing in predicting the presence of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae in South Africa. *BMC Infect Dis* **2016**; 16:536.
205. Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *J Antimicrob Chemother* **2011**; 66:1255–1259.
206. Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, et al. Emergence of NDM-1 metallo-β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55:3929–3931.
207. Roy S, Singh AK, Viswanathan R, Nandy RK, Basu S. Transmission of imipenem resistance determinants during the course of an outbreak of NDM-1 *Escherichia coli* in a sick newborn care unit. *J Antimicrob Chemother* **2011**; 66:2773–2780.
208. Lowe CF, Kus JV, Salt N, et al. Nosocomial transmission of New Delhi metallo-β-lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Toronto, Canada. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2013**; 34:49–55.
209. Koo VSW, O'Neill P, Elves A. Multidrug-resistant NDM-1 *Klebsiella* outbreak and infection control in endoscopic urology. *BJU Int* **2012**; 110:E922-926.
210. Gaibani P, Ambretti S, Berlingeri A, et al. Outbreak of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in northern Italy, July to August 2011. *Euro Surveill* **2011**; 16:20027.
211. Heinrichs A, Argudín MA, De Mendonça R, et al. An outpatient clinic as a potential site of transmission for an outbreak of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* ST716: a study using whole-genome sequencing. *Clin Infect Dis* **2018**;
212. Decousser JW, Jansen C, Nordmann P, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Euro Surveill* **2013**; 18.
213. Cheng Z, Thomas PW, Ju L, et al. Evolution of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM) in the clinic: effects of NDM mutations on stability, zinc affinity, mono-zinc activity. *Journal of Biological Chemistry* **2018**; :jbc.RA118.003835.
214. Bonnin RA, Poirel L, Nordmann P. New Delhi metallo-β-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*: a novel paradigm for spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiol* **2014**; 9:33–41.
215. Poirel L, Bonnin RA, Boulanger A, Schrenzel J, Kaase M, Nordmann P. Tn125-related acquisition of blaNDM-like genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:1087–1089.
216. Dortet L, Nordmann P, Poirel L. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:1693–1697.
217. Dortet L, Girlich D, Virlovet A-L, et al. Characterization of BRPMBL, the Bleomycin Resistance Protein

- Associated with the Carbapenemase NDM. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61.
218. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* **2002**; 50:673–679.
 219. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* **2005**; 56:1148–1151.
 220. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* **2003**; 52:699–702.
 221. Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:582.
 222. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48:4654–4661.
 223. Yong D, Toleman MA, Bell J, et al. Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo- β -lactamase gene, blaAIM-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:6154–6159.
 224. Poirel L, Rodríguez-Martínez J-M, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:2420–2424.
 225. Lee K, Yum JH, Yong D, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49:4485–4491.
 226. Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52:4194–4197.
 227. Wachino J, Yoshida H, Yamane K, et al. SMB-1, a novel subclass B3 metallo-beta-lactamase, associated with ISCR1 and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55:5143–5149.
 228. Pollini S, Maradei S, Pecile P, et al. FIM-1, a new acquired metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**; 57:410–416.
 229. El Salabi A, Borra PS, Toleman MA, Samuelsen Ø, Walsh TR. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo- β -lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:2241–2245.
 230. Suzuki S, Matsui M, Suzuki M, et al. Detection of tripoli metallo- β -lactamase 2 (TMB-2), a variant of blaTMB-1, in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. in Japan. *J Antimicrob Chemother* **2013**; 68:1441–1442.
 231. Gauthier L, Dortet L, Jousset AB, et al. Molecular characterization of plasmid-encoded Tripoli MBL 1 (TMB-1) in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* **2018**;
 232. Afzal-Shah M, Villar HE, Livermore DM. Biochemical characteristics of a carbapenemase from an *Acinetobacter baumannii* isolate collected in Buenos Aires, Argentina. *J Antimicrob Chemother* **1999**; 43:127–131.
 233. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infect Dis* **2010**; 16:35–40.
 234. Chen Z, Liu W, Zhang Y, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from XiangYa Hospital, in Hunan Province, China. *J Basic Microbiol* **2013**; 53:121–127.
 235. Saule M, Samuelsen Ø, Dumpis U, et al. Dissemination of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to international clone II/sequence type 2 and harboring a novel AbaR4-like resistance island in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**; 57:1069–1072.
 236. Zarrilli R, Di Popolo A, Bagattini M, et al. Clonal spread and patient risk factors for acquisition of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit in Italy. *J Hosp Infect* **2012**; 82:260–265.
 237. Bonnet R, Marchandin H, Chanal C, et al. Chromosome-encoded class D beta-lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46:2004–2006.
 238. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48:15–22.
 239. Aktaş Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* **2008**; 54:101–106.

240. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang T-D, Nordmann P. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52:3463–3464.
241. Cuzon G, Naas T, Lesenne A, Benhamou M, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents* **2010**; 36:91–93.
242. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother* **2009**; 64 Suppl 1:i29-36.
243. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52:2950–2954.
244. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical Microbiology and Infection* **2014**; 20:821–830.
245. Moquet O, Bouchiat C, Kinana A, et al. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. *Emerging Infect Dis* **2011**; 17:143–144.
246. Brink AJ, Coetzee J, Corcoran C, et al. Emergence of OXA-48 and OXA-181 carbapenemases among Enterobacteriaceae in South Africa and evidence of in vivo selection of colistin resistance as a consequence of selective decontamination of the gastrointestinal tract. *J Clin Microbiol* **2013**; 51:369–372.
247. Lixandru BE, Cotar AI, Straut M, et al. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Romania: A Six-Month Survey. *PLoS ONE* **2015**; 10:e0143214.
248. Fursova NK, Astashkin EI, Knyazeva AI, et al. The spread of bla OXA-48 and bla OXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **2015**; 14:46.
249. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. Characterization of OXA-181, a Carbapenem-Hydrolyzing Class D -Lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**; 55:4896–4899.
250. Potron A, Nordmann P, Poirel L. Characterization of OXA-204, a Carbapenem-Hydrolyzing Class D -Lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2013**; 57:633–636.
251. Potron A, Rondinaud E, Poirel L, et al. Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2013**; 41:325–329.
252. Magagnin CM, Rozales FP, Antochévis L, et al. Dissemination of bla OXA-370 gene among several Enterobacteriaceae species in Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2017**; 36:1907–1910.
253. Aubert D, Naas T, Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Functional Characterization of IS1999, an IS4 Family Element Involved in Mobilization and Expression of β -Lactam Resistance Genes. *J Bacteriol* **2006**; 188:6506–6514.
254. Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne J-P, Touati A. OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2018**; 37:587–604.
255. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**; 58:467–471.
256. Potel C, Ortega A, Martínez-Lamas L, Bautista V, Regueiro B, Oteo J. Interspecies Transmission of the bla_{OXA-48} Gene from a *Klebsiella pneumoniae* High-Risk Clone of Sequence Type 147 to Different *Escherichia coli* Clones in the Gut Microbiota. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2017**; 62. Available at: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01699-17>. Accessed 10 August 2018.
257. Beyrouthy R, Robin F, Delmas J, et al. IS1R-mediated plasticity of Incl/M plasmids leads to the insertion of bla OXA-48 into the *Escherichia coli* Chromosome. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**; 58:3785–3790.
258. Turton JF, Doumith M, Hopkins KL, Perry C, Meunier D, Woodford N. Clonal expansion of *Escherichia coli* ST38 carrying chromosomally-integrated OXA-48 carbapenemase gene. *J Med Microbiol* **2016**;
259. Patel G, Bonomo RA. ‘Stormy waters ahead’: global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol* **2013**; 4:48.
260. Sampaio JLM, Ribeiro VB, Campos JC, et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**; 58:3566–3567.
261. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Origin of OXA-181, an Emerging Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase, as a Chromosomal Gene in *Shewanella xiamenensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**; 55:4405–4407.
262. Nakano R, Okamoto R, Nagano N, Inoue M. Resistance to gram-negative organisms due to high-level

- expression of plasmid-encoded ampC beta-lactamase bla_{CMY-4} promoted by insertion sequence ISEcp1. *J Infect Chemother* **2007**; 13:18–23.
263. Poirel L, Decousser J-W, Nordmann P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47:2938–2945.
 264. Ceccarelli D, van Essen-Zandbergen A, Veldman KT, Tafro N, Haenen O, Mevius DJ. Chromosome-Based bla_{OXA-48}-Like Variants in *Shewanella* Species Isolates from Food-Producing Animals, Fish, and the Aquatic Environment. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61:e01013-16.
 265. Poirel L, Héritier C, Nordmann P. Chromosome-Encoded Ambler Class D β -Lactamase of *Shewanella oneidensis* as a Progenitor of Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48:348–351.
 266. Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Genetic and Biochemical Characterization of a Chromosome-Encoded Carbapenem-Hydrolyzing Ambler Class D β -Lactamase from *Shewanella* algae. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48:1670–1675.
 267. Tacao M, Correia A, Henriques I. Environmental *Shewanella xiamenensis* Strains That Carry bla_{OXA-48} or bla_{OXA-204} Genes: Additional Proof for bla_{OXA-48}-Like Gene Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2013**; 57:6399–6400.
 268. Zong Z. Discovery of bla_{OXA-199}, a Chromosome-Based bla_{OXA-48}-Like Variant, in *Shewanella xiamenensis*. *PLOS ONE* **2012**; 7:e48280.
 269. Antonelli A, Di Palo DM, Galano A, et al. Intestinal carriage of *Shewanella xiamenensis* simulating carriage of OXA-48-producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2015**; 82:1–3.
 270. Tacão M, Araújo S, Vendas M, Alves A, Henriques I. *Shewanella* species as the origin of bla_{OXA-48} genes: insights into gene diversity, associated phenotypes and possible transfer mechanisms. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2017**; 17:30222–4.
 271. Doi Y, Paterson DL. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Semin Respir Crit Care Med* **2015**; 36:74–84.
 272. Fattouh R, Tijet N, McGeer A, Poutanen SM, Melano RG, Patel SN. What Is the Appropriate Meropenem MIC for Screening of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Low-Prevalence Settings? *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 60:1556–1559.
 273. Haldorsen B, Giske CG, Hansen DS, et al. Performance of the EUCAST disc diffusion method and two MIC methods in detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to meropenem: the NordicAST CPE study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2018**; Available at: <https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dky276/5058071>. Accessed 11 August 2018.
 274. Woodford N, Eastaway AT, Ford M, et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* **2010**; 48:2999–3002.
 275. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases* **2012**; 18:1503–1507.
 276. van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect* **2014**; 20:345–349.
 277. Huang T-D, Poirel L, Bogaerts P, Berhin C, Nordmann P, Glupczynski Y. Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. *J Antimicrob Chemother* **2014**; 69:445–450.
 278. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. *PLoS ONE* **2015**; 10:e0123690.
 279. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, et al. Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* **2017**; 55:2321–2333.
 280. Muntean M-M, Muntean A-A, Gauthier L, et al. Evaluation of the rapid carbapenem inactivation method (rCIM): a phenotypic screening test for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2018**; 73:900–908.
 281. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, et al. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* **2016**; 71:1217–1222.
 282. Bernabeu S, Dortet L, Naas T. Evaluation of the β -CARBATM test, a colorimetric test for the rapid

- detection of carbapenemase activity in Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* **72**:1646–1658.
283. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**; **57**:4578–4580.
 284. Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **2011**; **49**:3222–3227.
 285. Lasserre C, Martin LDS, Cuzon G, et al. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J Clin Microbiol* **2015**; **53**:2163–2171.
 286. Kohlmann R, Hoffmann A, Geis G, Gatermann S. MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *International Journal of Medical Microbiology* **2015**; **305**:469–479.
 287. Lau AF, Wang H, Weingarten RA, et al. A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* **2014**; **52**:2804–2812.
 288. Gaibani P, Galea A, Fagioni M, Ambretti S, Sambri V, Landini MP. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **2016**; **54**:2609–2613.
 289. Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Momin MHFA. Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay (OXA-48 K-SeT) for Rapid Detection of OXA-48-Like Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* **2016**; **54**:471–473.
 290. Glupczynski Y, Jousset A, Evrard S, et al. Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* **2017**; **72**:1955–1960.
 291. Boutal H, Vogel A, Bernabeu S, et al. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2018**; Available at: <http://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dkx521/4819243>. Accessed 28 January 2018.
 292. Hopkins KL, Meunier D, Naas T, Volland H, Woodford N. Evaluation of the NG-Test CARBA 5 multiplex immunochromatographic assay for the detection of KPC, OXA-48-like, NDM, VIM and IMP carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* **2018**;
 293. Dortet L, Fusaro M, Naas T. Improvement of the Xpert Carba-R Kit for the Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**; **60**:3832–3837.
 294. Oueslati S, Girlich D, Dortet L, Naas T. Evaluation of the Amplidiag CarbaR+VRE Kit for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Bacteria. *J Clin Microbiol* **2018**; **56**.
 295. Huang T-D, Bogaerts P, Ghilani E, et al. Multicentre evaluation of the Check-Direct CPE® assay for direct screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from rectal swabs. *J Antimicrob Chemother* **2015**; **70**:1669–1673.
 296. Hoyos-Mallecot Y, Ouzani S, Dortet L, Fortineau N, Naas T. Performance of the Xpert(®) Carba-R v2 in the daily workflow of a hygiene unit in a country with a low prevalence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* **2017**; **49**:774–777.
 297. Tischendorf J, de Avila RA, Safdar N. Risk of infection following colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A systematic review. *Am J Infect Control* **2016**; **44**:539–543.
 298. Duin D van, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence* **2016**; **0**:1–10.
 299. Dautzenberg MJD, Ossewaarde JM, de Greeff SC, Troelstra A, Bonten MJM. Risk factors for the acquisition of OXA-48-producing Enterobacteriaceae in a hospital outbreak setting: a matched case-control study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2016**; **71**:2273–2279.
 300. van der Bij AK, Pitout JDD. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* **2012**; **67**:2090–2100.
 301. Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, et al. High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae After Travel to the Tropics. *Clin Infect Dis* **2015**; **61**:593–600.
 302. Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, et al. Acquisition of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by healthy travellers to India, France, February 2012 to March 2013. *Euro Surveill* **2014**; **19**.
 303. Kelly AM, Mathema B, Larson EL. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *Int J Antimicrob Agents* **2017**;
 304. Djenadi K, Zhang L, Murray AK, Gaze WH. Carbapenem resistance in bacteria isolated from soil and

- water environments in Algeria. *J Glob Antimicrob Resist* **2018**;
305. Potron A, Poirel L, Bussy F, Nordmann P. Occurrence of the Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase Gene blaOXA-48 in the Environment in Morocco. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55:5413–5414.
 306. Diab M, Hamze M, Bonnet R, Saras E, Madec J-Y, Haenni M. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in water sources in Lebanon. *Vet Microbiol* **2018**; 217:97–103.
 307. Caltagirone M, Nucleo E, Spalla M, et al. Occurrence of Extended Spectrum β -Lactamases, KPC-Type, and MCR-1.2-Producing Enterobacteriaceae from Wells, River Water, and Wastewater Treatment Plants in Oltrepò Pavese Area, Northern Italy. *Front Microbiol* **2017**; 8:2232.
 308. Jin L, Wang R, Wang X, et al. Emergence of mcr-1 and carbapenemase genes in hospital sewage water in Beijing, China. *J Antimicrob Chemother* **2018**; 73:84–87.
 309. de Araujo CFM, Silva DM, Carneiro MT, et al. Detection of Carbapenemase Genes in Aquatic Environments in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**; 60:4380–4383.
 310. Amit S, Mishali H, Kotlovsky T, Schwaber MJ, Carmeli Y. Bloodstream infections among carriers of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: etiology, incidence and predictors. *Clin Microbiol Infect* **2015**; 21:30–34.
 311. Balkan II, Aygün G, Aydın S, et al. Blood stream infections due to OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: treatment and survival. *Int J Infect Dis* **2014**; 26:51–56.
 312. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouvelekis LS, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**; 58:2322–2328.
 313. Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Emerging Infect Dis* **2014**; 20:1170–1175.
 314. Tamma PD, Goodman KE, Harris AD, et al. Comparing the Outcomes of Patients with Carbapenemase-Producing and Non-Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Bacteremia. *Clin Infect Dis* **2016**; :ciw741.
 315. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* **2012**; 55:943–950.
 316. Zimmerman FS, Assous MV, Bdolah-Abram T, Lachish T, Yinnon AM, Wiener-Well Y. Duration of carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae following hospital discharge. *American Journal of Infection Control* **2013**; 41:190–194.
 317. Feldman N, Adler A, Molshatzki N, et al. Gastrointestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* following hospital discharge: duration of carriage and risk factors for persistent carriage. *Clinical Microbiology and Infection* **2013**; 19:E190–E196.
 318. Lübbert C, Lippmann N, Busch T, et al. Long-term carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *K pneumoniae* after a large single-center outbreak in Germany. *American Journal of Infection Control* **2014**; 42:376–380.
 319. Lim YJ, Park HY, Lee JY, et al. Clearance of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) carriage: a comparative study of NDM-1 and KPC CPE. *Clin Microbiol Infect* **2018**;
 320. Bar-Yoseph H, Hussein K, Braun E, Paul M. Natural history and decolonization strategies for ESBL/carbapenem-resistant Enterobacteriaceae carriage: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* **2016**; 71:2729–2739.
 321. Lewis JD, Enfield KB, Mathers AJ, Giannetta ET, Sifri CD. The limits of serial surveillance cultures in predicting clearance of colonization with carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2015**; 36:835–837.
 322. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:2108–2113.
 323. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Piperaki E, Souli M, Daikos GL. Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* **2014**; 20:862–872.
 324. Oliva A, Scorzolini L, Castaldi D, et al. Double-carbapenem regimen, alone or in combination with colistin, in the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CR-Kp). *J Infect* **2017**; 74:103–106.
 325. De Pascale G, Martucci G, Montini L, et al. Double carbapenem as a rescue strategy for the treatment of severe carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a two-center, matched case-control study. *Crit Care* **2017**; 21:173.
 326. Cprek JB, Gallagher JC. Ertapenem-Containing Double-Carbapenem Therapy for Treatment of Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*

- 2016**; 60:669–673.
327. Krishnappa LG, Marie MAM, Al Sheikh YA. Characterization of carbapenem resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* and in vitro synergy of the colistin-meropenem combination. *J Chemother* **2015**; 27:277–282.
 328. Mavroidi A, Katsiari M, Likousi S, et al. Characterization of ST258 Colistin-Resistant, blaKPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek Hospital. *Microb Drug Resist* **2016**; 22.
 329. Maherault A-C, Nordmann P, Therby A, Pangon B. Efficacy of imipenem for the treatment of bacteremia due to an OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Clin Infect Dis* **2012**; 54:577–578.
 330. Falagas ME, Lourida P, Poulidakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**; 58:654–663.
 331. Mimos O, Grégoire N, Poirel L, Marliat M, Couet W, Nordmann P. Broad-spectrum β -lactam antibiotics for treating experimental peritonitis in mice due to *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:2759–2760.
 332. Flamm RK, Stone GG, Sader HS, Jones RN, Nichols WW. Avibactam reverts the ceftazidime MIC₉₀ of European Gram-negative bacterial clinical isolates to the epidemiological cut-off value. *J Chemother* **2014**; 26:333–338.
 333. Castanheira M, Mills JC, Costello SE, Jones RN, Sader HS. Ceftazidime-avibactam activity tested against Enterobacteriaceae isolates from U.S. hospitals (2011 to 2013) and characterization of β -lactamase-producing strains. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59:3509–3517.
 334. Li H, Estabrook M, Jacoby GA, Nichols WW, Testa RT, Bush K. In vitro susceptibility of characterized β -lactamase-producing strains tested with avibactam combinations. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59:1789–1793.
 335. Aktaş Z, Kayacan C, Oncul O. In vitro activity of avibactam (NXL104) in combination with β -lactams against Gram-negative bacteria, including OXA-48 β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2012**; 39:86–89.
 336. Wright H, Bonomo RA, Paterson DL. New agents for the treatment of infections with Gram-negative bacteria: restoring the miracle or false dawn? *Clinical Microbiology and Infection* **2017**; 23:704–712.
 337. Humphries RM, Yang S, Hemarajata P, et al. First Report of Ceftazidime-Avibactam Resistance in a KPC-3-Expressing *Klebsiella pneumoniae* Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**; 59:6605–6607.
 338. Shields RK, Clancy CJ, Hao B, et al. Effects of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase subtypes, extended-spectrum β -lactamases, and porin mutations on the in vitro activity of ceftazidime-avibactam against carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59:5793–5797.
 339. Shields RK, Chen L, Cheng S, et al. Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Due to Plasmid-Borne blaKPC-3 Mutations during Treatment of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61.
 340. Compain F, Arthur M. Impaired Inhibition by Avibactam and Resistance to the Ceftazidime-Avibactam Combination Due to the D179Y Substitution in the KPC-2 β -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61.
 341. Barnes MD, Winkler ML, Taracila MA, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2 (KPC-2), Substitutions at Ambler Position Asp179, and Resistance to Ceftazidime-Avibactam: Unique Antibiotic-Resistant Phenotypes Emerge from β -Lactamase Protein Engineering. *MBio* **2017**; 8.
 342. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Chen L, Kreiswirth BN, Clancy CJ. Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance and Restoration of Carbapenem Susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K pneumoniae*: A Case Report and Review of Literature. *Open Forum Infect Dis* **2017**; 4:ofx101.
 343. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Chen L, Kreiswirth BN, Clancy CJ. In Vitro Selection of Meropenem Resistance among Ceftazidime-Avibactam-Resistant, Meropenem-Susceptible *Klebsiella pneumoniae* Isolates with Variant KPC-3 Carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61.
 344. Giddins MJ, Macesic N, Annavajhala MK, et al. Successive Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance through Distinct Genomic Adaptations in blaKPC-2-Harboring *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 307 Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**; 62.
 345. Datta N, Hedges RW. Compatibility groups among fi - R factors. *Nature* **1971**; 234:222–223.
 346. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **2005**; 63:219–228.
 347. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53:2227–2238.
 348. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, et al. In silico detection and typing of plasmids using

- PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**; 58:3895–3903.
349. Zechner EL, Moncalián G, de la Cruz F. Relaxases and Plasmid Transfer in Gram-Negative Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* **2017**; 413:93–113.
 350. Brantl S. Bacterial type I toxin-antitoxin systems. *RNA Biol* **2012**; 9:1488–1490.
 351. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **1998**; 62:725–774.
 352. Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* **2006**; 34:D32–36.
 353. Nissley DV, Lindh F, Fennewald MA. Mutations in the inverted repeats of Tn3 affect binding of transposase and transposition immunity. *J Mol Biol* **1991**; 218:335–347.
 354. Chandler M, Mahillon J. Insertion sequences revisited. In: *Mobile DNA II*. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 2002: 305–366.
 355. Poirel L, Lartigue M-F, Decousser J-W, Nordmann P. ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2005**; 49:447–450.
 356. Prère MF, Chandler M, Fayet O. Transposition in *Shigella dysenteriae*: isolation and analysis of IS911, a new member of the IS3 group of insertion sequences. *J Bacteriol* **1990**; 172:4090–4099.
 357. van der Ploeg J, Willemsen M, van Hall G, Janssen DB. Adaptation of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 to bromoacetate due to activation and mobilization of the haloacetate dehalogenase gene by insertion element IS1247. *J Bacteriol* **1995**; 177:1348–1356.
 358. Lartigue M-F, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene blaCTX-M of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50:1282–1286.
 359. Lartigue M-F, Poirel L, Nordmann P. Diversity of genetic environment of bla(CTX-M) genes. *FEMS Microbiol Lett* **2004**; 234:201–207.
 360. Dimude JU, Amyes SGB. Molecular diversity associated with the dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase gene in blood culture isolates of *Escherichia coli* from Edinburgh. *Scand J Infect Dis* **2013**; 45:32–37.
 361. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol* **2012**; 3:110.
 362. Harada S, Ishii Y, Saga T, Tateda K, Yamaguchi K. Chromosomally encoded blaCMY-2 located on a novel SXT/R391-related integrating conjugative element in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:3545–3550.
 363. Mata C, Miró E, Alvarado A, et al. Plasmid typing and genetic context of AmpC β -lactamases in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes: findings from a Spanish hospital 1999–2007. *J Antimicrob Chemother* **2012**; 67:115–122.
 364. Berçot B, Poirel L, Silva-Sanchez J, Nordmann P. Association of the extended-spectrum beta-lactamase gene blaTLA-1 with a novel ISCR element, ISCR20. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54:4026–4028.
 365. Rodriguez-Martinez J-M, Poirel L, Canton R, Nordmann P. Common region CR1 for expression of antibiotic resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50:2544–2546.
 366. Figueiredo S, Bonnin RA, Poirel L, Duranteau J, Nordmann P. Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. *Clin Microbiol Infect* **2012**; 18:907–913.
 367. Aubert D, Naas T, Nordmann P. IS1999 increases expression of the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **2003**; 185:5314–5319.
 368. Bennett PM, Richmond MH. Translocation of a discrete piece of deoxyribonucleic acid carrying an amp gene between replicons in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **1976**; 126:1–6.
 369. Naas T, Cuzon G, Villegas M-V, Lartigue M-F, Quinn JP, Nordmann P. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the β -Lactamase blaKPC Gene. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52:1257–1263.
 370. Salyers AA, Shoemaker NB. Conjugative transposons. *Genet Eng (NY)* **1997**; 19:89–100.
 371. Martinez E, de la Cruz F. Transposon Tn21 encodes a RecA-independent site-specific integration system. *Mol Gen Genet* **1988**; 211:320–325.
 372. Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* **1989**; 3:1669–1683.
 373. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* **2009**; 33:757–784.
 374. Ploy MC, Lambert T, Couty JP, Denis F. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clin Chem Lab Med* **2000**; 38:483–487.
 375. Cambray G, Guerout A-M, Mazel D. Integrons. *Annu Rev Genet* **2010**; 44:141–166.

376. Tijet N, Macmullin G, Lastovetska O, et al. Verona integron-encoded metallo- β -lactamase 1 in Enterobacteria, Ontario, Canada. *Emerging Infect Dis* **2013**; 19:1156–1158.
377. Barker A, Clark CA, Manning PA. Identification of VCR, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1. *J Bacteriol* **1994**; 176:5450–5458.
378. Loman NJ, Constantinidou C, Chan JZM, et al. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nat Rev Microbiol* **2012**; 10:599–606.
379. Bonnin RA, Naas T, Dortet L. Impact du séquençage d'ADN à haut débit sur la surveillance des épidémies de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. *Les feuillets de biologie* **2017**;
380. Hayden EC. Technology: The \$1,000 genome. *Nature* **2014**; 507:294–295.
381. Mardis ER. Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry* **2013**; 6:287–303.
382. Merriman B, Ion Torrent R&D Team, Rothberg JM. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis* **2012**; 33:3397–3417.
383. Jeong H, Lee D-H, Ryu C-M, Park S-H. Toward Complete Bacterial Genome Sequencing Through the Combined Use of Multiple Next-Generation Sequencing Platforms. *J Microbiol Biotechnol* **2016**; 26:207–212.
384. Benjak A, Sala C, Hartkoorn RC. Whole-genome sequencing for comparative genomics and de novo genome assembly. *Methods Mol Biol* **2015**; 1285:1–16.
385. Quick J, Loman NJ, Duraffour S, et al. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* **2016**; 530:228–232.
386. Ip CLC, Loose M, Tyson JR, et al. MinION Analysis and Reference Consortium: Phase 1 data release and analysis. *F1000Res* **2015**; 4:1075.
387. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **2015**; 517:455–459.
388. Köser CU, Ellington MJ, Peacock SJ. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends in Genetics* **2014**; 30:401–407.
389. Köser CU, Holden MTG, Ellington MJ, et al. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. *N Engl J Med* **2012**; 366:2267–2275.
390. Köser CU, Holden MTG, Ellington MJ, et al. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. *N Engl J Med* **2012**; 366:2267–2275.
391. Prunier A-L, Malbruny B, Laurans M, Brouard J, Duhamel J-F, Leclercq R. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis* **2003**; 187:1709–1716.
392. Morero NR, Monti MR, Argaraña CE. Effect of ciprofloxacin concentration on the frequency and nature of resistant mutants selected from *Pseudomonas aeruginosa* mutS and mutT hypermutators. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55:3668–3676.
393. Zhou K, Lokate M, Deurenberg RH, et al. Use of whole-genome sequencing to trace, control and characterize the regional expansion of extended-spectrum β -lactamase producing ST15 *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports* **2016**; 6. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep20840>. Accessed 14 October 2018.
394. Alghoribi MF, Balkhy HH, Woodford N, Ellington MJ. The role of whole genome sequencing in monitoring antimicrobial resistance: A biosafety and public health priority in the Arabian Peninsula. *Journal of Infection and Public Health* **2018**; Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876034118301151>. Accessed 24 August 2018.
395. Dettman JR, Rodrigue N, Aaron SD, Kassen R. Evolutionary genomics of epidemic and nonepidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **2013**; 110:21065–21070.
396. He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat Genet* **2013**; 45:109–113.
397. Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett* **2001**; 201:237–241.
398. Poirel L, Naas T, Le Thomas I, Karim A, Bingen E, Nordmann P. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45:3355–3361.
399. Banerjee R, Johnson JR. A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**; 58:4997–5004.
400. Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, et al. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **2013**; 207:919–928.
401. Price LB, Johnson JR, Aziz M, et al. The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing

- Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *MBio* **2013**; 4:e00377-00313.
402. Colpan A, Johnston B, Porter S, et al. *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans. *Clin Infect Dis* **2013**; 57:1256–1265.
 403. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* **2016**; 16:161–168.
 404. Tyson GH, McDermott PF, Li C, et al. WGS accurately predicts antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **2015**; 70:2763–2769.
 405. McDermott PF, Tyson GH, Kabera C, et al. Whole-Genome Sequencing for Detecting Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**; 60:5515–5520.
 406. Zhao S, Tyson GH, Chen Y, et al. Whole-Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol* **2016**; 82:459–466.
 407. Suzuki S, Horinouchi T, Furusawa C. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. *Nat Commun* **2014**; 5:5792.
 408. Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clinical Microbiology and Infection* **2017**; 23:2–22.
 409. Didelot X, Walker AS, Peto TE, Crook DW, Wilson DJ. Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Micro* **2016**; 14:150–162.
 410. Kennemann L, Didelot X, Aebischer T, et al. *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *PNAS* **2011**; 108:5033–5038.
 411. Young BC, Golubchik T, Batty EM, et al. Evolutionary dynamics of *Staphylococcus aureus* during progression from carriage to disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **2012**; 109:4550–4555.
 412. Ford CB, Lin PL, Chase MR, et al. Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nat Genet* **2011**; 43:482–486.
 413. Peterson DA, Frank DN, Pace NR, Gordon JI. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* **2008**; 3:417–427.
 414. Dar D, Prasse D, Schmitz RA, Sorek R. Widespread formation of alternative 3' UTR isoforms via transcription termination in archaea. *Nat Microbiol* **2016**; 1:16143.
 415. Sorek R, Cossart P. Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nat Rev Genet* **2010**; 11:9–16.
 416. Ruiz de los Mozos I, Vergara-Irigaray M, Segura V, et al. Base Pairing Interaction between 5'- and 3'-UTRs Controls *icaR* mRNA Translation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genetics* **2013**; 9:e1004001.
 417. Croucher NJ, Thomson NR. Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Curr Opin Microbiol* **2010**; 13:619–624.
 418. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **2009**; 10:57–63.
 419. Felden B, Cattoir V. Bacterial Adaptation to Antibiotics through Regulatory RNAs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2018**; 62:e02503-17.
 420. Siezen RJ, Wilson G, Todt T. Prokaryotic whole-transcriptome analysis: deep sequencing and tiling arrays. *Microb Biotechnol* **2010**; 3:125–130.
 421. Saliba A-E, Santos S, Vogel J. New RNA-seq approaches for the study of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology* **2017**; 35:78–87.
 422. McGrath PT, Lee H, Zhang L, et al. High-throughput identification of transcription start sites, conserved promoter motifs and predicted regulons. *Nat Biotechnol* **2007**; 25:584–592.
 423. Miravet-Verde S, Lloréns-Rico V, Serrano L. Alternative transcriptional regulation in genome-reduced bacteria. *Curr Opin Microbiol* **2017**; 39:89–95.
 424. Rosinski-Chupin I, Soutourina O, Martin-Verstraete I. Riboswitch discovery by combining RNA-seq and genome-wide identification of transcriptional start sites. *Meth Enzymol* **2014**; 549:3–27.
 425. Adiconis X, Haber AL, Simmons SK, et al. Comprehensive comparative analysis of 5'-end RNA-sequencing methods. *Nat Methods* **2018**; 15:505–511.
 426. Saliba A-E, Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J. Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucl Acids Res* **2014**; :gku555.
 427. Westermann AJ, Förstner KU, Amman F, et al. Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions. *Nature* **2016**; 529:496–501.
 428. Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**; 91:7693–7697.
 429. Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we

- still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect* **2011**; 17:1135–1141.
430. Weisenberg SA, Morgan DJ, Espinal-Witter R, Larone DH. Clinical outcomes of patients with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* after treatment with imipenem or meropenem. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **2009**; 64:233–235.
 431. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell* **2007**; 130:797–810.
 432. Samuelsen O, Hansen F, Aasnaes B, et al. Dissemination and characteristics of a novel Enterobacteriaceae-encoded carbapenem-hydrolysing class D beta-lactamase, OXA-436 from four patients involving six different hospitals in Denmark.
 433. Schechner V, Kotlovsky T, Tarabeia J, et al. Predictors of rectal carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) among patients with known CRE carriage at their next hospital encounter. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2011**; 32:497–503.
 434. Moradigaravand D, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *MBio* **2017**; 8.
 435. Mathers AJ, Stoesser N, Sheppard AE, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing *K. pneumoniae* at a Single Institution: Insights into Endemicity from Whole-Genome Sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59:1656–1663.
 436. Ghalayini M, Launay A, Bridier-Nahmias A, et al. Evolution of a dominant natural isolate of *Escherichia coli* in the human gut over a year suggests a neutral evolution with reduced effective population size. *Appl Environ Microbiol* **2018**;
 437. Szijártó V, Guachalla LM, Hartl K, et al. Both clades of the epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clone ST258 share a modified galactan O-antigen type. *International Journal of Medical Microbiology* **2016**; 306:89–98.
 438. Delbrück H, Bogaerts P, Kupper MB, et al. Kinetic and crystallographic studies of extended-spectrum GES-11, GES-12, and GES-14 beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:5618–5625.
 439. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**; 41:563–569.
 440. Lee Y-T, Chen T-L, Siu L-K, Chen C-P, Fung C-P. Impact of Derepressed AmpC beta-Lactamase ACT-9 on the Clinical Efficacy of Ertapenem. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55:4440–4442.
 441. Szabó D, Silveira F, Hujer AM, et al. Outer Membrane Protein Changes and Efflux Pump Expression Together May Confer Resistance to Ertapenem in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50:2833–2835.
 442. Fernández-Baca V, Ballesteros F, Hervás JA, et al. Molecular epidemiological typing of *Enterobacter cloacae* isolates from a neonatal intensive care unit: three-year prospective study. *Journal of Hospital Infection* **2001**; 49:173–182.
 443. Pestourie N, Garnier F, Barraud O, Bedu A, Ploy M-C, Mounier M. Outbreak of AmpC beta-lactamase-hyper-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit in a French teaching hospital. *Am J Infect Control* **2014**; 42:456–458.
 444. Manzur A, Tubau F, Pujol M, et al. Nosocomial Outbreak Due to Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Enterobacter cloacae* in a Cardiothoracic Intensive Care Unit. *Journal of Clinical Microbiology* **2007**; 45:2365–2369.

Annexes

Bactéries multirésistantes et nouvelles émergences de résistance chez les entérobactéries

Le dernier rempart antibiotique est en train de céder...

La résistance acquise vis-à-vis des céphalosporines de 3^e génération (C3G) est apparue dans les années 1980 avec l'émergence d'enzymes appelées bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE). L'espèce était alors la plus fréquente parmi les souches productrices de BLSE était *Klebsiella pneumoniae*. Ces BLSE dérivait d'enzymes de type TEM et SHV,¹ codées par des gènes plasmidiques ; elles ont diffusé majoritairement au sein de clones hospitaliers de *K. pneumoniae* et d'*Enterobacter* spp. (p. ex. *Enterobacter aerogenes* producteurs de la BLSE TEM-24). Mais, dès le début des années 2000, l'émergence et la diffusion rapide des enzymes de type CTX-M, capables d'hydrolyser de façon prédominante le céfotaxime au sein des céphalosporines, ont complètement modifié l'épidémiologie des entérobactéries productrices de BLSE.² Leur diffusion est particulièrement préoccupante car elle ne concerne plus seulement les bactéries classiquement responsables d'infections nosocomiales. En France, une étude récente menée chez des enfants non hospitalisés a montré que le taux de portage d'entérobactéries productrices de BLSE a doublé sur les 5 dernières années passant de 4,8 % en 2010 à 10,2 % en 2015.⁴

Alors que dans les années 1990 les BLSE étaient principalement produites par des *K. pneumoniae*, nous assistons à une augmentation des cas au sein de l'espèce *Escherichia coli*, considérée à la fois comme un commensal du microbiote humain et comme un pathogène communautaire majeur. Une étude menée à l'Assistance publique-Hôpitaux de Paris indique qu'en 1997, 40 % des souches productrices de BLSE étaient des *K. pneumoniae* et 20 % des *E. coli*, alors qu'en 2005 cette proportion s'est inversée avec 50 % d'*E. coli* et 20 % de *K. pneumoniae*.⁵ Cette diffusion semble liée à la fois au succès des éléments génétiques mobiles portant blaCTX-M et au succès de certains clones capables de créer de véritables épidémies et de diffuser mondialement, comme le clone d'*E. coli* ST-131.⁶ Ainsi, l'étude pédiatrique indique que la prévalence de ce clone passe de 5 % en 2010 à 37 % en 2015.⁴

Émergence des résistances aux carbapénèmes...

Parallèlement, les carbapénèmes (bêta-lactamines non hydrolysées par les BLSE) sont devenus le traitement de

référence des infections sévères causées par des entérobactéries productrices de BLSE. Malheureusement, leur utilisation est maintenant régulièrement compromise du fait de la dissémination de bactéries résistantes à cette classe d'antibiotiques, en raison notamment de la production de carbapénémases.⁷ La production de ces carbapénémases est devenu un problème majeur de santé publique notamment chez les entérobactéries (fig. 1 et 2). Actuellement, la majorité des infections causées par les entérobactéries productrices de carbapénémases surviennent dans un contexte hospitalier, mais le nombre de ces bactéries isolées de patients sans lien avec une structure de soin ne cesse de croître.⁸⁻¹⁰

... et aux antibiotiques de dernier recours

Le traitement des infections induites par ces bactéries extrêmement résistantes (notamment à toutes les bêta-lactamines) a engendré un regain d'intérêt pour d'autres familles d'antibiotiques comme les aminosides, les cyclines ou les polymyxines. Malheureusement, en plus d'une utilisation parfois compliquée par des risques de toxicité chez l'homme, nous observons également l'émergence de la résistance à ces antibiotiques dits de dernier recours.

Ainsi, des méthylases impliquées dans la résistance à l'ensemble des aminoglycosides par modification de l'ARN ribosomal 16S sont en train d'émerger chez les bacilles à Gram négatif.¹¹ Les gènes codant ces enzymes sont fréquemment associés à des structures génétiques mobiles favorisant leur dissémination et constituant ainsi une véritable menace pour l'utilisation future de cette famille d'antibiotiques.¹¹

Le regain d'utilisation des polymyxines comme la colistine s'est accompagné d'une augmentation des infections causées par des bactéries naturellement résistantes à cette famille d'antibiotiques tels que les *Serratia*, *Morganella*, *Proteus* et *Providencia*.¹² Par ailleurs, on assiste également à l'émergence de la résistance acquise aux polymyxines chez des bacilles à Gram négatif naturellement sensibles comme *E. coli* et surtout *K. pneumoniae*.¹³ Ces résistances sont majoritairement le fruit de mutations chromosomiques¹⁴ mais le premier gène plasmidique responsable de résistance à la colistine, >>>

AGNÈS B. JOUSSET, LAURENT DORTET, THIERRY NAAS
Centre national de référence associé de la résistance aux antibiotiques : entérobactéries productrices de carbapénémases, Le Kremlin-Bicêtre, France
EA7361, université Paris-Sud, université Paris-Saclay, LabEx Lermite, service de bactériologie-hygiène, AP-HP, hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France
Evolution and Ecology of Resistance to Antibiotics Unit, Institut Pasteur-AP-HP-université Paris Sud, Paris, France
thierry.naas@aphp.fr

A. B. Jousset déclare...
L. Dortet déclare...
T. Naas déclare...

INFECTIONS ASSOCIÉES AUX SOINS EN MILIEU HOSPITALIER

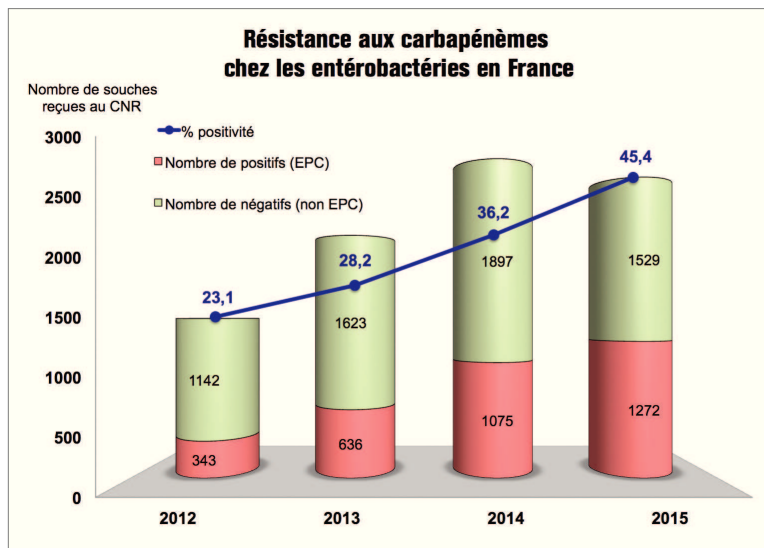


Figure 1. Résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries en France (2012-2015). CNR: centre national de référence ; EPC: entérobactéries productrices de carbapénèmes.

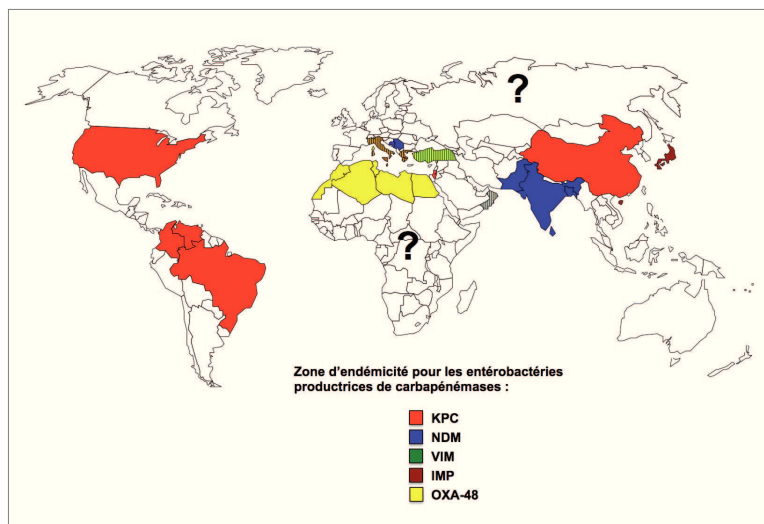


Figure 2. Zone d'endémicité pour les entérobactéries productrices de carbapénèmes KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapénémase ; IMP : imipinémase ; NDM : New Delhi métallo-bétalactamase ; OXA : oxacillines ; VIM : Verona imipinémase.

nommé *mcr-1*, a récemment été décrit chez des souches d'origine humaine, animale et environnementale.¹⁵

L'émergence et la dissémination de la résistance plasmidique aux bêta-lactamines et autres antibiotiques de dernier recours (aminoglycoside, polymyxines) sont des phénomènes inquiétants qui posent de réels problèmes thérapeutiques. Cette revue bibliographique aborde le problème des résistances émergentes de ces dernières années et des années à venir : carbapénèmes, méthylases de l'ARNr 16S et résistance aux polymyxines.

Résistance aux carbapénèmes

L'émergence des entérobactéries productrices de BLSE a contribué à l'augmentation de l'utilisation des carbapénèmes, antibiotiques de dernier recours essentiellement prescrits en milieu hospitalier. Parallèlement à cette utilisation croissante, nous observons l'émergence de bactéries résistantes aux carbapénèmes. Chez les entérobactéries, cette résistance s'explique par deux grands mécanismes (fig. 3) : la production d'une céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique) ou d'une BLSE associée à une diminution de perméabilité par perte ou altération de porines qui permettent le passage transmembranaire de carbapénèmes ; ou la production de carbapénémases, bêta-lactamases capables d'hydrolyser les carbapénèmes.

Ces carbapénémases appartiennent à différentes familles moléculaires de bêta-lactamases : les carbapénémases de la classe A selon la classification d'Ambler (KPC, IMI, GES...), les carbapénémases de la classe B selon Ambler ou métallo-bétalactamases (NDM, VIM, IMP...) et les carbapénémases de la classe D selon Ambler (CHDL) ou oxacillinase à activité carbapénémase (OXA-48 et ses variants).

Carbapénémases de classe D

Les carbapénémases les plus fréquemment isolées en France sont de type OXA-48 (fig. 4). Elles représentent environ 77 % des entérobactéries productrices de carbapénémases analysées par le Centre national de référence (CNR) « Résistance aux antibiotiques » en 2015.¹⁶ Après une première description en Turquie en 2001, ces CHDL ont diffusé à l'ensemble des pays du Moyen-Orient, d'Afrique du Nord et d'Europe. L'une des raisons du succès d'OXA-48 réside dans le fort pouvoir de dissémination du support génétique du gène *bla*_{OXA-48} et dans leur détection difficile. En effet, le gène *bla*_{OXA-48} est quasi systématiquement localisé sur un plasmide (de type IncL) ne portant aucun autre marqueur de résistance mais possédant des capacités conjugatives élevées.¹⁷ En outre, les carbapénémases de type OXA-48 n'hydrolysent pas les C3G et leur action n'est pas inhibée par l'acide clavulonique. De plus, ces enzymes hydrolysent assez faiblement les carbapénèmes conférant généralement une simple diminution de sensibilité à ces molécules. Ainsi, leur détection est particulièrement délicate si elle est fondée sur le seul phénotype de résistance aux bêta-lactamines, favorisant leur dissémination. Bien qu'OXA-48 soit majoritairement identifiée en France, on observe ces dernières années une diversification et l'émergence de variants possédant également une activité carbapénémase (OXA-162, OXA-181, OXA-204, OXA-232 et OXA-244).¹⁶

Carbapénémases de classe B

Parmi les métallo-bétalactamases (MBL), la New Delhi métallo-bétalactamase (NDM) est l'enzyme la plus répandue en France et représente 14,5 % des entérobactéries productrices de carbapénémases analysées par le CNR

INFECTIONS ASSOCIÉES AUX SOINS EN MILIEU HOSPITALIER

en 2015 (fig. 4). Cette proportion ne cesse d'augmenter chaque année.¹⁶ Depuis la première description en 2008 chez un patient suédois ayant été hospitalisé en Inde, les entérobactéries produisant NDM ont été retrouvées sur l'ensemble des continents.¹⁸ Un lien entre les patients porteurs de NDM et le sous-continent indien est souvent retrouvé, mais des souches productrices de NDM sont régulièrement isolées dans certains pays d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient. Le succès de cette carbapénémase semble lié à sa capacité à persister dans l'environnement et à diffuser dans le milieu communautaire à travers l'espèce *E. coli* notamment.¹⁹

Parmi les autres MBL, les Verona imipénémases (VIM) représentent 3,9 % des entérobactéries productrices de carbapénémases adressées au CNR en 2015 (fig. 4). En France, la diffusion d'entérobactéries produisant VIM-1 ou VIM-4 semble restreinte à quelques épidémies hospitalières.

Carbapénémases de classe A

Les carbapénémases de type *K. pneumoniae* carbapénémase (KPC) ont été les premières à émerger mondialement depuis la côte Est des États-Unis dès la fin des années 1990.²⁰ Depuis, ces souches ont diffusé principalement en Israël, puis en Grèce et en Italie où elles sont maintenant endémiques depuis le début des années 2010. Des souches productrices de KPC ont été décrites dans tous les pays européens, mais plutôt sous la forme de petites épidémies dont la diffusion semble contrôlée. En France, la proportion des souches KPC positives est actuellement en diminution et ne représente plus que 2,3 % des souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases adressées au CNR en 2015 (fig. 4).

Il existe actuellement une vingtaine de variants décrits, mais KPC-2 et KPC-3 sont largement prédominants au niveau mondial.²¹ La diffusion de KPC semble étroitement liée à la diffusion d'un clone unique de *K. pneumoniae*, le ST-258, ou d'autres ST comme les ST-11, ST-512 qui appartiennent au complexe-clonal CC-258.⁶ Les raisons de cette association KPC et CC-258 ne sont pas encore élucidées.

Quel que soit le mécanisme de résistance sous-jacent, le nombre de souches résistantes aux carbapénèmes adressées au CNR ne cesse d'augmenter chaque année (+200 % entre 2012 et 2014).¹⁶ Par ailleurs, cette progression semble particulièrement importante chez l'espèce *E. coli*. Ce phénomène est inquiétant car la diffusion des carbapénémases ne semble plus limitée aux espèces classiquement responsables d'épidémies hospitalières comme *K. pneumoniae* ou *Enterobacter cloacae*, mais concerne maintenant *E. coli*, principal pathogène humain en milieu hospitalier et surtout communautaire.

Résistance aux aminoglycosides : les méthylases de l'ARNr 16S

L'amikacine et la gentamicine sont les deux aminosides

LES VOYAGES : FACTEURS DE RISQUE D'ACQUISITION D'ENTÉROBACTÉRIES MULTIRÉSISTANTES

Récemment, une étude multicentrique prospective¹ menée par une équipe néerlandaise s'est intéressée au taux d'acquisition d'entérobactéries productrices de BLSE au sein d'une large population de 1 847 voyageurs ayant visité plusieurs régions du globe. Sur l'ensemble de cette population, 34,3 % ont acquis une entérobactérie productrice de BLSE pendant leur voyage. L'Asie du Sud est une région particulièrement à risque car ce chiffre monte à 75,1 % en considérant seulement cette sous-population de voyageurs. Les autres facteurs de risque d'acquisition d'entérobactéries productrices de BLSE identifiés par l'étude sont des facteurs favorisant un déséquilibre au sein du microbiote digestif comme l'usage d'antibiotiques pendant le séjour (notamment les fluoroquinolones), une diarrhée acquise pendant le voyage et persistant au retour ainsi que la préexistence d'une pathologie inflammatoire chronique de l'intestin. Le suivi sur 12 mois de la cohorte indique que la durée moyenne du portage est de 30 jours, mais 11,3 % des voyageurs sont toujours colonisés par une ou plusieurs entérobactéries productrices de BLSE au moins 1 an après leur retour.

RÉFÉRENCE

1. Arcilla MS, Hattem JM, Haverkate MR, et al. Import and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study. *Lancet Infect Dis* 2017;17:78-85.

les plus utilisés dans le traitement des infections bactériennes graves, la plupart du temps, en association avec des bêtalactamines (effet synergique). Le principal mécanisme de résistance aux aminosides est l'acquisition d'enzymes (acétyltransférases, nucléotidyltransférases et phosphotransférases) capables de modifier la structure des aminosides en y ajoutant un groupement chimique. Chaque enzyme possède ses propres substrats, et les aminosides ainsi modifiés ne peuvent se fixer sur leur cible, l'ARN ribosomal 16S.

Ces dernières années, a émergé chez les bacilles à Gram négatif un mécanisme de résistance capable d'entraîner une résistance à l'ensemble des aminosides. Il s'agit de l'acquisition de méthylases de l'ARNr 16S. Ces enzymes trouvent leur origine chez les actinomycètes, bactéries naturellement résistantes aux aminosides. Elles sont capables de méthyler l'ARNr 16S au niveau du site de liaison de l'aminoside (résidu G1405), empêchant ainsi leur fixation.¹¹

Ces méthylases acquises sont nommées ArmA, NpmA, ou Rmt (RmtA à RmtH).¹¹ Elles ont été identifiées sur des structures génétiques mobiles comme des plasmides, chez de nombreuses espèces d'entérobactéries, ainsi que chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.¹¹

Après leur première description chez *K. pneumoniae* en France en 2003,²² la plupart des méthylases ont >>>

INFECTIONS ASSOCIÉES AUX SOINS EN MILIEU HOSPITALIER

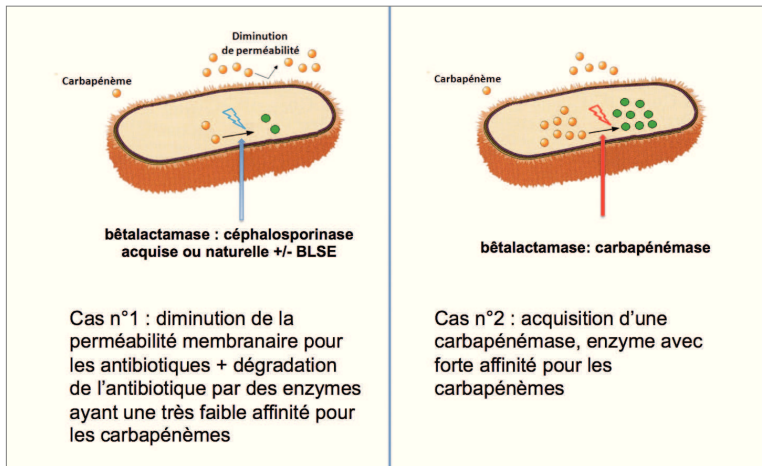


Figure 3. Principaux mécanismes de résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries. BLSE: bêta-lactamases à spectre élargi.

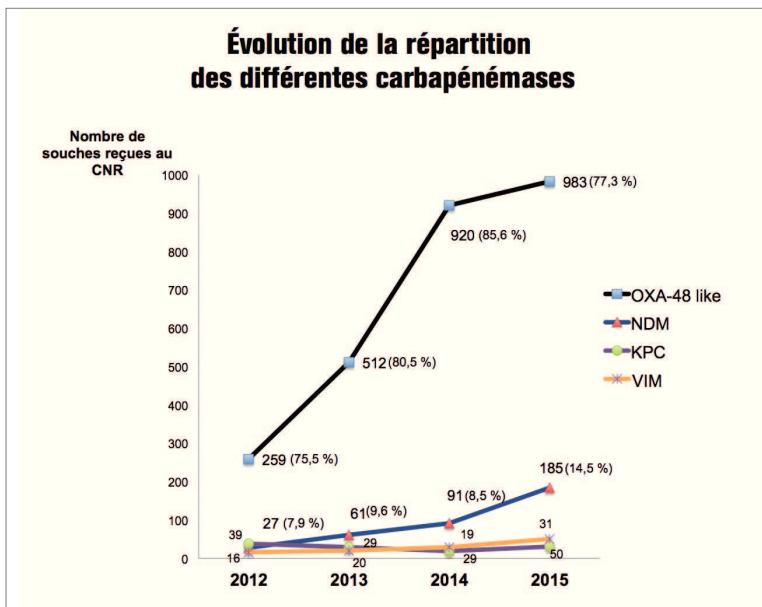


Figure 4.

été identifiées dans des souches d'entérobactéries produisant des BLSE de type CTX-M.²³ Plus récemment, il a été montré que ces méthylases étaient particulièrement associées aux entérobactéries produisant une carbapénémase de type NDM.¹¹ En effet, dans ces entérobactéries productrices de carbapénémases, les deux gènes de résistance (*bla*_{NDM} et le gène codant la méthylase) sont souvent localisés sur un même plasmide conjugatif, facilitant la diffusion en bloc de la résistance à l'ensemble des bêta-lactamines et des aminoglycosides.

La prévalence des méthylases est encore fortement corrélée à la prévalence des MBL. Ainsi, les pays particulièrement concernés sont l'Inde, la Chine, la Corée, et

Taiwan où des prévalences de 10,5 %, 6,9 %, 6,1 % et 5 % ont été rapportées.²⁴ Il existe peu d'études récentes sur la prévalence des méthylases en Europe. Les enquêtes réalisées dans quelques hôpitaux rapportent des chiffres beaucoup plus faibles avec des prévalences locales de 1,3 % en France,^{25,26} 0,7 % en Belgique²³ et 0,3 % en Grèce.²⁷ Cependant l'augmentation récente de la prévalence de souches productrices de carbapénémases de type NDM fait craindre une ascension parallèle des souches produisant des méthylases.

Résistance aux polymyxines

L'augmentation de l'utilisation des polymyxines pour le traitement des infections à bacilles à Gram négatif multirésistants, notamment les entérobactéries productrices de carbapénémases, a contribué à l'émergence rapide de la résistance dans certains pays (Grèce, Italie).^{13, 28}

Deux molécules sont utilisées en thérapeutique : la colistine (ou polymyxine E) et la polymyxine B. La cible des polymyxines est le lipopolysaccharide bactérien, composant de la membrane externe des bacilles à Gram négatif.²⁹ Les polymyxines (chargées positivement) se fixent au lipide A (chargé négativement) puis s'insèrent dans la membrane externe *via* leur chaîne d'acide gras N-terminale.^{29,30} Des brèches se forment dans la membrane cytoplasmique entraînant la lyse bactérienne.²⁹

De nos jours, la prévalence de la résistance à la colistine reste basse, bien qu'elle n'ait été rapportée que dans peu d'études. L'étude SENTRY 2010-2013 regroupant 18 nations européennes montre une prévalence globale de la résistance à la colistine de 8,2 %.³¹ Cependant, cette prévalence semble parfaitement corrélée à celle de la résistance aux carbapénèmes puisque ce taux est de 26,1 % chez les souches résistantes aux carbapénèmes isolées notamment en Grèce, Italie ou Pologne.³¹

Résistance acquise chromosomique

Pour se protéger de l'action des peptides antimicrobiens tels que la colistine, une des stratégies les plus utilisées par les bacilles à Gram négatif est la modification de la composition du lipopolysaccharide de sa membrane externe. Ces modifications ont toutes pour but de diminuer sa charge négative, essentiellement par l'ajout de résidus chargés positivement, entraînant ainsi une répulsion des polymyxines, elles-mêmes chargées positivement. Chez les entérobactéries, ces modifications du lipopolysaccharide sont finement régulées par deux systèmes à deux composants nommés PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB.¹⁴ Le système PhoP/PhoQ est lui-même régulé par la protéine transmembranaire MgrB.¹⁴ Ainsi, les principaux mécanismes de résistance à la colistine correspondent à des altérations des gènes (mutation, délétion, insertion) impliqués dans l'un ou l'autre de ces systèmes à deux composants et/ou du gène *mgrB*.³²

LES INFECTIONS DUES AUX ENTÉROBACTÉRIES MULTIRÉSISTANTES EN FRANCE ET EN EUROPE

Les données issues du réseau européen EARS-Net sur l'étude des souches responsables d'infections invasives indiquent que l'incidence moyenne des infections par *K. pneumoniae* résistants aux carbapénèmes est passée de 3,2 % en 2009 à 6,2 % en 2012.¹ Il existe cependant de grandes disparités entre les différents pays d'Europe puisque ce chiffre grimpe à 60 % en Grèce contre 0,7 % en France. L'incidence moyenne des infections invasives à *E. coli* résistant aux carbapénèmes en Europe est bien inférieure et concerne 0,1 % des isolats en 2012.

En France, les données issues des signalements réalisés à Santé Publique France (anciennement Institut de veille sanitaire [InVS]) en septembre 2015 font état de 3 417 patients porteurs d'entérobactéries productrices de carbapénémases depuis 2010 ;² 20 % de ces patients ont été infectés et 80 % ont été colonisés. Les principaux sites d'infections sont les infections urinaires (46 %), les bactériémies (23 %) et les

pneumopathies (15 %). Il n'existe pas d'étude concernant le poids des infections dues aux entérobactéries productrices de carbapénémases en France. Cependant, en 2012, une étude mise en place par l'InVS a permis d'estimer le nombre annuel d'infections à l'ensemble des bactéries multirésistantes (BMR) tous sites infectieux confondus à environ 158 000 cas.³ Les infections à *E. coli* et *K. pneumoniae* résistants aux C3G représentent respectivement 32 % et 10 % de ces infections à BMR. Les infections à *K. pneumoniae* résistant aux carbapénèmes quant à elles représentent 0,4 % des infections à BMR. Il est important d'identifier le mécanisme de résistance aux carbapénèmes sous-jacent car une infection invasive due à une entérobactérie productrice de carbapénémases a un moins bon pronostic qu'une infection due à une souche résistante aux carbapénèmes par un autre mécanisme.⁴ De plus, avec l'arrivée de nouveaux inhibiteurs de bêta-lactamase, telle que l'avibactam capable d'inhiber les enzymes de type KPC

et OXA-48 mais pas NDM, l'identification des gènes responsables de la résistance aux carbapénèmes devient primordiale pour initier le bon traitement.

RÉFÉRENCES

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm : ECDC ; 2014.
2. Santé publique France. Épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénémases en France. Situation épidémiologique du 4 septembre 2015. Publié le 15/12/2015. <http://bit.ly/2k2q9Qd>
3. Morbidité et mortalité des infections à bactéries multirésistantes aux antibiotiques en France en 2012. Étude Burden BMR rapport, juin 2015. <http://bit.ly/2ccAQNT>
4. Tamma PD, Goodman KE, Harris AD, et al. Comparing the Outcomes of Patients with Carbapenemase-Producing and non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant enterobacteriaceae bacteremia. Clin Infect Dis 2017 ;64 :257-64.

Résistance plasmidique

En novembre 2015 a été rapporté pour la première fois l'émergence d'une résistance plasmidique à la colistine, nommé MCR-1 (*plasmid-mediated colistin resistance*).¹⁵ La protéine MCR-1 fait partie de la famille des phosphoéthanolamine transférases dont l'expression chez *E. coli* et *K. pneumoniae* aboutit à l'addition de phosphoéthanolamine sur le lipide A, entraînant une diminution de la charge négative du lipopolysaccharide et donc une diminution de sensibilité aux polymyxines. Les niveaux de résistance aux polymyxines conférés par MCR-1 sont relativement faibles avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) à la colistine comprises entre 2 mg/L et 8 mg/L.

Depuis cette première description, un nombre important de rapports a fait état de la présence de ce gène dans un grand nombre de pays. Au 1^{er} août 2016, près de 1 500 souches d'entérobactéries productrices de MCR-1 ont été décrites sur l'ensemble du globe, mais principalement en Asie (43,4 % des souches) et en Europe (49,0 % des souches).³³ Dans la vaste majorité des cas (93,8 %), les souches positives pour *mcr-1* appartiennent à l'espèce *E. coli*.

Par ailleurs, nous assistons clairement à une dissémination du gène *mcr-1* dans le monde animal et plus particulièrement chez les animaux d'élevage. On trouve notamment une prévalence de 21 % chez des souches d'*E. coli* productrices d'une BLSE isolées chez des veaux en France entre 2014 et 2015.³⁴ Pour le moment, la prévalence de ces souches *mcr-1* positives isolées chez l'homme reste faible. Une étude rapporte ainsi une prévalence de 1,4 % (13/902) et de 0,7 % (3/420) en Chine parmi les souches clinique d'*E. coli* et *K. pneumoniae*, respectivement.¹⁵


MCR-1 peut être retrouvé parmi des souches d'*E. coli* produisant une simple pénicillinase mais le problème de la résistance à la colistine se pose plus particulièrement pour les souches productrices de BLSE et plus encore pour les souches productrices de carbapénémases. Malheureusement, les souches d'*E. coli* productrices de MCR-1 sont majoritairement également productrices de BLSE de type CTX-M15,³⁵⁻³⁷ et/ou d'une céphalosporinase acquise (CMY-2 ou DHA-1).^{38, 39} Quelques souches d'*E. coli* productrices à la fois d'une carbapénémase et de MCR-1 ont été décrites de façon sporadique.^{40, 41}



INFECTIONS ASSOCIÉES AUX SOINS EN MILIEU HOSPITALIER

PEU DE SOLUTIONS THÉRAPEUTIQUES POUR LE MOMENT

L'accumulation des gènes codant des résistances acquises à différentes familles d'antibiotiques (bêta-lactamines, aminoglycosides, quinolones, sulfamides, triméthoprime, polymyxines, etc.) ne laisse que peu de solutions théra-

peutiques. Pour le moment, seule une stratégie d'identification des patients porteurs de bactéries multirésistantes ou de bactéries hautement résistantes émergentes ainsi que des mesures d'isolement permettent le contrôle de la diffusion de ces souches multirésistantes, en attendant l'arrivée sur le marché de nouveaux antibiotiques. 

RÉSUMÉ BACTÉRIES MULTIRÉSISTANTES ET NOUVELLES ÉMERGENCES DE RÉSISTANCE CHEZ LES ENTÉROBACTÉRIES

L'émergence des entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre étendu depuis le début des années 1990 a favorisé la consommation d'antibiotiques à très large spectre comme les carbapénèmes. Malheureusement, leur utilisation semble de plus en plus compromise avec l'émergence de bactéries devenues résistantes aux carbapénèmes, notamment par production de carbapénémases. Les entérobactéries productrices de carbapénémase sont essentiellement retrouvées en portage digestif, mais le nombre d'infections induites par ces germes extrêmement résistants en France et dans le monde ne cesse d'augmenter. Ainsi, pour traiter les patients infectés par

ces entérobactéries productrices de carbapénémase, on assiste à un regain d'intérêt pour des anciennes molécules comme la témocilline, la tigécycline, ou encore les polymyxines. Les aminosides, lorsqu'ils sont sensibles, font également partie des options thérapeutiques. Cependant, en plus d'un risque de toxicité souvent non négligeable chez l'homme, nous observons également l'émergence de la résistance à ces antibiotiques de dernier recours qui constituaient le dernier rempart contre la pan-résistance.

SUMMARY MULTIDRUG RESISTANT BACTERIA AND EMERGING ANTIBIOTIC RESISTANCE TRAITS

Since the 1990s, the dissemination of extended spectrum β -lacta-

mase producing *Enterobacteriaceae* that are resistant to a wide variety of common antimicrobials is serious global health concern. Carbapenems have rapidly become the treatment of choice of severe infections due to ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, but carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* have been increasingly reported in France and worldwide. These bacteria are mainly found in faecal carriage but the number of clinically-relevant infections is increasing. In that context, we observe a renewed interest for old drugs like temocillin, tigecyclin or polymyxins. When susceptible, aminoglycosides are also often used to treat infections due to multiresistant bacteria. Unfortunately, in addition to significant risks of toxicity, the use of these last resort drugs can be compromised due to the emergence of new mechanisms of resistance.

RÉFÉRENCES

1. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection. *Crit Rev Microbiol* 2004;30:25-32.
2. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2006;59:165-74.
3. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-66.
4. Birgy A, Levy C, Bidet P, et al. ESBL-producing *Escherichia coli* ST131 versus non-ST131: evolution and risk factors of carriage among French children in the community between 2010 and 2015. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:2949-56.
5. Nicolas-Chanoine MH, Jarlier V. Extended-spectrum β -lactamases in long-term-care facilities. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 Suppl 1:111-6.
6. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:565-91.
7. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med* 2012;18:263-72.
8. Arpin C, Noury P, Boraud D, et al. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to colistin in a French community patient without history of foreign travel. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:3432-4.
9. Zurfluh K, Nüesch-Inderbinen MT, Poirel L, Nordmann P, Hächler H, Stephan R. Emergence of *Escherichia coli* producing OXA-48 β -lactamase in the community in Switzerland. *Antimicrob Resist Infect Control* 2015;4:9.
10. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:821-30.
11. Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat* 2012;15:133-48.
12. Hayakawa K, Marchaim D, Divine GW, et al. Growing prevalence of *Providencia stuartii* associated with the increased usage of colistin at a tertiary health care center. *Int J Infect Dis* 2012;16:e646-8.
13. Neonakis IK, Samonis G, Messaritakis H, et al. Resistance status and evolution trends of *Klebsiella pneumoniae* isolates in a University Hospital in Greece: ineffectiveness of carbapenems and increasing resistance to colistin. *Chemotherapy* 2010;56:448-52.
14. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Antimicrob Resist Chemother* 2014;5:643.
15. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, 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* 2016;16:161-8.
16. Dortet L, Cuzon G, Nordmann P. Trend of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in France from 2012 to 2014. *Euro Surveill* 2016 (manuscript accepted).
17. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill* 2013;18(31). pii:20549
18. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1791-8.
19. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* 2011;11:355-62.
20. Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Carbapénémases de type KPC : quel enjeu en microbiologie clinique ? *Pathol Biol* 2010;58:39-45.
21. Cuzon G, Naas T, Truong H, et al. Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produce β -Lactamase bla KPC-2 Gene1. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1349-56.
22. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2565-71.
23. Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, et al. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:459-64.
24. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, et al. Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:48-53.
25. Bercot B, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:4526-7.
26. Bercot B, Poirel L, Ozdamar M, Hakkio E, Turkoglu S, Nordmann P. Low prevalence of 16S methylases among extended-spectrum β -lactamase-producing

Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT assay, an immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-type carbapenemases

Laurent Dortet^{1-4*}, Agnès Jousset¹⁻⁴, Vincent Sainte-Rose³, Gaëlle Cuzon¹⁻⁴ and Thierry Naas¹⁻⁴

¹Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance, Le Kremlin-Bicêtre, France; ²Research Unit EA7361 'Structure, Dynamic, Function and Expression of Broad Spectrum β -Lactamases', Faculty of Medicine, University Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France;

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

⁴Joint Research Unit EERA 'Evolution and Ecology of Resistance to Antibiotics', Institut Pasteur-APHP-University Paris Sud, Paris, France

*Corresponding author. Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital de Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France. Tel: +33-1-45-21-36-32; Fax: +33-1-45-21-63-40; E-mail: laurent.dortet@aphp.fr

Received 2 December 2015; returned 24 January 2016; revised 9 February 2016; accepted 14 February 2016

Objectives: There is an urgent need for accurate and fast diagnostic tests to identify MDR bacteria. Here, we evaluated an immunochromatographic assay (the OXA-48 K-SeT assay) to detect OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from culture colonies.

Methods: One hundred and sixty-one collection isolates with characterized β -lactamase content and 185 non-duplicate consecutive clinical isolates referred to the Associated French National Reference Center between 15 February and 15 March 2015 were used to evaluate the OXA-48 K-SeT assay. Among these 346 isolates, 100 were OXA-48-like carbapenemase producers, 3 were OXA-48-like producers lacking carbapenemase activity and 243 were ESBL, AmpC, oxacillinase and/or non-OXA-48 carbapenemase producers.

Results: All 100 OXA-48-like carbapenemase producers were correctly detected by the OXA-48 K-SeT assay, including OXA-48 ($n=73$), OXA-181 ($n=18$), OXA-162 ($n=1$), OXA-204 ($n=4$), OXA-232 ($n=2$) and OXA-244 ($n=2$) variants. The three OXA-48 variants lacking carbapenemase activity, OXA-163 ($n=2$) and OXA-405 ($n=1$), were not detected. All non-OXA-48 producers gave a negative result with the OXA-48 K-SeT assay. No cross-reaction was evidenced with the carbapenemases (VIM, IMP, NDM and KPC), ESBLs (TEM, SHV and CTX-M), AmpCs (CMY-2, DHA-2 and ACC-1) and oxacillinases (OXA-1, -2, -9 and -10). Overall, the sensitivity and specificity of the assay were 100% for OXA-48-like carbapenemase detection.

Conclusions: The OXA-48 K-SeT assay was efficient, rapid and easy to implement in the routine workflow of a clinical microbiology laboratory for the confirmation of OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. It could complete the existing panel of tests available for the confirmation of OXA-48-like carbapenemases, especially in countries with high OXA-48 prevalence.

Introduction

The global dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE), which are most often resistant to many classes of antibiotics, is a major public health concern. Accordingly, rapid and reliable detection of CPE is an urgent issue, but it cannot be simply based on the resistance profile.¹ Indeed, resistance to carbapenems may result from complex processes, including (i) plasmid-encoded or chromosome-encoded cephalosporinases and/or ESBL production associated with outer membrane impermeability and (ii) from carbapenemase production.² Various phenotypic confirmation tests for detecting carbapenemases have been developed, including inhibition tests

of carbapenemase activity,^{1,3} detection of carbapenem hydrolysis using MALDI-TOF MS⁴ or biochemical tests (e.g. the Carba NP test and derivatives)^{5,6} and the Carbapenem Inactivation Method.⁷ These tests are able to detect the presence of carbapenemase activity and sometimes to discriminate between Ambler class A, B and D carbapenemases (e.g. the Carba NP test II, combined-disc inhibition tests and the OXA-48 disc test).^{3,8} However, since no specific inhibitor of Ambler class D carbapenemase is available, molecular methods remain the gold standard for the detection of OXA-48-like producers.^{9,10}

Recent epidemiological studies showed that OXA-48 carbapenemases are now the most prevalent carbapenemase in many European countries.¹¹ In France, OXA-48-like enzymes represent

86% of the carbapenemases sent to the Associated French National Reference Center (NRC) (L. Dortet, unpublished data). Of note, although all OXA-48-like enzymes confer resistance to penicillins, only some variants possess carbapenemase activity (OXA-48, OXA-162, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244 and OXA-245).^{12,13} On the contrary, few OXA-48 variants lacking significant carbapenemase activity (OXA-163, OXA-247 and OXA-405) have been described.^{12,14,15} These variants were systematically falsely detected as OXA-48-like carbapenemases using molecular methods.¹² Accordingly, a simple, rapid and accurate method able to discriminate between carbapenemase and non-carbapenemase OXA-48 enzymes is still needed.

Here, we evaluated a new immunochromatographic method, named the OXA-48 K-SeT assay, aiming to detect OXA-48-like CPE from solid cultures.

Materials and methods

Strain collection

One hundred and sixty-one enterobacterial isolates with characterized β -lactamase content, referred to our laboratory between 2008 and 2014, were used to evaluate the OXA-48 K-SeT assay. This strain collection includes 55 non-carbapenemase producers and 106 carbapenemase producers, including 21 Ambler class A carbapenemase producers, 47 metallo- β -lactamase producers and 38 OXA-48-like producers. Three OXA-48-like producers (two producing OXA-163 and one producing OXA-405) devoid of any carbapenem hydrolytic activity were also tested.

Prospective analysis

From 15 February to 15 March 2015, all non-duplicate consecutive clinical isolates with decreased susceptibility to carbapenems referred to the Associated French NRC for antibiotic resistance were included (185 isolates). All isolates were verified for the presence of carbapenemase using the updated version of the Carba NP test, which was performed and interpreted as previously described.⁵ In addition, the carbapenem resistance gene was sought using home-made PCRs targeting *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} and *bla*_{OXA-48} as previously described.¹⁶

MIC determination

MICs of carbapenems were determined using the Etest (bioMérieux, La Balme les Grottes, France) and the results were recorded according to EUCAST guidelines, as updated in 2015 (<http://www.eucast.org>).

OXA-48 K-SeT assay

The OXA-48 K-SeT assay is an immunochromatographic assay that has been developed by Coris BioConcept (Gembloux, Belgium) to specifically detect OXA-48-like carbapenemases. For this study, the strains to be tested were grown on trypticase soy agar supplemented with 5% sheep blood (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) for 16–24 h at 37°C. The tests were performed according to the manufacturer's recommendations.^{17,18}

Statistical analysis

The sensitivity and specificity of the OXA-48 K-SeT assay were calculated on all tested strains, whereas the positive and negative predictive values were calculated on consecutive isolates referred to the NRC. Results of PCRs and sequencing were used as reference.

Results

Performance of the OXA-48 K-SeT assay on collection strains

The OXA-48 K-SeT assay was able to detect all the isolates that produced an OXA-48-like enzyme with carbapenemase activity ($n=38$) (Table 1). These OXA-48-like carbapenemases included 21 OXA-48, 1 OXA-162, 8 OXA-181, 4 OXA-204, 2 OXA-232 and 2 OXA-244 (Table 1). All isolates that did not produce an OXA-48-like carbapenemase gave negative results, including 21 KPC enzymes, 47 metallo- β -lactamases (21 NDM, 15 VIM and 11 IMP) and 55 non-carbapenemase-producing strains (Table 1).

Interestingly, no cross-reaction was observed either with strains that produced a narrow-spectrum oxacillinase, such as OXA-1 ($n=15$), OXA-2 ($n=1$), OXA-9 ($n=11$) and OXA-10 ($n=3$), or with strains that produced an extended-spectrum oxacillinase of OXA-48-type devoid of any significant carbapenemase activity, such as OXA-163 ($n=2$) and OXA-405 ($n=1$) (see Table 1). Therefore, the OXA-48 K-SeT assay seems to recognize only OXA-48-like enzymes that are able to hydrolyse carbapenems. Furthermore, for six OXA-48-like producers, the MICs of carbapenems were only slightly increased and remained under the EUCAST screening breakpoints for imipenem (imipenem MIC ≤ 1.0 mg/L). The OXA-48 K-SeT assay perfectly detected those isolates even though the carbapenemase activity was weak with biochemical tests.

The Carba NP test yielded equivocal results for two isolates (one OXA-181- and one OXA-244-producing isolate) and was unable to detect a single OXA-244 producer. Besides these 3 strains, the Carba NP test was able to detect the other 103 carbapenemase producers regardless of the carbapenemase type. None of the control strains gave false-positive results ($n=55$).

Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT assay

During the study period, a total of 185 consecutive enterobacterial clinical isolates with decreased susceptibility to at least one carbapenem were referred by several laboratories throughout France to the Associated French NRC for CPE. A carbapenemase was detected in 47% (87/185) of the isolates (Table 2). For the 98 non-carbapenemase-producing isolates, the decreased carbapenem susceptibility resulted from ESBLs and/or cephalosporinase production associated with reduced outer membrane permeability (Table 2).

Again, the OXA-48 K-SeT assay was able to detect all the isolates that produced an OXA-48-like carbapenemase ($n=62$), including 51 OXA-48 producers, 10 OXA-181 producers and 1 isolate coproducing OXA-48 and NDM-1 (Table 2). In addition, for these OXA-48-like-positive bacteria, the diameter of the temocillin disc was always <15 mm, confirming the interest of this antibiotic as a marker to detect oxacillinases with carbapenemase activity (data not shown).¹⁹

All isolates that did not produce an OXA-48-like carbapenemase gave negative results, including 25 carbapenemase producers (1 KPC-2, 20 NDM-1, 2 NDM-7 and 2 VIM-1) and the 98 non-CPE (Table 2).

During this prospective study, the Carba NP test correctly identified all the carbapenemase-producing strains ($n=87$) and gave negative results for all non-CPE isolates ($n=98$).

Table 1. Results of the OXA-48 K-SeT assay and the Carba NP test on a collection of strains comprising carbapenemase and non-carbapenemase producers

Bacterial species	Number of isolates	β -Lactamase content	OXA-48 K-SeT ^a	Carba NP test ^a	MIC range (mg/L)				
					IPM	ETP	MEM		
Ambler class D carbapenemases									
OXA-48	<i>E. coli</i>	4	OXA-48 + CTX-M-15	P	P	0.38–3	0.75–16	0.12–1	
	<i>E. coli</i>	2	OXA-48 + CTX-M-24 + TEM-1	P	P	0.25–0.75	0.5–1	0.19	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-48 + TEM-1	P	P	0.38	1	0.5	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-48 + CTX-M-15	P	P	2	3	2	
	<i>K. pneumoniae</i>	4	OXA-48	P	P	0.5 to >32	2 to >32	0.5 to >32	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-48 + SHV-11	P	P	0.5	0.75	0.25	
	<i>K. pneumoniae</i>	2	OXA-48 + CTX-M-15 + TEM-1	P	P	0.5–0.75	16 to >32	1–1.5	
	<i>E. cloacae</i>	2	OXA-48 + TEM-1 + CTX-M-15 + OXA-1	P	P	0.5–1	2.0–16	0.5–1.5	
	<i>E. cloacae</i>	1	OXA-48 + SHV-5	P	P	2	8	1	
	<i>C. koseri</i>	1	OXA-48	P	P	0.38	2	0.38	
	<i>C. koseri</i>	1	OXA-48 + TEM-1	P	P	0.75	2	0.38	
	<i>C. freundii</i>	1	OXA-48 + SHV-12 + TEM-1	P	P	0.75	1.5	0.38	
	OXA-162	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-162 + TEM-1 + SHV-11	P	P	4	8	1
OXA-181	<i>E. coli</i>	1	OXA-181	P	P	0.38	1.5	0.19	
	<i>E. coli</i>	1	OXA-181	P	E	0.5	1.5	0.25	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-181 + SHV-11 + TEM-1 + CTX-M-15 + NDM-1 + OXA-1	P	P	3	>32	4	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-181 + SHV-27 + CTX-M-15 + TEM-1 + NDM-1 + OXA-1	P	P	>32	>32	>32	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-181 + SHV-11 + CTX-M-15 + NDM-1 + OXA-1	P	P	>32	>32	>32	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-181 + SHV-11 + TEM-1 + CTX-M-15 + NDM-1 + OXA-9	P	P	16	>32	>32	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-181 + SHV-11 + CTX-M-15 + OXA-1	P	P	0.5	2	0.5	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-181 + NDM-1 + SHV-2 + CTX-M-15 + OXA-1	P	P	>32	>32	16	
	OXA-204	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-204 + CMY-4	P	P	0.5	2	0.5
		<i>E. coli</i>	1	OXA-204 + CMY-4 + CTX-M-15 + OXA-1	P	P	0.5	2	0.25
<i>E. coli</i>		1	OXA-204 + CMY-4 + CTX-M-15	P	P	0.5	2	0.38	
<i>K. pneumoniae</i>		1	OXA-204 + SHV-28 + TEM-1 + CTX-M-15	P	P	0.5	16	0.75	
OXA-232		<i>E. coli</i>	1	OXA-232 + CTX-M-15 + OXA-1	P	P	>32	>32	>32
OXA-244	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-232 + SHV-1 + TEM-1 + CTX-M-15 + OXA-1	P	P	3	>32	12	
	<i>E. coli</i>	1	OXA-244 + TEM-1 + CMY-2	P	E	0.5	2	0.5	
<i>E. coli</i>	1	OXA-244 + TEM-1 + CMY-2	P	N	0.5	1.5	0.5		
Ambler class A carbapenemases									
KPC-2	<i>E. coli</i>	2	KPC-2	N	P	0.5–1	0.5 to >32	0.5–3	
	<i>E. coli</i>	1	KPC-2 + TEM-1 + OXA-9	N	P	2	1.5	1	
	<i>E. coli</i>	1	KPC-2 + CTX-M-9 + TEM-1	N	P	4	4	2	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	KPC-2 + SHV-11 + TEM-1 + CTX-M-2	N	P	16	24	32	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	KPC-2 + SHV-11 + TEM-1 + CTX-M-2 + OXA-9	N	P	>32	>32	>32	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	KPC-2 + SHV-11 + CTX-M-15	N	P	16	>32	>32	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	KPC-2 + TEM-1 + SHV-1 + CTX-M-15	N	P	4	4	32	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	KPC-2 + SHV-11 + TEM-1 + SHV-12 + OXA-9	N	P	4	24	2	
	<i>K. pneumoniae</i>	1	KPC-2 + SHV-11	N	P	>32	>32	>32	

Continued

Table 1. Continued

Bacterial species	Number of isolates	β -Lactamase content	OXA-48 K-SeT ^a	Carba NP test ^a	MIC range (mg/L)			
					IPM	ETP	MEM	
<i>K. pneumoniae</i>	1	KPC-2 + SHV-11 + TEM-1	N	P	4	6	8	
<i>E. cloacae</i>	1	KPC-2	N	P	1	1.5	0.75	
<i>E. cloacae</i>	1	KPC-2 + TEM-1	N	P	24	>32	16	
<i>E. cloacae</i>	1	KPC-2 + TEM-1 + OXA-1	N	P	4	6	2	
<i>E. cloacae</i>	1	KPC-2 + TEM-1 + SHV-11	N	P	2	4	1.5	
<i>E. cloacae</i>	1	KPC-2 + TEM-3	N	P	2	2	1	
<i>C. freundii</i>	1	KPC-2 + TEM-1	N	P	8	1.5	3	
<i>S. marcescens</i>	1	KPC-2 + TEM-1 + SHV-12	N	P	>32	>32	>32	
<i>S. marcescens</i>	1	KPC-2 + TEM-1	N	P	>32	>32	>32	
<i>K. pneumoniae</i>	1	KPC-3 + SHV-11 + OXA-9 + TEM-1	N	P	8	>32	8	
KPC-3	<i>K. ozaenae</i>	1	KPC-3 + OXA-9 + TEM-1	N	P	>32	>32	2
NDM-type	<i>E. coli</i>	1	NDM-1 + OXA-1 + OXA-10 + CMY-16 + TEM-1	N	P	1	3	1
	<i>E. coli</i>	1	NDM-1 + OXA-1 + TEM-1	N	P	3	3	2
	<i>E. coli</i>	1	NDM-1 + CTX-M-15 + TEM-1	N	P	6	32	16
	<i>E. coli</i>	1	NDM-1 + OXA-1 + OXA-2 + CTX-M-15 + TEM-1	N	P	4	>32	8
	<i>E. coli</i>	1	NDM-1 + CTX-M-15 + TEM-1	N	P	16	>32	16
	<i>E. coli</i>	1	NDM-4 + CTX-M-15 + OXA-1	N	P	>32	>32	>32
	<i>E. coli</i>	1	NDM-4 + CTX-M-15 + CMY-6	N	P	>32	>32	>32
	<i>E. coli</i>	1	NDM-5 + TEM-1 + CTX-M-15	N	P	>32	>32	>32
	<i>E. coli</i>	1	NDM-6 + CTX-M-15 + OXA-1	N	P	6	32	8
	<i>E. coli</i>	1	NDM-7	N	P	4	16	3
	<i>K. pneumoniae</i>	1	NDM-1 + CTX-M-15 + SHV-11 + OXA-1	N	P	2	8	3
	<i>K. pneumoniae</i>	1	NDM-1 + CTX-M-15 + CMY-4 + OXA-1	N	P	>32	>32	>32
	<i>K. pneumoniae</i>	1	NDM-1 + CTX-M-15 + OXA-1 + OXA-9 + TEM-1 + SHV-28 + SHV-11	N	P	>32	>32	>32
	<i>K. pneumoniae</i>	1	NDM-1 + OXA-1 + SHV-11	N	P	1.5	6	2
	<i>K. pneumoniae</i>	1	NDM-1 + OXA-1 + CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-28 + OXA-9 + CMY-6	N	P	1	8	4
	<i>K. pneumoniae</i>	1	NDM-1 + TEM-1 + CTX-M-15 + SHV-12 + OXA-9	N	P	1.5	8	1.5
	<i>K. pneumoniae</i>	1	NDM-1 + TEM-1 + CTX-M-15 + SHV-12 + OXA-9	N	P	4	8	16
	<i>K. pneumoniae</i>	1	NDM-1 + TEM-1 + CTX-M-15 + SHV-11 + OXA-1	N	P	2	>32	4
	<i>P. stuartii</i>	1	NDM-1 + OXA-1 + CMY-6 + TEM-1	N	P	12	0.38	1.5
	<i>P. rettgeri</i>	1	NDM-1 + CTX-M-15	N	P	3	0.5	1.5
<i>S. enterica</i>	1	NDM-1 + CTX-M-15 + TEM-1 + OXA-1 + OXA-9 + OXA-10	N	P	4	6	3	
VIM-type	<i>E. coli</i>	1	VIM-1 + CTX-M-3	N	P	1.5	0.38	0.5
	<i>E. coli</i>	1	VIM-1 + CMY-13	N	P	3	1.5	1
	<i>E. coli</i>	1	VIM-4	N	P	8	4	3
	<i>K. pneumoniae</i>	1	VIM-1 + SHV-12	N	P	>32	>32	>32
	<i>K. pneumoniae</i>	2	VIM-1	N	P	>32	>32	>32
	<i>K. pneumoniae</i>	1	VIM-1 + CTX-M-3	N	P	1	0.5	1
	<i>K. pneumoniae</i>	3	VIM-1 + SHV-5	N	P	0.5 to >32	4 to >32	0.38 to >32
	<i>K. pneumoniae</i>	1	VIM-19 + CTX-M-3 + TEM-1 + SHV-1	N	P	8	16	4
	<i>E. cloacae</i>	1	VIM-1 + SHV-70	N	P	1	0.38	0.5
	<i>E. cloacae</i>	1	VIM-4 + CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-31	N	P	3	2	1

	<i>C. freundii</i>	1	VIM-2 + TEM-1	N	P	2	2	0.75
	<i>C. freundii</i>	1	VIM-2 + TEM-1 + OXA-9 + OXA-10	N	P	1.5	4	0.5
IMP-type	<i>E. coli</i>	1	IMP-1	N	P	0.5	3	0.5
	<i>E. coli</i>	1	IMP-8 + SHV-12	N	P	6	8	3
	<i>K. pneumoniae</i>	1	IMP-1	N	P	1.5	3	1
	<i>K. pneumoniae</i>	1	IMP-1 + TEM-15	N	P	8	3	2
	<i>K. pneumoniae</i>	1	IMP-1 + TEM-15 + CTX-M-15	N	P	1.5	4	2
	<i>K. pneumoniae</i>	1	IMP-1 + SHV-5	N	P	1	2	8
	<i>K. pneumoniae</i>	1	IMP-8	N	P	1	1	0.5
	<i>K. pneumoniae</i>	1	IMP-8 + SHV-12	N	P	0.5	0.5	0.5
	<i>E. cloacae</i>	1	IMP-8	N	P	1.5	1	1
	<i>E. cloacae</i>	1	IMP-8 + SHV-12	N	P	0.75	0.5	0.5
	<i>S. marcescens</i>	1	IMP-11	N	P	8	>32	2
Non-carbapenemase producers								
WT	<i>K. pneumoniae</i>	1	SHV-11	N	N	0.06	0.06	0.06
acquired cephalosporinase	<i>E. coli</i>	1	DHA-1	N	N	0.12	0.02	0.02
	<i>E. coli</i>	1	ACC-1	N	N	0.12	0.12	0.12
	<i>K. pneumoniae</i>	1	DHA-2	N	N	0.12	0.5	0.12
ESBL	<i>P. mirabilis</i>	1	ACC-1	N	N	0.25	0.12	0.12
	<i>E. coli</i>	1	CTX-M-1	N	N	0.12	0.12	0.12
	<i>E. coli</i>	1	CTX-M-3	N	N	0.12	0.12	0.12
	<i>K. pneumoniae</i>	1	CTX-M-3	N	N	0.12	0.12	0.12
	<i>E. coli</i>	2	CTX-M-14	N	N	0.12	0.12	0.12
	<i>K. pneumoniae</i>	1	CTX-M-14	N	N	0.12	0.12	0.12
	<i>E. coli</i>	2	CTX-M-15	N	N	0.12	0.12	0.12
	<i>K. pneumoniae</i>	3	CTX-M-15	N	N	0.12	0.12	0.12
	<i>E. cloacae</i>	1	CTX-M-15	N	N	0.12	0.12	0.12
	<i>E. cloacae</i>	1	VEB-1	N	N	0.12	0.12	0.12
cephalosporinase + impermeability	<i>E. coli</i>	1	↑↑↑ cephalosporinase ^b	N	N	16	>32	2
	<i>E. cloacae</i>	14	↑↑↑ cephalosporinase	N	N	0.12-8	0.75 to >32	0.12-4
	<i>E. aerogenes</i>	1	↑↑↑ cephalosporinase	N	N	1	4	0.75
	<i>M. morgani</i>	1	↑↑↑ cephalosporinase	N	N	1.5	0.02	0.12
ESBL + impermeability	<i>E. coli</i>	1	CTX-M-15	N	N	2	4	1
	<i>K. pneumoniae</i>	1	CTX-M-15 + SHV-1	N	N	1	>32	4
	<i>K. pneumoniae</i>	2	CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-1	N	N	0.25-1.5	1 to >32	1-4
	<i>K. pneumoniae</i>	1	CTX-M-15 + SHV-11	N	N	1.5	>32	6
	<i>K. pneumoniae</i>	1	CTX-M-15 + SHV-28 + TEM-1	N	N	8	>32	4
	<i>K. pneumoniae</i>	1	TEM-1 + SHV-28	N	N	1	4	1
	<i>K. pneumoniae</i>	3	CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-11	N	N	0.25-6	1 to >32	1 to >32
	<i>K. pneumoniae</i>	1	CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-12	N	N	0.75	>32	3
	<i>K. pneumoniae</i>	1	CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-11	N	N	1	24	0.5
	<i>K. pneumoniae</i>	1	CTX-M-15 + TEM-1 + SHV-1 + OXA-1	N	N	2	4	1
ESBL + cephalosporinase + impermeability	<i>E. cloacae</i>	3	↑↑↑ cephalosporinase + CTX-M-15	N	N	1.5-3	6-12	1-2
	<i>C. freundii</i>	1	↑↑↑ cephalosporinase + TEM-3	N	N	1	8	1
extended-spectrum oxacillinases	<i>K. pneumoniae</i>	1	OXA-163	N	N	0.5	0.38	0.12
	<i>E. cloacae</i>	1	OXA-163	N	N	0.5	2	0.19
	<i>S. marcescens</i>	1	OXA-405	N	N	0.5	0.75	0.19

IPM, imipenem; ETP, ertapenem; MEM, meropenem.

^aP indicates a positive result, N indicates a negative result and E indicates an equivocal result.

^bOverexpressed cephalosporinase.

Table 2. Results of the OXA-48 K-SeT assay and the Carba NP test on enterobacterial isolates referred to the NRC from 15 February to 15 March 2015

β -Lactamase content	Species	Number of isolates	OXA-48 K-SeT ^a	Carba NP test ^a
OXA-48-like carbapenemases				
OXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	24	P	P
	<i>E. coli</i>	11	P	P
	<i>C. freundii</i>	8	P	P
	<i>E. cloacae</i>	4	P	P
	<i>K. oxytoca</i>	2	P	P
	<i>C. koseri</i>	1	P	P
	<i>C. amalonaticus</i>	1	P	P
OXA-181	<i>E. coli</i>	10	P	P
OXA-48+NDM-1	<i>K. pneumoniae</i>	1	P	P
Other carbapenemases				
NDM-1	<i>K. pneumoniae</i>	13	N	P
	<i>E. coli</i>	3	N	P
	<i>M. morgani</i>	3	N	P
	<i>E. cloacae</i>	1	N	P
NDM-7	<i>E. coli</i>	2	N	P
VIM-1	<i>E. cloacae</i>	1	N	P
	<i>E. coli</i>	1	N	P
KPC-2	<i>K. pneumoniae</i>	1	N	P
Non-carbapenemase producers				
ESBL + impermeability	<i>K. pneumoniae</i>	18	N	N
	<i>E. coli</i>	5	N	N
	<i>E. cloacae</i>	2	N	N
cephalosporinase + impermeability	<i>E. cloacae</i>	38	N	N
	<i>E. aerogenes</i>	3	N	N
	<i>K. pneumoniae</i>	2	N	N
	<i>M. morgani</i>	2	N	N
	<i>S. marcescens</i>	2	N	N
	<i>E. coli</i>	1	N	N
	<i>H. alvei</i>	1	N	N
	<i>C. freundii</i>	1	N	N
cephalosporinase + ESBL + impermeability	<i>E. cloacae</i>	15	N	N
	<i>C. freundii</i>	2	N	N
	<i>E. coli</i>	1	N	N
	<i>K. pneumoniae</i>	1	N	N
other	<i>K. pneumoniae</i>	4	N	N

^aP indicates a positive result and N indicates a negative result.

Global performances of the OXA-48 K-SeT assay

Based on the overall results (collection strains and prospective study), the sensitivity and specificity of the OXA-48 K-SeT assay reached 100% (95% CI=96.3%–100%) and 100% (95% CI=98.5%–100%), respectively. From the prospective study, the assessment of the assay using clinical isolates showed that the OXA-48 K-SeT assay yielded excellent positive and negative predictive values (both 100%).

Considering equivocal results as invalid results, the sensitivity and specificity of the Carba NP test were 98.5% (95% CI=95.6%–99.5%) and 100% (95% CI=97.6%–100%), respectively. The Carba NP test confirmed its high performance as a

general screening method for the presence of carbapenemases, yielding excellent results during this prospective evaluation (positive and negative predictive values of 100%).

Discussion

The OXA-48 K-SeT assay is an immunochromatographic assay designed to detect the carbapenemase OXA-48 and its variants that possess carbapenem-hydrolysing activity, when associated with or without other β -lactamases. On the 346 tested isolates, no false positives, false negatives or ambiguous results were observed in this study. Globally, the performance of the OXA-48

K-SeT assay was 100% (95% CI=96.3%–100%) for sensitivity and 100% (95% CI=98.5%–100%) for specificity. The OXA-48 K-SeT assay can be easily performed by untrained personnel and it does not lead to subjective interpretation. The test gives easy-to-read results after only 15 min of incubation, providing a very quick answer to whether the strain produces an OXA-48-like carbapenemase. This is particularly relevant in countries with a high prevalence of OXA-48 producers where it might be proposed to perform the OXA-48 K-SeT assay: (i) on all enterobacterial isolates with decreased susceptibility to carbapenems (inhibition diameters <25, <23 and <25 mm for meropenem, imipenem and ertapenem, respectively, according to Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (CA-SFM) recommendations) and presenting an inhibition zone diameter of temocillin <15 mm; (ii) on colonies grown on CPE screening media; or (iii) directly on clinical samples such as urine as proposed by Wareham *et al.*¹⁷ However, since the OXA-48 K-SeT assay only detects OXA-48 carbapenemase variants, it has to be used in combination with other diagnostic methods based on the detection of carbapenemase hydrolytic activity and with molecular methods to detect co-expression of several carbapenemases and identify their variants.

Interestingly, another immunochromatographic assay has been developed for the detection of IMP-type metallo-carbapenemases that are highly prevalent in South-East Asia. This test also presented excellent 100% sensitivity and 100% specificity for the detection of IMP-type carbapenemases in *Pseudomonas* spp.²⁰ Moreover, Glupczynski *et al.*¹⁸ developed a single immunochromatographic test for the detection of both OXA-48-like and KPC carbapenemases. Thus, in the near future, the combination of different antibodies targeting several carbapenemases in a single immunochromatographic assay might provide a very powerful tool for the detection of CPEs.

Funding

This work was funded by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche (EA7361), Université Paris Sud and by a grant from the European Community (MAGIC-BULLET, FP7/HEALTH-F3-2001-27823). L. D., A. J., G. C. and T. N. are members of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

Transparency declarations

An international patent form for the Carba NP test has been filed on behalf of public translational research INSERM Transfert (Paris, France). This patent has been licensed to bioMérieux Inc. and the co-inventor of the patent (L. D.) received fees from INSERM Transfert according to French law. All other authors: none to declare.

References

- Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 839–53.
- Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med* 2012; **18**: 263–72.
- Tsakris A, Poulou A, Bogaerts P *et al.* Evaluation of a new phenotypic OXA-48 disk test for differentiation of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 1245–51.
- Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH₄HCO₃, a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 1731–5.
- Dortet L, Brechard L, Poirel L *et al.* Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae using an updated version of the Carba NP test. *J Med Microbiol* 2014; **63**: 772–6.
- Dortet L, Agathine A, Naas T *et al.* Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 3014–22.
- Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 274–6.
- Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 6437–40.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 1791–8.
- Hemarajata P, Yang S, Hindler JA *et al.* Development of a novel real-time PCR assay with high-resolution melt analysis to detect and differentiate OXA-48-like β-lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 5574–80.
- Glasner C, Albiger B, Buist G *et al.* Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill* 2013; **18**: pii=20525.
- Dortet L, Oueslati S, Jeannot K *et al.* Genetic and biochemical characterization of OXA-405, an OXA-48-type extended-spectrum β-lactamase without significant carbapenemase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 3823–8.
- Oueslati S, Nordmann P, Poirel L. Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like β-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 1059–63.
- Poirel L, Castanheira M, Carrère A *et al.* OXA-163, an OXA-48-related class D β-lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 2546–51.
- Gomez S, Pasteran F, Faccione D *et al.* Inpatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2013; **19**: E233–5.
- Poirel L, Dortet L, Bernabeu S *et al.* Genetic features of bla_{NDM-1}-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 5403–7.
- Wareham DW, Shah R, Betts JW *et al.* Evaluation of an immunochromatographic lateral flow assay (OXA-48 K-SeT) for rapid detection of OXA-48-like carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2016; **54**: 471–3.
- Glupczynski Y, Evrard S, Ote I *et al.* Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2016; doi:10.1093/jac/dkv472.
- Dortet L, Cuzon G, Plésiat P *et al.* Prospective evaluation of an algorithm for the phenotypic screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 135–40.
- Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Tanaka M *et al.* Development of an immunochromatographic assay for diagnosing the production of IMP-type metallo-β-lactamases that mediate carbapenem resistance in *Pseudomonas*. *J Microbiol Methods* 2011; **87**: 330–7.

Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases

Youri Glupczynski^{1*}, Agnès Jousset²⁻⁴, Stéphanie Evrard¹, Rémy A. Bonnin²⁻⁴, Te-Din Huang¹, Laurent Dortet²⁻⁴, Pierre Bogaerts¹ and Thierry Naas²⁻⁴

¹Laboratory of Clinical Microbiology, National Reference Centre for Monitoring Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria, CHU UCL Namur, Yvoir, Belgium; ²Department of Bacteriology-Parasitology-Hygiene, Bicêtre Hospital, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, France; ³Research Unit EA7361 'Structure, dynamic, function and expression of broad-spectrum β -lactamases', Faculty of Medicine, Université Paris Sud, Université Paris Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France; ⁴Associated French National Reference Centre for Antibiotic Resistance, Le Kremlin-Bicêtre, France

*Corresponding author. Tel: +32-81-423-245; Fax: +32-81-423-246; E-mail: gerald.glupczynski@uclouvain.be

Received 24 January 2017; returned 21 February 2017; revised 27 February 2017; accepted 27 February 2017

Objectives: There is an urgent need for accurate and fast diagnostic tests capable of identifying carbapenemase producers. Here, we assessed the performance of a new multiplex lateral flow assay (OKN K-SeT) for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from culture colonies.

Methods: Two hundred collection isolates with characterized β -lactamase content and 183 non-duplicate consecutive isolates referred to two National Reference Centres over a 2 month period in 2016 were used to evaluate the OKN K-SeT assay.

Results: The assay correctly detected all 42 OXA-48-like-, 27 KPC- and 30 NDM-producing isolates from the collection panel, including 7 isolates that co-produced NDM and OXA-181 carbapenemases. No cross-reactivity was observed with non-targeted carbapenemases ($n = 41$) or with non-carbapenemase producers ($n = 60$). Prospectively, all OXA-48-like ($n = 69$), KPC ($n = 9$) and NDM ($n = 19$) carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates were correctly detected, while 11 carbapenemase producers not targeted by the assay went undetected [VIM ($n = 8$) and OXA-23/OXA-58-like ($n = 3$)]. Overall, the sensitivity and specificity of the assay were 100%.

Conclusions: The OKN assay is efficient, rapid and easy to implement in the workflow of a clinical microbiology laboratory for the confirmation of OXA-48, NDM and KPC carbapenemases. This test represents a powerful diagnostic tool as it enables the rapid detection of the most clinically important carbapenemases without the need for more costly and less frequently available molecular assays.

Introduction

The emergence and global dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) constitutes a major public health concern. Accurate and timely detection of CPE is essential for patient management and for rapid implementation of appropriate infection control measures.^{1,2} In addition, the most promising therapies to treat infection caused by CPE involve combinations of a broad-spectrum β -lactam and a β -lactamase inhibitor (e.g. ceftazidime/avibactam) that are only active against certain classes of carbapenemases [e.g. avibactam inhibits Ambler class A and D carbapenemase but not metallo- β -lactamases (MBLs)].

Accordingly, it becomes crucial not only to detect a carbapenemase activity but also to characterize the enzyme. However, the detection of CPE constitutes one of the most challenging issues for diagnostic microbiological laboratories as it is extremely difficult to detect them based only on the resistance phenotype.³

Since 2010, various tests have been developed for the detection of carbapenemase activity in cultured bacteria. These include inhibitor-based tests,³ tests based on carbapenem hydrolysis including the colorimetric assays (e.g. the Carba NP tests or derivatives),^{4,5} MS,⁶ electrochemical assays (e.g. the BYG test)⁷ and the carbapenem inactivation method.⁸ All these tests are able to

detect the presence of carbapenemase activity and sometimes to discriminate between Ambler class A, B and D carbapenemases (e.g. Carba NP test II, combined disc test inhibition tests).^{3–5} However, one of their major limitations relates to the absence of reliable phenotypical tests for detection of OXA-48 producers. This is mostly due to (i) the lack of suitable inhibitor compounds that might be used in confirmatory tests and (ii) weak carbapenemase activity, which might affect their detection by biochemical methods^{9–12} and results in relatively low MICs of carbapenems.

Recently, lateral flow assays based on monoclonal antibodies generated by immunization in mice have been developed for easy and rapid detection of OXA-48-like and KPC carbapenemases.^{13,14} This technology was shown by our group¹⁴ and confirmed by several other investigators in different countries^{15–18} to be a powerful means (100% sensitivity and 100% specificity) to identify OXA-48 and KPC producers within 15 min directly from bacterial colonies. The potential of the OXA-48-K-Se T[®] assay (Coris BioConcept) for the direct detection of OXA-48-producing strains in biological samples such as blood or urine (detection limit of 10⁶ cfu/mL) was also highlighted in some of the studies.^{15,18}

Here we present the evaluation of a new multiplex assay (the OKN K-SeT), which incorporates specific antibodies against OXA-48, NDM and KPC in a single test and aims to detect these three carbapenemases directly from solid cultures.

Materials and methods

Strain collection

Two hundred enterobacterial isolates with characterized β -lactamase content, referred to the Associated French National Reference Centre for Antibiotic Resistance between 2008 and 2014, were selected to validate the OKN K-SeT assay. This strain collection included 60 non-carbapenemase producers with various resistance mechanisms to carbapenems (including ESBL and/or acquired AmpC cephalosporinases \pm impermeability and extended-spectrum oxacillinases OXA-163 and OXA-405) and 140 carbapenemase producers, including 36 Ambler class A carbapenemase producers [KPC ($n = 27$), IMI ($n = 3$), GES ($n = 2$), SME ($n = 2$), NMC-A ($n = 1$) and FRI-1 ($n = 1$)], 61 metallo- β -lactamase producers (Ambler class B) [NDM ($n = 30$), VIM ($n = 18$), IMP ($n = 12$) and GIM ($n = 1$)], 42 OXA-48-like producers (Ambler class D) [OXA-48 ($n = 22$), OXA-162 ($n = 1$), OXA-181 ($n = 10$), OXA-204 ($n = 5$), OXA-232 ($n = 2$) and OXA-244 ($n = 2$)] and 1 OXA-372 carbapenemase not related to OXA-48. Seven of the isolates from the collection panel harboured both *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA-181} genes. All isolates in the collection panel had been previously verified for the presence of carbapenemase using the updated version of the Carba NP test.¹⁹ PCR/sequencing results for β -lactamases genes were used as reference gold standard as previously described.²⁰

Prospective analysis

From 15 July to 15 September 2016, all non-duplicate clinical isolates with decreased susceptibility to at least one carbapenem referred to the Belgian National Reference Centre were included (183 isolates). All isolates were verified for the presence of carbapenemase using the updated version of the BYG Carba test (BYG Carba v2.0).²¹ Carbapenemase resistance genes were sought in all tested strains by two in-house ISO15189-certified multiplex PCRs targeting *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP},²² and the amplicons were sequenced using external Sanger sequencing services (Macrogen, Seoul, Korea) for allele identification.

Susceptibility testing

MICs of carbapenems (imipenem, meropenem and ertapenem) were determined using the Etest (bioMérieux, La Balme les Grottes, France) and the results were interpreted according to the EUCAST guidelines (version 6.0, January 2016; <http://www.eucast.org>).

OKN K-SeT assay

The OKN K-SeT assay is a multiplex lateral flow assay developed by Coris BioConcept (Gembloux, Belgium) for the detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases in a single test. For this study, the strains to be tested were grown on trypticase soy agar supplemented with 5% sheep blood (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) for 16–24 h at 37°C. The tests were performed according to the manufacturer's recommendations.¹⁴

Statistical analysis

The sensitivity and specificity of the assay were calculated on all tested strains (collection strains and prospective consecutively obtained isolates), whereas the positive and negative predictive values were calculated only on the consecutive isolates that had been referred prospectively to the Belgian National Reference Centre.

Results

Performance of the OKN K-SeT assay on collection strains

The OKN K-SeT assay was able to detect correctly all OXA-48-like-producing isolates with carbapenemase activity ($n = 42$), as well as those producing KPC [$n = 27$; including KPC-2 ($n = 22$) and KPC-3 ($n = 5$)] and NDM [$n = 30$; including NDM-1 ($n = 24$), NDM-4 ($n = 2$), NDM-5 ($n = 1$), NDM-6 ($n = 1$), NDM-7 ($n = 1$) and NDM-9 ($n = 1$)] (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online). The OXA-48-like carbapenemases included the following variants: OXA-48 ($n = 22$), OXA-162 ($n = 1$), OXA-181 ($n = 10$), OXA-204 ($n = 5$), OXA-232 ($n = 2$) and OXA-244 ($n = 2$). Although most of the OXA-48-like isolates presented only slightly elevated MICs of carbapenem, they were perfectly detected by the test (Table S1). On the other hand, all CPE strains that produced an enzyme not belonging to any of these three major carbapenemase families yielded negative results with the test. These isolates included 9 Ambler class A carbapenemase producers [IMI ($n = 3$), GES ($n = 2$), SME ($n = 2$), NMC-A ($n = 1$) and FRI-1 ($n = 1$)], 31 metallo- β -lactamase producers of Ambler class B [VIM ($n = 18$), IMP ($n = 12$) and GIM ($n = 1$)] and 1 OXA-372, a novel class D carbapenem-hydrolysing β -lactamase unrelated to OXA-48.²³ Likewise, all 60 non-carbapenemase-producing isolates gave negative results with the test.

No cross-reaction was observed with strains that produced a narrow-spectrum oxacillinase, such as OXA-1 ($n = 15$), OXA-2 ($n = 1$), OXA-9 ($n = 14$) and OXA-10 ($n = 3$), or with strains that produced an extended-spectrum oxacillinase of OXA-48 type devoid of any significant carbapenemase activity, such as OXA-163 ($n = 2$) and OXA-405 ($n = 1$). These data are in line with results from previous evaluations by the OXA-48 K-SeT assay and they confirm the excellent specificity of this new triplex assay, which recognizes only carbapenem-hydrolysing OXA-48-like variants.

Remarkably, the OKN K-SeT assay perfectly detected the targeted carbapenemases even in rare CPE isolates that lacked or presented a very weak carbapenemase activity, as revealed with

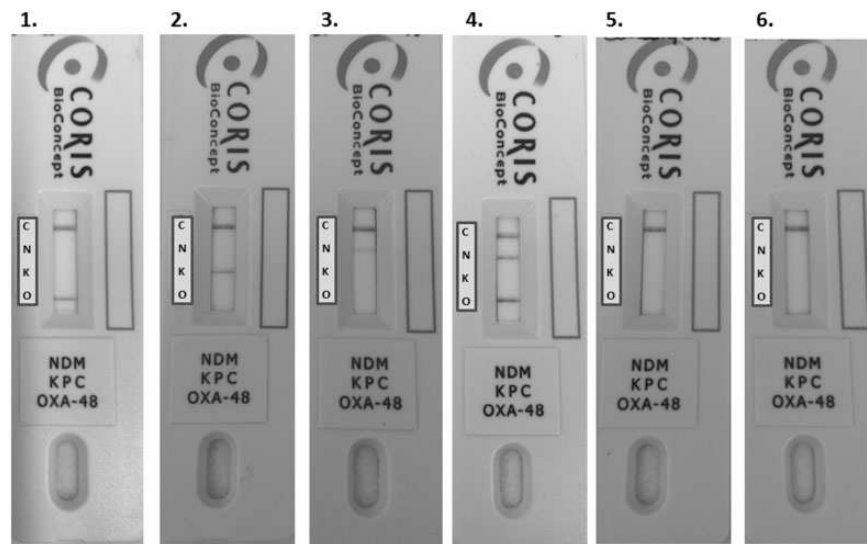


Figure 1. Multiplex lateral flow immunochromatographic assay for the detection of NDM (N), KPC (K) and OXA-48-like (O) carbapenemases. For a negative result a single line appears at the position of the control line (C). Examples of positive (1, 2, 3 and 4) and negative (5 and 6) results are shown. 1, *Klebsiella pneumoniae* OXA-48 positive; 2, *K. pneumoniae* KPC-3; 3, *Escherichia coli* NDM-1; 4, *E. coli* NDM-1 + OXA-181; 5, *K. pneumoniae* OXA-163; 6, *K. pneumoniae* ESBL (CTX-M-15) and impermeability.

the biochemical tests. Indeed, the Carba NP test yielded equivocal results for three isolates [OXA-181 ($n = 1$), OXA-244 ($n = 1$) and GES-5 ($n = 1$)] and it failed to detect three other strains [OXA-181 ($n = 1$), OXA-244 ($n = 1$) and IMI-2 ($n = 1$)]. Besides these 6 strains, the Carba NP test was able to detect the other 134 carbapenemase producers regardless of the carbapenemase type. None of the 60 control strains gave false-positive results. Examples of positive and negative results for the detection of OXA-48, KPC and NDM by the OKN assay are shown in Figure 1.

Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay

During the study period, 183 consecutive enterobacterial clinical isolates with decreased susceptibility to at least one carbapenem were referred by 57 clinical laboratories to the Belgian National Reference Centre for CPE. Using the BYG Carba test, a carbapenemase activity was detected in 57% (105/183) of the isolates (Table 1). During this prospective study, the BYG Carba failed to detect one OXA-48-positive *Enterobacter cloacae* and one VIM-1-producing *Citrobacter freundii*, both of which were detected by PCR. For the 76 non-carbapenemase-producing isolates (negative both by BYG Carba and by PCR testing), the decreased susceptibility to carbapenems resulted from ESBLs and/or cephalosporinase production associated with reduced outer membrane permeability (Table 1).

The OKN K-SeT assay was able to detect all the isolates that produced one of the three targeted carbapenemase families, including 69 OXA-48-like [OXA-48 ($n = 68$) and OXA-181 ($n = 1$)], 9 KPC (all KPC-3) and 19 NDM [NDM-1 ($n = 18$) and NDM-5 ($n = 1$)]. All isolates that produced a carbapenemase different from those targeted by the assay gave a negative result [namely, 11 CPE isolates [VIM-1 ($n = 8$), VIM-4 ($n = 1$), OXA-23 ($n = 1$) and OXA-58 ($n = 1$)], as did the 76 non-CPE (Table 1).

Interestingly, two OXA-23-producing *Proteus mirabilis* isolates and one OXA-58-producing *P. mirabilis* isolate yielded a positive

BYG Carba test but went undetected by our routine set of PCRs targeting the five major carbapenemase families in Enterobacteriaceae. These enzymes were detected through another multiplex PCR assay targeting other class D oxacillinases (data not shown) and by WGS.²⁴

Global performance of the OKN K-SeT assay

Based on the overall results (collection strains and prospective study), the sensitivity and specificity of the OKN K-SeT assay reached 100% (95% CI 96.7%–100%) and 100% (95% CI 98.6%–100%), respectively, for the detection of OXA-48-like, 100% (95% CI 90.4%–100%) and 100% (95% CI 98.9%–100%) for KPC, and 100% (95% CI 92.7%–100%) and 100% (95% CI 98.9%–100%) for NDM. Interestingly, it correctly detected eight isolates that contained a combination of NDM-1 and OXA-181 (seven in the collection panel and one in the prospective study). For the prospective study, the OKN K-SeT assay yielded a positive and negative predictive value of 100% for the detection of the three targeted carbapenemases.

Discussion

The OKN K-SeT assay is an immunochromatographic assay designed to detect OXA-48 and its variants that possess carbapenem-hydrolysing activities, and the NDM and KPC carbapenemase families. Globally, the performance of the OKN K-SeT assay was 100% for sensitivity and 100% for specificity without any false positives, false negatives or ambiguous results. In the prospective study, the assay allowed direct rapid detection of 97 of the 109 carbapenemases (89%) that were found in 107 CPE isolates. Thus, the use of additional confirmatory tests would have been required only for the detection of 12 CPE isolates (i.e. 9 VIM producers, including 1 VIM in combination with a KPC enzyme, and 2 OXA-23-producing *P. mirabilis* isolates and 1 OXA-58-producing *P. mirabilis* isolate).

Table 1. Results of the OKN K-SeT assay and of the BYG Carba test for enterobacterial isolates prospectively referred to the Belgian National Reference Centre

β -Lactamase content	Species	No. of isolates	RESIST-3 OKN K-SeT assay ^a	BYG Carba test ^a
Carbapenemase producers				
OXA-48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	42	OXA-48	P
	<i>E. cloacae</i>	12	OXA-48	P
	<i>E. cloacae</i>	1	OXA-48	N
	<i>Escherichia coli</i>	7	OXA-48	P
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	OXA-48	P
	<i>C. freundii</i>	2	OXA-48	P
	<i>Kluyvera georgiana</i>	1	OXA-48	P
OXA-48 + NDM-1	<i>E. coli</i>	1	OXA-48+NDM	P
NDM-1	<i>K. pneumoniae</i>	11	NDM	P
	<i>E. cloacae</i>	3	NDM	P
	<i>E. coli</i>	2	NDM	P
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	NDM	P
NDM-5	<i>E. coli</i>	1	NDM	P
KPC-3	<i>K. pneumoniae</i>	7	KPC	P
	<i>E. coli</i>	1	KPC	P
KPC-3 + VIM-1	<i>C. freundii</i>	1	KPC	P
VIM-1	<i>E. cloacae</i>	4	N	P
	<i>E. coli</i>	1	N	P
	<i>C. freundii</i>	1	N	N
	<i>Serratia marcescens</i>	1	N	P
VIM-4	<i>K. oxytoca</i>	1	N	P
OXA-23	<i>P. mirabilis</i>	2	N	P
OXA-58	<i>P. mirabilis</i>	1	N	P
Non-carbapenemase producers				
ESBL + impermeability	<i>K. pneumoniae</i>	19	N	N
	<i>E. cloacae</i>	11	N	N
	<i>E. coli</i>	8	N	N
	<i>C. freundii</i>	1	N	N
	<i>K. oxytoca</i>	1	N	N
	<i>E. cloacae</i>	1	N	N
cephalosporinase + impermeability	<i>E. aerogenes</i>	3	N	N
	<i>C. freundii</i>	1	N	N
	<i>Hafnia alvei</i>	1	N	N
	<i>S. marcescens</i>	1	N	N
	<i>K. pneumoniae</i>	1	N	N
DHA-1 + impermeability	<i>E. cloacae</i>	4	N	N
cephalosporinase + ESBL + impermeability	<i>E. aerogenes</i>	1	N	N
	<i>K. pneumoniae</i>	1	N	N
	<i>E. coli</i>	1	N	N
	<i>C. freundii</i>	1	N	N
	<i>E. coli</i>	3	N	N
other	<i>K. pneumoniae</i>	1	N	N
	<i>K. oxytoca</i>	3	N	N
	<i>E. cloacae</i>	1	N	N

For the RESIST-3 OKN K-SeT assay, the detected carbapenemases are indicated by their family name (OXA-48, NDM and KPC).

^aP, positive result; N, negative result.

The OKN K-SeT assay can be easily performed by untrained personnel in a routine laboratory workflow and gives easy-to-read results after only ≤ 15 min of incubation, providing a very quick answer to whether the strain produces an OXA-48-, KPC- or

NDM-like carbapenemase, or possibly a combination of more than one of these enzymes. In countries like Belgium or France, where these three enzyme families represent 90%–95% of all carbapenemases in Enterobacteriaceae (L. Dortet and Y. Glupczynski,

unpublished results) the OKN assay could be suitable for general testing for carbapenemase production in the following settings: (i) on all enterobacterial isolates with decreased susceptibility to carbapenems (inhibition diameters <28 and <25 mm for meropenem and ertapenem, respectively), according to EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms of clinical and/or epidemiological importance and presenting an inhibition zone diameter of temocillin <12 mm; (ii) on colonies growing on selective CPE screening media; or (iii) directly on clinical samples such as urine or blood, as previously proposed by Wareham *et al.*¹⁵ and Pasteran *et al.*¹⁸

Since the OKN assay does not detect certain carbapenemases (mostly the VIM family), the use of other diagnostic methods will still be required in cases of positive screening results based on the detection of carbapenem hydrolytic activity and a negative result by the immunochromatographic test. An update of the current assay with the addition of VIM-type monoclonal antibodies is currently under development and should in the near future fill the gap, thus making it possible to detect in a single rapid test the four major families of carbapenemases that are usually encountered in Enterobacteriaceae in Europe.

Meanwhile, the availability of the OKN K-SeT assay provides a powerful tool to detect carbapenemase producers cheaply (recommended price of €10 per test) in a local hospital setting and it represents a cost-effective alternative to more costly and less widely available characterization by molecular amplification methods.

The speed and ease of use of this multiplex assay represents a significant technical advance and makes it particularly attractive as it would decrease the need for molecular methods to confirm the results. Additional potential benefits would possibly also include better patient management, e.g. more rapid switching to ceftazidime/avibactam treatment in cases of infection caused by a KPC- or OXA-48-like CPE, and a reduction in the escalation of antibiotic resistance through better infection control.

Acknowledgements

We thank our Belgian microbiologist colleagues for referring their clinical isolates to the National Reference Centre. We would also like to thank Coris BioConcept for providing the OKN K-SeT assays.

Funding

The Belgian National Reference Centre is partially supported by the Belgian Ministry of Social Affairs through a fund within the health insurance system.

This study was supported in part by a research grant from the Region Wallonne under the CWALity convention n°1318265, project FEAR (Fighting Enterobacteriaceae Antibiotic Resistance), a grant from the French Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche (EA7361), Université Paris Sud and in part by a grant from Joint Programme Initiative on Antimicrobial Resistance (ANR-14-JAMR-0002). A. J., R. B., L. D. and T. N. are members of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

Transparency declarations

L. D. is co-inventor of the Carba NP test, the patent of which has been licensed to bioMérieux (La Balme les Grottes, France). All other authors: none to declare.

Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

References

- Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 821–30.
- Patel G, Bonomo RA. “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol* 2013; **4**: 48.
- Aguirre-Quiñonero A, Martínez-Martínez L. Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Infect Chemother* 2017; **23**: 1–11.
- Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 6437–40.
- Dortet L, Agathine A, Naas T *et al.* Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 3014–22.
- Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G *et al.* Efficient detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 2163–71.
- Bogaerts P, Yunus S, Massart M *et al.* Evaluation of the BYG Carba test, a new electrochemical assay for rapid laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2016; **54**: 349–58.
- Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 274–6.
- Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1597–606.
- Woodford N, Eastaway A, Ford M *et al.* Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 2999–3002.
- Pasteran F, Veliz O, Ceriana P *et al.* Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 1996–8.
- Kabir MH, Meunier D, Hopkins KL *et al.* A two-centre evaluation of RAPIDEC® CARBA NP for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1213–6.
- Ote I, Bogaerts P, Denorme L *et al.* Development of a novel immunochromatographic confirmatory test for the detection of OXA-48 carbapenemase in Enterobacteriaceae. In: *Abstracts of the Twenty-fifth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, Denmark*. Abstract O047. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Basel, Switzerland.
- Glupczynski Y, Evrard S, Ote I *et al.* Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1217–22.
- Wareham DH, Shah R, Betts JW *et al.* Evaluation of an immunochromatographic lateral flow assay (OXA-48 K-SeT) for rapid detection of OXA-48 like carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2016; **54**: 471–3.
- Dortet L, Jousset A, Sainte-Rose V *et al.* Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT assay, an immunochromatographic test for the

rapid detection of OXA-48-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1834–40.

17 Meunier D, Vickers A, Pike R et al. Evaluation of the K-SeT R.E.S.I.S.T. immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 2357–9.

18 Pasteran F, Denorme L, Ote I et al. Rapid identification of OXA-48 and OXA-163 subfamilies in carbapenem-resistant Gram-negative bacilli with a novel immunochromatographic lateral flow assay. *J Clin Microbiol* 2016; **54**: 2832–6.

19 Dortet L, Brechard L, Poirel L et al. Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae using an updated version of the Carba NP test. *J Med Microbiol* 2014; **63**: 772–6.

20 Dortet L, Cuzon G, Plésiat P et al. Prospective evaluation of an algorithm for the phenotypic screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 135–40.


21 Noël A, Huang TD, Berhin C et al. Comparative evaluation of four phenotypic tests for the detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 2017; **55**: 510–8.

22 Bogaerts P, Rezende de Castro R, de Mendonça R et al. Validation of carbapenemase and extended-spectrum β -lactamase multiplex endpoint PCR assays according to ISO 15189. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1576–82.


23 Antonelli A, D'Andrea MM, Vaggelli G et al. OXA-372, a novel carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from a *Citrobacter freundii* isolated from a hospital wastewater plant. *J Antimicrob Chemother* 2016; **70**: 2749–56.

24 Girlich D, Bonnin RA, Bogaerts P et al. Chromosomal amplification of the *bla*_{OXA-58} carbapenemase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: e016917–6.

MALDI-TOF for the rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: comparison of the commercialized MBT STAR[®]-Carba IVD Kit with two in-house MALDI-TOF techniques and the RAPIDEC[®] CARBA NP

Laurent Dortet ^{1-3*}†, Didier Tandé⁴†, Dominique de Briel⁵†, Sandrine Bernabeu¹⁻³, Camille Lasserre⁴, Guillaume Gregorowicz⁵, Agnès B. Jousset¹⁻³ and Thierry Naas¹⁻³

¹Department of Bacteriology-Hygiene, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, France; ²Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance, Le Kremlin-Bicêtre, France; ³Research Unit EA 7361 'Structure, dynamics, function and expression of broad spectrum β -lactamases', Faculty of Medicine, University Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France; ⁴Department of Microbiology, CHU de Brest, Brest, France; ⁵Department of Microbiology, Hôpitaux Civils de Colmar, Colmar, France

*Corresponding author. Service de Bactériologie-Hygiène, Hôpital de Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France. Tel: +33 1 45 21 36 24; Fax: +33 1 45 21 63 40; E-mail: laurent.dortet@aphp.fr  orcid.org/0000-0001-6596-7384

†These authors contributed equally.

Received 5 December 2017; returned 7 March 2018; revised 18 April 2018; accepted 8 May 2018

Objectives: There is an urgent need for accurate and fast diagnostic tests to identify carbapenemase-producing bacteria. Here, we have evaluated three MALDI-TOF-based techniques to detect carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) from cultured colonies.

Methods: The performance of three MALDI-TOF-based techniques, including the commercialized MBT STAR[®]-Carba IVD Kit (Bruker Daltonics) and two in-house protocols performed on the Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonics) and the VITEK[®] MS Plus (bioMérieux), were compared with those of the RAPIDEC[®] CARBA NP (bioMérieux). A collection of 175 isolates including 120 carbapenemase producers and 55 non-carbapenemase producers was tested. Samples were tested blind in the three participating centres. The repeatability of the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit was also evaluated.

Results: The three MALDI-TOF techniques possess sensitivities ranging from 95% to 100% and specificities from 98.2% to 100% compared with 99.2% and 100%, respectively, for the RAPIDEC[®] CARBA NP. The MBT STAR[®]-Carba IVD Kit gave highly reproducible results and is the only technique able to provide a concomitant identification of the bacterial isolate. The three MALDI-TOF techniques possess a fast turnaround time (less than 1.5 h).

Conclusions: Overall, MALDI-TOF is a reliable technique for the rapid detection of CPE from cultured colonies. MBT STAR[®]-Carba IVD Kit, the only commercially available assay, could easily be implemented in a clinical microbiology laboratory if it is already equipped with a Microflex LT Biotyper mass spectrometer.

Introduction

Currently, the increase of carbapenem resistance in Gram-negative bacilli is of great concern worldwide.¹ Carbapenem resistance is mediated by two main processes: (i) association of decreased outer-membrane permeability with plasmid-encoded or chromosome-encoded cephalosporinases and/or ESBLs; and (ii) production of carbapenem-hydrolysing enzymes (carbapenemases).² In Enterobacteriaceae, the rise of resistance to carbapenems is mainly due to the dissemination of carbapenemase producers, which are often resistant to most, if not all, antimicrobial molecules available.

The carbapenemases belong to three groups according to the Ambler classification: (i) Ambler Class A carbapenemases including mostly KPC enzymes but also rarer enzymes such as IMI, NMC-A, SME, some GES variants and FRI-1;³⁻⁵ (ii) Ambler Class B MBLs with NDM-, VIM-, IMP- and GIM-types;⁶ and (iii) carbapenem-hydrolysing Ambler Class D β -lactamases (CHDL) of the OXA-48 group (mostly OXA-48, OXA-162, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244 and OXA-245).⁷ To fight the dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE), their early detection is one of the key issues. Unfortunately, classic antibiotic susceptibility testing is not totally effective for the detection of CPE. Even with low

screening cut-offs defined by EUCAST (MIC 0.125 mg/L for meropenem or ertapenem and 1 mg/L for imipenem) nearly 20% of CPEs are missed, especially OXA-48 producers.⁸ Recently, two algorithms based on recording the inhibition diameter around discs for a few (two or three) antibiotics were proposed to directly identify non-CPE among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae.^{9,10} However, 42% to 66% of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to at least one carbapenem required confirmatory testing. Thus, simple and reliable confirmatory tests are mandatory to rapidly discriminate CPE from non-CPE.¹¹ Various phenotypic confirmation tests for detecting carbapenemases have been developed, including inhibition tests of carbapenemase activity,^{11,12} the modified Hodge test¹³ and the Carbapenem Inactivation Method.^{14,15} These tests are cheap but they require at least 16 h of additional incubation time after antimicrobial susceptibility results and often lack sensitivity and specificity (mostly the case for inhibition tests and the modified Hodge test). Immunochromatographic assays, aiming to detect OXA-48-like CPE,^{16,17} IMP-like CPE,¹⁸ NDM-like CPE,¹⁹ OXA-48/KPC CPE¹⁷ and OXA-48/KPC/NDM CPE in less than 15 min have been proposed more recently.²⁰ However, to be really useful these immunochromatographic assays need to be able to detect all the most common carbapenemases including VIM, which is still not possible. Molecular methods are still considered the gold standard for the detection of carbapenemase producers,^{21–23} despite the fact that they regularly misidentify several OXA-48 variants (i.e. OXA-163 and OXA-405) that are not true carbapenemases.^{9,24} The detection of carbapenem-hydrolysing activity remains the most powerful method to detect all types of carbapenemases including those considered to be rare (e.g. IMI, GES, FRI, DIM, GIM, AIM, etc.) and therefore not included in commercially available molecular tests.^{21,22} These tests include biochemical tests (e.g. Carba NP Test and derivatives)^{24–26} and MALDI-TOF MS techniques.²⁷

All published MALDI-TOF MS assays are based on the same principle that aims to detect the disappearance of the native carbapenem and/or the production of the carbapenem hydrolysis product after incubation of the tested strain with a carbapenem molecule. Currently, all these techniques are based on in-house protocols that use different carbapenem molecules such as imipenem, meropenem or ertapenem; different bacterial inocula; and variable incubation times from 20 min to 4 h. These protocols are difficult to standardize and, to our knowledge, no comparison has been performed between MALDI-TOF MS techniques using the same collection of strains.

Here, we have compared the performance of two in-house assays with the first CE-IVD (*in vitro* diagnostic)-certified mass spectrometric resistance detection assay (MBT STAR[®]-Carba IVD Kit in conjunction with the MBT STAR[®]-BL IVD software, Bruker Daltonics; MBT STAR[®] being MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance) for the rapid detection of CPE. In addition, we have assessed the repeatability of the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit.

Materials and methods

Strain collection and participating centres

A total of 175 Enterobacteriaceae isolates were used to evaluate the performance of the two in-house MALDI-TOF MS assays and the commercially available MALDI-TOF MS test (MBT STAR[®]-Carba IVD Kit). The results of

these three MALDI-TOF MS assays were compared with those obtained with the RAPIDEC[®] CARBA NP test (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, France). All strains had previously been characterized for their β -lactamase content at the molecular level.²⁴ This collection included 55 non-carbapenemase producers (Table S1, available as [Supplementary data](#) at JAC Online), among which 37 have decreased susceptibility to at least one carbapenem molecule (imipenem, meropenem or ertapenem) and 120 CPEs. These CPEs from our own strain collection were isolated from various clinical samples (blood cultures, urine, sputum, etc.) and from worldwide geographic origins. They include: (i) 30 Ambler Class A with 22 KPC, 3 IMI, 1 NMC-A, 2 SME, 1 GES-5 and 1 FRI-1; (ii) 50 MBLs including 21 NDM, 17 VIM, 11 IMP and 1 GIM-1; (iii) 34 CHDLs with 21 OXA-48, 1 OXA-162, 3 OXA-181, 5 OXA-204, 2 OXA-232 and 2 OXA-244; and (iv) six strains producing two carbapenemases (OXA-181 + NDM-1) (Tables S2–S4). These 175 strains were evaluated blind by the microbiology laboratories of the hospitals in Brest, Bicêtre and Colmar.

Antimicrobial susceptibility testing

MICs of carbapenems were previously determined using the Etest[®] (bioMérieux)^{21,24} and results were recorded according to EUCAST guidelines.

In-house MALDI-TOF-based assays

The Brest in-house MALDI-TOF-based assay was performed in the microbiology unit of the University Hospital of Brest (Brest, France) as previously published.²⁸ Briefly, a 1 μ L loopful of bacteria was suspended in 20 μ L of 0.5 mg/mL imipenem solution, incubated for 20 min at 37°C and centrifuged for 1 min at 14 000 g. One microlitre of the clear supernatant was spotted onto an MSP 96 target polished steel plate (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) and dried at room temperature, before 1 μ L of matrix [α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA); Bruker Daltonics] was overlaid onto each target spot. Mass spectra were acquired using a Microflex LT Biotyper mass spectrometer and flexControl software v3.3 (Bruker Daltonics) operating in positive linear ion mode between 100 and 1000 Da. Peaks of imipenem, C₁₂H₁₇N₃O₄S, (300 \pm 0.2 *m/z*) and its metabolite, C₁₁H₁₇N₃O₂S (254 \pm 0.1 *m/z*) were manually labelled and their intensities noted (Figure 1a). MS ratios of intensities, metabolite/(metabolite + imipenem) [M/(M + I)], were calculated. A cut-off was established at 0.82²⁸ and strains were classified as carbapenemase producers when this ratio was greater than or equal to the cut-off.

The Colmar in-house MALDI-TOF-based assay was performed in the microbiology unit of the Colmar Civil Hospitals (Colmar, France) as follows: ready-to-use 1 mL aliquots of imipenem/cilastatin 0.5 mg/mL solution were prepared with commercially available drug (MYLAN[®], France) diluted in sterile 0.45% NaCl (Versylène[®] Fresenius, France). Aliquots were stored at –80°C. Blinded strains were incubated overnight on blood agar plates (bioMérieux, France) at 35°C. A 10 μ L loopful of bacteria was suspended in an imipenem solution aliquot, vortexed for 15 s and incubated for 1–2 h at 35°C, then centrifuged for 2 min at 12 000 g. One microlitre of the supernatant was spotted in duplicate onto a FlexiMass target plate (bioMérieux, France) and overlaid with 1 μ L of HCCA matrix before drying at room temperature. Mass spectra acquisitions were performed using a VITEK[®] MS Plus Research Use Only (RUO) instrument (bioMérieux, France) and Shimadzu Biotech Launchpad v2.9 (Shimadzu Corporation, Japan), in positive linear ion mode between 150 and 650 *m/z* and optimal pulsed extraction at 400 *m/z*. Final analysed spectra were obtained by the superposition of five shots on 100 points per spot. The matrix [2HCCA + H⁺] peak at 379 *m/z* was used for calibration.²⁹ The strains for which a total disappearance of native imipenem peak at 302 *m/z* and/or adduct [imipenem + HCCA] peak at 489 *m/z* was observed after 1 h of incubation were considered as producing carbapenemase (Figure 1b).³⁰ Analyses were repeated with 2 h incubation using the same interpretation criteria for all strains negative after 1 h.

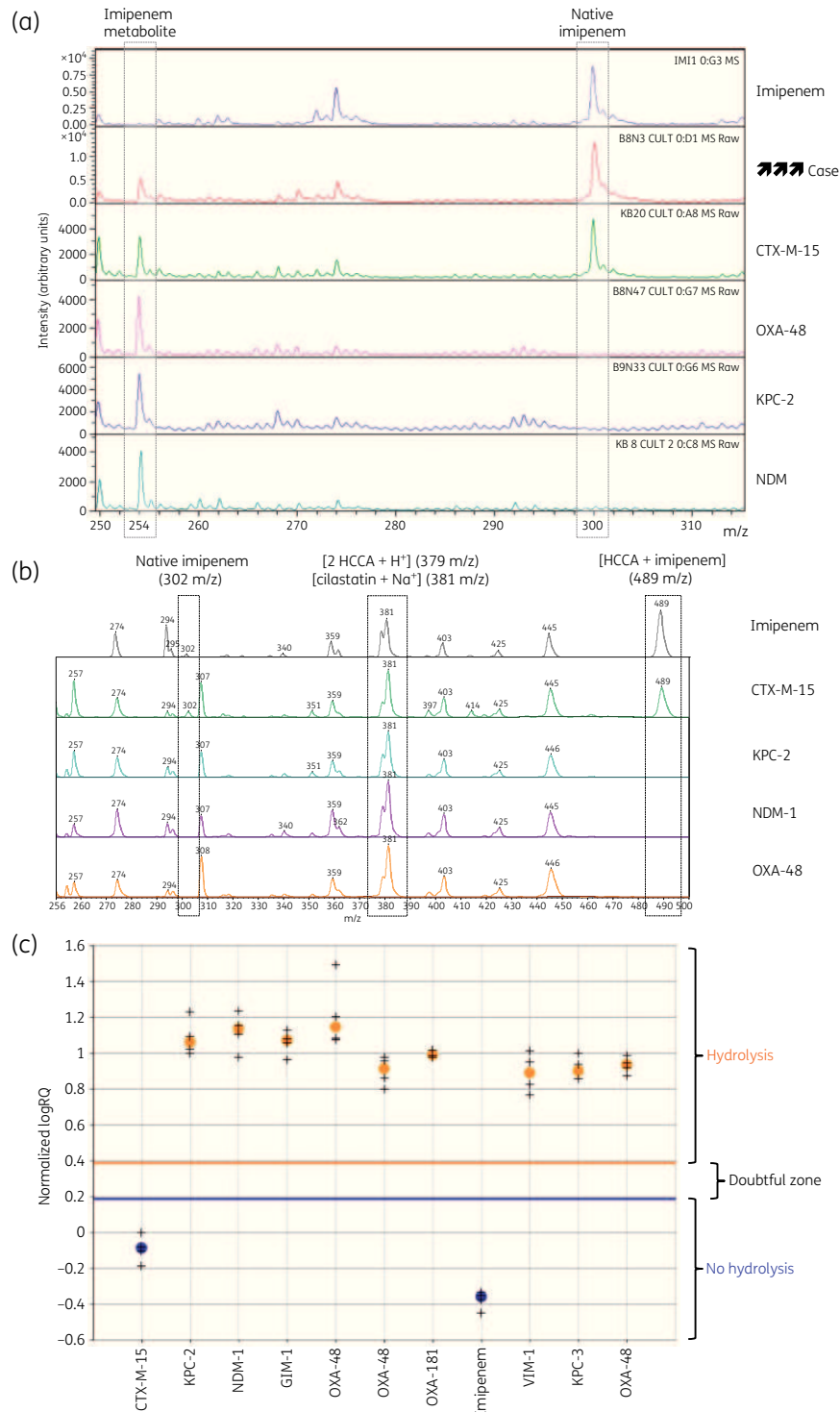


Figure 1. Representative results obtained with the three MALDI-TOF-based techniques. (a) Results obtained with the in-house Brest MALDI-TOF technique on imipenem alone, *E. cloacae* overexpression of its chromosome-encoded AmpC (↗↗ Case) (Strain 55), CTX-M-15-producing *E. coli* (strain 25), OXA-48-producing *E. coli* (strain 64), KPC-2-producing *E. coli* (strain 2) and NDM-1-producing *E. coli* (strain 6). (b) Results obtained with the in-house Colmar MALDI-TOF technique on imipenem alone, CTX-M-15-producing *E. coli* (strain 25), KPC-2-producing *E. coli* (strain 2), NDM-1-producing *E. coli* (strain 6) and OXA-48-producing *E. coli* (strain 64). (c) Results obtained with the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit on CTX-M-15-producing *E. coli* (strain 25), KPC-2-producing *E. coli* (strain 2), NDM-1-producing *E. coli* (strain 6), GIM-1-producing *E. cloacae* (strain 20), OXA-48-producing *E. cloacae* (strain 143), OXA-48-producing *E. coli* (strain 64), OXA-181-producing *E. coli* (strain 30), imipenem alone, VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* (strain 62), KPC-3-producing *K. pneumoniae* (strain 105) and OXA-48-producing *K. pneumoniae* (strain 122). This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

MBT STAR[®]-Carba IVD Kit

The MBT STAR[®]-Carba IVD Kit testing was performed in the bacteriology unit of the Bicêtre hospital as recommended by the manufacturer. Briefly, 50 µL of MBT STAR[®]-BL incubation buffer was added into a ready-to-use tube containing MBT STAR[®]-BL antibiotic reagent. One to five individual bacterial colonies were resuspended in the tube by vortexing. Samples were incubated at 37°C for 30 min under agitation (900 rpm). After incubation, the bacteria were pelleted by centrifugation for 2 min at 16 000 g. One microlitre of the supernatant was loaded onto the MALDI target, dried under a stream of air (1 min) and overlaid with the MBT STAR[®]-BL Matrix solution. The spots were dried gently under a stream of air (<1 min). MALDI-TOF MS analysis was performed on the Microflex LT Biotyper mass spectrometer (Bruker Daltonics). Final spectra were automatically interpreted using the MBT STAR[®]-BL IVD software. Results can be visualized as a graphic (Figure 1c) or as a table (Figure S1).

RAPIDEC[®] CARBA NP

The RAPIDEC[®] CARBA NP testing was performed as previously described,^{24,25} using an increased inoculum of bacteria compared with the manufacturer's recommendations. During this evaluation, results were checked and interpreted at 5, 15, 30, 60 and 120 min of incubation in the revealing reagent (phenol red) after the first step of bacterial lysis (30 min).

Performance calculation

Sensitivity, specificity and positive and negative predictive values were computed using the free software vassarStats (<http://vassarstats.net/>). Repeatability was evaluated using the Cohen's unweighted kappa score as a measure of inter-rater agreement for qualitative (categorical) items.³¹ Calculation of the Cohen's unweighted kappa score was performed using the vassarStats software. The kappa score was interpreted as follows: ≤0, poor agreement; 0.01–0.20, slight agreement; 0.21–0.40, fair agreement; 0.41–0.60, moderate agreement; 0.61–0.80, substantial agreement; 0.81–1, almost perfect agreement.³²

Results

Comparison of the performances of the three MALDI-TOF techniques for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

Results of the three MALDI-TOF techniques for each tested strain are summarized in Tables S1 to S4. Overall, these three MALDI-TOF techniques possessed good sensitivity and specificity for the identification of CPE among Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems. The performances ranged from 95.0% to 100% sensitivity and 98.2% to 100% specificity (Table 1). These performances were similar to those of the RAPIDEC[®] CARBA NP which had 99.2% sensitivity and 100% specificity. On this strain collection, the Brest in-house MALDI-TOF technique was the most efficient technique with 100% sensitivity and 100% specificity (Table 1). Both MALDI-TOF techniques performed on the Microflex LT Biotyper (Bruker) instrument possessed 100% sensitivity, while the Colmar in-house technique performed on the VITEK[®] MS Plus failed to identify six CPE including two NDM-1 producers (Table S3) and four OXA-48 variants (two OXA-232 producers and two OXA-244 producers) (Table S4). Of note, OXA-232 and OXA-244 enzymes were described to have weak hydrolysis activity compared with OXA-48.^{33–35} Accordingly, and as previously observed, the RAPIDEC[®] CARBA NP also failed to detect one of the OXA-244 producers (Table S4).^{24,33} The two NDM-1 producers that were not

detected by the Colmar in-house technique belong to the Proteaceae family (*Providencia stuartii* and *Providencia rettgeri*). In these two strains the *bla*_{NDM-1} gene is present as a single copy located on the chromosome.³⁶ The MBT STAR[®]-Carba IVD Kit was not able to correctly identify one non-CPE (Table S1) leading to a specificity of 98.2%. This non-CPE strain, an *Enterobacter cloacae* isolate with decreased susceptibility related to overexpression of its chromosome-encoded AmpC associated with outer-membrane impermeability, gave a doubtful result with a ratio of 0.22. When this strain was tested again, ratios of 0.28 and 0.34, both assigned as doubtful, were obtained (Table S5).

Regarding the characteristics of the three MALDI-TOF methods and the RAPIDEC[®] CARBA NP, the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit is the only one which can provide concomitant identification of the bacterial isolate.

Repeatability of the commercially available MBT STAR[®]-Carba IVD Kit

As the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit is the only commercially available MALDI-TOF-based assay, we evaluated its repeatability. Accordingly, for each strain the test was performed three times by the same technician with a gap of 7 days between each repetition. As shown in Table S5, the same classification (CPE, non-CPE or doubtful result) was obtained for all strains except one ACC-1-producing *Escherichia coli* (strain 23), which was classified twice as non-CPE and once as doubtful, and one OXA-244-producing *E. coli* (strain 33), which was classified twice as CPE and once as non-CPE. Overall, a calculated kappa coefficient of 0.987 (95% CI 0.961–1.000) demonstrated an almost perfect repeatability of the technique.

Comparison of the turnaround times and workflows

As shown in Figure 2, the three MALDI-TOF-based techniques were able to give a definitive result in a better turnaround time compared with the RAPIDEC[®] CARBA NP in the case of non-CPE. Overall, these final results were obtained in ~40 min, ~55 min, ~80 min and ~150 min for the Brest in-house method, the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit, the Colmar in-house method and the RAPIDEC[®] CARBA NP, respectively. However, in the case of CPE, the RAPIDEC[®] CARBA NP is able to give results in an intermediate turnaround time. Here, the test was checked after 5, 15, 30, 60 and 120 min of incubation following the first lysis step (30 min) (Figure 2 and Tables S1–S4). Using this strain collection, positive results were obtained after: (i) ~35 min total time for KPC, NDM, IMP and GIM producers; (ii) ~45 min total time for VIM producers and non-KPC Ambler class A carbapenemase producers; and (iii) ~90 min for most of the OXA-48-like producers. Only carbapenemase enzymes with very weak activity (OXA-232, OXA-244 and GES-5) needed complete incubation for a total time of ~150 min.

The technical handling time for one bacterial isolate, which is associated with an additional technical staff cost (not estimated here), is ~10 min for the two in-house MALDI-TOF techniques, ~15 min for the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit and ~2 min for the RAPIDEC[®] CARBA NP (Figure 2).

Discussion

During the last decade, MALDI-TOF MS has become the workhorse for the identification of bacterial isolates. Although the use of

Table 1. Main characteristics and performances of the three MALDI-TOF-based techniques for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

	MALDI-TOF based techniques			Biochemical technique
	in-house Brest	in-house Colmar	MBT STAR [®] -Carba IVD Kit	RAPIDEC [®] CARBA NP
Characteristics				
Material (supplier)/ test denomination	Microflex LT Biotyper (Bruker)/ in-house	VITEK [®] MS Plus (bioMérieux)/ in-house	Microflex LT Biotyper (Bruker)/ MBT STAR [®] -Carba IVD Kit	(bioMérieux)/ RAPIDEC [®] CARBA NP
Carbapenem	imipenem (0.5 mg/mL)	imipenem (0.5 mg/mL)	imipenem (0.25 mg/mL)	imipenem
Incubation time	20 min	1–2 h	30 min	5 min to 2 h
Peaks of interest	imipenem (300 <i>m/z</i>) imipenem metabolite (254 <i>m/z</i>)	imipenem (302 <i>m/z</i>) [HCCA + imipenem] (489 <i>m/z</i>)	imipenem internal standard	NA NA
Readout	ratio (metabolite/metabolite + imipenem)	disappearance of imipenem and/or [HCCA + imipenem] peaks	log (standard/imipenem)	colour change (red to yellow)
Cut-off	positive: ratio ≥0.82 negative: ratio <0.82	positive: 100% hydrolysis negative: <100% hydrolysis	positive: ≥0.4 negative: <0.2 0.2 ≤doubtful<0.4	NA NA NA
Concomitant bacterial identification	no	no	yes	no
Performance				
Sensitivity (95% CI)	100% (96.1%–100%)	95.0% (89.0%–98.0%)	100% (96.1%–100%)	99.2% (94.8%–99.9%)
Specificity (95% CI)	100% (91.9%–100%)	100% (91.9%–100%)	98.2% (89.0%–99.9%) ^a	100% (91.9%–100%)
Detection of:				
KPC	100% (22/22)	100% (22/22)	100% (22/22)	100% (22/22)
NDM	100% (21/21)	95.2% (19/21) ^b	100% (21/21)	100% (21/21)
VIM	100% (17/17)	100% (17/17)	100% (17/17)	100% (17/17)
IMP	100% (11/11)	100% (11/11)	100% (11/11)	100% (11/11)
OXA-48	100% (21/21)	100% (21/21)	100% (21/21)	100% (21/21)
OXA-48 variants	100% (19/19)	78.9% (15/19) ^c	100% (19/19)	94.7% (18/19)

NA, not applicable.

^aStrain number 24 not detected as non-CPE (Table S1).

^bStrain numbers 155 and 162 not detected as CPE (Table S3).

^cStrain numbers 32, 33, 67 and 85 not detected as CPE (Table S4).

MALDI-TOF technology has drastically changed the landscape of bacterial identification in clinical laboratories, very few other applications are currently proposed on commercially available machines. One of the most promising tools that has been recently developed on MALDI-TOF MS is the detection of antimicrobial resistance and particularly the detection of carbapenemase hydrolytic activity. The first MALDI-TOF-based detection method for the identification of CPE was developed in 2011.^{37,38} Since then several teams have developed similar in-house techniques in which the incubation time, the carbapenem and the type of mass spectrometer used vary.²⁷ Thus, these in-house techniques are sometimes difficult to reproduce in another centre. Recently, a CE-IVD MALDI-TOF-based detection method for the identification of CPE has been developed and commercialized, the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit. Here, we have evaluated this first commercially available test in comparison with in-house assays developed on the two most widespread mass spectrometers, the Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonics) and the VITEK[®] MS Plus (bioMérieux). This blinded evaluation revealed that the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit possesses excellent performance for the accurate detection of CPE among Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems (Table S1). Overall, the performance of this test was similar to the

performance of the two other in-house techniques and to the RAPIDEC[®] CARBA NP, another commercially available test dedicated to the early detection of carbapenem-hydrolysing activity in Gram-negative bacteria.^{24,26} The MBT STAR[®]-Carba IVD Kit seems to be adapted to the routine workflow of clinical microbiology laboratories. Indeed, among the three MALDI-TOF-based techniques, MBT STAR[®]-Carba IVD Kit shares the best turnaround time with the Brest in-house technique, which allows final results to be obtained in <1 h (~40 min for the Brest in-house technique and ~55 min for the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit). This reduced turnaround time is an improvement compared with the in-house technique of Colmar (~80 min), but also compared with the RAPIDEC[®] CARBA NP, which is able to give a definitive result in only ~150 min. However, it should be mentioned that, as opposed to all the MALDI-TOF-based techniques, the RAPIDEC[®] CARBA NP turnaround time could be reduced to ~35 min total time for KPC, NDM, IMP and GIM producers, ~45 min total time for VIM producers and non-KPC Ambler class A carbapenemase producers and ~60 min for most of the OXA-48-like producers (Figure 2). The technical handling time is ~10 min and ~15 min for the two in-house MALDI-TOF techniques and the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit, respectively. The sample preparation is slightly more time consuming than the RAPIDEC[®] CARBA

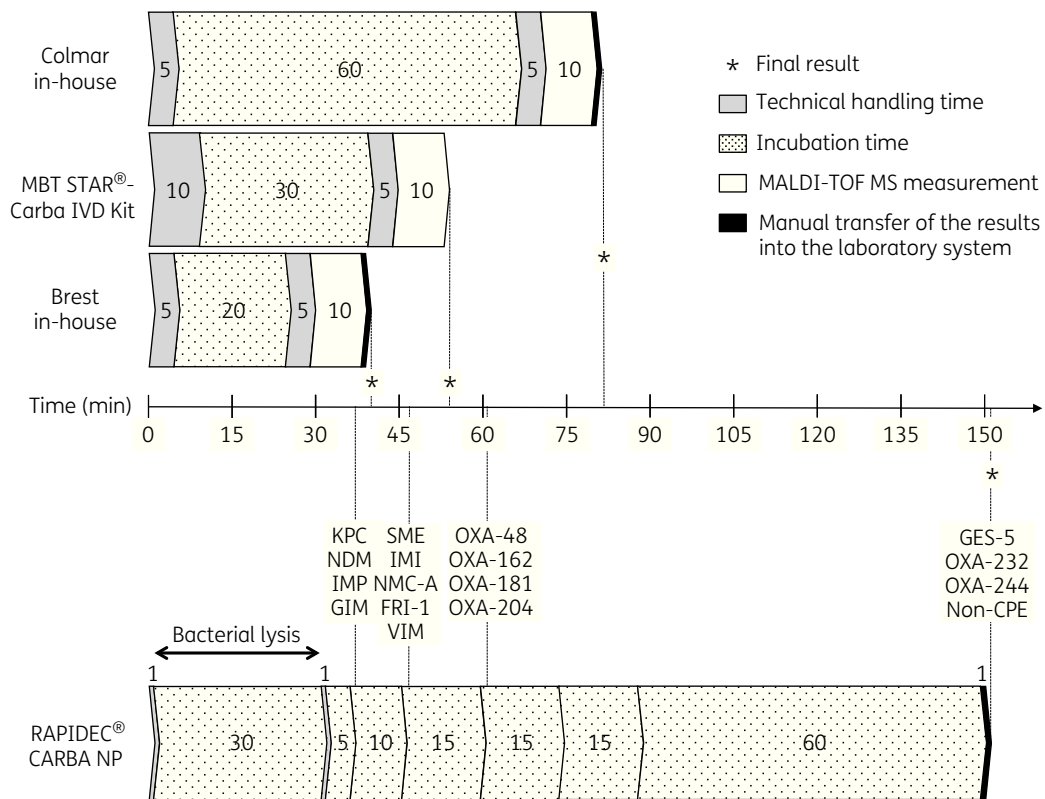


Figure 2. Comparison of the turnaround times and workflows of the three MALDI-TOF MS-based techniques and the RAPIDECCARBA NP.

NP (~2 min of technical handling time), which also does not require any additional equipment (centrifuge, microtubes) as compared with the MALDI-TOF-based techniques. However, for the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit, the automated interpretation of the result avoids any subjective analysis of the results, which has been reported to sometimes be tricky with the RAPIDECCARBA NP in the presence of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae.³³ The MBT STAR[®]-Carba IVD Kit is also the only technique able to provide a concomitant identification of the bacterial isolate. As expected for a CE-IVD kit, we also demonstrated excellent repeatability of the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit, which is crucial for its implementation into routine use. Another main advantage of the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit coupled with the MBT STAR[®]-BL IVD software is the possible direct connection with laboratory software, which limits the technical errors that can occur when copying data, and also contributes to a fast turnaround time.

Overall, our results demonstrate that the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit is a reliable technique for the rapid detection of CPE that possesses all the required properties to be implemented in a clinical microbiology laboratory that is already equipped with a Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonics) mass spectrometer. Finally, based on the few publications that mixed an in-house MALDI-TOF technique with the use of known inhibitors of Ambler class A enzymes (e.g. tazobactam, clavulanic acid or boronic acid) and metallo-β-lactamases (e.g. EDTA and dipicolinic acid),^{39–41} we might expect future development of the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit for not only detection of CPE but also classification of the carbapenemase produced. Indeed, this added function might be

of the utmost interest for the management of infected patients with the development and the recent commercialization of a few therapies involving combinations of a broad-spectrum β-lactam and a β-lactamase inhibitor (e.g. ceftazidime/avibactam) that are only active against a few classes of carbapenemases (e.g. avibactam inhibits Ambler class A and D carbapenemases but not MBLs).

Acknowledgements

We would like to thank Guillaume Bois-Salvaro for technical support during the implementation of the MBT STAR[®]-Carba IVD Kit and the MBT STAR[®]-BL IVD software at Bicêtre hospital.

Funding

This work was partially funded by the Santé Publique France (SpF) and from the University Paris-Sud, France. L. D., S. B., A. B. J. and T. N. are members of the Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT) supported by a grant from the French National Research Agency (ANR-10-LABX-33).

Transparency declarations

L. D. is a co-inventor of the Carba NP test for which a patent was filed and licensed to bioMérieux (La Balme-les-Grottes, France). All other authors: none to declare.

Supplementary data

Figure S1 and Tables S1 to S5 appear as [Supplementary data](#) at JAC Online.

References

- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 1791–8.
- Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med* 2012; **18**: 263–72.
- Dortet L, Poirel L, Abbas S *et al.* Genetic and biochemical characterization of FRI-1, a carbapenem-hydrolyzing Class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 7420–5.
- Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 785–96.
- Naas T, Dortet L, Iorga BI. Structural and functional aspects of class A carbapenemases. *Curr Drug Targets* 2016; **17**: 1006–28.
- Mojica MF, Bonomo RA, Fast W. B1-Metallo- β -lactamases: where do we stand? *Curr Drug Targets* 2016; **17**: 1029–50.
- Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1597–606.
- Huang TD, Poirel L, Bogaerts P *et al.* Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 445–50.
- Dortet L, Bernabeu S, Gonzalez C *et al.* Comparison of two phenotypic algorithms to detect carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: pii=e00796–17.
- Dortet L, Cuzon G, Plésiat P *et al.* Prospective evaluation of an algorithm for the phenotypic screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 135–40.
- Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 839–53.
- Tsakris A, Poulou A, Bogaerts P *et al.* Evaluation of a new phenotypic OXA-48 disk test for differentiation of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 1245–51.
- Pasteran F, Mendez T, Rapoport M *et al.* Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic acid. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 1323–32.
- Gauthier L, Bonnin RA, Dortet L *et al.* Retrospective and prospective evaluation of the carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *PLoS One* 2017; **12**: e0170769.
- van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN *et al.* The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One* 2015; **10**: e0123690.
- Dortet L, Jousset A, Sainte-Rose V *et al.* Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT assay, an immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1834–40.
- Glupczynski Y, Evrard S, Ote I *et al.* Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1217–22.
- Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Tanaka M *et al.* Development of an immunochromatographic assay for diagnosing the production of IMP-type metallo- β -lactamases that mediate carbapenem resistance in *Pseudomonas*. *J Microbiol Methods* 2011; **87**: 330–7.
- Boutal H, Naas T, Devilliers K *et al.* Development and validation of a lateral flow immunoassay for rapid detection of NDM-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2017; **55**: 2018–29.
- Glupczynski Y, Jousset A, Evrard S *et al.* Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 1955–60.
- Dortet L, Fusaro M, Naas T. Improvement of the Xpert Carba-R Kit for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 3832–7.
- Findlay J, Hopkins KL, Meunier D *et al.* Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 1338–42.
- Hemarajata P, Yang S, Hindler JA *et al.* Development of a novel real-time PCR assay with high-resolution melt analysis to detect and differentiate OXA-48-like β -lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 5574–80.
- Dortet L, Agathine A, Naas T *et al.* Evaluation of the RAPIDEC[®] CARBA NP, the Rapid CARB Screen[®] and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 3014–22.
- Hombach M, von Gunten B, Castelberg C *et al.* Evaluation of the Rapidec Carba NP test for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 3828–33.
- Kabir MH, Meunier D, Hopkins KL *et al.* A two-centre evaluation of RAPIDEC[®] CARBA NP for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1213–6.
- Hrabák J, Chudáčková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 2013; **26**: 103–14.
- Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G *et al.* Efficient detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 2163–71.
- Sparbier K, Schubert S, Weller U *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 927–37.
- Alvarez-Buylla A, Picazo JJ, Culebras E. Optimized method for *Acinetobacter* species carbapenemase detection and identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 1589–92.
- Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational Psychology Measurement* 1960; **20**: 37–46.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; **33**: 159–74.
- Hoyos-Mallecot Y, Naas T, Bonnin RA *et al.* OXA-244-producing *Escherichia coli* isolates, a challenge for clinical microbiology laboratories. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: pii=e00818-17.
- Potron A, Poirel L, Dortet L *et al.* Characterisation of OXA-244, a chromosomally-encoded OXA-48-like β -lactamase from *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2016; **47**: 102–3.
- Potron A, Rondinaud E, Poirel L *et al.* Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 2013; **41**: 325–9.

- 36** Poirel L, Dortet L, Bernabeu S et al. Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 5403–7.
- 37** Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 3321–4.
- 38** Hrabák J, Walková R, Studentová V et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 3222–7.
- 39** Hoyos-Mallecot Y, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Miranda-Casas C et al. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. *Lett Appl Microbiol* 2014; **58**: 325–9.
- 40** Monteferrante CG, Sultan S, Ten Kate MT et al. Evaluation of different pre-treatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 2856–67.
- 41** Oviaño M, Bou G. Imipenem-avibactam: a novel combination for the rapid detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; **87**: 129–32.

Title: Genomic and transcriptomic analysis of carbapenemase-producing bacteria

Keywords β -lactamase, KPC, *Klebsiella pneumoniae*, expression

Abstract : Multidrug resistant bacteria and in particular carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* remain a major health public challenge. Some successful clones are emerging globally, due to their high transmissibility and their ability to colonize and persist in patients over time. Genomic analyses revealed that the dissemination of KPC carbapenemase is closely related to the spread of *Klebsiella pneumoniae* of the sequence-type (ST) 258 and to few successful plasmids linked to IncFIIk family. However, the reasons of the association between *K. pneumoniae* ST258, IncFIIk plasmids and KPC that led to the rapid spread of this clone are currently unknown.

Furthermore, there is no correlation between expression level of a carbapenemase-encoding gene, *in vitro* susceptibility to carbapenems and efficiency of a carbapenem-based treatment. Most of the time, KPC-producing *K. pneumoniae* exhibit a heteroresistant phenotype with carbapenems, but its clinical impact remains unknown. The mechanisms underlying the regulation of carbapenemases expression remain to be explored.

The objectives of the thesis are to obtain deeper insights into genomic plasticity of carbapenemase-producing clones, and into the expression of their β -lactamases.

The first part of this work was dedicated to the *in vivo* evolution of a single strain of KPC-producing *K. pneumoniae* ST258 that colonized a patient for almost 5 years. Genomic comparison of 17 isolates revealed a remarkable diversification with occurrence of several mutations with impact on bacterial virulence and susceptibility to antibiotics.

Several studies extensively described the genetic structures of *bla*_{KPC}-carrying plasmids, but information regarding gene expression at the whole plasmid level are lacking.

Accordingly, we performed RNA-seq on *Escherichia coli* TOP10 transformed with an IncFIIk-IncFI *bla*_{KPC-2}-carrying plasmid, with or without imipenem exposure. In both conditions, plasmid-encoded genes related to antimicrobial resistance and involved in plasmid replication were the most expressed. Imipenem exposure led to a more general response with overexpression of *E. coli* numerous chromosome-encoded genes involved in oxidative stress response.

In addition, analysis of *bla*_{KPC-2} gene expression in several species using 5'RACE revealed the presence of several promoters whose strength depends on the bacterial genetic background. This could promote higher expression of *bla*_{KPC-2} gene and explain the association of some isoforms of Tn4401 in different species.

The tools developed in the frame of this work were also applied to study a single *Enterobacter kobei* ST125 clone whose natural cephalosporinase (ACT-28) has increased hydrolytic activity towards imipenem. Finally, genomic analysis of the first ESBL-producing *Shewanella* sp. was performed. It revealed the presence of *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{SHV-2} genes carried on an IncA/C plasmid and a new chromosomally-encoded oxacillinase variant of OXA-48 with carbapenemase activity, called OXA-535. OXA-535 was found to be closely related to OXA-436, another carbapenemase which has recently spread in *Enterobacteriaceae*. Analysis of the genetic environment of both *bla*_{OXA-48-like} genes confirmed the role of *Shewanella* spp. as progenitors of class D carbapenemases.

Overall, this work contributes to a better comprehension of the diffusion of multi-drug resistant clones and of the mechanisms implicated in β -lactamase expression.



Titre : Analyse génomique et transcriptomique de bactéries productrices de carbapénèmases

Mots clés : β -lactamase, KPC, *Klebsiella pneumoniae*, expression

Résumé :

Le combat contre les infections bactériennes reste un enjeu majeur de santé publique notamment avec la dissémination des Entérobactéries productrices de carbapénèmases, capables d'hydrolyser l'ensemble des β -lactamines. On assiste à l'émergence de certains clones épidémiques, se distinguant par leur distribution mondiale, leur forte transmissibilité et leur capacité à persister chez les patients.

L'exemple le plus parlant est le cas du clone de *Klebsiella pneumoniae* appartenant au « *sequence type* » (ST) 258 et responsable de la diffusion mondiale de la carbapénémase KPC (*Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase) portée majoritairement par des plasmides de la famille IncFIIk. Les raisons du succès de ce clone et de l'association KPC/IncFIIk/ST258 ne sont pas encore totalement élucidées.

Par ailleurs, il n'existe pas de corrélation entre le niveau d'expression d'une carbapénémase, la sensibilité *in vitro* de la souche vis à vis des carbapénèmes et l'efficacité clinique d'un traitement par ces molécules. Les phénomènes d'hétérorésistance aux carbapénèmes sont fréquents chez les souches produisant KPC mais l'impact clinique est inconnu. Les mécanismes de régulation de l'expression des carbapénèmases ne sont pas élucidés.

Les objectifs de cette thèse résident dans l'analyse des facteurs génétiques associés à la diffusion et la persistance de clones multi-résistants ainsi que l'analyse de l'expression des β -lactamases associées.

La première partie de ce travail porte sur l'analyse de l'évolution *in vivo* d'une souche de *K. pneumoniae* ST258 produisant KPC ayant persisté chez un patient pendant près de 5 ans. L'analyse comparative des génomes provenant de 17 isolats a permis de mettre en évidence une diversification génétique importante ainsi que la

sélection de mutations modifiant la virulence de la souche et sa sensibilité aux antibiotiques. Afin de caractériser les raisons du succès de certains plasmides portant KPC, une analyse transcriptomique d'une souche de *Escherichia coli* TOP10 transformée par un plasmide multi-réplicon IncFIIk-IncFIB exprimant KPC-2, a été réalisée en présence, ou non, d'imipénème. Les gènes les plus exprimés dans ces conditions sont les gènes de résistance aux antibiotiques et certains gènes essentiels à la réplication du plasmide. La présence d'imipénème affecte peu la transcription des gènes plasmidiques mais induit un stress oxydatif important dans l'ensemble de la souche. Par ailleurs, l'analyse de l'expression du gène *bla*_{KPC-2} dans différentes espèces par 5'-RACE a permis de révéler que ce gène de résistance est sous la dépendance de plusieurs promoteurs dont la force diffère selon le fond génétique. Cette caractéristique pourrait expliquer le succès de certains isoformes du transposon *Tn4401* permettant une meilleure expression du gène *bla*_{KPC-2}, dans certaines espèces.

Les outils développés dans cette thèse ont également été appliqués à l'analyse d'un clone d'*Enterobacter kobei* ST125 dont la céphalosporinase naturelle ACT-28 possède une activité d'hydrolyse accrue vis à vis de l'imipénème. Enfin, l'analyse du génome de la première souche *Shewanella* sp. produisant une BLSE de type CTX-M-15 a permis de révéler la présence d'un nouveau variant oxacillinase chromosomique avec activité carbapénémase, appelé OXA-535. OXA-535 est proche d'OXA-436, un autre variant carbapénémase porté par un plasmide ayant déjà disséminé chez les entérobactéries. L'analyse de l'environnement génétique des gènes *bla*_{OXA-535} et *bla*_{OXA-436} confirme le rôle du genre *Shewanella* comme progéniteur des carbapénèmases de classe D.

Ce travail contribue à une meilleure compréhension de la diffusion de certains clones multi-résistants et des mécanismes contrôlant l'expression des gènes de résistance aux β -lactamines.

