

UNIVERSITE DE NANTES

---

FACULTE DE MEDECINE

---

Année 2009

N° 160

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Conformément aux dispositions du décret 90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de :

**THESE**

pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

(Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale)

par

**Olivia BEAUDOUX**

née le 17 février 1981 à Reims

---

présentée et soutenue publiquement le 19 octobre 2009

---

**EPIDEMIOLOGIE ET CARACTERISATION MOLECULAIRE  
DES SOUCHES DE *KLEBSIELLA OXYTOCA*  
ISOLEES EN 2006-2007 AU CHU DE NANTES**

---

Président : Monsieur le Professeur François RAFFI

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Stéphane CORVEC

<b><u>SOMMAIRE</u></b>
------------------------

<b>TABLE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>7</b>
<b>PARTIE I : GENERALITES SUR <i>KLEBSIELLA OXYTOCA</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>I TAXONOMIE ET PHYLOGENIE .....</b>	<b>10</b>
<b>II DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE .....</b>	<b>14</b>
II.1 Diagnostic de famille .....	14
II.2 Diagnostic de genre.....	14
II.3 Diagnostic d'espèce.....	14
II.3.1 Caractères biochimiques .....	14
II.3.1.1 Caractères positifs.....	14
II.3.1.2 Diagnostic différentiel .....	15
II.3.2 Caractères cultureux .....	16
II.3.3 Caractères moléculaires.....	18
II.3.3.1 Analyse de l'ARNr 16S.....	18
II.3.3.2 Analyse du gène <i>rpoB</i> .....	19
<b>III HABITAT ET POUVOIR PATHOGENE .....</b>	<b>19</b>
III.1 <i>Klebsiella oxytoca</i> : bactérie et outil de préservation de l'environnement .....	19
III.2 <i>Klebsiella oxytoca</i> : espèce commensale et pathogène opportuniste .....	20
III.2.1 Facteurs de pathogénicité .....	20
III.2.1.1 Les fimbriae .....	20
III.2.1.2 La capsule .....	21
III.2.1.3 La résistance à la bactéricidie du sérum .....	21
III.2.1.4 Les sidérophores .....	21
III.2.1.5 Les exotoxines .....	21
III.2.1.6 Les endotoxines et le lipopolysaccharide (LPS) .....	21
III.2.1.7 Les autres enzymes bactériennes .....	22
III.2.1.7.1 L'uréase .....	22
III.2.1.7.2 Les exoprotéines .....	22
III.2.2 Espèce commensale.....	22
III.2.3 Pouvoir pathogène.....	22
III.2.3.1 Les infections urinaires.....	23
III.2.3.2 Les infections pulmonaires .....	23
III.2.3.3 Les infections digestives et hépatobiliaires.....	23
III.2.3.3.1 Les colites hémorragiques post-antibiotiques .....	23
III.2.3.3.2 Les infections hépatobiliaires .....	24
III.2.3.4 Les bactériémies .....	24
III.2.3.5 Les endocardites et autres infections cardiaques .....	25
III.2.3.6 Les fasciites nécrosantes et autres infections cutanées .....	25
III.2.3.7 Les épidémies dues à <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	25
<b>PARTIE II : RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>26</b>
<b>I LES B-LACTAMASES .....</b>	<b>27</b>
I.1 Mode d'action des $\beta$ -lactamases .....	27

I.2	Les classifications des $\beta$ -lactamases .....	28
I.2.1	La classification de Ambler.....	28
I.2.1.1	Classe A.....	28
I.2.1.2	Classe B.....	30
I.2.1.3	Classe C.....	30
I.2.1.4	Classe D.....	30
I.2.2	La Classification de Bush-Jacobi-Medeiros.....	30
I.3	La $\beta$ -lactamase de <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	31
I.3.1	Dénomination .....	31
I.3.2	Le gène de la $\beta$ -lactamase, <i>bla</i> <sub>OXY</sub> .....	31
I.3.2.1	La séquence nucléotidique du gène <i>bla</i> <sub>OXY</sub> .....	31
I.3.2.2	Homologie avec les gènes d'autres $\beta$ -lactamases .....	32
I.3.3	La séquence peptidique OXY .....	33
I.3.4	Les groupes et sous-groupes de la $\beta$ -lactamase OXY .....	36
I.3.4.1	Les 6 groupes (de OXY-1 à OXY-6).....	36
I.3.4.2	Les sous-groupes (de OXY-1-1 à OXY-6-4).....	36
I.3.4.2.1	Selon les points isoélectriques .....	36
I.3.4.2.2	Selon les séquences nucléotidiques et peptidiques du gène <i>bla</i> <sub>OXY</sub> .....	36
I.3.4.3	Epidémiologie des groupes et sous-groupes OXY .....	37
I.3.5	Localisation plasmidique du gène codant pour la $\beta$ -lactamase OXY .....	38
<b>II</b>	<b>RESISTANCE AUX B-LACTAMINES .....</b>	<b>38</b>
II.1	Résistance naturelle aux $\beta$ -lactamines .....	38
II.1.1	Expression à bas niveau de la $\beta$ -lactamase OXY.....	38
II.1.2	Les mutations chromosomiques du gène <i>bla</i> <sub>OXY</sub> .....	38
II.1.2.1	Les mutations dans la région promotrice du gène <i>bla</i> <sub>OXY</sub> .....	38
II.1.2.2	Les mutations dans les régions codantes du gène <i>bla</i> <sub>OXY</sub> .....	42
II.2	Résistance acquise aux $\beta$ -lactamines .....	43
II.2.1	Classe A : $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE).....	43
II.2.2	Classe B : carbapénémases.....	44
II.2.3	Classe C : céphalosporinases.....	44
<b>III</b>	<b>RESISTANCE AUX AUTRES FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES .....</b>	<b>45</b>
III.1	Résistance aux quinolones .....	45
III.2	Autres antibiotiques.....	45
III.3	Résistance aux biocides.....	46
<b>IV</b>	<b>EPIDEMIOLOGIE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>46</b>
IV.1	Résistance en Europe .....	46
IV.2	Résistance en France .....	46
<b>PARTIE III : MATERIEL ET METHODES.....</b>		<b>48</b>
<b>I</b>	<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE.....</b>	<b>49</b>
<b>II</b>	<b>SOUCHES BACTERIENNES ETUDIEES.....</b>	<b>50</b>
<b>III</b>	<b>METHODES .....</b>	<b>52</b>
III.1	Sensibilité aux antibiotiques.....	52
III.1.1	Choix des antibiotiques .....	52
III.1.2	Mode opératoire .....	52
III.2	Etude du promoteur par biologie moléculaire.....	52
III.2.1	Extraction de l'ADN bactérien : méthode rapide par ébullition .....	52

III.2.2	Amplification .....	53
III.2.3	Analyse du produit d'amplification par séquençage .....	54
III.3	Etude du gène <i>bla<sub>OXY</sub></i> de la $\beta$ -lactamase .....	54
III.4	Typage moléculaire .....	55
III.4.1.1	« Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus »-PCR.....	55
III.4.1.2	Typage par électrophorèse en champs pulsés .....	55
<b>PARTIE IV : RESULTATS</b>	.....	<b>57</b>
<b>I</b>	<b>EPIDEMIOLOGIE DES SOUCHES ETUDIEES.....</b>	<b>58</b>
<b>II</b>	<b>ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>59</b>
<b>III</b>	<b>ETUDE DU PROMOTEUR DU GENE <i>BLA<sub>OXY</sub></i>.....</b>	<b>61</b>
<b>IV</b>	<b>ETUDE DU GENE <i>BLA<sub>OXY</sub></i> DE LA B-LACTAMASE.....</b>	<b>62</b>
<b>V</b>	<b>TYPAGE MOLECULAIRE .....</b>	<b>68</b>
V.1	ERIC 2-PCR.....	68
V.2	Electrophorèse en champs pulsés.....	69
<b>PARTIE V : DISCUSSION</b>	.....	<b>70</b>
<b>CONCLUSION.....</b>		<b>81</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>82</b>
<b>ANNEXE .....</b>		<b>95</b>

**TABLE DES ABREVIATIONS**

AA	Acide aminé
ADH	Arginine di-hydrolase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
BLSE	$\beta$ -lactamase à spectre étendu
CA-SFM	Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
ddNTP	didésoxyribonucléotide
GBEA	Guide de Bonne Exécution des Analyses
LDC	Lysine décarboxylase
MH	Mueller-Hinton (gélose de)
ODC	Ornithine-décarboxylase
ONERBA	Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques
ONPG	O-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside
Pb	Paire de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PM	Poids moléculaire
VP	Voges-Proskauer (réaction de)

**Abréviations des antibiotiques utilisés**

AMC	Amoxicilline + acide clavulanique
AMX	Amoxicilline
ATM	Aztréonam
CAZ	Ceftazidime
CF	Céfalotine
CRO	Ceftriaxone
CTX	Céfotaxime
CXM	Céfuroxime
CZ	Céfazoline
FOX	Céfoxitine
TIC	Ticarcilline

**Code international des acides aminés**

A (Ala)	Alanine	M (Met)	Méthionine
C (Cys)	Cystéine	N (Asn)	Asparagine
D (Asp)	Acide aspartique	P (Pro)	Proline
E (Glu)	Acide glutamique	Q (Gln)	Glutamine
F (Phe)	Phénylalanine	R (Arg)	Arginine
G (Gly)	Glycine	S (Ser)	Sérine
H (His)	Histidine	T (Thr)	Thréonine
I (Ile)	Isoleucine	V (Val)	Valine
K (Lys)	Lysine	W (Trp)	Tryptophane
L (Leu)	Leucine	Y (Tyr)	Tyrosine

**LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU I :	CHRONOLOGIE DES CLASSIFICATIONS PROPOSEES POUR LES ESPECES DU GENRE <i>KLEBSIELLA</i> .....	13
TABLEAU II :	CARACTERES GENERAUX DES <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> .....	14
TABLEAU III :	TESTS BIOCHIMIQUES ET CULTURAUX DISCRIMINANTS ENTRE <i>K. OXYTOCA</i> ET <i>RAOULTELLA</i> INDOLE-POSITIF.....	16
TABLEAU IV :	TESTS D'IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE DES <i>KLEBSIELLA</i> SP. ET DES <i>RAOULTELLA</i> SP. PAR LA GALERIE API 20E® .....	17
TABLEAU V :	COLORATION DES COLONIES CULTIVEES SUR DES MILIEUX CHROMOGENES EN FONCTION DES ESPECES BACTERIENNES.....	18
TABLEAU VI :	LES BASES DES PRINCIPALES CLASSIFICATIONS DES B-LACTAMASES SELON LEURS AUTEURS.....	28
TABLEAU VII :	LES DEUX CLASSIFICATIONS DES B-LACTAMASES LES PLUS UTILISEES.....	29
TABLEAU VIII :	ACIDES AMINES CONSERVES DES B-LACTAMASES DE CLASSE A SELON AMBLER .....	31
TABLEAU IX :	SEQUENCE PEPTIDIQUE DU SITE ACTIF DE OXY COMPAREE AUX ENZYMES D'AUTRES BACTERIES .....	34
TABLEAU X :	FORCE DU PROMOTEUR DU GENE <i>BLA<sub>OXY</sub></i> SELON LES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES BOITES -10 ET -35.....	39
TABLEAU XI :	SENSIBILITE AUX PRINCIPAUX ANTIBIOTIQUES DE SOUCHES HOSPITALIERES DE <i>K. OXYTOCA</i> ISOLEES EN FRANCE EN 1999 .....	47
TABLEAU XII :	EVOLUTION DE LA SENSIBILITE DE <i>K. OXYTOCA</i> EN FRANCE.....	47
TABLEAU XIII :	CMI A L'EGARD DE DIFFERENTES B-LACTAMINES EN MILIEU LIQUIDE (VITEK®) POUR LES 45 SOUCHES ETUDIEES .....	51
TABLEAU XIV :	AMORCES UTILISEES POUR L'ETUDE DU PROMOTEUR DU GENE <i>BLA<sub>OXY</sub></i> .....	53
TABLEAU XV :	AMORCES UTILISEES POUR L'ETUDE DU GENE <i>BLA<sub>OXY</sub></i> .....	54
TABLEAU XVI :	PROPORTION DE <i>K. OXYTOCA</i> HYPERPRODUCTRICES ISOLEES PAR SERVICE .	58
TABLEAU XVII :	CMI A L'EGARD DE DIFFERENTES B-LACTAMINES EN MILIEU GELOSE DE MUELLER HINTON POUR LES 45 SOUCHES DE L'ETUDE.....	60
TABLEAU XVIII :	SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES BOITES -10 ET -35 DES PROMOTEURS DES SOUCHES ETUDIEES.....	61
TABLEAU XIX :	RECAPITULATIF DES CARACTERISTIQUES BACTERIOLOGIQUES ET GENETIQUES DES 45 SOUCHES.....	67
TABLEAU XX :	SERVICE ET DATE D'ISOLEMENT DES SOUCHES OXY-2-7 CLASSEES PAR ORDRE CHRONOLOGIQUE .....	69

**LISTE DES FIGURES**

FIGURE 1 :	CULTURE BACTERIENNE SUR GELOSE CHROMOGENE URISELECT <sup>®</sup> .....	18
FIGURE 2:	LE NOYAU B-LACTAME .....	27
FIGURE 3 :	INACTIVATION DES B-LACTAMINES (SUBSTRATS) PAR UNE B-LACTAMASE (ENZYME) .....	27
FIGURE 4 :	SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE DU PREMIER GENE <i>BLA<sub>OXY</sub></i> SEQUENCE, <i>BLA<sub>OXY</sub></i> -1-7 ..	32
FIGURE 5 :	ARBRE PHYLOGENIQUE DES <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> EXPRIMANT LES GENES <i>BLA<sub>CTX-M</sub></i> ET <i>BLA<sub>OXY</sub></i> .....	33
FIGURE 6 :	SEQUENCES PEPTIDIQUES DES ENZYMES OXY-1-1 A OXY-6-1 .....	35
FIGURE 7 :	ARBRE PHYLOGENETIQUE DES OXY .....	37
FIGURE 8 :	ANTIBIOGRAMME PAR DIFFUSION EN MILIEU GELOSE D'UNE SOUCHE SAUVAGE DE <i>K. OXYTOCA</i> .....	41
FIGURE 9 :	ANTIBIOGRAMMES PAR DIFFUSION EN MILIEU GELOSE DE SOUCHES DE <i>K. OXYTOCA</i> DE PHENOTYPE HYPEROXY .....	41
FIGURE 10 :	ANTIBIOGRAMME PAR DIFFUSION EN MILIEU GELOSE D'UNE SOUCHE DE <i>K. OXYTOCA</i> EXPRIMANT UNE BLSE .....	44
FIGURE 11 :	MIGRATION EN GEL D'AGAROSE APRES AMPLIFICATION DU DEBUT DU GENE <i>BLA<sub>OXY</sub></i> .....	62
FIGURE 12 :	MIGRATION EN GEL D'AGAROSE APRES AMPLIFICATION DU GENE <i>BLA<sub>OXY</sub></i> .....	62
FIGURE 13 :	ARBRE PHYLOGENETIQUE DES 45 SOUCHES ETUDIEES ET DES 24 SOUS-GROUPES DE REFERENCE .....	63
FIGURE 14 :	SEQUENCES PEPTIDIQUES DE LA B-LACTAMASE OXY DE LA SOUCHE 33 ET OXY-1-5 .....	64
FIGURE 15 :	SEQUENCES PEPTIDIQUES DE LA B-LACTAMASE OXY DE LA SOUCHE 15 ET OXY-2-7 .....	64
FIGURE 16 :	SEQUENCES PEPTIDIQUES OXY DES SOUCHES 2, 14, 26, 28 ET OXY-2-8 .....	65
FIGURE 17 :	SEQUENCE PEPTIDIQUE OXY DE LA SOUCHE 1 COMPAREE A LA SEQUENCE PEPTIDIQUE OXY-2-9 .....	66
FIGURE 18 :	GEL DE TYPAGE MOLECULAIRE PAR ERIC 2-PCR DE SOUCHES OXY-2-7 .....	68
FIGURE 19 :	GEL DE TYPAGE MOLECULAIRE PAR ERIC 2-PCR POUR LES ISOLATS OXY-1-5.... .....	68
FIGURE 20 :	DENDROGRAMME DES SOUCHES OXY-2-7 APRES ELECTROPHORESE EN CHAMPS PULSES .....	69

**INTRODUCTION**

L'Homme a longtemps ignoré la diversité et l'importance du monde bactérien. Les découvertes du 20<sup>ème</sup> siècle lui ont révélé qu'il était lui-même un « porte-bactéries ». Omniprésentes dans les organismes humains, animaux et végétaux, elles interagissent entre elles et avec l'environnement. Leur évolution constante et rapide sous la pression de l'environnement, leurs différents modes d'échange et de brassage de l'information génétique font de la Bactériologie une science en perpétuel renouveau. Les bactéries multirésistantes sont là pour souligner qu'un agent pathogène, même bien connu, peut se révéler un ennemi redoutable s'il en vient à se défendre contre les molécules qui le détruisaient jusqu'alors.

*K. oxytoca* est une entérobactérie retrouvée de façon ubiquitaire dans l'environnement. Elle colonise également le tube digestif des êtres humains et peut provoquer des infections opportunistes sévères, en particulier chez les nouveau-nés (1, 2).

Depuis les années 1980, l'utilisation des céphalosporines de troisième génération en milieu hospitalier a entraîné une augmentation de la résistance aux  $\beta$ -lactamines de nombreuses bactéries jusqu'alors sensibles. L'isolement de souches de *K. oxytoca* de sensibilité diminuée aux céphalosporines de troisième génération et aux monobactams a incité certaines équipes à étudier les mécanismes impliqués.

Le principal mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les bacilles à Gram négatif est la production de  $\beta$ -lactamases. *K. oxytoca* possède une  $\beta$ -lactamase chromosomique naturelle nommée OXY. Cette enzyme s'exprime constitutivement à bas niveau, conférant une résistance aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines. Par contre, une hyperproduction de l'enzyme provoque une résistance à toutes les pénicillines et à l'association amoxicilline-inhibiteur de  $\beta$ -lactamase, et un niveau de sensibilité variable à l'aztréonam, aux céphalosporines de première et deuxième générations, à la ceftriaxone, au céfotaxime et à la ceftazidime.

Le but de notre travail était d'étudier la résistance de *K. oxytoca* aux  $\beta$ -lactamines, chez des souches isolées au CHU de Nantes en 2006 et 2007, dont le phénotype était compatible avec l'hyperproduction de la  $\beta$ -lactamase naturelle.

Dans un premier temps, une analyse phénotypique des souches de *K. oxytoca* hyperproductrices a permis la détermination de concentrations minimales inhibitrices à l'égard de différentes  $\beta$ -lactamines. Dans un second temps, une analyse génotypique a été réalisée pour caractériser les mécanismes moléculaires à l'origine de cette résistance aux  $\beta$ -lactamines.

**PARTIE I : GENERALITES SUR *KLEBSIELLA OXYTOCA***

## **I Taxonomie et phylogénie**

A ce jour, l'espèce *Klebsiella oxytoca* appartient au règne des *Procaryotae*, au domaine des *Bacteria*, au phylum des *Proteobacteria*, à la classe des *Gammaproteobacteria*, à l'ordre des *Enterobacteriales*, à la famille des *Enterobacteriaceae* et au genre *Klebsiella*. Toutefois, sa place dans la nomenclature est encore controversée.

Le genre bactérien *Klebsiella* a été créé en 1885 en l'honneur du microbiologiste allemand Edwin Klebs (1834-1913), inventeur de la technique de fixation des prélèvements dans la paraffine et co-découvreur de *Corynebacterium diphtheriae* (3). *K. oxytoca* a d'abord été dénommée *Bacillus oxytocus perniciosus* par Flugge *et al.* en 1886 (4). Dans les années 1950, Brooke *et al.* ont observé que certaines souches du genre *Klebsiella* étaient indole-positif (5). En 1956, Lautrop *et al.* ont proposé de dénommer ces souches *Bacterium oxytocom* mais cette dénomination a été peu utilisée par la communauté scientifique (6, 7) et, elle ne figurait pas dans la classification des *Klebsiella* proposée par Cowan *et al.* en 1960 (Tableau I, page 13) (8). En 1971, Bascomb *et al.* ont proposé une nouvelle classification (Tableau I, page 13) où les souches de *Klebsiella* indole-positif apparaissaient sous plusieurs dénominations dont celle de *K. oxytoca* (9). L'année suivante, la classification était à nouveau modifiée par Stenzel *et al.*, qui ont inclu les espèces du genre *Oxytocom* (10). En 1974, Jain *et al.* (11) ont distingué le groupe *Oxytocom* du genre *Klebsiella* par hybridation ADN-ADN. Malgré cette découverte, à cette époque, *K. oxytoca* était toujours considérée comme un biovar indologène de *Klebsiella pneumoniae*. *K. oxytoca* a reçu de nombreux noms différents (*K. aerogenes*, *K. pneumoniae*, etc...) jusqu'en 1984. A cette date, la nomenclature des *Klebsiella* a changé, du fait de l'utilisation de nouveaux critères taxonomiques incluant l'hydrolyse enzymatique de certains substrats. (12). L'espèce *K. oxytoca* est alors apparue comme une espèce à part entière dans la classification des espèces de *Klebsiella* (Tableau I, page 13) (13). Parmi les différentes classifications, la plus communément admise à la fin du vingtième siècle était celle d'Orskov, dans laquelle le genre *Klebsiella* comprenait cinq espèces : *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* (appelée aussi *K. trevisanii*), *K. terrigena* et *K. ornithinolytica* (13).

En 2001, un nouveau nom de genre, *Raoultella*, a été donné aux espèces jusqu'alors dénommées *K. ornithinolytica*, *K. planticola* et *K. terrigena* (14). La justification de cette nouvelle dénomination a été apportée par l'étude des gènes codant pour l'ARNr 16S et *rpoB* (14). Malgré ces travaux, de nombreux auteurs ont continué à décrire sous le nom de *Klebsiella* les espèces du genre *Raoultella*, alimentant la confusion (15, 16). Cette étude a également montré que *K. oxytoca* constituait une espèce phylogénétique séparée de *K.*

*pneumoniae* et des espèces du genre *Raoultella* (14, 17). L'hypothèse selon laquelle *K. oxytoca* formait un nouveau genre pour lequel il n'y avait pas encore de nomenclature était même clairement émise par Drancourt *et al.*

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence la grande diversité génétique de l'espèce *K. oxytoca*. Chaque technique de typage moléculaire a donné lieu à une classification spécifique, mais toutes les classifications ont individualisé 6 groupes génétiques majeurs chez *K. oxytoca*. L'étude du gène *gyrA* a abouti à classer les 6 groupes de KoI à KoVI, et à dater leur ancêtre commun à plusieurs dizaines de millions d'années (17). Une seconde classification basée sur l'étude du gène *bla<sub>OXY</sub>* de la  $\beta$ -lactamase a été initiée par Fournier *et al.* en 1996 (deux sous-espèces) (18) puis poursuivie par Granier *et al.* en 2004 (trois sous-espèces) (19) et Fèvre *et al.* en 2005 (six sous-espèces) (20). L'évolution du gène *bla<sub>OXY</sub>* semble corrélée à celle des autres gènes chromosomiques dits de ménage dont le gène *gyrA* (21). D'où l'hypothèse émise par Granier *et al.* que la  $\beta$ -lactamase chromosomique pouvait avoir un rôle dans la vie métabolique de la bactérie en dehors de la protection vis-à-vis de certaines  $\beta$ -lactamines (21, 22). Enfin, une étude génétique par PCR-MT (Melting Profiles) a permis de distinguer 6 groupes génétiques (KoA, KoB, KoC, KoD, KoE et KoF), selon un seuil de variabilité génétique fixé à 15 % pour qu'un groupe soit individualisé (23). Chaque groupe était représenté à part égale sauf le groupe KoA qui représentait 28 % des 200 souches de *K. oxytoca* étudiées. Ces 6 groupes ont semblé présents dans les mêmes proportions depuis 50 ans (23).

Enfin, de nouvelles espèces du genre *Klebsiella* ont été régulièrement ajoutées à la nomenclature. En 1999, *Calymmatobacterium granulomatis* a été transféré dans le genre *Klebsiella* et renommé *K. granulomatis* après étude des gènes codant pour l'ARNr 16S et du gène *phoE* codant pour une porine (24). Les travaux de Boye *et al.* (gènes codant pour l'ARNr 16S) et de Drancourt *et al.* (gènes codant pour l'ARNr 16S et *rpoB*) ont confirmé la parenté entre *K. granulomatis* et *K. pneumoniae* (14, 25). Mais, en l'absence d'hybridations ADN-ADN, il était impossible de savoir si ce taxon constituait une nouvelle sous-espèce de *K. pneumoniae* ou une nouvelle espèce du genre *Klebsiella*.

En janvier 2004, une autre nouvelle espèce, *K. variicola*, a été individualisée au sein de l'espèce *K. pneumoniae*, à partir des homologues ADN-ADN et du séquençage des gènes *rpoB*, *phoE*, *gyrA*, *mdh*, *infB* et *nifH* (26). En novembre 2004, *K. singaporensis* a été ajoutée à la nomenclature, après séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S et *rpoB*, études du G + C % et des hybridations ADN-ADN (27).

À ce jour, le genre *Klebsiella* est composé des espèces *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. variicola*, *K. granulomatis*, *K. rhinoscleromatis* et *K. singaporensis*.

*K. milletis* et *K. senegalensis*, proposées à la nomenclature par Mbengue *et al.* en 2003, mais non reconnues comme faisant partie du genre *Klebsiella* (28), participent aussi au questionnement permanent concernant la taxonomie et la phylogénie du genre *Klebsiella*. Ces difficultés illustrent les soucis de classification des bactéries en général, 150 ans après la 1<sup>ère</sup> dénomination d'une bactérie par Ferdinand Cohn (Tableau I, page 13) (3, 29).

**Tableau I : Chronologie des classifications proposées pour les espèces du genre *Klebsiella***

<b>Cowan (1960) (8)</b>	<b>Bascomb (1971) (9)</b>	<b>Orskov (1984) (13)</b>	<b>Carter (1999) (24)</b>	<b>Drancourt (2001) (14)</b>	<b>Rosenblueth (2004) (26)</b>	<b>Plusieurs auteurs *** (2004 à 2009) (27, 30)</b>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>sensu stricto,</i> <i>sensu lato</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae,</i> <i>subsp. ozaenae et</i> <i>subsp. rhinoscleromatis</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae,</i> <i>subsp. ozaenae,</i> <i>subsp. rhinoscleromatis</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae,</i> <i>subsp. ozaenae,</i> <i>subsp. rhinoscleromatis</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae,</i> <i>subsp. ozaenae,</i> <i>subsp. rhinoscleromatis</i>	<i>K. pneumoniae subsp. KpI, KpII, KpIII</i>
<i>K. aerogenes</i>	<b><i>K. indole positif</i></b> <b><i>aerogenes/oxytoca/edwardsii</i></b>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca subsp. KoI, KoII et KoIII</i>
<i>K. ozaenae</i> <i>K. rhinoscleromatis</i> <i>K. edwardsii</i> <i>subsp. edwardsii,</i> <i>subsp. atlantae</i>	<i>K. ozaenae</i> <i>K. rhinoscleromatis</i> <i>K. “ groupe sans nom ”</i>	<i>K. terrigena</i> <i>K. planticola (syn</i> <i>K. trevisanii)</i> <i>K. ornithinolytica</i>	<i>K. terrigena</i> <i>K. planticola</i> <i>K. ornithinolytica</i> <i>K. granulomatis</i>	<i>Raoultella terrigena*</i> <i>R. planticola*</i> <i>R. ornithinolytica*</i> <i>K. granulomatis</i>	<i>K. granulomatis</i> <i>K. variicola</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i> <i>K. granulomatis</i> <i>K. variicola</i> <i>K. singaporensis</i> <i>K. milletis**</i> <i>K. senegalensis**</i>

\* Espèces reclassées dans le genre *Raoultella* en 2001  
 \*\* Espèces proposées mais non reconnues par la communauté scientifique  
 \*\*\* Plusieurs auteurs : Li *et al.*, Mbengue *et al.*

## **II Diagnostic bactériologique**

### **II.1 Diagnostic de famille**

Le genre *Klebsiella* rassemble des bacilles à Gram négatif, assez grands (de 0,6 à 6,0 µm de longueur) se présentant de manière isolée, ou groupés par deux ou en courtes chaînes. Ce genre possède les caractères généraux des *Enterobacteriaceae* (Tableau II).

#### **Tableau II : Caractères généraux des *Enterobacteriaceae***

---

Bacilles à Gram négatif,  
mobiles avec ciliature péritriche ou immobiles,  
poussant sur milieux de culture ordinaires,  
aérobies-anaérobies facultatifs,  
fermentant le glucose avec ou sans production de gaz,  
réduisant les nitrates en nitrites,  
oxydase négatif.

---

### **II.2 Diagnostic de genre**

Le diagnostic du genre *Klebsiella* est orienté par l'immobilité constante, le caractère muqueux des colonies et le grand nombre de sucres fermentés (31).

Une entérobactérie immobile, capsulée, produisant du o-nitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG-positif) et présentant un test de Voges-Proskauer (VP) positif, uréase-positif, lysine décarboxylase (LDC) positive, ornithine décarboxylase (ODC) négative et arginine dihydrolase (ADH) négative est très certainement une souche du genre *Klebsiella* ou de son principal diagnostic différentiel, le genre *Raoultella* (31, 32).

### **II.3 Diagnostic d'espèce**

#### **II.3.1 Caractères biochimiques**

##### II.3.1.1 Caractères positifs

En plus des réponses positives aux tests indole, o-nitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG), lysine décarboxylase (LDC), citrate, Voges-Proskauer (VP) et uréase (réaction parfois lentement positive), *K. oxytoca* entraîne également une réaction positive pour l'assimilation du malonate, la synthèse d'une xylosidase et celle plus aléatoire d'une

tétrathionate-réductase (retrouvée chez 20 % des isolats) (33). Elle fermente de nombreux substrats glucidiques avec production de gaz, dont le sorbose dans 100 % des cas (33). Ces caractères ne sont pas spécifiques à 100 % (34).

L'identification automatisée ou semi-automatisée des espèces du genre *Klebsiella* est possible grâce à différents systèmes : Vitek<sup>®</sup> (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), API 20E<sup>®</sup>, API 32E<sup>®</sup>, API 32GN<sup>®</sup>, API 50CH<sup>®</sup> et API 100<sup>®</sup> (bioMérieux), MicroScan<sup>®</sup> (WalkAway, Dade Behring, Etats-Unis), etc ... Les galeries utilisées en routine ne permettent pas toujours d'identifier avec certitude les isolats cliniques de *K. oxytoca* (Tableau III page 16). Monnet *et al.* ont évalué à 13 % le taux d'erreur avec la galerie 20E<sup>®</sup> du système API (bioMérieux) quand elle est utilisée pour l'identification des isolats cliniques de *Klebsiella* sp. (29). L'identification phénotypique de *R. terrigena*, *R. planticola* et *R. ornithinolytica* est rendue difficile du fait de l'absence de codage de ces espèces dans certaines galeries d'identification (dont API 20E<sup>®</sup>). Elles peuvent être confondues avec *K. oxytoca* et *K. pneumoniae* (29) (Tableau IV page 17).

#### II.3.1.2 Diagnostic différentiel

Les tests de production d'indole permettent de distinguer *K. oxytoca* (indole-positif) de *K. pneumoniae* (indole-négatif). *K. oxytoca* fait ainsi partie avec *R. ornithinolytica* et *R. planticola* des espèces indole-positif (31). Des études ont montré que pour distinguer avec certitude les isolats de *K. oxytoca* de ceux de *R. planticola* et de *R. ornithinolytica*, des tests spécifiques étaient nécessaires incluant des tests biochimiques et des températures de croissance différentielles : utilisation de substrats (ornithine, histamine, D-mélézitose, dulcitol, L-tartrate, 3-O-méthyl-D-glucose, 3-hydroxybenzoate), croissance à 10°C, etc... (30, 32, 35, 36) (Tableau III, page 16). *K. oxytoca* se différencie de toutes les espèces du genre *Raoultella* par sa capacité à assimiler le dulcitol et le L-tartrate et par son incapacité à assimiler le 3-O-méthyl-D-glucose (31). *R. ornithinolytica* est ornithine décarboxylase (ODC) positive, contrairement à *K. oxytoca* et *R. planticola* (31). Le diagnostic différentiel entre *K. oxytoca* et *R. planticola* est basé sur l'hydrolyse du 3-hydroxybenzoate (positive chez *K. oxytoca*), et l'hydrolyse du 3-hydroxybutyrate (négative chez *K. oxytoca*), tests retrouvés dans la galerie API 32GN<sup>®</sup> (15).

**Tableau III : Tests biochimiques et cultureux discriminants entre *K. oxytoca* et *Raoultella indole-positif*.**

Espèce / Tests	Indole	10°C	Histamine	D-mélézitose	Ornithine
<i>K. oxytoca</i>	+	+	-	V	-
<i>R. planticola</i>	V	+	+	-	-
<i>R. ornithinolytica</i>	+	+	+	-	+

+ : positif, - : négatif, V : variable

10°C : croissance bactérienne à 10°C

### II.3.2 Caractères cultureux

Après 24 heures d'incubation, les colonies de *K. oxytoca* sont rondes, plus ou moins bombées, brillantes et muqueuses. *K. oxytoca* cultive sur des milieux non enrichis, classiquement utilisés pour les entérobactéries : gélose trypticase soja, gélose au sang, gélose MacConkey, gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP), gélose éosine-bleu de méthylène (EMB), gélose de Drigalski, etc... Sur les milieux contenant du lactose et un indicateur de pH (gélose BCP), les colonies de *K. oxytoca* apparaissent lactose-positives et colorent le milieu en jaune.

Des milieux chromogènes peuvent orienter le diagnostic vers le groupe K.E.S. (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*) (34). Les chromogènes sont des substrats artificiels incolores incorporés dans la gélose qui libèrent des composés directement visibles au niveau des colonies bactériennes dont la couleur varie selon l'activité enzymatique de la bactérie (Figure 1, page 18). Le groupe K.E.S. regroupe des bactéries qui possèdent une  $\beta$ -galactosidase et une  $\beta$ -glucosidase. Elles donnent une coloration franche bleue intense sur CHROMagar Orientation<sup>®</sup>, UriSelect 4<sup>®</sup>, UTI<sup>®</sup>, et une coloration bleu-vert sur CPS ID 3<sup>®</sup> (Tableau V, page 18). La mise en évidence de bacilles Gram négatif à l'examen direct donne une forte présomption de bactéries appartenant à ce groupe, permettant une orientation diagnostique rapide en pratique quotidienne.

**Tableau IV : Tests d'identification biochimique des *Klebsiella* sp. et des *Raoultella* sp. par la galerie API 20E®**

Bactérie / Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	urée	TDA	indole	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
<i>K. oxytoca</i>	+	-	(+)	-	+	-	(+)	-	+	(+)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>R. planticola</i>	+	-	V	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>R. ornithinolytica</i>	+	-	+	+	+	-	(+)	-	+	(+)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>R. terrigena</i>	+	-	+	(-)	V	-	-	-	-	(+)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	+	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>K. rhinoscleromatis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	-	+	(-)	-

ONPG : o-nitrophényl-β-D-galactopyranoside, ADH : arginine di-hydrolase, LDC : lysine-décarboxylase, ODC : ornithine-décarboxylase, CIT : citrate, H<sub>2</sub>S : thiosulfate-réductase, TDA : tryptophane-désaminase, VP : Voges-Proskauer, GEL : gélatinase, GLU : glucose, MAN : mannitol, INO : inositol, SOR : sorbitol, RHA : rhamnose, SAC : saccharose, MEL : mélibiose, AMY : amygdaline, ARA : arabinose, OX : oxydase

+ : réaction positive > 90 % des souches bactériennes

(+) : réaction positive 60-90 %

V : variable

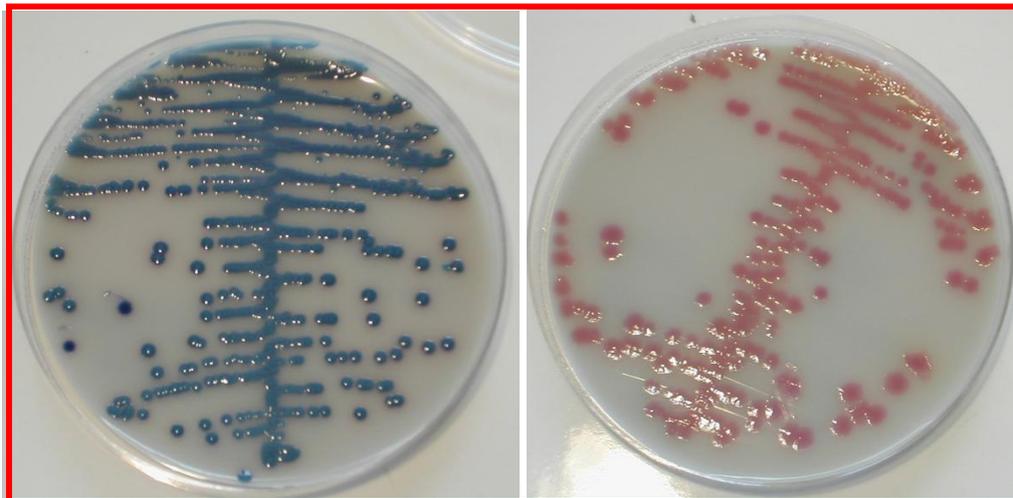
(-) : réaction négative 60-90 %

- : réaction négative > 90 %

**Tableau V : Coloration des colonies cultivées sur des milieux chromogènes en fonction des espèces bactériennes**

Couleur des colonies selon le milieu utilisé	CHROMagar Orientation® (BD)	CPS ID 3® (bioMérieux)	UriSelect 4® (Bio-Rad)	UTI® (Oxoid)
Groupe <i>Klebsiella-Enterobacter-Serratia</i> ( $\beta$ -galactosidase et $\beta$ -glucosidase)	Bleu-métallique avec ou sans halo rose, colonies de grande taille	Vert à brun vert, de grande taille	Bleu-violet, de grande taille	Bleu-pourpre, de grande taille
<i>E. coli</i> ( $\beta$ -galactosidase)	Rose	Rose à bordeaux	Rose à pourpre	Rose

**Figure 1 : Culture bactérienne sur gélose chromogène Urisélect®**



La coloration bleue des colonies évoque une bactérie du « groupe K.E.S. » à gauche et la coloration rose une souche appartenant à l'espèce *E. coli* à droite.

### II.3.3 Caractères moléculaires

#### II.3.3.1 Analyse de l'ARNr 16S

L'évolution des biotechnologies dans les années 70 et 80 a permis de classer les organismes selon la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S (37). Les arguments en faveur du choix de ce gène d'environ 1500 paires de bases (pb) étaient principalement sa distribution universelle, son homologie de fonctionnement chez tous les êtres vivants, son évolution lente et la présence en son sein de régions très conservées et d'autres régions hypervariables (37). Dans ces régions très conservées, des amorces universelles ont été déterminées pour amplifier le gène codant pour l'ARNr 16S. Malgré tout, la présence de régions variables constitue parfois

un inconvénient par manque de sensibilité pour différencier avec certitude des bactéries génétiquement proches. Au milieu de l'année 2009, GenBank disposait d'environ 752 séquences d'ARNr 16S de *Klebsiella* dont 132 de *K. oxytoca* (38).

#### II.3.3.2 Analyse du gène *rpoB*

L'ARN-polymérase est une enzyme cruciale dans le processus de transcription. Elle est constituée de cinq sous-unités. La sous-unité  $\beta$ , codée par le gène *rpoB*, permet l'activité catalytique. Le gène *rpoB* est un gène universel ne présentant qu'une seule copie dans le génome bactérien. L'identification bactérienne moléculaire par analyse de la séquence partielle du gène *rpoB* est une technique régulièrement utilisée. Elle est complémentaire de l'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S. La détermination d'une région hypervariable de 512 pb encadrée par deux régions très conservées a permis de développer son utilisation pour la phylogénie des entérobactéries (39).

### **III Habitat et pouvoir pathogène**

*K. oxytoca* est une bactérie de l'environnement, isolée également chez l'Homme et les mammifères. Ces différents types d'habitat expliquent en partie l'intérêt croissant porté à *K. oxytoca*, tant en recherche environnementale qu'en microbiologie clinique.

#### **III.1 *Klebsiella oxytoca* : bactérie et outil de préservation de l'environnement**

*K. oxytoca* est une espèce ubiquitaire de l'environnement, isolée des eaux de surface (40), des eaux usées (41), des effluents industriels (papeteries, minoteries, scieries, usines textiles), du sol, du bois, de végétaux divers (42) et des aliments (35).

Les secteurs industriels et agricoles tentent de modifier leurs techniques de production afin de préserver l'environnement. Les méthodes de production dites biologiques commencent à suppléer les techniques chimiques (43). De nombreux travaux de recherche sur les biocarburants (44, 45), les biopolymères (46) ou la détoxification des eaux usées (41, 47) étudient les propriétés de *K. oxytoca*. La recherche agronomique s'intéresse aussi à elle comme engrais biologique (48) ou pour lutter contre certaines maladies des plantes (maladie de la pourriture molle des tubercules, échaudure des feuilles de canne à sucre) (49, 50).

## **III.2 *Klebsiella oxytoca* : espèce commensale et pathogène opportuniste**

### **III.2.1 Facteurs de pathogénicité**

*K. oxytoca* n'est pas systématiquement pathogène pour l'Homme. Elle colonise 1 à 2 % de la population sans engendrer de signes cliniques (51). Toutefois, pour des raisons encore mal élucidées, certaines souches peuvent être à l'origine d'infections potentiellement graves, souvent à point de départ urinaire ou digestif. L'hypothèse de l'existence de différences entre les souches responsables d'infections et celles non pathogènes a été émise (existence de différents pathotypes ou pathovars). La virulence d'une bactérie se définit comme ses propriétés à envahir et à se multiplier sur ou dans un hôte, malgré les défenses que celui-ci oppose. Les gènes de virulence sont chromosomiques ou plasmidiques, souvent regroupés sous forme d'opérons dans des régions génomiques appelées îlots de pathogénicité (IDP), qui peuvent être transmis « en bloc » d'une souche à l'autre, et même entre espèces différentes (transfert horizontal) (52). Jusqu'à maintenant, les facteurs de virulence et les gènes correspondants ont été peu étudiés chez *K. oxytoca*.

#### III.2.1.1 Les fimbriae

Une infection débute généralement par la fixation de la bactérie sur les muqueuses. Cette fixation évite à la bactérie d'être éliminée par des phénomènes mécaniques tels le flux urinaire, la toux ou les mouvements péristaltiques de l'intestin. Chez *K. oxytoca*, les phénomènes d'adhérence sont dépendants des fimbriae. Elle peut produire des fimbriae de type 1 et de type 3 (53). Les fimbriae de type 1 sont impliqués dans l'adhérence de *K. oxytoca* aux cellules épithéliales de l'arbre urinaire et participent à la physiopathologie des infections urinaires (54). Les fimbriae de type 3 favorisent la formation des biofilms (55). La détection de ces marqueurs de virulence repose sur l'agglutination *in vitro* d'érythrocytes traités par de l'acide tannique (56). L'hémagglutination avec les fimbriae de type 3 survient en l'absence ou en présence de D-Mannose. Cette caractéristique a été initialement mise en évidence chez *Klebsiella* sp. (57). Le phénotype associé a été dénommé « phénotype résistant au mannose », et le gène codant pour les fimbriae de type 3, *mrk* pour « mannose resistant *Klebsiella*-like hemagglutination ». Les fimbriae de type 1 sont dits « mannose-sensible », car l'hémagglutination nécessite la présence de D-mannose (57).

### III.2.1.2 La capsule

La capsule est un facteur de virulence majeur (5, 58). Elle protège les bactéries de la phagocytose, de l'action du complément et du pouvoir bactéricide du sérum. La majorité des souches de *K. oxytoca* sont capsulées, bien qu'environ 18 % des souches en soient dépourvues (59). Parmi les 77 antigènes capsulaires (antigènes K) décrits chez les *Klebsiella*, les antigènes K55 et K66 sont les plus fréquemment isolés chez *K. oxytoca* (59).

### III.2.1.3 La résistance à la bactéricidie du sérum

Les souches de *K. oxytoca* ont une résistance au pouvoir bactéricide du sérum plus élevée que les souches de *K. pneumoniae* (60). Le mécanisme de cette résistance n'est pas connu ; une des hypothèses avancées étant le rôle possible de facteurs capsulaires (60).

### III.2.1.4 Les sidérophores

Le fer joue un rôle essentiel dans la croissance et la multiplication bactérienne, notamment dans la synthèse de co-enzymes d'oxydo-réduction. Ainsi, la majorité des bactéries pathogènes développent des systèmes de captation du fer, dont des sidérophores. D'après Podschun *et al.*, *K. oxytoca* est apte à synthétiser trois sidérophores (60) : l'entérobactine synthétisée par la grande majorité des souches, l'aérobactine par 16 à 50 % d'entre elles et encore plus rarement la yersiniabactine chez certaines souches hébergeant l'îlot de pathogénicité HPI (High-Pathogenicity Island) des *Yersinia* sp. (61).

### III.2.1.5 Les exotoxines

*K. oxytoca* synthétise une cytotoxine de bas poids moléculaire (moins de 1 kDa) de support chromosomique (62). Les cytotoxines de bas poids moléculaire sont moins décrites dans la littérature que celles de haut poids moléculaire (plus de 10 kDa), comme celles de *Shigella* sp. (63) ou *E. coli* (63). La toxine de *K. oxytoca* exerce un effet cytopathogène sur les cellules humaines HEP-2, CHO, HeLa et Vero, se traduisant par la ballonnisation puis la mort cellulaire. Chez l'animal, son injection au niveau des anses iléales et coliques de lapin provoque un afflux liquidien dans la lumière du tube digestif. En 2006, 100 % des souches cliniques de *K. oxytoca* responsables de colite infectieuse exprimaient la cytotoxine (51).

### III.2.1.6 Les endotoxines et le lipopolysaccharide (LPS)

Comme tous les bacilles à Gram négatif, *K. oxytoca* possède une endotoxine (complexe lipogluco-protéique) composée de 3 parties, le lipide A, le core polysaccharidique et la chaîne

latérale O. Toutefois, seule une fraction de ce complexe est réellement active (lipopolysaccharide ou LPS) provoquant des effets physiopathologiques caractéristiques chez l'hôte (leucopénie, réaction fébrile, voire choc anaphylactique et collapsus) (64).

### III.2.1.7 Les autres enzymes bactériennes

L'équipement enzymatique particulier de *K. oxytoca* favorise l'envahissement des cellules eucaryotes.

#### **III.2.1.7.1 L'uréase**

L'uréase est une enzyme utilisant l'urée comme substrat pour produire de l'ammoniac. Les bactéries tamponnent ainsi les milieux acides afin de s'y développer. L'uréase des *Klebsiella* sp. n'a jamais été étudiée comme facteur de virulence, contrairement à celle d'autres bactéries, par exemple le genre *Proteus* (65).

#### **III.2.1.7.2 Les exoprotéines**

Les systèmes de sécrétion de type 2 (ou T2SS pour Type II System Secretion) ont été retrouvés chez de nombreuses bactéries à Gram négatif (15 genres au moins), d'après la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (66). Ces T2SS sont exprimés par certaines souches de *K. oxytoca* (67). Ils permettent d'injecter une exoprotéine bactérienne spécifique de *K. oxytoca*, la pullulanase, dans les cellules hôtes. Cette protéine déjoue les mécanismes de défenses de l'hôte pour créer une niche dans laquelle la bactérie pathogène survit et se multiplie. Cette niche est appelée sécrétion.

### **III.2.2 Espèce commensale**

La recherche de *K. oxytoca* dans les selles a été positive chez 1,6 % des sujets sains dans une étude portant sur 385 personnes en 2006 (51). *Klebsiella* sp. a également été isolée dans 34,2 % des coprocultures de patients atteints de spondylarthrite ankylosante en 1999 (68).

### **III.2.3 Pouvoir pathogène**

La plupart des infections à *Klebsiella* sp. surviennent lors d'hospitalisations. *Klebsiella* sp. représente 8 % de toutes les infections bactériennes nosocomiales en Europe et aux Etats-Unis, soit le 8<sup>ème</sup> rang des bactéries pathogènes hospitalières (69). *K. pneumoniae* est la principale espèce du genre *Klebsiella* responsable d'infections nosocomiales. *K. oxytoca* est moins souvent isolée des prélèvements biologiques humains, représentant 2 % des infections nosocomiales en 2008 (69).

Ces infections touchent généralement des sujets à risque (immunodéprimés ou souffrant de pathologies chroniques : diabète, bronchopneumopathie obstructive chronique, cancer, etc...) ou surviennent au décours d'actes invasifs (interventions neurochirurgicales, prostatectomies, pose de cathéters, coloscopies, transfusions plaquettaires, etc...) (70).

Les infections à *K. oxytoca* sont diverses et le plus souvent graves (infections urinaires, infections suppuratives, infections biliaires, infections hépatiques, infections intra-abdominales, bactériémies, septicémies, chocs septiques, fasciites nécrosantes, méningites, infections respiratoires, etc...).

#### III.2.3.1 Les infections urinaires

Chez l'adulte, *K. oxytoca* est responsable de 3,9 % des infections urinaires des patients hospitalisés, alors qu'elle est très rarement isolée dans les infections urinaires communautaires (Réseau AFORCOPI-BIO, 2004) (71). Chez l'enfant, elle est à l'origine de 2,1 % des pyélonéphrites (72), et de 3 % des infections urinaires récidivantes (73). Un cas d'infection urinaire à *K. oxytoca* compliquée d'encéphalopathie a été décrit chez un enfant en 1998 (74).

#### III.2.3.2 Les infections pulmonaires

En 1983, Power *et al.* ont étudié les espèces de *Klebsiella* sp. responsables de pneumopathies aiguës. Parmi les 110 souches isolées d'expectorations ou d'hémocultures, 10 étaient des *K. oxytoca*, soit environ 10 % (75). Aucune étude en faveur de son rôle pathogène dans l'arbre respiratoire n'a été publiée depuis.

#### III.2.3.3 Les infections digestives et hépatobiliaires

##### **III.2.3.3.1 Les colites hémorragiques post-antibiotiques**

Le premier cas de colite hémorragique associée à la présence de *K. oxytoca* a été décrit en 1979 (76). Depuis, *K. oxytoca* a été régulièrement signalée comme agent de diarrhées post-antibiotique (77). Le tableau clinique de diarrhée aiguë fébrile apparaît brutalement entre le 2<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour d'un traitement antibiotique. Les spécificités cliniques sont la composante hémorragique et les douleurs abdominales, que l'on retrouve rarement dans les diarrhées à *Clostridium difficile* (51). Une hyperleucocytose est fréquente. La radiologie de l'abdomen

sans préparation est en faveur d'une colite ischémique. L'examen clé est la coloscopie étendue au colon transverse et au colon droit. L'endoscopie retrouve une muqueuse colique droite ou transverse oedématiée, avec des zones purpuriques ou hémorragiques, mais sans pseudomembranes. Les antibiotiques les plus souvent impliqués sont la pénicilline G, l'ampicilline (76), l'amoxicilline (78, 79), l'association amoxicilline-acide clavulanique (78, 79), les céphalosporines de première génération (78), les synergistines (80-82), l'acide fusidique (83). L'évolution est généralement spontanément favorable dans les 2 à 4 jours qui suivent l'arrêt de l'antibiothérapie (79). L'intérêt d'un traitement par ciprofloxacine n'est pas clairement démontré dans la littérature. Son indication pourrait se limiter aux formes graves ou résistantes à l'arrêt de l'antibiotique responsable (84). La coproculture semble peu rentable (51). L'absence de *K. oxytoca* ne doit pas faire éliminer le diagnostic (hypothèse de l'adhérence à la muqueuse colique (78)), et la présence de cette bactérie saprophyte de la flore colique ne permet pas toujours d'affirmer son rôle pathogène. La culture de biopsie colique est très sensible et constitue l'examen-clé (78). En colligeant les principales séries de la littérature dans lesquelles une coproculture et une culture de biopsies ont été réalisées, *K. oxytoca* a été isolée à partir des selles dans 1/3 des cas et à partir des biopsies coliques dans 2/3 des cas (85), voire dans tous les cas si l'examen était répété (86). L'intérêt de rechercher *K. oxytoca* sur milieu sélectif au même titre que *C. difficile* en cas de diarrhée hémorragique post-antibiotique reste discuté (81).

#### **III.2.3.3.2 Les infections hépatobiliaires**

D'après Lin *et al.*, les infections hépatobiliaires représentent 58 % des infections à *K. oxytoca* (87). Les cas rapportés dans la littérature sont rares : un cas d'abcès splénique (88) et un cas d'abcès hépatique (89).

#### **III.2.3.4 Les bactériémies**

*K. oxytoca* était responsable de 1,6 % des bactériémies nosocomiales en 2004 d'après le réseau Col-BVH-1996/2004 (71). En colligeant les principales études, les bactériémies à *K. oxytoca* compliquent environ 2 pour 10000 hospitalisations (71, 87, 89, 90). Une pathologie sous-jacente biliaire ou pancréatique (55 %), néoplasique (40 %) ou un diabète (15 %) sont

retrouvés chez 95 % des patients. La porte d'entrée est principalement urinaire (91-93), puis digestive (94-96) ou cutanée (97). Les principales complications sont le choc septique (20 % des cas) (70, 94) et la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) (5 % des cas) (71, 87, 89). La mortalité est d'environ 25 % (89).

#### III.2.3.5 Les endocardites et autres infections cardiaques

Les *Klebsiella* sp. sont responsables de 1,2 % des endocardites sur valve native et 4,1 % des endocardites sur valve prothétique (98). *K. oxytoca* est encore plus rarement diagnostiquée dans les endocardites (93, 99, 100). Un cas de myopéricardite à *K. oxytoca* a aussi été décrit (101).

#### III.2.3.6 Les fasciites nécrosantes et autres infections cutanées

La fasciite nécrosante est une infection grave des tissus mous, engageant le pronostic vital parfois causée par *K. oxytoca* (102, 103). *K. oxytoca* a également été décrite dans des cellulites plantaires et de jambes (104) ou des folliculites (105, 106).

#### III.2.3.7 Les épidémies dues à *Klebsiella oxytoca*

Des épidémies dues à *K. oxytoca* ont été rapportées dans les services accueillant certaines populations de patients à risque (nouveau-nés, transplantés d'organe, etc...). Les patients les plus touchés étaient les nouveau-nés. Ces épidémies peuvent être causées par la contamination d'antiseptiques (107), de médicaments ou dérivés de médicaments : albumine (108), solutés isotoniques de chlorure de sodium (109, 110), solutions de nutrition parentérale (111), solutés pour injection intraveineuse (112), et médicaments sous forme d'aérosols (113), etc...

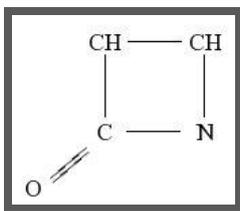
**PARTIE II : RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES**

# **I Les $\beta$ -lactamases**

## **I.1 Mode d'action des $\beta$ -lactamases**

Les  $\beta$ -lactamines constituent la principale famille d'antibiotiques (environ 50 % des molécules). Elle se compose de l'ensemble des antibiotiques dont la structure de base comporte un noyau  $\beta$ -lactame (Figure 2). Elle peut être classée en sous-groupes en fonction de la structure du noyau de base (pénème, oxapénème, pénème, céphème, oxacéphème, azétididone, etc...).

**Figure 2: Le noyau  $\beta$ -lactame**

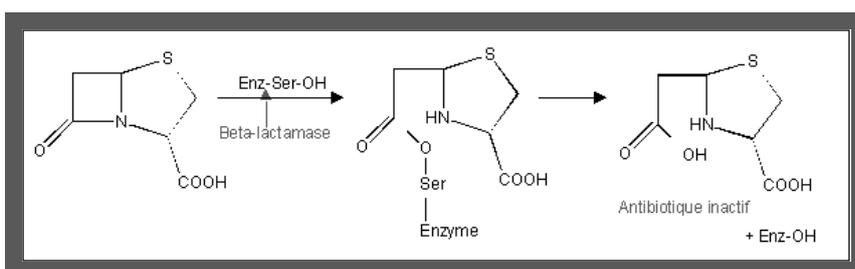


En 1940, Abraham *et al.* décrivent une enzyme bactérienne capable de détruire la pénicilline. Ils la nomment pénicillinase car la structure du cycle  $\beta$ -lactame n'est pas encore connue (114). La découverte d'enzymes hydrolysant d'autres  $\beta$ -lactamines, céphalosporines (115), monobactams ou carbapénèmes, laisse place au nom de  $\beta$ -lactamases. Elles constituent l'un des mécanismes prépondérants de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les bacilles à Gram négatif.

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation localisées au niveau de l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram négatif. L'inactivation enzymatique (perte de l'activité antibiotique) survient lors de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame (Figure 3). L'enzyme hydrolyse le pont amide du cycle  $\beta$ -lactame pour donner un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif. Les pénicillines sont dégradées en acide pénicilloïque et les céphalosporines en acide céphalosporoïque.

Le support génétique des  $\beta$ -lactamases est chromosomique ou plasmidique.

**Figure 3 : Inactivation des  $\beta$ -lactamines (substrats) par une  $\beta$ -lactamase (enzyme)**



## **I.2 Les classifications des $\beta$ -lactamases**

Les  $\beta$ -lactamases sont nombreuses et hétérogènes, ce qui explique les difficultés rencontrées pour les classer. Le Tableau VI résume les classifications qui se sont succédées au fur et à mesure des avancées scientifiques. Le Tableau VII (page 29) détaille les deux classifications les plus utilisées, celles de Ambler et celle de Bush. La classification la plus communément admise est celle de Ambler (116). D'autres classifications existent (117-120), mais ne sont pas d'usage courant.

**Tableau VI : Les bases des principales classifications des  $\beta$ -lactamases selon leurs auteurs**

Année et auteur	Principes de chaque classification des $\beta$ -lactamases
<b>1968, Sawai <i>et al.</i></b>	Selon les substrats utilisés (pénicillines ou céphalosporines)
<b>1973, Richmond et Sykes</b>	Précisent les substrats utilisés et suggèrent une classification en 5 groupes majeurs (Ia-d, II, III, IV, V)
<b>1980, Ambler</b>	Selon le site actif (sérine ou zinc)
<b>1981, Mitsuhashi et Inoue</b>	Ajout de la catégorie $\beta$ -lactamase hydrolysant le céfuroxime ou céfuroximase
<b>1989, Bush</b>	Selon les substrats utilisés et la réaction à l'EDTA ; corrélation des caractéristiques fonctionnelles et moléculaires
<b>1995, Bush, Jacoby, et Medeiros</b>	Complètent la classification de Bush, en utilisant les propriétés biochimiques, la structure moléculaire et la séquence nucléotidique ; suggèrent une classification en 4 groupes basée sur le spectre d'activité et d'autres caractéristiques fonctionnelles.

### **I.2.1 La classification de Ambler**

La première classification basée sur des critères scientifiques a été proposée en 1980 par Ambler (121). Les classes A des sérine-enzymes et B des métallo- $\beta$ -lactamases ont été décrites à cette époque. La classe C correspondant aux céphalosporinases (sérine-enzymes) a été décrite en 1981 par Jaurin et Grunstrom (122). La classe D regroupant les oxacillinases a été dissociée des autres classes de sérine-enzymes au milieu des années 90 (123). Les classes les plus fréquemment rencontrées en pratique quotidienne sont les classes A et C. Cette classification est la plus utilisée en pratique médicale. Elle tient compte des analogies de séquence peptidique, en particulier celles du site actif de l'enzyme.

#### **I.2.1.1 Classe A**

La classe A comprend des enzymes à sérine-active inhibées par l'acide clavulanique et hydrolysant préférentiellement les pénicillines et à un moindre degré les céphalosporines.

**Tableau VII : Les deux classifications des  $\beta$ -lactamases les plus utilisées**

<b>Classification de Ambler [162]</b>	Type d'enzyme et mécanisme d'hydrolyse	Exemples d'enzymes
<u>Classe A</u>	pénicillinases	TEM, SHV, PC1, CTX-M, KPC-1, <b>OXY</b>
<u>Classe B</u>	métallo- $\beta$ -lactamases (Zinc)	GIM ; SIM, AIM, IMP-1, VIM-1
<u>Classe C</u>	céphalosporinases	AmpC, CMY, ACT, MOX, ACC, FOX
<u>Classe D</u>	oxacillinases	OXA
<b>Classification de Bush-Jacoby-Medeiros [163]</b>		
<u>Groupe 1</u>	céphalosporinases hydrolyse des céphalosporines à large spectre	AmpC, CMY, ACT, MIR
<u>Groupe 2</u>		
2a	pénicillinase	PC1 de <i>S. aureus</i>
2b	pénicillinase de haut niveau	TEM-1, SHV-1, TEM-2
2be	BLSE	SHV-2, TEM-10, CTX-M, <b>OXY</b>
2br	résistance aux inhibiteurs	TEM, TRI, TEM-30, TEM-31
2c	hydrolyse de la carbénécilline	PSE
2d	hydrolyse de l'oxacilline	OXA
2e	céphalosporinases inhibées par acide clavulanique	FEC-1
2f	carbapénèmases	KPC-1, SME-1
<u>Groupe 3</u>	métallo- $\beta$ -lactamases hydrolyse de l'imipénème inhibée par l'EDTA, résistance à acide clavulanique	IMP-1, VIM-1

Le support génétique est chromosomique ou plasmidique. Cette classe comprend notamment des  $\beta$ -lactamases de type TEM, SHV, CTX-M, KPC et OXY.

#### I.2.1.2 Classe B

Elle comprend des métallo-enzymes comportant un atome de zinc divalent, inactivant l'ensemble des  $\beta$ -lactamines, y compris les carbapénèmes. Elles restent insensibles à l'action de l'acide clavulanique. Le support génétique est chromosomique ou plasmidique. Leur activité est inhibée *in vitro* par l'EDTA.

#### I.2.1.3 Classe C

La classe C est constituée d'enzymes à sérine-active, les céphalosporinases. Elles inactivent les céphalosporines (C1G  $\pm$  C2G  $\pm$  C3G) et restent insensibles à l'acide clavulanique. Le support génétique est chromosomique ou plasmidique.

#### I.2.1.4 Classe D

Cette classe comprend des enzymes à sérine-active. Elle comprend des enzymes de type OXA de spectre parfois très différent. Elles inactivent les pénicillines et plus particulièrement l'oxacilline et ses dérivés.

### **I.2.2 La Classification de Bush-Jacobi-Medeiros**

Cette classification fonctionnelle proposée en 1989 a été remise à jour en 1995 (124). Elle reflète fidèlement le spectre d'hydrolyse des enzymes, prenant en compte le profil de substrat ainsi que le profil d'inhibition. Elle reste malgré tout peu utilisée en pratique médicale.

Le Groupe 1 correspond à des céphalosporinases chromosomiques peu inhibées par l'acide clavulanique.

Le Groupe 2 se compose de pénicillinases, oxacillinases et carbapénémases chromosomiques ou plasmidiques, en général inhibées par l'acide clavulanique. En 1995, en raison de l'augmentation du nombre de dérivés des  $\beta$ -lactamases TEM et SHV, différents groupes de préfixe « 2b » ont été ajoutés: les groupes 2be ( $\beta$ -lactamases à spectre étendu), 2br ( $\beta$ -lactamases dérivant du groupe 2b avec une affinité réduite pour l'acide clavulanique) et le groupe 2f (carbapénémases inhibées par l'acide clavulanique et possédant un site actif à sérine).

Le Groupe 3 comprend des métallo- $\beta$ -enzymes en général retrouvées chez les *Pseudomonas* sp., *Bacteroides* sp. et *Serratia marcescens*, peu inhibées par l'acide clavulanique mais inhibées *in vitro* par l'EDTA.

Malgré son support chromosomique, la  $\beta$ -lactamase OXY de *K. oxytoca* est classée dans le groupe 2be avec les BLSE, en raison de son profil de sensibilité aux antibiotiques et de l'aspect (de fausse image) de synergie avec l'acide clavulanique.

### **I.3 La $\beta$ -lactamase de *Klebsiella oxytoca***

#### **I.3.1 Dénomination**

*K. oxytoca* exprime constitutivement une  $\beta$ -lactamase chromosomique de type pénicillinase appartenant à la Classe A de Ambler et au Groupe 2be de la classification de Bush, d'abord appelée K1 (125, 126), puis KOXY (127). Elle est maintenant nommée OXY (18).

Les acides aminés conservés de cette  $\beta$ -lactamase sont présentés dans le Tableau VIII (116).

**Tableau VIII : Acides aminés conservés des  $\beta$ -lactamases de classe A selon Ambler**

Position*	<b>48</b> (46)	<b>49</b> (47)	<b>50</b> (48)	<b>51</b> (49)	<b>52</b> (50)	<b>53</b> (51)	<b>72</b> (70)	<b>73</b> (71)	<b>74</b> (72)	<b>75</b> (73)
Acide aminé conservé	G	V	A	L	I	N	S	T	S	K
Position*	<b>107</b> (106)	<b>113</b> (112)	<b>168</b> (167)	<b>212</b> (211)		<b>236</b> (233)	<b>237</b> (234)	<b>238</b> (235)		
Acide aminé conservé	W	K	E	W		K	T	G		

\* Position selon la séquence d'acides aminés (en gras) et selon Ambler (entre parenthèses)

#### **I.3.2 Le gène de la $\beta$ -lactamase, *bla*<sub>OXY</sub>**

##### I.3.2.1 La séquence nucléotidique du gène *bla*<sub>OXY</sub>

Le gène de la  $\beta$ -lactamase de *K. oxytoca* nommé *bla*<sub>OXY</sub> a été cloné et séquencé en 1989 (22). Cette première séquence (illustrée par la Figure 4, page 32) comptait 961 pb. Le promoteur du gène *bla*<sub>OXY</sub> est composé de 2 régions principales, les boîtes -35 (site de reconnaissance de l'ARN-polymérase) et -10 (site de liaison de l'ARN-polymérase, appelé aussi boîte Pribnow) (128). Le site d'initiation de la transcription est une cytosine située 26 nucléotides avant le codon start ATG. Le site de fixation du ribosome (ou RBS pour Ribosome Binding Site) est le site d'initiation de la traduction (129).

**Figure 4 : Séquence nucléotidique du premier gène *bla*<sub>OXY</sub> séquencé, *bla*<sub>OXY-1-7</sub>**

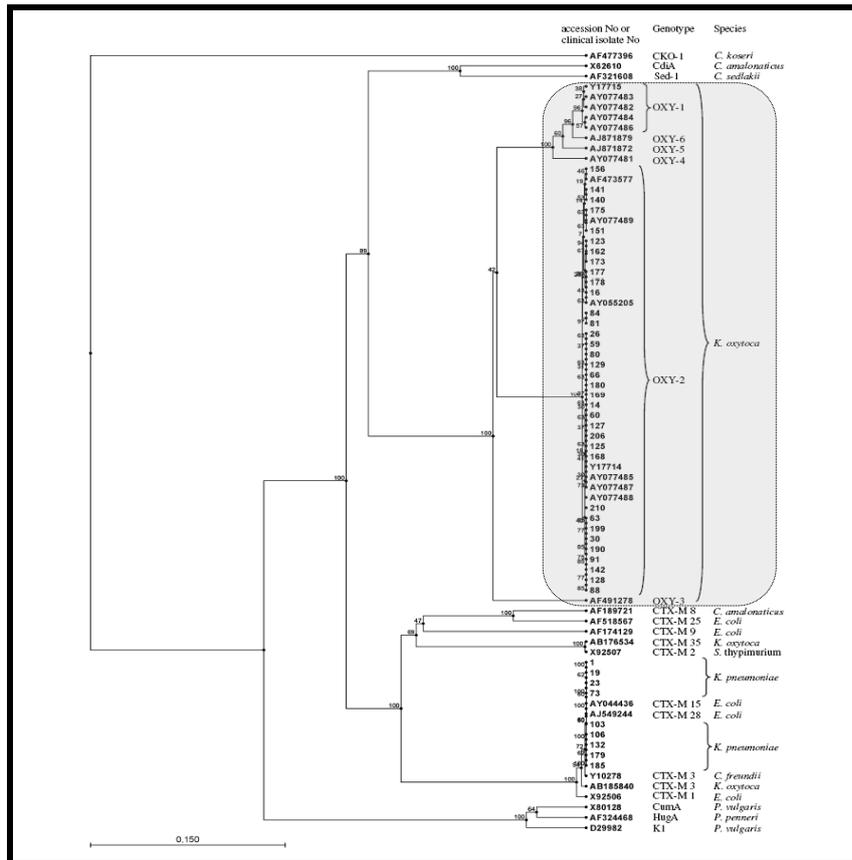
```
___ GAATTCATCATCGACATAGTGCTTGTCAAAAGCGCGGGAGTCGCGGATAATCCGGGCGAGCTC
ATCACTATCAAGGAGTCTGAGATGTTGAAAAGTTTCGTGGCGTAAAACCGCCCTGATGGCCGCCGCC
GCCGTTCCGCTGCTGCTGGCGAGCGGTTTATTATGGGCCAGTGCCGATGCTATCCAGCAAAAAGCTG
GCTGATTTAGAAAAACGTTCCGGCGGTTCGGCTGGGCGTAGCGCTGATTAACACGGCAGATGATTCG
CAAACCCTCTATCGCGGCGATGAACGTTTTGCCATGTGCAGCACCGGTAAAGTGATGGCCGCCGCC
GCGGTGTTAAAACAGAGCGAAAGCAATCCAGAGGTGGTGAATAAAAAGGCTGGAGATTAATAAATC
GGATTTAGTGGTCTGGAGCCCGATCACCGAAAAACATCTGCAAAGCGGAATGACCCTGGCGGAAC
TCAGCGCGGCGGGCGCTGCAGTACAGCGACAATACCGCGATGAATAAGATGATTAGCTACCTTGGC
GGACCGGAAAAGGTGACCGCATTTCGCCAGAGTATCGGGGATGTAACCTTTTCGTCTCGATCGTACG
GAGCCGGCGCTGAACAGCGCGATTCCCGGCGATAAGCGCGATACCACCACCCGTTGGCGATGGC
CGAAAGCCTGCGCAAGCTGACGCTGGGCAATGCGCTGGGCGAACAGCAGCGCGCCAGTTAGTGA
CGTGGCTAAAAGGCAATACCACCGGCGGGCAAAGCATTTCGCGCAGGCCTGCCCGCAAGCTGGGCG
GTCGGGGATAAAAACCGGCGCCGGAGATTACGGCACCACCAACGATATTGCGGTGATCTGGCCGGA
AAATCATGCCCGCTGGTGTGGTGACCTATTTTACCCAGCCGCAGCAGGATGCGAAAAGCCGCAA
AGAGGTGTTAGCCGCGGCGGCAAAAATCGTCACCGAAGGGCTTTAACCCGGGAACAGGCCCGTTC
TGCAACACTCTGCGCTTTGTTTCCCGGTGGTTCGTGCGCTGACCGGGCTACGGGTTCCCGCCGCTCT
GCGGACCGGTAGCCCGGACAGATGCGCAGCATG___
```

Le codon initiateur ATG (souligné en gras) est précédé par un promoteur dont les deux régions d'importance sont les boîtes -35 (TTGTCA, soulignée par un double trait) et -10 (GATAAT, soulignée par un double trait en pointillé). Le site d'initiation de la transcription est une cytosine (surlignée en gris). Le site de fixation du ribosome (AGGAGT) est souligné d'un trait simple.

### I.3.2.2 Homologie avec les gènes d'autres $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases OXY sont phylogénétiquement proches des  $\beta$ -lactamases chromosomiques de *Kluyvera ascorbata* (KLUA-1) et *K. cryocescens* (KLUC-1) (16) (Figure 5, page 33). MEN-1, première CTX-M plasmidique décrite, présente 72 % de similitude avec la  $\beta$ -lactamase de *K. oxytoca* (130). La CTX-M plasmidique Toho-1, autre CTX-M, et OXY présentent une homologie de 73 % (18). Cette proximité phylogénétique est liée aux progéniteurs des CTX-M qui dériveraient des  $\beta$ -lactamases chromosomiques de *K. ascorbata* et *K. cryocescens* (131, 132).

L'homologie entre OXY et les  $\beta$ -lactamases chromosomiques SHV-1 et LEN de *K. pneumoniae* est d'environ 45 % alors que les 2 espèces sont classées dans le même genre bactérien (22). L'homologie entre OXY et les  $\beta$ -lactamases chromosomiques ORN-1 et PLA-1 des *Raoultella* sp. et les  $\beta$ -lactamases plasmidiques de type SHV, TEM et CARB est faible (< 40 %) (18).

**Figure 5 : Arbre phylogénique des *Enterobacteriaceae* exprimant les gènes  $bla_{CTX-M}$  et  $bla_{OXY}$** 

Les différentes enzymes OXY de *K. oxytoca* sont entourées par un trait pointillé.

### I.3.3 La séquence peptidique OXY

La séquence peptidique OXY comporte 288 (OXY-3), 290 (OXY-2, OXY-4 et OXY-5) ou 291 aminoacides (OXY-1 et OXY-6) soulignant une certaine diversité génétique au sein de l'espèce (Figure 6, page 35) (20). Les comparaisons de séquences peptidiques ont montré l'existence de motifs (séquences courtes en acides aminés) souvent conservés ou partiellement dégénérés, propres à chaque classe de  $\beta$ -lactamases (A, B, C, D). Ces motifs sont présents dans le site actif et interviennent dans l'activité catalytique de manière directe ou indirecte. Les boîtes I à VII (133) et les boucles SDN (134) et Omega (135) correspondent à des acides aminés très conservés chez les  $\beta$ -lactamases de classe A. Ils sont identiques pour tous les groupes OXY.

Le pouvoir catalytique de l'enzyme est lié à la présence d'acides aminés conservés. Certains acides aminés, situés à proximité de l'une des boîtes décrites par Joris *et al.* (133) ou de la boucle SDN (Sérine-Acide Aspartique-Asparagine) (134) participent à l'activité des  $\beta$ -lactamases de classe A mais n'ont pas été étudiés spécifiquement pour la  $\beta$ -lactamase OXY.

Selon la numérotation de Ambler (116), il s'agit des Arginine-43, Acide Glutamique-104, Sérine-130, Asparagine-164, Acide Glutamique-166, Acide Aspartique-179, Glutamine-205, Lysine-234, Alanine-237, Glycine-238, Acide Glutamique-240 et Glycine-242 (22, 116, 136). La Thréonine-138 semble impliquée dans l'hydrolyse du céfotaxime (137). La séquence consensus des  $\beta$ -lactamases de classe A, -Phe-AA-AA-AA-Ser-AA-AA-Lys- (138), située entre les positions 66 et 73 (numérotation de Ambler) chez *K. oxytoca*, a été comparée à celles d'autres bactéries Gram négatif (Tableau IX). Elle constitue le principal site actif d'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines, notamment par l'intermédiaire de la Sérine 70 (133).

**Tableau IX : Séquence peptidique du site actif de OXY comparée aux enzymes d'autres bactéries**

	PHE—ALA—MET—CYS— <b>SER</b> —THR—GLY—LYS							
Position des acides aminés*	68 (66)	69 (67)	70 (68)	71 (69)	72 (70)	73 (71)	74 (72)	75 (73)
<i>K. oxytoca</i> (18)	PHE	ALA	MET	CYS	<b>SER</b>	THR	SER	LYS
<i>K. pneumoniae</i> (139)	PHE	PRO	MET	VAL	<b>SER</b>	THR	PHE	LYS
<i>E. coli</i> (140)	PHE	GLU	LEU	GLY	<b>SER</b>	VAL	SER	LYS
<i>E. cloacae</i> (141)	PHE	GLU	LEU	GLY	<b>SER</b>	ILE	SER	LYS
<i>P. aeruginosa</i> (138)	PHE	GLU	ILE	GLY	<b>SER</b>	VAL	SER	LYS

PHE : phénylalanine, ALA : alanine, MET : méthionine, CYS : cystéine, SER : sérine, THR : thréonine, GLY : glycine, LYS: lysine, PRO : proline, VAL : valine, GLU : acide glutamique, LEU : leucine, ILE : isoleucine

\*Position selon la séquence d'acides aminés en gras et selon Ambler entre parenthèses

**Figure 6 : Séquences peptidiques des enzymes OXY-1-1 à OXY-6-1**

		Boîte I	
<b>OXY-1-1</b>	MLKSSWRKTALMAAAAVPLLLASGSLWASADA IQQKLADLEKRSGGRL	<u>GVALINTADDSQ</u>	
<b>OXY-2-1</b>	MLKSSWRKSALMAAAAVPLLLASGSLWASADA IQQKLADLEKRSGGRL	<u>GVALINTADDSQ</u>	
<b>OXY-2-7</b>	MLKSSWRKSALMAAA--VPLLLASGSLWASADTLQQKLADLEKRSGGRL	<u>GVALINTADDSQ</u>	
<b>OXY-3-1</b>	MLKSSWRKTALMAAA--VPLLLASGSLWASADA IQQKLADLEKHS GGRL	<u>GVALINTADDSQ</u>	
<b>OXY-4-1</b>	M IKTSWRKSAL IAAA—LPLLLCSSSLWANA--- IQQKLADLEKSTGGRL	<u>GVALINTT DNSQ</u>	
<b>OXY-5-1</b>	M IKSSWRK IAMLAAA—VPLLLASGALWASTDAIHQKLT DLEKRSGGRL	<u>GVALINTADNSQ</u>	
<b>OXY-6-1</b>	M IKSSWRK IAMLAAA—VPLLLASGALWASTDAIHQKLT DLEKRSGGRL	<u>GVALINTADNSQ</u>	
	Boîte II	Boîte III	Boîte IV
<b>OXY-1-1</b>	TLYRGDERFAMCSTGK	VMAAAAVLKQSESNPEVVNKRLEIKKSDLVV	<u>WSPITEKHLQSGM</u>
<b>OXY-2-1</b>	TLYRGDERFAMCSTGK	VMAAAAVLKQSESHPDVVNKRLEIKKSDLVV	<u>WSPITEKHLQSGM</u>
<b>OXY-2-7</b>	TLYRGDERFAMCSTGK	VMAAAAVLKQSESHPDVVNKRLEIKKSDLVV	<u>WSPITEKHLQSGM</u>
<b>OXY-3-1</b>	TLYRGDERFAMCSTGK	VMAAAAVLKQSESNPEVVNKRLEIKKADL	<u>VVWSPITEKHLQSGM</u>
<b>OXY-4-1</b>	I L YRGDERFAMCSTGK	VMAAAAVLKQSESNKDVVNKRLEIKASDL	<u>VVWSPVTEKHLQSGM</u>
<b>OXY-5-1</b>	I L YRGDERFAMCSTSK	VMAAAAVLKQSESNKEVVNKRLEINAADL	<u>VVWSPITEKHLQSGM</u>
<b>OXY-6-1</b>	I L YRGDERFAMCSTSK	VMAAAAVLKQSESNKEVVNKRLEINAADL	<u>VVWSPITEKHLQSGM</u>
	Boucle SDN	Boîte V	Boucle Omega
<b>OXY-1-1</b>	TLAELSAALQYSDN	TAMNKMISYLG GPEKVTAFASIGDVTFR	<u>LDRT EPALNSAIPGDK</u>
<b>OXY-2-1</b>	TLAELSAALQYSDN	TAMNKMISYLG GPEKVTAFASIGDVTFR	<u>LDRT EPALNSAIPGDK</u>
<b>OXY-2-7</b>	TLAELSAALQYSDN	TAMNK IIGYLG GPEKVTAFASIGDVTFR	<u>LDRM EPALNSAIPGDK</u>
<b>OXY-3-1</b>	TLAELSAALQYSDN	TAMNK IIGYLG GPEKVTAFASIGDVTFR	<u>LDRM EPALNSAIPGDK</u>
<b>OXY-4-1</b>	TLAELSAALQYSDN	TAMNKMIGYLG GPEKVTAFARSIGDVTFR	<u>LDRT EPALNTAIPGDE</u>
<b>OXY-5-1</b>	TLAELSAATLQYSDN	TAMNL I IGYLG GPEKVTAFASIGDATFR	<u>LDRT EPTLNTAIPGDE</u>
<b>OXY-6-1</b>	TLAELSAATLQYSDN	TAMNL I IGYLG GPEKVTAFARSIGDATFR	<u>LDRT EPTLNTAIPGDE</u>
	Boîte VI	Boîte VII	
<b>OXY-1-1</b>	RDTTTPLAMAESLRKLT	LGNALGEQQAQLVT	<u>WLKGN TTGGQSIRAGLPASWAVGDKTGA</u>
<b>OXY-2-1</b>	RDTTTPLAMAESLRKLT	LGNALGEQQAQLVT	<u>WLKGN TTGGQSIRAGLPASWAVGDKTGA</u>
<b>OXY-2-7</b>	RDTTTPLAMAESLRKLT	LGNALGEQQAQLVT	<u>WLKGN TTGGQSIRAGLPASWAVGDKTGG</u>
<b>OXY-3-1</b>	RDTTTPLAMAESLRKLT	LGNALGEQQAQLVT	<u>WLKGN TTGGQSIRAGLPASWAVGDKTGA</u>
<b>OXY-4-1</b>	RDTTTPLAMAESLHKL	LGNALGEQQAQLVT	<u>WLKGN TTGGQSIRAGLPASWVVGDKTGA</u>
<b>OXY-5-1</b>	RDTSTPLAMAESLRKLT	LGDALGEQQAQLVT	<u>WLKGN TTGGQSIRAGLPESWVVGDKTGA</u>
<b>OXY-6-1</b>	RDTSTPLAMAESLRKLT	LGDALGEQQAQLVT	<u>WLKGN TTGGQSIRAGLPESWVVGDKTGA</u>
<b>OXY-1-1</b>	GDYGTNDIAVIWPENHAPL	VLVTYFTQPQQDAKSRKEVLAAA	<u>KIVTEGL</u>
<b>OXY-2-1</b>	GDYGTNDIAVIWPENHAPL	VLVTYFTQPQQDAKSRKEVLAAA	<u>KIVTEGL</u>
<b>OXY-2-7</b>	GDYGTNDIAVIWPENHAPL	VLVTYFTQPQQDAKSRKEVLAAA	<u>KIVTEGL</u>
<b>OXY-3-1</b>	GDYGTNDIAVIWPENHAPL	VLVTYFTQPQQDAKSRKEVLAAA	<u>KIVTEGL</u>
<b>OXY-4-1</b>	GDYGTNDIAVIWPENHAPL	VLVTYFTQPQLDAKSRKDV LAAA	<u>KIVTEGL</u>
<b>OXY-5-1</b>	GDYGTNDIAVIWPEDHAPL	VLVTYFTQPQQDAKNRKEVLAAA	<u>KIVTEGL</u>
<b>OXY-6-1</b>	GDYGTNDIAVIWPEDHAPL	VLVTYFTQPQQDAKNRKEVLAAA	<u>KIVTEGL</u>

Les boîtes I à VII sont soulignées par un trait fin, les boucles SDN et Oméga par un trait épais et la séquence du site actif (FAMCST(S/G)K) est surlignée en gris.

### **I.3.4 Les groupes et sous-groupes de la $\beta$ -lactamase OXY**

#### I.3.4.1 Les 6 groupes (de OXY-1 à OXY-6)

La diversité des séquences nucléotidiques des souches de *K. oxytoca* a permis de décrire différents groupes de gènes codant pour les enzymes OXY. En 1996, Fournier *et al.* ont distingué 2 groupes de gènes *bla*<sub>OXY-1</sub> et *bla*<sub>OXY-2</sub> avec une similarité nucléotidique de 87 % (18). En 2003, Granier *et al.* ont ajouté les groupes *bla*<sub>OXY-3</sub> et *bla*<sub>OXY-4</sub> qui présentaient des similarités nucléotidiques respectivement de 85 % et 84 % avec *bla*<sub>OXY-1</sub> et de 95 % et 86 % avec *bla*<sub>OXY-2</sub> (142). En 2005, 2 nouveaux groupes *bla*<sub>OXY</sub> ont été décrits par Fèvre *et al.*, *bla*<sub>OXY-5</sub> et *bla*<sub>OXY-6</sub>, sur la base de leur séquence nucléotidique. Fèvre *et al.* ont également confirmé l'existence de 6 principaux groupes génétiques chez *K. oxytoca* en comparant les séquences du gène *bla*<sub>OXY</sub> de la  $\beta$ -lactamase chromosomique et de plusieurs gènes de ménage (gènes codant pour l'ARNr 16S et *rpoB*, *gyrA*, *gapDH*) (20).

#### I.3.4.2 Les sous-groupes (de OXY-1-1 à OXY-6-4)

##### **I.3.4.2.1 Selon les points isoélectriques**

La technique de focalisation isoélectrique a été la 1<sup>ère</sup> technique utilisée par Fournier *et al.* pour différencier les sous-groupes génétiques du gène *bla*<sub>OXY</sub>. (136, 143). Dans le groupe OXY-1, les  $\beta$ -lactamases de pI 7.5, pI 7.1, pI 8.2 et pI 8.8 ont été nommées respectivement OXY-1-1, OXY-1-2, OXY-1-3 et OXY-1-4. Dans le groupe OXY-2, les  $\beta$ -lactamases de pI 5.2, pI 5.7, pI 6.4 et pI 6.8 ont été nommées respectivement OXY-2-1, OXY-2-2, OXY-2-3 et OXY-2-4.

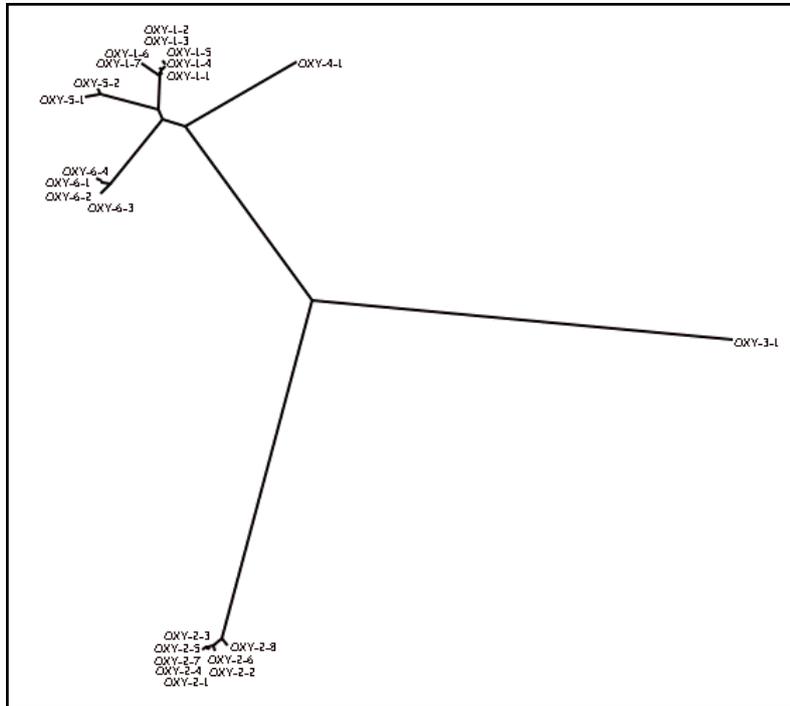
##### **I.3.4.2.2 Selon les séquences nucléotidiques et peptidiques du gène *bla*<sub>OXY</sub>**

En 1997, quatre sous-groupes ont été individualisés dans le groupe OXY-1 (OXY-1-1 à OXY-1-4) et quatre dans le groupe OXY-2 (OXY-2-1 à OXY-2-4), par analyse phylogénétique à partir de souches cliniques isolées en France par Fournier et Roy (136). Puis, en 2005, vingt-trois sous-groupes ont été décrits, à partir de souches de référence et de souches cliniques isolées dans une dizaine de pays (France, Italie, Espagne, Suisse)(20). Fèvre *et al.* les ont classés selon les principes de la nomenclature internationale (Figure 7, page 37) (144). Ainsi, chaque substitution de séquence peptidique a défini un nouveau sous-groupe OXY par rapport au sous-groupe de référence (20). Le tableau de ces variants de la  $\beta$ -lactamase OXY est consultable en ligne (145).

Les sous-groupes définis par Fournier et ceux définis par Fèvre ne sont pas comparables. Seul le sous-groupe 1-1 reste inchangé. Actuellement, la classification de référence est celle de

Fèvre *et al.* Ainsi, les nouveaux variants sont intégrés à cette classification, comme OXY-2-9, décrit par Kristo *et al.* en 2009 (146).

**Figure 7 : Arbre phylogénétique des OXY**



Cet arbre phylogénétique a été réalisé par Fèvre *et al.* Il illustre la proximité génétique des groupes OXY-1, OXY-4, OXY-5 et OXY-6, par rapport aux groupes OXY-2 et OXY-3.

#### I.3.4.3 Epidémiologie des groupes et sous-groupes OXY

En 1996, la classification de Fournier *et al.* ne comportait que les groupes OXY-1 et OXY-2 dont les sous-groupes ne correspondaient pas exactement aux sous-groupes actuels. Fournier *et al.* ont étudié 26 souches cliniques sensibles et 45 souches résistantes à l'atréonam (18). La répartition des groupes et sous-groupes était identique pour les 2 populations (sensibles et résistantes). Le groupe le plus fréquemment isolé était le groupe  $bla_{\text{OXY-2}}$  (53 %), fréquence confirmée par d'autres études (129, 136). Le sous-groupe le plus fréquemment retrouvé était le sous-groupe  $bla_{\text{OXY-1-1}}$  (sous-groupe OXY-1-1 actuel) (42 %). Le sous-groupe le plus représenté dans le groupe 2 était le sous-groupe 2-1 (sous-groupe 2-7 de Fèvre *et al.*) (31 %). Depuis la description de la classification en 6 groupes  $bla_{\text{OXY}}$  par Fèvre *et al.* en 2005, aucune enquête épidémiologique n'a été réalisée.

### **I.3.5 Localisation plasmidique du gène codant pour la $\beta$ -lactamase OXY**

Récemment, en 2009, Gonzales-Lopez *et al.* ont mis en évidence un plasmide codant pour le gène *bla*<sub>OXY</sub> chez deux espèces différentes d'entérobactéries possédant déjà une  $\beta$ -lactamase naturelle chromosomique, *K. oxytoca* et *K. pneumoniae* (147). Plusieurs  $\beta$ -lactamases plasmidiques (SHV, CTX-M, AmpC, etc...) dérivent de  $\beta$ -lactamases chromosomiques. La localisation plasmidique facilite la diffusion de ces marqueurs de résistance aux antibiotiques. Le support plasmidique de la  $\beta$ -lactamase OXY risque de faciliter sa transmission horizontale à d'autres espèces bactériennes compliquant la détection (importance des techniques génotypiques) et l'épidémiologie des  $\beta$ -lactamases OXY.

## **II Résistance aux $\beta$ -lactamines**

### **II.1 Résistance naturelle aux $\beta$ -lactamines**

#### **II.1.1 Expression à bas niveau de la $\beta$ -lactamase OXY**

Les souches sauvages de *K. oxytoca* produisent à bas niveau l'enzyme chromosomique OXY (148). Cet enzyme confère une résistance aux aminopénicillines (amoxicilline) et aux carboxypénicillines (ticarcilline) (149). L'activité de ces antibiotiques est restaurée en présence d'inhibiteur de  $\beta$ -lactamase tel que l'acide clavulanique (sensibilité pour les associations amoxicilline-acide clavulanique et ticarcilline-acide clavulanique). Chez ces souches, les céphalosporines, les monobactams et les carbapénèmes demeurent sensibles (Figure 8, page 41).

#### **II.1.2 Les mutations chromosomiques du gène *bla*<sub>OXY</sub>**

Différentes mutations ont été décrites, d'une part dans la région promotrice (129, 148) et, d'autre part, dans la région codante du gène *bla*<sub>OXY</sub> (150, 151).

##### II.1.2.1 Les mutations dans la région promotrice du gène *bla*<sub>OXY</sub>

Bien que moins souvent rencontrée en pathologie infectieuse humaine que *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* fait l'objet d'un intérêt particulier depuis 1980 en raison de son phénotype de résistance particulier aux  $\beta$ -lactamines (152, 153). Lors des premiers essais thérapeutiques de l'aztréonam, certaines souches de *K. oxytoca* se caractérisaient par une diminution de sensibilité à cette molécule (154). Dix à 20 % des souches de *K. oxytoca* développent un haut niveau de résistance à l'aztréonam (148, 155). En 1994, Fournier *et al.* ont démontré que la

résistance à l'aztréonam était liée à des mutations dans la région promotrice du gène *bla<sub>OXY</sub>* (129, 148). Ces mutations augmentent le niveau d'expression de OXY. Le phénotype de résistance est dénommé « hyperOXY ». En effet, 95 % des souches résistantes présentent une mutation dans la boîte -10, et 5 % dans la boîte -35. La mutation la plus fréquente (67 %) est la substitution G→A de la cinquième base de la boîte -10. Dans 27 % des cas, la substitution G→T de la première base de la boîte -10 est détectée, et la substitution T→A de la quatrième base de la boîte -35 est moins fréquente (Tableau X). Enfin, les doubles mutations sont encore plus rarement décrites. Des mutations en dehors de ces régions existent, mais ne semblent pas intervenir dans le phénomène d'hyperproduction (156). La force du promoteur est augmentée par les mutations décrites dans les boîtes -35 et -10 (Tableau X). Les mutations simples multiplient la force du promoteur d'un facteur 4 à 20 et les doubles mutations d'un facteur 15 à 60 (156). L'augmentation de la force du promoteur conduit à une hyperproduction de la β-lactamase chromosomique dont le niveau est variable selon la mutation (augmentation d'un facteur 70 à 220 environ) (128, 157). La mutation G→T de la première base de la boîte -10 entraîne une production plus importante d'enzyme (augmentation d'un facteur 200) que les deux autres mutations. La mutation G→A de la 5<sup>ème</sup> base de la boîte -10 du promoteur augmente d'environ 13 fois le niveau d'expression de la β-lactamase OXY (128, 129). La force du promoteur est également dépendante de la distance entre les boîtes -35 et -10. Une distance de 17 pb est classiquement retrouvée chez *K. oxytoca* (156). Une souche recombinante d'*E. coli* exprimant le gène *bla<sub>OXY</sub>* et dont la distance entre les boîtes -35 et -10 était de 16 pb a montré une diminution de 9 fois de la force de son promoteur par rapport à la même souche recombinante pour laquelle la distance était de 17 pb (156).

**Tableau X : Force du promoteur du gène *bla<sub>OXY</sub>* selon les séquences nucléotidiques des boîtes -10 et -35.**

Région	Promoteur sauvage	Promoteur muté	Fréquence	Force du promoteur
-35	TTGTCA	TTGACA	< 5 %	X 4 à 9
-10	GATAGT	TATAGT	27 %	{ X 20 ( <i>bla<sub>OXY-1</sub></i> ) X 5 ( <i>bla<sub>OXY-2</sub></i> )
		GATAAT	67 %	

Cette augmentation du niveau d'expression de la β-lactamase chromosomique se traduit *in vitro* par :

- une résistance de haut niveau aux pénicillines, aux céphalosporines de première et deuxième génération,

- une résistance de niveau variable à certaines céphalosporines à large spectre (ceftriaxone et céfotaxime) et à l'aztréonam. Une image de synergie peut être détectée entre les céphalosporines de troisième génération ou l'aztréonam et l'acide clavulanique. Il s'agit d'une fausse synergie et, *in vivo*, les souches hyperOXY doivent être considérées comme résistantes à toutes les associations  $\beta$ -lactamines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (158).

Jusqu'à récemment, ces souches demeuraient sensibles à la ceftazidime. Or en 2008, des souches résistantes à la ceftazidime par production d'un variant OXY-2 ont été décrites par Rodriguez-Martinez *et al.* (159). Cette résistance a également été rapportée en 2009, liée à l'hyperproduction de l'enzyme chromosomique (157, 159). La sensibilité des souches hyperproductrices de *K. oxytoca* vis-à-vis d'une nouvelle céphalosporine à large spectre, le ceftobiprole (BAL 9141), a aussi été étudiée (157). Ces souches étaient 350 fois plus résistantes que des souches sauvages. Le risque de sélectionner des souches hyperproductrices présentes dans la flore digestive des sujets sains a été souligné en cas d'utilisation de cet antibiotique.

Les arguments diagnostiques en faveur d'une souche hyperOXY (Figure 9, page 41) sont :

- une CMI très élevée au céfuroxime (158)  $\pm$  à la ceftriaxone,  $\pm$  au céfépime (augmentation d'un facteur 230) (136, 157, 160).
- une CMI modérément élevée à la ceftazidime (augmentation d'un facteur 15) (157).
- une CMI basse aux céphamycines (notamment à la céfoxitine) (158).
- une fausse image de synergie dite « en entonnoir » entre l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamase (acide clavulanique) et le céfotaxime  $\pm$  la ceftriaxone  $\pm$  le céfépime (157).
- une absence de résistance associée aux autres familles d'antibiotiques (aminosides, cotrimoxazole et fluoroquinolones notamment) (161)

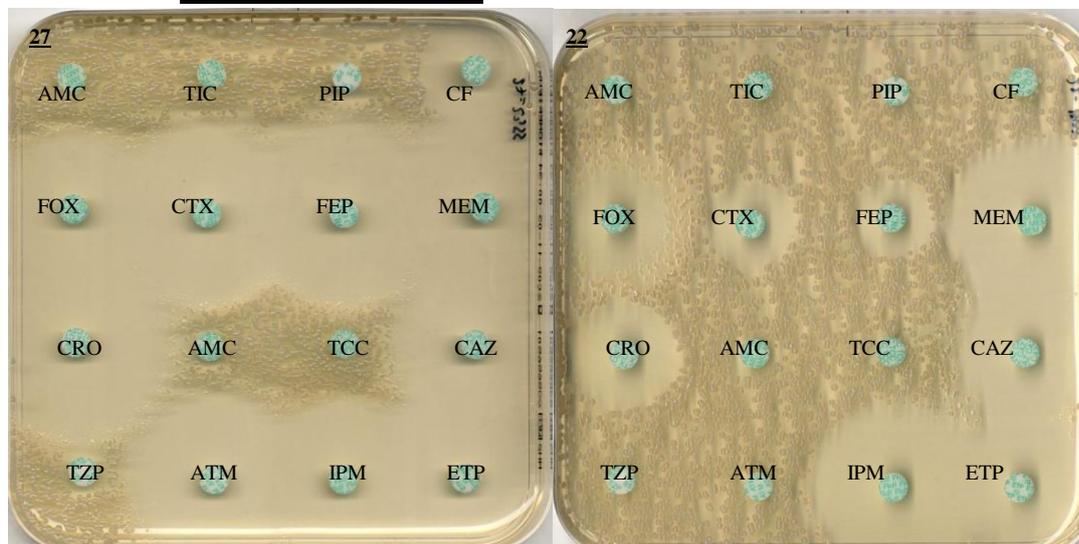
**Figure 8 : Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé d'une souche sauvage de *K. oxytoca***



AMX (Amoxicilline), TIC (Ticarcilline), PIP (Pipéracilline), CF (Céfalotine), FOX (Céfoxitine), FEP (Céfépime), CRO (Ceftriaxone), MEM (Méropénème), CTX (Ceftriaxone), AMC (Amoxicilline-Acide clavulanique), TCC (Ticarcilline-Acide Clavulanique), CAZ (Ceftazidime), TPZ (Tazocilline-Sulbactam), ATM (Aztréonam), IPM (Imipénème), ETP (Ertapénème)

Cet antibiogramme a été réalisé par diffusion en milieu gélosé avec la souche de référence ATCC 13182 utilisée dans notre étude.

**Figure 9 : Antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé de souches de *K. oxytoca* de phénotype hyperOXY**



AMX (Amoxicilline), TIC (Ticarcilline), PIP (Pipéracilline), CF (Céfalotine), FOX (Céfoxitine), FEP (Céfépime), CRO (Ceftriaxone), MEM (Méropénème), CTX (Ceftriaxone), AMC (Amoxicilline-Acide clavulanique), TCC (Ticarcilline-Acide Clavulanique), CAZ (Ceftazidime), TPZ (Tazocilline-Sulbactam), ATM (Aztréonam), IPM (Imipénème), ETP (Ertapénème)

Les antibiogrammes de la Figure 9 ont été réalisés par diffusion en milieu gélosé avec des souches de notre étude (souche 27 à gauche et souche 22 à droite). Ils illustrent la variété d'aspects des antibiogrammes pour des souches de phénotype « hyperOXY ».

II.1.2.2 Les mutations dans les régions codantes du gène *bla<sub>OXY</sub>*

Les mutations chromosomiques dans les régions codantes du gène *bla<sub>OXY</sub>* modifient le spectre d'activité de l'enzyme (150, 151). Selon certains auteurs, un ou deux acides aminés mutés au niveau de positions fonctionnelles importantes pour l'activité enzymatique suffisent à modifier le spectre d'hydrolyse (20, 136). Pour Fèvre *et al.*, les six groupes OXY présentent un spectre d'hydrolyse presque similaire vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines (20). A l'inverse, Fournier *et al.* ont montré l'influence de certaines mutations sur les spectres d'hydrolyse des  $\beta$ -lactamases OXY (109, 128, 129, 136). Ainsi, la substitution Ala237Gly augmente de dix fois le niveau d'expression de la  $\beta$ -lactamase (hydrolyse de plusieurs  $\beta$ -lactamines dont l'aztréonam) (18). Cette substitution se retrouve surtout chez *bla<sub>OXY-2</sub>* (136). Dans le groupe OXY-1, le sous-groupe OXY-1-1 (Ala237) est moins résistant aux céphalosporines et à l'aztréonam que le sous-groupe OXY-1-2 (Ala237Gly) (136). Le résidu 237 appartient à une poche oxyanionique qui sert à stabiliser un intermédiaire réactionnel (oxyanion). La substitution Ala237Gly modifie probablement la conformation de la poche et augmente ainsi l'affinité de l'enzyme vis-à-vis des céphalosporines et de l'aztréonam (136). De plus, une modification de l'activité vis-à-vis de l'acide clavulanique en fonction du résidu 237 n'est pas exclue (162). La position 69 qui forme l'arrière de la poche oxyanionique semble également importante dans l'activité vis-à-vis de l'acide clavulanique (136). D'autre part, une substitution Ser244Arg, déjà décrite chez la  $\beta$ -lactamase TEM (162), augmente la résistance à l'acide clavulanique dans le sous-groupe OXY-1-2 par rapport au sous-groupe OXY-1-1 (136). Enfin, l'activité catalytique est différente selon que la position 168 comporte une Thréonine (OXY-2) ou une Alanine (OXY-1) (136). Fournier *et al.* ont émis l'hypothèse que l'Ala168 entraîne une altération de la conformation de la boucle et une baisse d'affinité à l'égard de certains substrats (ampicilline, céfotaxime et ceftazidime) (136).

D'autres auteurs ont également montré l'influence de certaines mutations peptidiques sur le spectre d'hydrolyse de la  $\beta$ -lactamase. Mammeri *et al.* ont étudié une souche clinique de *K. oxytoca* résistante à la ceftazidime par hyperproduction de la pénicillinase naturelle, isolée chez un patient traité plusieurs semaines par de la ceftazidime. Cette souche présentait une substitution Pro167Ser élargissant le spectre d'hydrolyse à la ceftazidime (150). Une substitution Ser130Gly dans un des sites actifs de l'enzyme confère une résistance à l'association amoxicilline-acide clavulanique (151). Les résidus 166 à 170 constituent une partie importante du site de liaison au substrat au sein de la boucle Omega (135).

## II.2 Résistance acquise aux $\beta$ -lactamines

Chez *K. oxytoca*, comme chez les autres entérobactéries, la résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines est liée principalement à l'acquisition de nouveaux supports génétiques de type plasmidique par transfert horizontal. Une grande variété de  $\beta$ -lactamases plasmidiques sont décrites chez *K. oxytoca* : BLSE, TEM résistante aux inhibiteurs (TRI) (TEM-59 (163), etc...), céphalosporinases (CMY-5 (164), FOX-3 (165), etc...), carbapénémases de classe A (KPC-2, etc...).

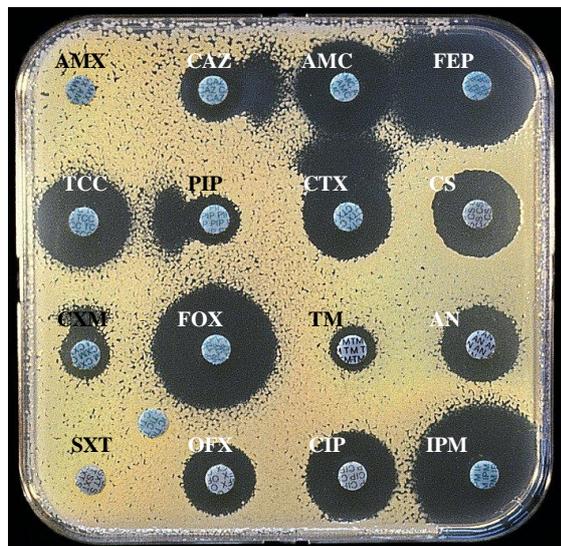
### II.2.1 Classe A : $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Le nombre de BLSE répertoriées chez *K. oxytoca* augmente constamment. Décrites initialement par Wu *et al.* en 1992 (166), les BLSE répertoriées sont de type SHV-5 (167), SHV-12 (168), SHV-46, TEM-3 (143), TEM-10 (169), TEM-12 (170), TEM-24 (143), TEM-110, TEM-118, TEM-120, CTX-M9 (171), etc...

Le diagnostic différentiel entre les souches hyperOXY et les souches exprimant une BLSE est complexe, notamment la distinction entre vraie et fausse image de synergie. Pour un biologiste averti, les deux profils de résistance diffèrent *in vitro*. Les arguments en faveur d'une BLSE sont :

- une CMI élevée pour la ceftazidime et/ou la ceftriaxone et/ou le céfotaxime (160).
- une synergie entre inhibiteur de  $\beta$ -lactamase et céphalosporine de troisième génération (161) se traduisant par une image dite en « bouchon de champagne » et/ou une réduction de la CMI avec l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamase
- une CMI basse pour le céfépime et les céphamycines (notamment la céfoxitine) (161).
- une résistance associée aux aminosides type AAC 6' (6' aminoside-acétyl-transférase), correspondant à une résistance à la tobramycine et/ou à l'amikacine, et à une sensibilité à la gentamycine (161). La Figure 10 page 44 illustre le phénotype BLSE chez *K. oxytoca*, le type de BLSE n'ayant pas été précisé par les auteurs (172).

**Figure 10 : Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé d'une souche de *K. oxytoca* exprimant une BLSE**



AMX (Amoxicilline), CAZ (Ceftazidime), AMC (Amoxicilline-Acide clavulanique), FEP (Céfépime), TCC (Ticarilline-Acide Clavulanique), PIP (Pipéracilline), CTX (Ceftriaxone), CS (Colistine), CXM (Céfuroxime), FOX (Céfoxitine), TM (Tobramycine), AN (Amikacine), SXT (Cotrimoxazole), OFX (Ofloxacine), CIP (Ciprofloxacine), IPM (Imipénème)

### II.2.2 Classe B : carbapénémases

Les métallo-enzymes constituent une famille qui ne cesse de grandir avec de nouvelles enzymes (IMP, VIM, GIM, AIM, SIM, etc...). Les carbapénémases de type VIM, les plus fréquentes, sont principalement décrites chez des bactéries non fermentantes comme *Pseudomonas aeruginosa* (173-175). Les gènes *bla*<sub>VIM</sub> sont généralement portés au sein d'intégrons de classe 1 par des cassettes mobiles, les rendant facilement transférables d'une souche à l'autre (176). Ce mécanisme de résistance a largement diffusé aux entérobactéries ces dernières années. En 2005, une souche de *K. oxytoca* portant le gène *bla*<sub>VIM-2</sub> sur un plasmide a été décrite au Portugal (177).

### II.2.3 Classe C : céphalosporinases

La découverte de nouvelles  $\beta$ -lactamases plasmidiques par mobilisation de gènes chromosomiques issus des entérobactéries s'est avérée une étape importante dans l'évolution de la résistance acquise aux antibiotiques, notamment aux céphalosporines à large spectre (178). Les 1<sup>ères</sup> souches cliniques de *Klebsiella* sp. exprimant un phénotype de résistance de type céphalosporinase sont apparues en 1988 (178, 179). Des céphalosporinases AmpC plasmidiques de type DHA-1, CMY-2, CMY-5 ont ainsi été décrites chez des souches

cliniques de *K. oxytoca* (180-182). La mobilisation et le transfert génétique font généralement intervenir des séquences d'insertion pour lesquelles certains progéniteurs ont été identifiés : *Citrobacter freundii* pour le groupe CMY, *Morganella morganii* pour le groupe DHA, etc...(178). Le phénotype de résistance observé est comparable à celui d'une céphalosporinase chromosomique hyperproduite, c'est-à-dire une résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (céfotaxime, ceftriaxone) et aux associations  $\beta$ -lactamines-inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase.

### **III Résistance aux autres familles d'antibiotiques**

La résistance aux autres familles d'antibiotiques est peu étudiée chez *K. oxytoca*.

#### **III.1 Résistance aux quinolones**

En 2000, la résistance à la ciprofloxacine chez *K. oxytoca* représentait 3,4 % des isolats (183). Aujourd'hui, les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones impliqués sont chromosomiques et/ou plasmidiques. Chez *K. oxytoca*, la résistance chromosomique est liée soit à des mutations du site actif de la sous-unité GyrA de l'ADN-gyrase (Thr83Ile) ou de la sous-unité ParC (Ser80Ile) de la topoisomérase (184), soit à des mécanismes d'efflux dont le système AcrAB-TolC, impliqué dans les mécanismes actifs d'efflux chez plusieurs genres d'entérobactéries (185, 186). La protéine de membrane externe TolC forme un canal permettant une sortie de l'antibiotique par la pompe d'efflux AcrAB.

La résistance plasmidique aux quinolones a été décrite pour la première fois en 1998 (187). En 2005, une souche de *K. oxytoca* productrice de BLSE, résistante aux quinolones, et portant le gène plasmidique *qnrA*, a été décrite au Japon (188). En 2006, l'ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques) a rapporté une souche de *K. oxytoca* productrice d'une BLSE (SHV-12) et du gène *qnrB4* (168). En 2009, au Japon, une souche clinique de *K. oxytoca* de phénotype BLSE était résistante aux quinolones et exprimait un variant *qnrB6* (189).

#### **III.2 Autres antibiotiques**

Les souches de *K. oxytoca* sont naturellement sensibles à la colistine, aux quinolones, aux aminosides, aux furanes et à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole.

Des résistances acquises (liées à des intégrons) au sulfaméthoxazole, à la gentamycine et à la tobramycine ont été décrites en 2002 lors d'une épidémie (17 cas) chez des souches cliniques de *K. oxytoca* productrices de BLSE (190).

### **III.3 Résistance aux biocides**

Le terme biocide regroupe les antiseptiques, les désinfectants et les agents de conservation. Plusieurs cas de *K. oxytoca* résistantes à un désinfectant ont été décrits notamment en néonatalogie (191). En 2003, l'origine de la contamination s'est avérée être un flacon de désinfectant de surface concentré à 0,25 % de formaldéhyde (107). L'isolat clinique était plus résistant au désinfectant que la souche ATCC 43863 utilisée comme contrôle. Le mécanisme de cette résistance est mal connu, peut-être capsulaire (192).

## **IV Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques**

### **IV.1 Résistance en Europe**

Il existe très peu de données épidémiologiques européennes concernant *K. oxytoca*, qui n'est pas recensée par le principal réseau européen, le réseau EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System).

En 2004, l'ENARE (European Network for Antimicrobial Resistance and Epidemiology) a évalué la sensibilité aux  $\beta$ -lactamines de 5000 isolats cliniques d'entérobactéries dont 215 souches de *K. oxytoca* (193). La France était le second pays en nombre d'isolats de *K. oxytoca* après l'Espagne (36 isolats soit 17 %).

L'association pipéracilline-tazocilline était la pénicilline la plus efficace vis-à-vis de *K. oxytoca* (87,4 %). La céphalosporine la plus efficace était la céfoxitine (98,6 %). Le taux de BLSE rapporté était de 12,6 % (BLSE et hyperOXYconfondues). La résistance semblait plus élevée en Europe de l'Ouest qu'en Europe du Nord et de l'Est.

### **IV.2 Résistance en France**

D'après les données du réseau ONERBA, soixante-quinze pour cent des souches de *K. oxytoca* isolées en France en 1999 présentaient un phénotype sauvage aux  $\beta$ -lactamines

(Tableau XI) (194). La résistance a peu évolué sur la période 2000-2004 d'après les données du réseau ONERBA (Tableau XII). Aucune donnée plus récente n'a été publiée. Les taux de phénotypes hyperOXY et BLSE ne sont pas connus pour *K. oxytoca* en France en 2009.

**Tableau XI : Sensibilité aux principaux antibiotiques de souches hospitalières de *K. oxytoca* isolées en France en 1999**

<b>Antibiotique</b>	<b>Sensibilité (%)</b>
Amoxicilline-acide clavulanique	75
Céfalotine	71
Céfotaxime	95
Imipénème	100
Gentamycine	98
Amikacine	99
Cotrimoxazole	93
Acide nalidixique	90
Ciprofloxacine	95

L'étude portait sur 975 souches de *K. oxytoca*. Les résultats sont exprimés en pourcentage de sensibilité dans l'espèce.

**Tableau XII : Evolution de la sensibilité de *K. oxytoca* en France**

<b>Antibiotique</b>	<b>2000</b> (n=439)	<b>2001</b> (n=440)	<b>2002</b> (n=442)	<b>2003</b> (n=815)	<b>2004</b> (n=1430)
Amoxicilline	0	0	0	0	0
Ticarcilline	0	0	0	0	0
Pipéracilline	1	2	1	0	0
Amoxicilline-acide clavulanique	82	78	81	75	75
Céfalotine	73	71	74	74	73
Céfotaxime	97	98	97	98	97
Gentamycine	97	98	97	98	96
Amikacine	99	99	99	99	99
Fluoroquinolones	95	95	94	94	91
Cotrimoxazole	95	95	94	93	92

Les résultats sont exprimés en pourcentage de souches sensibles pour la période 2000-2004, d'après les données du réseau REUSSIR (Réseau Epidémiologique des Utilisateurs du Système SIR) (n= nombre de souches de *K. oxytoca* étudiées par année).

**PARTIE III : MATERIEL ET METHODES**

## **I Objectifs de l'étude**

L'évolution constante des résistances bactériennes aux antibiotiques pourrait mettre en péril à terme l'efficacité des thérapeutiques. Nos travaux de recherche ont été initiés suite au constat fait au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Nantes de l'augmentation du nombre de souches de *K. oxytoca* résistantes aux  $\beta$ -lactamines isolées au laboratoire.

Détecter les résistances au plus tôt et comprendre leurs mécanismes font parties des missions du biologiste dans un laboratoire de Bactériologie. A ce jour, aucune étude épidémiologique et moléculaire concernant des souches cliniques de *K. oxytoca* suspectées d'être hyperproductrices de la  $\beta$ -lactamase chromosomique OXY n'avait été conduite au CHU de Nantes.

Des études antérieures, supports de nos travaux expérimentaux, ont établi une relation entre l'augmentation du niveau de résistance aux  $\beta$ -lactamines et les mutations détectées dans le promoteur du gène de la  $\beta$ -lactamase *bla<sub>OXY</sub>* (22, 148). Par ailleurs, une classification des souches de *K. oxytoca* en fonction de la séquence peptidique de leur  $\beta$ -lactamase OXY est utilisée par plusieurs auteurs (20, 136, 142).

L'objectif de cette étude était de préciser l'évolution de la résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches de *K. oxytoca* suspectées d'être hyperproductrices de OXY, et notamment de mettre en évidence d'éventuelles nouvelles modifications génétiques responsables de ce phénotype de résistance (20, 129).

Dans un 1<sup>er</sup> temps, nous avons vérifié les CMI par diffusion en milieu gélosé à l'égard de différentes  $\beta$ -lactamines pour l'ensemble des souches sélectionnées, isolées au CHU de Nantes en 2006 et 2007.

Dans le cadre de ce travail, nous avons ensuite entrepris une étude génétique par amplification et séquençage des promoteurs et des gènes de la  $\beta$ -lactamase *bla<sub>OXY</sub>* des souches suspectées d'être hyperproductrices.

Enfin, les souches étudiées ont été classées par groupes génétiques (20) et nous avons déterminé s'il existait une éventuelle clonalité chez les souches de même groupe génétique, isolées chez des patients différents, au sein de services variés, sur une période de 2 ans.

## **II Souches bactériennes étudiées**

Parmi les 246 et 302 souches de *K. oxytoca* isolées en 2006 et 2007 au CHU de Nantes, nous avons sélectionné 45 isolats (17 en 2006 et 28 en 2007) en raison de leur profil de résistance à l'égard des  $\beta$ -lactamines évoquant une hyperproduction de la  $\beta$ -lactamase chromosomique OXY (résistance aux pénicillines et aux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase  $\pm$  aux céphalosporines). Toutes les souches ont été identifiées par méthode automatisée par le système Vitek2<sup>®</sup> (bioMérieux) ou par méthode semi-automatisée par le système API20E<sup>®</sup> (bioMérieux). Les antibiogrammes ont été réalisés en milieu liquide (système Vitek2<sup>®</sup>) ou en milieu solide (gélose Mueller-Hinton). Les diamètres et concentrations d'inhibition critiques ont été interprétés selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM 2009) (195). En cas de souche résistante aux  $\beta$ -lactamines, des tests complémentaires (existence ou non d'une synergie avec l'acide clavulanique, CMI par bandelettes E-test<sup>®</sup>) ont été réalisés afin de détecter une éventuelle BLSE.

Seules les souches qui présentaient un profil de résistance compatible avec une hyperproduction de l'enzyme OXY ont été incluses dans l'étude. Une souche initialement identifiée à *K. oxytoca* en 2006 a été exclue après réalisation de tests complémentaires, et reclassée dans l'espèce *R. planticola*. Certaines souches, retrouvées à plusieurs reprises chez un même patient, ont été « dédoublonnées », si elles étaient isolées à partir du même site et présentaient le même profil de résistance aux  $\beta$ -lactamines.

La souche de référence *K. oxytoca* ATCC 13182, utilisée par Mollet *et al.* et Drancourt *et al.* pour préciser la phylogénie entre certaines espèces d'entérobactéries, a été incluse dans l'étude (14, 39). Il s'agit d'une souche sauvage produisant la  $\beta$ -lactamase OXY-2-2 à bas niveau.

Au total, l'étude a donc porté sur 45 souches, dont les caractéristiques (année d'isolement, nature du prélèvement, service, CMI obtenues lors du diagnostic) sont résumées dans le Tableau XIII page 51.

**Tableau XIII : CMI à l'égard de différentes  $\beta$ -lactamines en milieu liquide (Vitek®) pour les 45 souches étudiées**

Année	N° isolat	Services	Nature des prélèvements	CMI en milieu liquide (mg/L) (Vitek®) ou gélose MH (mm) en gris						
				AMX	AMC	TIC	CF	FOX	CTX	CAZ
2006	1	Hépto-gastro	abcès	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2006	2	Chir vasculaire	hématome	RC	R=13	RC	RC	S	S	S
2006	3	Suivi greffes	urines	>32	>32	>128	>64	S = 8	S = 2	<1
2006	4	Chir vasculaire	bile	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2006	5	Chir vasculaire	urines	>32	>32	>128	>64	16	2	<1
2006	6	Méd interne	urines	>32	>32	>128	>64	16	2	<1
2006	7	Hépto-gastro	hémoculture	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2006	8	Réadaptation	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2006	9	Clinique chir	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2006	10	Méd interne	urines	>32	>32	>128	>64	16	2	<1
2006	11	Urgences	urines	>32	>32	>128	>64	<4	2	<1
2006	12	Méd interne	urines	>32	>32	>128	>64	16	2	<1
2006	13	Hémodigestive	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2006	14	Chir vasculaire	urines	>32	16	>128	>64	<4	<1	<1
2006	15	Urgences	urines	>32	>32	>128	>64	16	32	4
2006	16	Orthopédie	urines	>32	16	>128	>64	<4	<1	<1
2006	17	Orthopédie	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2007	18	Urg traumat	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2007	19	BDR	sperme	>32	16	>128	>64	<4	<1	<1
2007	20	Beausejour	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2007	21	Réadaptation	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2007	22	Urologie	urines	>32	>32	>128	>64	16	4	4
2007	23	Traumatologie	urines	>32	>32	>128	>64	S = 8	4	2
2007	24	Endocrinologie	urines	>32	>32	>128	>64	16	4	2
2007	25	Urgences	urines	>32	>32	>128	>64	<4	32	<1
2007	26	Labo extérieur	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2007	27	Urgences	hémoculture	>32	>32	>128	4	<4	<1	<1
2007	28	Bellier	urines	>32	>32	>128	>64	S = 8	S = 2	<1
2007	29	Réadaptation	urines	>32	16	>128	>64	<4	<1	<1
2007	30	Méd interne	urines	>32	>32	>128	>64	16	2	<1
2007	31	Orthopédie	crachat	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2007	32	Méd interne	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2007	33	Suivi greffes	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2007	34	Bellier	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2007	35	Urologie	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2007	36	Pédiatrie	urines	>32	16	>128	>64	<4	<1	<1
2007	37	Seilleraye	urines	>32	16	>128	>64	<4	<1	<1
2007	38	Urgences	liq péritonéal	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2007	39	Bellier	urines	>32	>32	>128	>64	32	4	2
2007	40	Réa chir	LBA	>32	16	>128	>64	<4	<1	<1
2007	41	Bellier	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2007	42	Rééducation	urines	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1
2007	43	Clinique chir	urines	>32	>32	>128	>64	16	4	4
2007	44	Méd interne	urines	>32	>32	>128	>64	8	2	<1
2007	45	Hépto-gastro	CTV distal	>32	>32	>128	>64	<4	<1	<1

Les souches sont classées par ordre chronologique d'isolement.

Pour les antibiogrammes en milieu solide, les résultats sont exprimés par un S si la souche est sensible, un R ou RC si elle est résistante  $\pm$  avec des colonies bactériennes au Contact du disque d'antibiotique. Les diamètres d'inhibition sont précisés si possible.

AMX : Amoxicilline, AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique, TIC : Ticarcilline, CF : Céfalotine, FOX : Céfoxitine, CTX : Ceftriaxone, CAZ : Ceftazidime, BDR : Biologie de la reproduction, LBA : liquide broncho-alvéolaire, CTV : cathéter veineux distal

## **III Méthodes**

### **III.1 Sensibilité aux antibiotiques**

#### **III.1.1 Choix des antibiotiques**

Les antibiotiques utilisés étaient l'amoxicilline (AmoxicillinePAN<sup>®</sup> Panpharma, Fougères, France), l'amoxicilline/acide clavulanique (Augmentin<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline GSK, Londres, Grande-Bretagne), la ticarcilline (Ticarpen<sup>®</sup>, GSK), la céfazoline (CéfazolinePAN<sup>®</sup>), le céfuroxime (CéfuroximePAN<sup>®</sup>), l'aztréonam (Azactam<sup>®</sup>, Sanofi Aventis, France), la ceftriaxone (Rocéphine<sup>®</sup>, Sanofi) et la ceftazidime (Fortum<sup>®</sup>, GSK). Ces antibiotiques ont été choisis en raison de leur intérêt particulier pour l'identification des souches hyperproductrices d'OXY, notamment le céfuroxime, la ceftriaxone et l'aztréonam. Pour chaque antibiotique, la gamme des concentrations utilisées a été établie en fonction des données de la littérature et des recommandations du CA-SFM (129, 148, 158, 195, 196).

#### **III.1.2 Mode opératoire**

La technique de détermination des CMI en milieu solide gélosé de Mueller-Hinton (MH) a été utilisée. Des géloses additionnées de concentrations croissantes d'antibiotique ont été préparées pour chaque antibiotique. Une suspension bactérienne a été obtenue en mettant en suspension une colonie pure et isolée de *K. oxytoca* dans un bouillon MH de façon à obtenir une concentration de 0,5 MacFarland au néphélémètre. Un ensemencement multiple a été réalisé par spots, grâce à l'ensemencement de Steers. La valeur de l'inoculum était de 10<sup>4</sup> bactéries pour chaque spot. Les boîtes ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. Une lecture manuelle a été réalisée à 24 heures puis à 48 heures. L'interprétation de la sensibilité ou de la résistance des souches de *K. oxytoca* a été déterminée selon les recommandations du CA-SFM (195).

### **III.2 Etude du promoteur par biologie moléculaire**

#### **III.2.1 Extraction de l'ADN bactérien : méthode rapide par ébullition**

Dans un premier temps pour réaliser une réaction de PCR, il est nécessaire d'extraire l'ADN bactérien. Après mise en culture sur pente Trypticase-soja à 37°C pendant 18 à 24 heures, nous avons réalisé une extraction d'ADN par choc thermique. Pour chaque isolat, l'ADN total a été extrait par ébullition à partir de la culture. Une anse de 1 µL de la culture bactérienne

était mise en suspension dans 100 µL d'eau distillée stérile dans un tube eppendorf. Après dix minutes dans une casserole d'eau bouillante, le tube était centrifugé huit minutes à onze mille tours par minute. Le surnageant contenant la matrice d'ADN était récupéré puis conservé à -20°C pour étude ultérieure.

### **III.2.2 Amplification**

L'amplification de l'ADN cible a été réalisée par PCR. Cette étape est basée sur la capacité de l'ADN-polymérase à synthétiser, en présence d'un couple d'amorces, un brin d'ADN complémentaire d'un ADN matrice. Cette réaction en chaîne s'effectue en trois étapes : dénaturation, hybridation des amorces et élongation. L'ensemble de ces trois étapes constitue un cycle de PCR :

- L'étape de dénaturation (entre 93 et 96°C) pendant 10 à 30 secondes permet la séparation des deux brins d'ADN.
- La seconde étape d'hybridation des amorces s'effectue à une température spécifique des amorces pendant 15 à 30 secondes en fonction des réactions. Les amorces utilisées sont présentées dans le Tableau XIV.
- L'étape d'élongation durant laquelle l'ADN-polymérase synthétise le brin complémentaire se déroule à 72°C pendant un temps fonction de la longueur du fragment à amplifier (de 30 secondes à 3 minutes). Classiquement, une PCR comprend 30 cycles.

**Tableau XIV : Amorces utilisées pour l'étude du promoteur du gène *bla<sub>OXY</sub>***

<b>Amorces</b>	<b>Séquences</b>	<b>position dans le gène *</b>	<b>référence</b>
OXY-Q (sens)	5'-TTC-ACA-AAG-CGC-TCG-GCA-AT-3'	-242 à -223	(129)
OXY-R (anti-sens)	5'-CCT-GCT-GCG-GCT-GGG-TAA-AA-3'	236 à 255	(129)

\* la position 1 correspond au site d'initiation de la transcription, 10 nucléotides après la 3<sup>ème</sup> base de la boîte -10.

Les amorces, réalisées par génie génétique (Eurogentec, Liège, Belgique), ont permis l'amplification du promoteur du gène *bla<sub>OXY</sub>*. La souche *K. oxytoca* ATCC 13182 constituait notre témoin positif. Pendant 30 cycles d'amplification, les conditions opératoires étaient les suivantes :

- Dénaturation à 94°C pendant 30 secondes
- Hybridation des amorces à 53°C pendant 30 secondes
- Élongation à 72°C pendant 30 secondes

Après amplification, les produits de PCR ont été soumis à une électrophorèse à 120 volts pendant 1 heure 30 en gel d'agarose à 1 % et révélés sous lumière U.V. après un passage dans un bain de bromure d'éthidium à 0,5 %.

### **III.2.3 Analyse du produit d'amplification par séquençage**

Le séquençage consiste à déterminer la séquence nucléotidique du gène amplifié par PCR, selon la méthode proposée par Sanger en 1977. Après purification de l'ADN cible à séquencer, quatre didéoxynucléotides (ddATP, ddTTP, ddCTP et ddGTP) marqués par des fluorochromes spécifiques sont incorporés au mélange réactionnel. Après incorporation à l'ADN, ceux-ci en bloquent la synthèse par impossibilité de former une liaison phosphodiester avec d'autres nucléotides. Une collection de brins, dont la taille diffère d'un nucléotide, est alors présente dans le milieu réactionnel. Après purification, les produits de séquence sont analysés par électrophorèse capillaire (séquenceur capillaire ABI PrismR 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems)). L'appareil capte différents fragments d'ADN marqués et les résultats sont acheminés vers un logiciel d'interprétation qui les retranscrit en un chromatogramme. Les séquences sont ensuite extraites à l'aide du logiciel Sequence Navigator<sup>®</sup> (Applied Biosystems) puis analysées et identifiées grâce à plusieurs bases de données disponibles en accès libre sur internet : GenBank (Blast) (38), ClustalW (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany) (197), etc...

## **III.3 Etude du gène *bla*<sub>OXY</sub> de la $\beta$ -lactamase**

Les mêmes conditions d'extraction, d'amplification et de séquençage ont été utilisées pour l'étude des promoteurs et des gènes *bla*<sub>OXY</sub>. Seules les amorces utilisées étaient différentes. Elles sont récapitulées dans le Tableau XV. Le choix des amorces a reposé principalement sur l'identification de séquences conservées dans tous les groupes OXY, de 18 à 20 pb. Les isolats ont été classés selon la classification OXY de Fèvre *et al.* (20).

**Tableau XV : Amorces utilisées pour l'étude du gène *bla*<sub>OXY</sub>**

Amorces	Séquences	Position dans le gène	Référence
OXY-Q ( <i>sens</i> )	5'-TTC-ACA-AAG-CGC-TCG-GCA-AT-3'	-242 à -223	(129)
OXY-A ( <i>sens</i> )	5'- CCG-TTC-CGC-TGC-TGC-TGG-3'	73 à 90	cette étude
OXY-R ( <i>anti-sens</i> )	5'-CCT-TAC-TGG-TGC-TGC-ACA-TG-3'	236 à 255	(129)
OXY-H ( <i>sens</i> )	5'-GCG-ACA-ATA-C(G/C)G-CGA-TGA-3'	424 à 441	(20)
OXY-B ( <i>anti-sens</i> )	5'-GCG-CGA-ATG-CTT-TGC-CCG-3'	686 à 704	cette étude
OXY-G ( <i>anti-sens</i> )	5'-CAG-AGT-GCA-GAG-TGT-TGC-AG-3'	921 à 940	(20)

\* la position 1 correspond au site d'initiation de la transcription, 10 nucléotides après la 3<sup>ème</sup> base de la boîte - 10.

### **III.4 Typage moléculaire**

#### III.4.1.1 « Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus »-PCR

L'ADN total de chaque souche hyperproductrice a été testé par ERIC-PCR afin de déterminer l'absence de clonalité entre les isolats. Cette technique est une « Repetitive Extragenic Palindromic » (REP)-PCR, basée sur la présence dans les génomes des cellules procaryotes de séquences répétées. Elle utilise des ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) caractérisées par une taille de 126 pb et une structure de palindrome imparfait avec une structure centrale hautement conservée (Versalovic *et al.* 1991). L'ADN est amplifié à l'aide de l'amorce unique ERIC-2 : 5'-AAG-TAA-GTG-ACT-GGG-GTG-ACG-G-3'. Cette amorce correspond à 22 bases de l'extrémité 3' de l'un des brins de la partie conservée de la séquence ERIC. Les fragments compris entre deux séquences d'orientation opposée suffisamment proches pour que la PCR soit efficace sont amplifiés. Des profils de bande sont alors obtenus et permettent de comparer des isolats pouvant avoir un éventuel lien épidémiologique.

La PCR a été réalisée selon les conditions suivantes :

- 5 minutes à 94°C
  - 1 minute à 94°C
  - 1 minute à 45°C
  - 1 minute à 72°C
  - 7 minutes à 72°C
- } 40 cycles

Après amplification, les produits de PCR ont été soumis à une électrophorèse à 120 volts pendant 3 heures 30 en gel d'agarose à 1,5 % et révélés sous lumière U.V. après un passage dans un bain de bromure d'éthidium à 0,5 %.

#### III.4.1.2 Typage par électrophorèse en champs pulsés

Ce type d'électrophorèse a été développé par Schwartz *et al.* en 1984. Elle s'effectue en 4 étapes : incorporation des bactéries dans la gélose, lyse de la paroi bactérienne, digestion de l'ADN bactérien et électrophorèse. L'étape de lyse est la plus délicate car le génome ne doit pas être accidentellement fragmenté. Elle s'effectue après incorporation des bactéries en phase de croissance exponentielle dans une gélose d'agarose à 1 %. C'est dans cette gélose que l'ADN est libéré chimiquement par du lysosyme puis digéré par l'endonucléase de restriction SpeI<sup>®</sup> (25U) (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Le principe de

l'électrophorèse en champs pulsés consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel augmentant ainsi la probabilité que la molécule d'ADN puisse passer à travers les mailles du gel. Nos conditions d'électrophorèse étaient les suivantes :

- Pulse initial : 2 secondes
- Pulse final : 20 secondes
- Temps : 20 heures
- Voltage :  $V=200$  ou  $6$  V/cm
- Angle :  $120^\circ$

La révélation a été réalisée sous lumière U.V. après un passage dans un bain de bromure d'éthidium à 0,5 %.

**PARTIE IV : RESULTATS**

## **I Epidémiologie des souches étudiées**

Parmi les 246 et 302 souches de *K. oxytoca* isolées au CHU de Nantes en 2006 et 2007, 17 (6,9 %) et 28 (9,3 %) étaient suspectées d'être hyperproductrices d'OXY. Parmi ces 45 isolats, trente-quatre (75,5 %) étaient détectés à l'hôpital Hôtel Dieu dont treize (28,8 %) dans un service de médecine, douze (26,6 %) dans un service de chirurgie, six (13,3 %) à l'Accueil des Urgences Médicochirurgicales, un (2,2 %) en Réanimation et deux (4,4 %) à l'Hôpital Mère-Enfant (Tableau XVI).

**Tableau XVI : Proportion de *K. oxytoca* suspectées d'être hyperproductrices isolées par service en 2006-2007**

<b><u>Services</u></b>	<b>Nombre</b>	<b>%</b>
<b><u>Hôpital Hôtel Dieu</u></b>	<b>34</b>	<b>75,5</b>
Urgences médicochirurgicales	6	13.3
Médecine interne	6	13.3
Hépatogastro-entérologie	3	6.7
Suivi de greffes	2	4.4
Hémorragies digestives	1	2.2
Endocrinologie	1	2.2
Orthopédie et traumatologie	6	13.3
Chirurgie vasculaire	4	8.9
Urologie	2	4.4
Réanimations	1	2.2
Pédiatrie	1	2.2
Biologie de la reproduction (BDR)	1	2.2
<b><u>Hôpital Saint-Jacques</u></b>	<b>4</b>	<b>8.9</b>
Réadaptation	3	6.7
Rééducation	1	2.2
<b><u>Hôpital Bellier</u></b>	<b>4</b>	<b>8.9</b>
<b><u>Hôpital Seilleraye</u></b>	<b>1</b>	<b>2.2</b>
<b><u>Hôpital Beausejour</u></b>	<b>1</b>	<b>2.2</b>
<b><u>Laboratoire extérieur</u></b>	<b>1</b>	<b>2.2</b>

Le principal site d'isolement était urinaire (35 isolats, soit 77,7 %). Les autres prélèvements étaient les hémocultures (2 isolats soit 4,4 %) puis 1 isolat (2,2 % par site) pour chacun des prélèvements suivants : sperme, abcès colique, abcès pancréatique, bile, cathéter veineux périphérique, liquide broncho-alvéolaire, liquide péritonéal et crachat.

Une légère prédominance féminine était notée avec un sex-ratio H/F de 0.91. L'âge moyen était de  $72,7 \pm 17,2$  ans quel que soit le sexe, de  $80,4 \pm 7,7$  ans pour les femmes et de  $63,5 \pm 20,9$  ans pour les hommes, d'où une différence d'âge statistiquement significative ( $p = 0,01$  selon le test univarié de Levene).

## **II Etude de la sensibilité aux antibiotiques**

L'étude de la sensibilité aux  $\beta$ -lactamines a été réalisée par mesure des CMI selon la méthode de référence sur gélose Mueller-Hinton. Les CMI des 45 souches sont résumées dans le Tableau XVII page 60. L'interprétation des CMI a été réalisée selon les recommandations du CA-SFM pour les *Enterobacteriaceae* (195). L'ensemble des isolats présentaient un haut niveau de résistance à l'égard de l'amoxicilline et de la ticarcilline ( $> 512$  mg/L). L'inhibiteur de  $\beta$ -lactamase (acide clavulanique) ne permettait pas la récupération partielle ou totale de l'activité de l'amoxicilline (CMI de 64 ou 128 mg/L en général). La céfazoline (C1G) était en général très fortement hydrolysée ( $> 512$  mg/L) et dans une moindre mesure le céfuroxime (C2G  $> 256$  mg/L). Pour l'aztréonam, 43 souches étaient résistantes soit 95,6 % des isolats. Pour la ceftriaxone, 41 souches (91,1 %) étaient résistantes. Pour la ceftazidime, 24 souches (53,3 %) étaient sensibles et 21 souches (46,6 %) étaient intermédiaires.

**Tableau XVII : CMI à l'égard de différentes  $\beta$ -lactamines en milieu gélosé de Mueller Hinton pour les 45 souches de l'étude**

Année	n° isolat	service	nature du prélèvement	CMI par dilution en agar (mg/L)							
				AMX	AMC	TIC	CZ	CXM	ATM	CRO	CAZ
*	ATCC	*	*	128	< 16	64	< 8	4	0,12	0,12	< 0,06
2006	1	Hépatogastro	abcès	>512	64	>512	>512	>256	64	4	1
2006	2	Chir vasculaire	hématome	>512	64	>512	>512	>256	>64	16	2
2006	3	Suivi greffes	urines	>512	64	>512	>512	>256	64	16	2
2006	4	Chir vasculaire	bile	>512	64	>512	256	128	16	4	0,5
2006	5	Chir vasculaire	urines	>512	128	>512	>512	>256	>64	16	4
2006	6	Méd interne	urines	>512	128	>512	>512	>256	>64	16	4
2006	7	Hépatogastro	hémoculture	>512	128	>512	>512	>256	>64	16	4
2006	8	Réadaptation	urines	>512	64	>512	>512	>256	32	32	1
2006	9	Clinique chir	urines	>512	64	>512	>512	>256	32	4	1
2006	10	Méd interne	urines	>512	128	>512	>512	>256	>64	16	4
2006	11	Urgences	urines	>512	128	>512	>512	>256	>64	16	2
2006	12	Méd interne	urines	>512	128	>512	>512	>256	>64	16	4
2006	13	Hémodigestive	urines	>512	128	>512	>512	>256	64	16	2
2006	14	Chir vasculaire	urines	>512	64	>512	256	256	32	4	0,5
2006	15	Urgences	urines	>512	128	>512	>512	>256	>64	>64	4
2006	16	Orthopédie	urines	>512	32	>512	128	8	0,25	0,25	< 0,06
2006	17	Orthopédie	urines	>512	128	>512	>512	>256	64	8	1
2007	18	Urg traumat	urines	>512	64	>512	256	64	8	0,5	0,25
2007	19	BDR	sperme	>512	64	>512	>512	>256	64	8	1
2007	20	Beauséjour	urines	>512	64	>512	>512	>256	32	8	1
2007	21	Réadaptation	urines	>512	64	>512	>512	>256	32	4	1
2007	22	Urologie	urines	>512	128	>512	>512	>256	>64	32	4
2007	23	Traumatologie	urines	>512	128	>512	>512	>256	>64	32	4
2007	24	Endocrinologie	urines	>512	512	>512	>512	>256	>64	64	4
2007	25	Urgences	urines	>512	64	>512	512	>256	32	4	1
2007	26	Labo extérieur	urines	>512	128	>512	512	256	64	4	1
2007	27	Urgences	hémoculture	>512	256	>512	16	8	0,25	< 0,06	0,25
2007	28	Bellier	urines	>512	128	>512	>512	>256	>64	16	2
2007	29	Réadaptation	urines	>512	128	>512	>512	>256	32	4	1
2007	30	Méd interne	urines	>512	128	>512	>512	>256	>64	16	4
2007	31	Orthopédie	crachat	>512	128	>512	>512	>256	64	8	1
2007	32	Méd interne	urines	>512	128	>512	>512	>256	64	16	2
2007	33	Suivi greffes	urines	>512	128	>512	>512	256	32	2	1
2007	34	Bellier	urines	>512	64	>512	256	64	8	2	0,25
2007	35	Urologie	urines	>512	64	>512	>512	256	32	4	1
2007	36	Pédiatrie	urines	>512	64	>512	512	64	2	0,25	0,25
2007	37	Seilleraye	urines	>512	64	>512	<8	>256	32	4	1
2007	38	Urgences	L péritonéal	>512	64	>512	>512	128	32	2	0,5
2007	39	Bellier	urines	>512	128	>512	512	>256	>64	16	4
2007	40	Réa chir	LBA	>512	64	>512	>512	128	8	2	1
2007	41	Bellier	urines	>512	128	>512	>512	64	16	2	0,5
2007	42	Rééducation	urines	>512	64	>512	>512	>256	64	8	2
2007	43	Clinique chir	urines	>512	128	>512	>512	>256	>64	16	4
2007	44	Méd interne	urines	>512	128	>512	>512	>256	>64	32	4
2007	45	Hépatogastro	CTV distal	>512	64	>512	>512	>256	>64	8	2

AMX : Amoxicilline, AMC : Amoxicilline + acide clavulanique, TIC : Ticarcilline, CZ : Céfazoline, CXM: Céfuroxime, ATM : Aztréonam, CRO: Ceftriaxone, CAZ: Ceftazidime

BDR : Biologie de la reproduction, LBA : liquide broncho-alvéolaire, CTV : cathéter veineux distal

### III Etude du promoteur du gène *bla<sub>OXY</sub>*

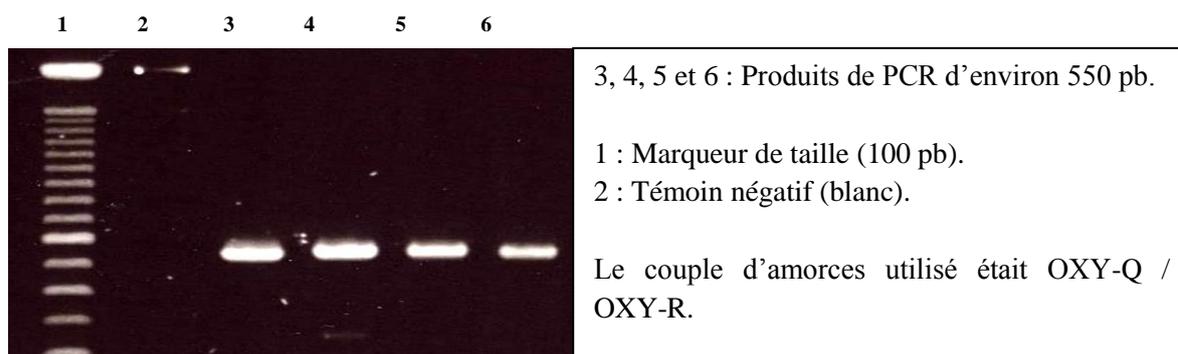
La région promotrice du gène *bla<sub>OXY</sub>* de chaque isolat a été séquencée. Les résultats du séquençage du promoteur réalisé après amplification avec les amorces OXY-Q/OXY-R (Figure 11, page 62) sont résumés dans le Tableau XVIII. Parmi les 45 souches, toutes présentaient une mutation du promoteur dans la boîte -10. Aucune mutation n'était retrouvée dans la boîte -35. Pour 33 souches (73,3 %), une mutation G→ T était retrouvée (1<sup>ère</sup> base de la boîte -10) et pour 12 souches (26,6 %), une mutation G→ A (5<sup>ème</sup> base de la boîte -10).

**Tableau XVIII : Séquences nucléotidiques des boîtes -10 et -35 des promoteurs des souches étudiées**

Souches ATCC	Boîte -35						Boîte -10					
	T	T	G	T	C	A	G	A	T	A	G	T
1	T	T	G	T	C	A	G	A	T	A	A	T
2	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
3	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
4	T	T	G	T	C	A	G	A	T	A	A	T
5	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
6	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
7	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
8	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
9	T	T	G	T	C	A	G	A	T	A	A	T
10	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
11	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
12	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
13	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
14	T	T	G	T	C	A	G	A	T	A	A	T
15	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
16	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
17	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
18	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
19	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
20	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
21	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
22	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
23	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
24	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
25	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
26	T	T	G	T	C	A	G	A	T	A	A	T
27	T	T	G	T	C	A	G	A	T	A	A	T
28	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
29	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
30	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
31	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
32	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
33	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
34	T	T	G	T	C	A	G	A	T	A	A	T
35	T	T	G	T	C	A	G	A	T	A	A	T
36	T	T	G	T	C	A	G	A	T	A	A	T
37	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
38	T	T	G	T	C	A	G	A	T	A	A	T
39	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
40	T	T	G	T	C	A	G	A	T	A	A	T
41	T	T	G	T	C	A	G	A	T	A	A	T
42	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
43	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
44	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T
45	T	T	G	T	C	A	T	A	T	A	G	T

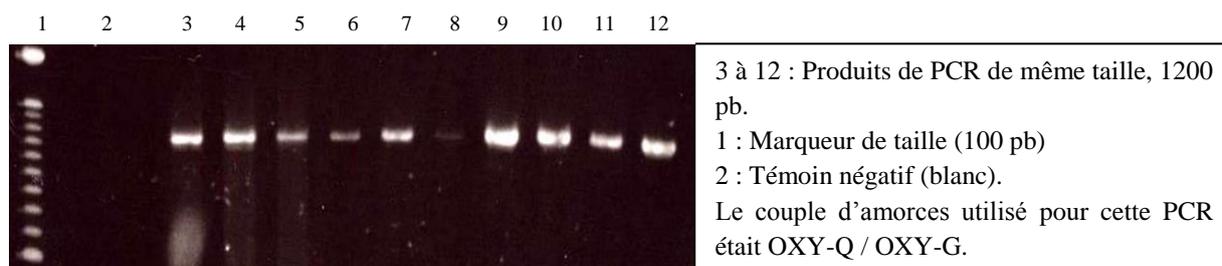
Les mutations apparaissent en gris.

A : adénine, T : thymidine, G : guanine, C : cytosine

**Figure 11 : Migration en gel d'agarose après amplification du début du gène *bla<sub>OXY</sub>***

#### IV Etude du gène *bla<sub>OXY</sub>* de la $\beta$ -lactamase

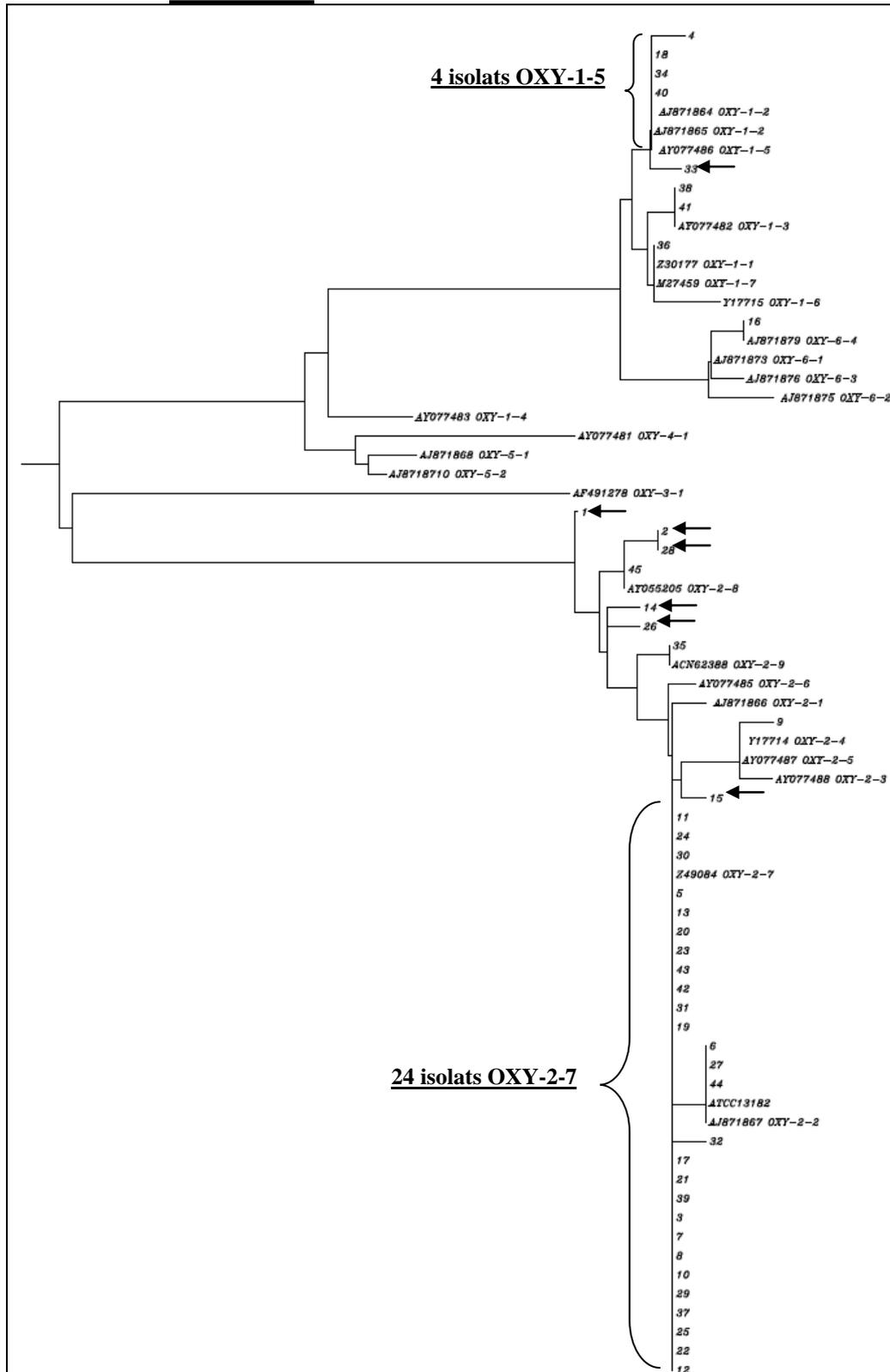
L'étude du gène a été réalisée par une PCR utilisant les amorces OXY-Q/OXY-G (Figure 12), complétée par des PCR OXY-Q/OXY-R (début du gène), OXY-A/OXY-B (milieu du gène) et OXY-H/OXY-G (fin du gène) si nécessaire. Les séquences peptidiques obtenues ont permis de classer les souches selon la classification de Fèvre *et al.* (20).

**Figure 12 : Migration en gel d'agarose après amplification du gène *bla<sub>OXY</sub>***

L'analyse phylogénétique est présentée sous forme d'un arbre phylogénétique à la Figure 13 page 63. La répartition des groupes OXY dans notre panel était la suivante :

- 24 isolats appartenait au groupe OXY-2-7, soit 53,3 % des souches.
- Le second groupe le plus représenté était le groupe OXY-1-5 avec 4 isolats, soit 8,8 %.
- Puis venaient les groupes OXY-2-2 (3 isolats : 6,6 %), 1-3 (2 isolats : 4,4 %), 2-5 (1 isolat : 2,2 %), 2-8 (1 isolat : 2,2 %), 2-9 (1 isolat : 2,2 %), 6-4 (1 isolat : 2,2 %) et 1-7 (1 isolat : 2,2 %).
- Les groupes OXY-1-1, 1-2, 1-4, 2-3, 2-4, 2-6, 3-1, 4-1, 5, 6-1 et 6-2 n'avaient aucun représentant parmi les souches étudiées.
- Six isolats (13,3 %) correspondaient à de nouveaux variants du groupe OXY-2 et 1 isolat (2,2 %) à un nouveau variant du groupe OXY-1. Ces mutations sont décrites dans les Figure 14 page 64, Figure 15 page 64, Figure 16 page 65 et Figure 17 page 66.

**Figure 13 : Arbre phylogénétique des 45 souches étudiées et des 24 sous-groupes OXY de référence**



Les flèches signalent les nouveaux variants détectés dans notre cohorte. Les 2 populations les plus représentées, OXY-2-7 et OXY-1-5, sont indiquées par des accolades.

La souche 33 n'appartenait à aucun sous-groupe génétique OXY décrit par Fèvre *et al.* Une homologie de séquence peptidique de 99,6 % était constatée avec les séquences peptidiques OXY-1-2 et 1-5, séquences de références les plus proches. Cette souche présentait une substitution d'un Acide aspartique par un Acide glutamique en position 92 selon la numérotation standard des acides aminés (position 89 selon la numérotation de Ambler) (Figure 14).

**Figure 14 : Séquences peptidiques de la β-lactamase OXY de la souche 33 et OXY-1-5**

OXY-1-5 33	MLKSSWRKTALMAAAAVPLLLASGSLWASADAIQQKLADLEKRSGGRLGVALINTADDSQ MLKSSWRKTALMAAAAVPLLLASGSLWASADAIQQKLADLEKRSGGRLGVALINTADDSQ
OXY-1-5 33	TLYRGDERFAMCSTGKVMAAAALVKQSESNPEVVNKRLEIKKSDLVWVSPITEKHLQSGM TLYRGDERFAMCSTGKVMAAAALVKQSESNP↓VVNKRLEIKKSDLVWVSPITEKHLQSGM
OXY-1-5 33	TLAELSAALQYSDNTAMNKMISYLGPEKVTAFASIGDVTFRDLRTEPALNSAIPGDK TLAELSAALQYSDNTAMNKMISYLGPEKVTAFASIGDVTFRDLRTEPALNSAIPGDK
OXY-1-5 33	RDTTTP LAMAESLRKLTGALGEEQRAQLVTWLKGNNTGGQSIRAGLPASWVVGDKTGG RDTTTP LAMAESLRKLTGALGEEQRAQLVTWLKGNNTGGQSIRAGLPASWVVGDKTGG
OXY-1-5 33	GDYGTNDIAVIWPNHAPLVLVYFTQPQDAKSRKEVLAAAIVTEGL GDYGTNDIAVIWPNHAPLVLVYFTQPQDAKSRKEVLAAAIVTEGL

Les acides aminés substitués sont marqués par une flèche.

**Figure 15 : Séquences peptidiques de la β-lactamase OXY de la souche 15 et OXY-2-7**

OXY-2-7 15	MIKSSWRKIAMLAAA VPLLLASGALWASTDAIHQKLTDLKRS GGRLGVALINTADNSQILY MIKSSWRKIAMLAAA VPLLLASGALWASTDAIHQKLTDLKRS GGRLGVALINTADNSQILY
OXY-2-7 15	RGDERFAMCSTSKVMAAAAALVKQSESNKEVVNKRLEINAADLVWVSPITEKHLQSGMTLA RGDERFAMCSTSKVMAAAAALVKQSESNKEVVNKRLEINAADLVWVSPITEKHLQSGMTLA
OXY-2-7 15	ELSAATLQYSDNTAMNLIIGYLGPEKVTAFARSIGDATFRDLRTEPTLNTAIPGDERDSTP ELSAATLQYSDNTAMNLIIGYLGPEKVTAFARSIGDATFRDLRTEPTLNTAIPGDERDSTP
OXY-2-7 15	LAMAESLRKLTGALGEEQRAQLVTWLKGNNTGGQSIRAGLPESWVVGDKTGAGDYGT LAMAESLRKLTGALGEEQRAQLVTWLKGNNTGGQSIRAGLPESWVVGDKTGS GDYGT
OXY-2-7 15	NDIAVIWPNHAPLVLVYFTQPQDAKSRKEVLAAAIVTEGL NDIAVIWPNHAPLVLVYFTQPQDAKSRKEVLAAAIVTEGL

Les acides aminés substitués sont marqués par une flèche.

L'isolat 15 présentait une variation de séquence peptidique ne permettant pas de le classer dans la classification actuelle de Fèvre *et al.* Une substitution d'une Alanine par une Sérine en position 240 de la séquence d'acides aminés était retrouvée (position 237 selon la numérotation de Ambler) (Figure 15). Il présentait une homologie de séquence peptidique de 99,6 % avec la séquence de référence OXY-2-7.

Parmi les 6 variants du groupe OXY-2, quatre présentaient une homologie de séquence peptidique de 99,6 % avec OXY-2-8. L'isolat 14 présentait une substitution d'un Acide aspartique par une Alanine en position 39 de la séquence d'acides aminés (position 35 selon la numérotation de Ambler). Les isolats 26 et 28 présentaient une même substitution, celle d'une Valine par une Isoleucine en position 83 de la séquence d'acides aminés (position 80 de la numérotation de Ambler). L'isolat 2 présentait une substitution d'une Thréonine par une Alanine en position 284 de la séquence d'acides aminés (position 281 selon la numérotation de Ambler) (Figure 16).

**Figure 16 : Séquences peptidiques OXY des souches 2, 14, 26, 28 et OXY-2-8**

OXY-2-8	MIKSSWRKIAMLAAAVPLLLASSALWASTDAIHQKLT	DLEKRSGGRLGVALINTADNSQILY
14	MIKSSWRKIAMLAAAVPLLLASGALWASTDAIHQKLT	ALEKRSGGRLGVALINTADNSQILY
26	MIKSSWRKIAMLAAAVPLLLASGALWASTDAIHQKLT	DLEKRSGGRLGVALINTADNSQILY
28	MIKSSWRKIAMLAAAVPLLLASGALWASTDAIHQKLT	DLEKRSGGRLGVALINTADNSQILY
2	MIKSSWRKIAMLAAAVPLLLASSALWASTDAIHQKLT	DLEKRSGGRLGVALINTADNSQILY
		↑
OXY-2-8	RGDERFAMCSTSKVMAAAAVLKQSESNKEVVNKRLEINAADL	VVWSPITEKHLQSGMTLAE
14	RGDERFAMCSTSKVMAAAAVLKQSESNKEVVNKRLEINAADL	VVWSPITEKHLQSGMTLAE
26	RGDERFAMCSTSKVMAAAAILKQSESNKEVVNKRLEINAADL	VVWSPITEKHLQSGMTLAE
28	RGDERFAMCSTSKVMAAAAILKQSESNKEVVNKRLEINAADL	VVWSPITEKHLQSGMTLAE
2	RGDERFAMCSTSKVMAAAAVLKQSESNKEVVNKRLEINAADL	VVWSPITEKHLQSGMTLAE
		↑
OXY-2-8	LSAATLQYSDNTAMNLIIGYLGPEKVTAFARSIGDATFRLDRTEPTLNTAIPGDERDTSTPLA	
14	LSAATLQYSDNTAMNLIIGYLGPEKVTAFARSIGDATFRLDRTEPTLNTAIPGDERDTSTPLA	
26	LSAATLQYSDNTAMNLIIGYLGPEKVTAFARSIGDATFRLDRTEPTLNTAIPGDERDTSTPLA	
28	LSAATLQYSDNTAMNLIIGYLGPEKVTAFARSIGDATFRLDRTEPTLNTAIPGDERDTSTPLA	
2	LSAATLQYSDNTAMNLIIGYLGPEKVTAFARSIGDATFRLDRTEPTLNTAIPGDERDTSTPLA	
		↑
OXY-2-8	MAESLRKLTGNALGEQQRAQLVTWLKGNNTGGQSIRAGLPESWVVGDKTGAGDYGTTND	
14	MAESLRKLTGNALGEQQRAQLVTWLKGNNTGGQSIRAGLPESWVVGDKTGAGDYGTTND	
26	MAESLRKLTGNALGEQQRAQLVTWLKGNNTGGQSIRAGLPESWVVGDKTGAGDYGTTND	
28	MAESLRKLTGNALGEQQRAQLVTWLKGNNTGGQSIRAGLPESWVVGDKTGAGDYGTTND	
2	MAESLRKLTGNALGEQQRAQLVTWLKGNNTGGQSIRAGLPESWVVGDKTGAGDYGTTND	
		↑
OXY-2-8	IAVIWPENHAPLVLVITYFTQPQQDAKNRKEVLAAAAKIVTEGL	
14	IAVIWPENHAPLVLVITYFTQPQQDAKNRKEVLAAAAKIVTEGL	
26	IAVIWPENHAPLVLVITYFTQPQQDAKNRKEVLAAAAKIVTEGL	
28	IAVIWPENHAPLVLVITYFTQPQQDAKNRKEVLAAAAKIVTEGL	
2	IAVIWPENHAPLVLVITYFTQPQQDAKNRKEVLAAATKIVTEGL	
		↑

Les acides aminés substitués sont marqués par une flèche.

Le dernier isolat (isolat 1) présentait une homologie de séquence peptidique de 98,7 % avec OXY-2-9. Il présentait 2 substitutions : une substitution d'un Acide aspartique par une Asparagine en position 256 de la séquence d'acides aminés (position 255 selon la numérotation de Ambler) et une substitution d'une Asparagine par une Sérine en position 275 de la séquence d'acides aminés (position 274 selon la numérotation de Ambler) (Figure 17, page 66).

**Figure 17 : Séquence peptidique OXY de la souche 1 comparée à la séquence peptidique OXY-2-9**

OXY-2-9	MIKSSWRKIAMLAAAVPLLLASGALWASTDAIHQKLTDLKRS GGRLGVALINTADNSQILY
1	MIKSSWRKIAMLAAAVPLLLASGALWASTDAIHQKLTDLKRS GGRLGVALINTADNSQILY
OXY-2-9	RGDERFAMCSTSKVMAAAAVLKQSESNKEVVNKRLEINAADLVVWSPITEKHLQSGMTLAE
1	RGDERFAMCSTSKVMAAAAVLKQSESNKEVVNKRLEINAADLVVWSPITEKHLQSGMTLAE
OXY-2-9	LSAATLQYSDNTAMNLIIGYLGPEKVTAFARSIGDETFRDLRTEPTLNTAIPGDERDTSTPLA
1	LSAATLQYSDNTAMNLIIGYLGPEKVTAFARSIGDATFRDLRTEPTLNTAIPGDERDTSTPLA
OXY-2-9	MAESLRKLTLDALGEQQRAQLVTWLGKNTTGGQSIRAGLPESWVVGDKTGAGDYGTND
1	MAESLRKLTLDALGEQQRAQLVTWLGKNTTGGQSIRAGLPESWVVGDKTGAGDYGTND
	↑
OXY-2-9	IAVIWPENHAPLVLVTYFTQPQDAKNRKEVLAAA KIVTEGL
1	IAVIWPENHAPLVLVTYFTQPQDAKSRKEVLAAA KIVTEGL
	↑

Les acides aminés substitués sont marqués par une flèche.

Le Tableau XIX page 67 résume les résultats de l'étude des 45 souches. Les souches 2-7 étaient les plus représentées. Elles avaient les CMI les plus élevées à l'aztréonam et aux céphalosporines testées. Elles présentaient toutes une mutation G→T au niveau de la 1<sup>ère</sup> base de la boîte -10 du promoteur. Les souches appartenant aux groupes OXY-1 et OXY-6 étaient moins représentées. Elles avaient des CMI moins élevées à l'aztréonam et aux céphalosporines testées que les souches du groupe OXY-2. Elles présentaient le plus souvent une mutation G→A au niveau de la 5<sup>ème</sup> base de la boîte -10 du promoteur. Les groupes OXY-3 et OXY-4 n'avaient aucun représentant. Ainsi, la résistance semble corrélée aux mutations dans le promoteur et au groupe OXY, le groupe OXY-2, présentant la mutation G→T au niveau de la 1<sup>ère</sup> base de la boîte -10, hydrolysant à un niveau plus élevé que le groupe OXY-1, l'aztréonam, la ceftriaxone et la ceftazidime.

**Tableau XIX : Récapitulatif des caractéristiques bactériologiques et génétiques des 45 souches**

Isolat	CMI ATM	CMI CRO	CMI CAZ	Promoteur (boîte -10)	Gène
ATCC	0,12	0,12	< 0,06	GATAGT	2-2
15	> 64	> 64	4	TATAGT	Nouveau variant (groupe 2)
24	> 64	64	4	TATAGT	2-7
22	> 64	32	4	TATAGT	2-7
23	> 64	32	4	TATAGT	2-7
44	> 64	32	4	TATAGT	2-2
5	> 64	16	4	TATAGT	2-7
6	> 64	16	4	TATAGT	2-2
7	> 64	16	4	TATAGT	2-7
10	> 64	16	4	TATAGT	2-7
12	> 64	16	4	TATAGT	2-7
6	> 64	16	4	TATAGT	2-7
39	> 64	16	4	TATAGT	2-7
43	> 64	16	4	TATAGT	2-7
2	> 64	16	2	TATAGT	Nouveau variant (groupe 2)
11	> 64	16	2	TATAGT	2-7
28	> 64	16	2	TATAGT	Nouveau variant (groupe 2)
45	> 64	8	2	TATAGT	2-8
3	64	16	2	TATAGT	2-7
13	64	16	2	TATAGT	2-7
32	64	16	2	TATAGT	2-7
42	64	8	2	TATAGT	2-7
17	64	8	1	TATAGT	2-7
19	64	8	1	TATAGT	2-7
31	64	8	1	TATAGT	2-7
1	64	4	1	GATAAT	Nouveau variant (groupe 2)
26	64	4	1	GATAAT	Nouveau variant (groupe 2)
8	32	32	1	TATAGT	2-7
20	32	8	1	TATAGT	2-7
9	32	4	1	GATAAT	2-5
21	32	4	1	TATAGT	2-7
25	32	4	1	TATAGT	2-7
29	32	4	1	TATAGT	2-7
37	32	4	1	TATAGT	2-7
35	32	4	1	GATAAT	2-9
14	32	4	0,5	GATAAT	Nouveau variant (groupe 2)
33	32	2	1	TATAGT	Nouveau variant (groupe 1)
38	32	2	0,5	GATAAT	1-3
4	16	4	0,5	GATAAT	1-5
41	16	2	0,5	GATAAT	1-3
40	8	2	1	GATAAT	1-5
34	8	1	0,25	GATAAT	1-5
18	8	0,5	0,25	TATAGT	1-5
36	2	0,25	0,25	GATAAT	1-7
16	0,25	0,25	< 0,06	TATAGT	6-4
27	0,25	< 0,06	0,25	GATAAT	2-2

Les souches ont été classées par niveau de résistance décroissant à l'aztréonam. La souche ATCC 13182 est la souche sauvage de référence (1<sup>ère</sup> ligne). Les accolades placées sur la droite du tableau montrent que la résistance est corrélée aux mutations dans le promoteur et au groupe OXY. Les CMI sont exprimées en mg/L.

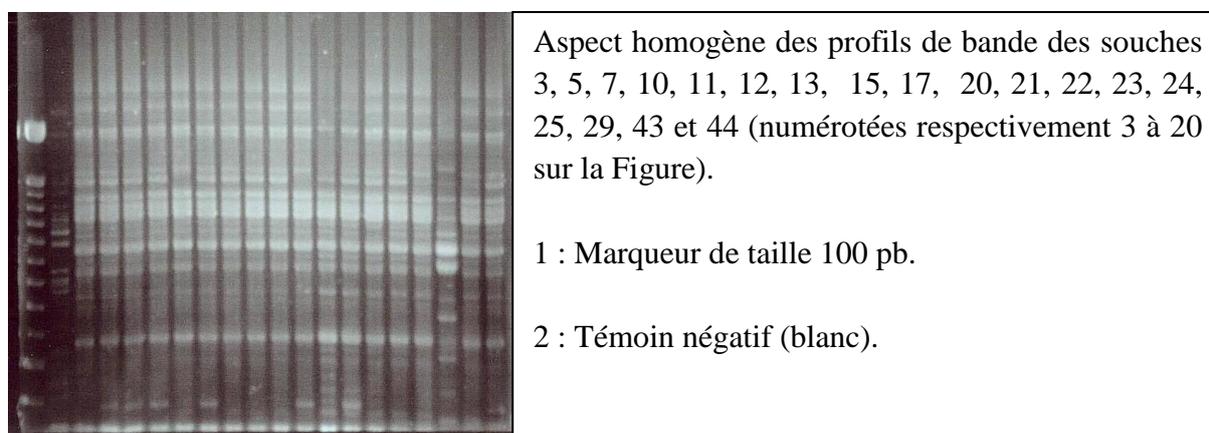
## V Typage moléculaire

### V.1 ERIC 2-PCR

Les 24 isolats du groupe OXY-2-7 ont été typés par la technique d'ERIC 2-PCR afin de mettre en évidence une éventuelle clonalité (Figure 18). Parmi les 24 souches, 23 présentaient des profils de bandes très proches, mais la technique ne permettait pas d'affirmer leur clonalité. Une confirmation par une technique d'électrophorèse en champs pulsés était nécessaire.

**Figure 18 : Gel de typage moléculaire par ERIC 2-PCR de souches OXY-2-7**

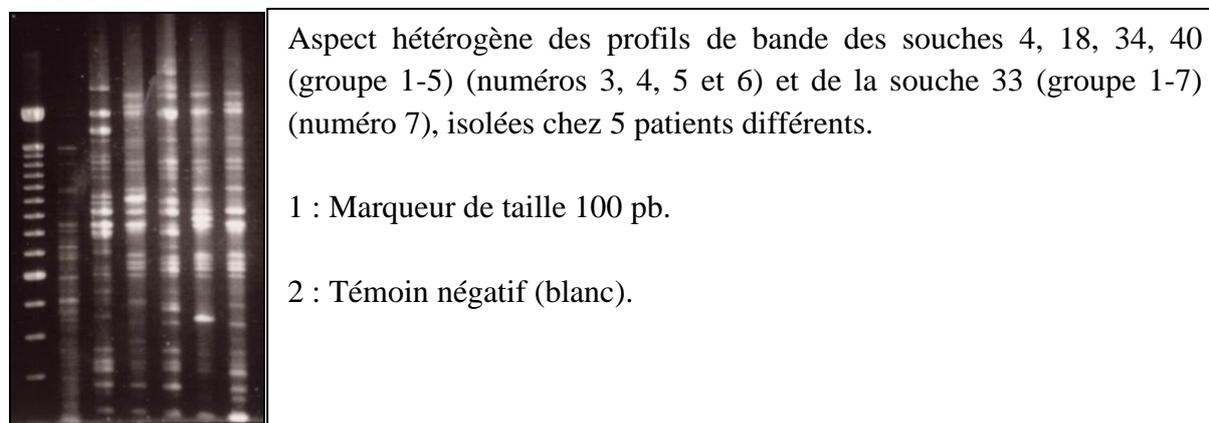
1- 2- 3- 4- 5- 6- 7- 8- 9- 10- 11- 12- 13- 14- 15- 16-17-18-19-20



Le second groupe le plus représenté était le groupe OXY-1-5 avec 4 isolats. Ces isolats présentaient des phénotypes de résistance proches, mais des profils de bande différents, confirmant l'absence de clone pour ces souches, isolées chez des patients différents (Figure 19).

**Figure 19 : Gel de typage moléculaire par ERIC 2-PCR pour les isolats OXY-1-5**

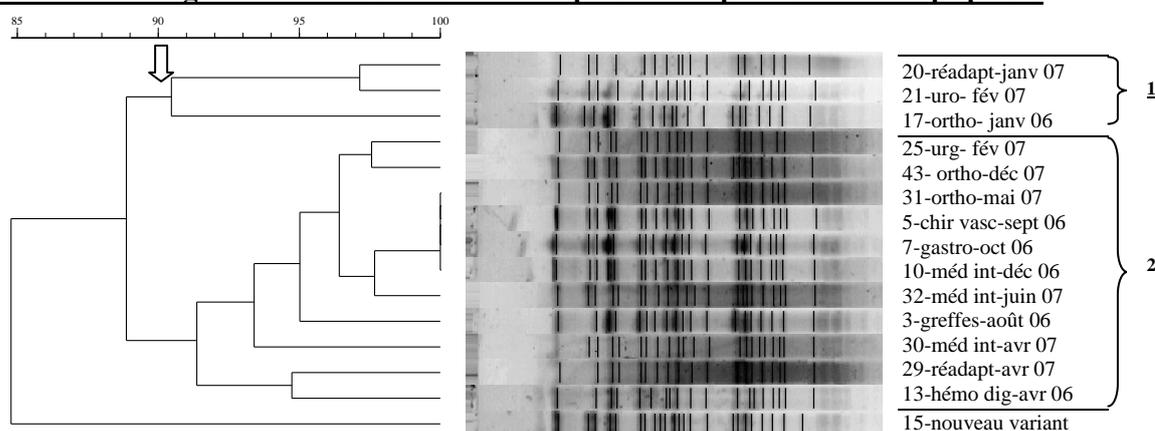
1 2 3 4 5 6 7



## V.2 Electrophorèse en champs pulsés

Un typage moléculaire par électrophorèse en champs pulsés a été réalisé pour les 24 souches 2-7 (Figure 20). Dix des 24 isolats produisant une OXY-2-7 n'ont pas pu être typés. Parmi les isolats restants, deux clones ont été identifiés. Les isolats étaient considérés comme phylogénétiquement liés les uns aux autres, quand ils montraient une similarité supérieure à 90 % avec au moins un autre isolat. Un clone était majoritaire et comprenait 11 souches, le second clone comportant 3 souches. L'analyse des services et des dates a permis de montrer des liens entre certains isolats (Tableau XX). Parmi les 11 isolats formant le clone principal, trois provenaient de médecine interne et 2 d'orthopédie. Les dates d'isolement allaient de janvier 2006 à décembre 2007 (2 en avril 2007). Parmi les 3 isolats du second clone, tous provenaient de services différents et ont été isolés à des mois différents.

**Figure 20 : Dendrogramme de souches OXY-2-7 après électrophorèse en champs pulsés**



La flèche indique le seuil de clonalité (90% d'homologie). Le numéro de souche, le service et la date d'isolement sont précisés pour chaque OXY-2-7 à droite des profils de bande. Les accolades regroupent chacune un clone.

**Tableau XX : Service et date d'isolement des souches OXY-2-7 classées par ordre chronologique**

Date	N° isolat	Service	Nature
10/1/2006	17	Orthopédie	urines
27/4/2006	13	Hémodigestive	urines
27/5/2006	12	Méd interne	urines
22/6/2006	11	Urgences	urines
25/8/2006	3	Suivi greffes	urines
20/9/2006	5	Chir vasculaire	urines
26/10/2006	7	Hépto-gastro	hémoculture
11/12/2006	8	Réadaptation	urines
28/12/2006	10	Méd interne	urines
9/1/2007	20	Beausejour	urines
28/1/2007	21	Réadaptation	urines
5/2/2007	22	Urologie	urines
7/2/2007	24	Endocrinologie	urines
9/2/2007	23	Traumatologie	urines
15/2/2007	25	Urgences	urines
14/3/2007	19	Biologie de la reproduction	sperme
6/4/2007	29	Réadaptation	urines
30/4/2007	30	Méd interne	urines
4/5/2007	31	Orthopédie	crachat
29/6/2007	32	Méd interne	urines
27/7/2007	37	Seilleraye	urines
13/10/2007	39	Bellier	urines
15/10/2007	42	Rééducation	urines
8/12/2007	43	Clinique chir	urines

**PARTIE V : DISCUSSION**

Au quotidien, chaque antibiothérapie prescrite a un impact non négligeable sur les flores bactériennes, avec pour conséquence l'émergence de bactéries toujours plus résistantes. La surveillance de l'évolution des résistances bactériennes aux antibiotiques ainsi que la détection précoce de mécanismes émergents devraient permettre de prévenir la dissémination des gènes de résistance acquis. Par ailleurs, pour certaines espèces, le chromosome bactérien peut héberger des gènes de résistance aux antibiotiques. Dans le domaine des  $\beta$ -lactamases, cette résistance, bien que de support chromosomique, n'est pas totalement figée. Elle peut évoluer, soit en terme de niveau d'expression du gène (aspect quantitatif), soit en terme de spectre d'hydrolyse (aspect qualitatif) (150, 198-200).

Chez *K. oxytoca*, une  $\beta$ -lactamase chromosomique de classe A, OXY, est exprimée constitutivement à bas niveau, conférant une résistance aux aminopénicillines et carboxypénicillines. L'hyperproduction de la  $\beta$ -lactamase qui est généralement due à une mutation dans la région promotrice du gène *bla<sub>OXY</sub>* conduit à une résistance aux pénicillines et à l'association amoxicilline-acide clavulanique, et une sensibilité variable aux céphalosporines de première et deuxième générations, à l'aztréonam, à la ceftriaxone, au céfotaxime et à la ceftazidime (147, 157).

Depuis 3 ans, nous avons observé un accroissement du nombre de souches de *K. oxytoca* résistantes à l'association amoxicilline-acide clavulanique détectées au laboratoire du CHU de Nantes. L'objectif de ce travail était d'étudier les souches de *K. oxytoca* isolées dans notre hôpital dont le phénotype était compatible avec une hyperproduction de la  $\beta$ -lactamase chromosomique OXY. Dans le cadre de ce travail, nous avons analysé, de manière rétrospective, 45 souches isolées entre 2006 et 2007. Dans un 1<sup>er</sup> temps, les travaux ont porté sur l'évaluation des concentrations minimales inhibitrices à l'égard de différentes  $\beta$ -lactamines. Dans un 2<sup>ème</sup> temps, les analyses du promoteur du gène *bla<sub>OXY</sub>*, puis du gène de la  $\beta$ -lactamase lui-même ont permis d'une part, d'identifier les mutations responsables de l'hyperexpression de la  $\beta$ -lactamase et, d'autre part, de déterminer les sous-groupes OXY. Enfin, un typage moléculaire des souches a été réalisé, afin de mettre en évidence une éventuelle clonalité entre les isolats de même sous-groupe OXY.

Au cours de nos investigations, l'analyse des prélèvements a montré que, dans notre cohorte, la principale nature de prélèvement était l'urine (75 %) puis le sang (4 %). Dans notre étude,

nous n'avons pas distingué les colonisations des infections urinaires. Les données de la littérature concernant les infections urinaires à *K. oxytoca* restent faibles, mais les bactériémies rapportées ont souvent un point de départ urinaire (70). Concernant les 34 patients pour lesquels l'isolement était urinaire, une dizaine d'entre eux (> 30 %) étaient porteurs d'une sonde vésicale. Or, le matériel étranger est connu pour favoriser le portage de *K. oxytoca* par formation de biofilm (53, 55). Ce facteur de pathogénicité pourrait être impliqué dans les infections dues à des souches hyperproductrices de OXY.

L'âge moyen était statistiquement différent entre les femmes (80 ans en moyenne) et les hommes (63 ans en moyenne). Il s'agit d'un indicateur épidémiologique dont la principale variable est la cause de l'hospitalisation. En effet, dans notre étude, les femmes étaient principalement hospitalisées pour des fractures du col du fémur et des pathologies biliaires, pathologies dont la fréquence augmente avec l'âge (201). Par contre, les hommes étaient généralement hospitalisés pour des pathologies non liées à l'âge (pathologies neurologiques (paraplégies) ou traumatiques, complications de l'alcoolisme chronique, etc...).

Les seuls travaux réunissant un nombre comparable de souches cliniques hyperproductrices de OXY sont ceux publiés par Fournier *et al.* en 1996, mais les caractéristiques épidémiologiques des patients n'étaient pas précisées (129).

Notre étude épidémiologique a reposé uniquement sur l'observation des données socio-démographiques colligées dans les dossiers informatisés des patients. Une véritable étude épidémiologique serait intéressante pour analyser la durée d'hospitalisation avant l'isolement de la bactérie, les notions d'hospitalisations antérieures, d'antécédents d'infection à *K. oxytoca* et d'antibiothérapie préalable, ayant éventuellement favorisé la sélection d'une souche hyperproductrice. En effet, *K. oxytoca* est retrouvée dans la flore digestive de 1,6 % des sujets sains (51).

Les 45 souches de *K. oxytoca* résistantes à l'association amoxicilline-acide clavulanique isolées au CHU de Nantes en 2006 et 2007 présentaient un phénotype de résistance compatible avec l'hyperproduction de la  $\beta$ -lactamase OXY. L'étude des concentrations minimales inhibitrices à l'égard de différentes  $\beta$ -lactamines dans cette population bactérienne sélectionnée a permis de préciser les observations faites au Laboratoire de Bactériologie concernant l'augmentation de la résistance aux  $\beta$ -lactamines sous 2 aspects : modifications génétiques impliquées et niveaux de résistance conférés.

L'intérêt de notre étude tient au nombre élevé de souches (quarante-cinq) de *K. oxytoca* suspectées d'être hyperproductrices alors que les études précédentes réunissaient trois (147) ou quatre isolats (160). Granier *et al.* avaient un nombre intermédiaire de souches hyperproductrices s'élevant à 16 (196). Seule l'étude de Fournier *et al.* en 1996 portait sur un nombre équivalent de souches cliniques hyperproductrices mais elles provenaient de plusieurs pays pour lesquels l'écologie bactérienne est difficilement comparable avec celle de la France. De plus, les résultats, exprimés en diamètre d'inhibition, n'étaient pas strictement comparables (129).

Parmi les 45 isolats étudiés, 43 (soit 95,6 %) présentaient une résistance à l'aztréonam (CMI moyenne > 64 mg/L). Cette caractéristique des souches hyperproductrices résistantes à l'aztréonam confirme la tendance observée dans différentes enquêtes épidémiologiques (147, 158, 160, 196). Toutefois, certaines souches présentaient des CMI très basses (0,25 à 0,5 mg/L), suggérant une certaine hétérogénéité du spectre d'hydrolyse vis-à-vis de l'aztréonam chez les souches hyperOXY.

Parmi les 45 isolats étudiés, 41 isolats (soit 91,1 %) exprimaient une résistance à la ceftriaxone (CMI > 2 mg/L). Cette fréquence élevée de résistance à la ceftriaxone chez les souches hyperproductrices confirme les enquêtes de Moland *et al.* en 1998 et Granier *et al.* en 2002 (160, 196). Ces résultats n'étaient pas retrouvés dans l'étude de Fournier *et al.* en 1996, dans laquelle les diamètres d'inhibition moyens des souches hyperproductrices étaient de  $28.6 \pm 3.3$  cm (seuil de sensibilité  $\geq 26$  cm) (129). Une augmentation de la résistance à la ceftriaxone semble donc se produire depuis 1996 (160), même si ce résultat doit être pondéré par la présence de biais de comparaison entre les études (biais de recrutement).

Parmi les 45 isolats, 21 (soit 46,6 %) présentaient une sensibilité diminuée à la ceftazidime (CMI comprise entre 1 et 8 mg/L). Aucune résistance à la ceftazidime n'était retrouvée dans les précédentes études réalisées entre 1996 et 2002 (147, 158, 160, 196).

Ainsi, alors que l'ONERBA a montré une moindre évolution de la résistance chez les *K. oxytoca* entre 2000 et 2005 (194), nos travaux indiquent une progression des niveaux de CMI aux  $\beta$ -lactamines.

Parmi notre cohorte, il est intéressant de souligner qu'aucune souche produisait une  $\beta$ -lactamase à large spectre. Cette observation indique sans doute l'extrême rareté de ce mécanisme de résistance chez *K. oxytoca* dans notre hôpital. Seule une surveillance épidémiologique permettrait de connaître la proportion exacte de ce phénotype parmi les

souches de *K. oxytoca*. Or, en France, les réseaux de surveillance des résistances bactériennes, comme l'ONERBA, ne les répertorient pas (194).

Par conséquent, les hypothèses sur les mécanismes associés à cette augmentation de résistance sont principalement l'apparition de nouveaux mécanismes moléculaires de dérégulation transcriptionnelle au niveau du promoteur, et/ou la sélection de mutants de la  $\beta$ -lactamase avec un élargissement du spectre aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération.

L'étude de la régulation transcriptionnelle de l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques permet de mieux comprendre certains phénotypes de résistance. Chez *K. oxytoca*, l'expression de la  $\beta$ -lactamase OXY est constitutive. Le promoteur du gène codant pour cette enzyme possède 2 séquences (dites boîtes -35 et -10), constituant respectivement le site de la reconnaissance pour l'ARN-polymérase et le site d'ouverture de la double hélice d'ADN. Seules quelques études se sont intéressées à la régulation du niveau de production de la  $\beta$ -lactamase OXY (128). Cette régulation transcriptionnelle est essentiellement liée à la force du promoteur du gène. Dans les promoteurs des souches sauvages, qui expriment OXY à bas niveau, la boîte -35 comporte la séquence TTGTCA, et la boîte -10 comporte la séquence GATAGT, ces 2 régions étant séparées de 17 pb (128). Des mutations rapportées dans les boîtes -10 et -35 peuvent augmenter la force du promoteur et, par conséquent, le niveau de transcription du gène *bla*<sub>OXY</sub>.

Lors de ce travail, le séquençage du promoteur des souches suspectées d'être hyperproductrices a révélé que toutes présentaient une mutation dans la boîte -10. Les 2 substitutions détectées (G → T au niveau de la 1<sup>ère</sup> base et G → A au niveau de la 5<sup>ème</sup> base de la boîte -10) améliorent l'homologie avec la séquence consensus TATAAT (définie chez *E. coli*) et, par conséquent, le niveau de transcription du gène *bla*<sub>OXY</sub>. Aucun nouvel événement génétique n'a été détecté dans la boîte -10. Par ailleurs, nous n'avons pas mis en évidence de mutation dans la boîte -35. Ces observations confirment celles initialement rapportées par Fournier *et al.* (128, 129), la force du promoteur augmentant si la séquence réelle se rapproche de la séquence consensus. Chez *E. coli*, des substitutions aux mêmes positions de la boîte -10 entraînent également une augmentation du niveau de production du gène *maltT* (substitution G → T de la 1<sup>ère</sup> base) (202), et du gène *fol* (substitution G → A de la 5<sup>ème</sup> base de la boîte -10) (203).

Par ailleurs, la distance entre les séquences consensus -35 et -10 peut également être impliquée dans des modifications de force du promoteur, comme cela a déjà été démontré *in vitro* par Fournier *et al.* (156). Dans notre cohorte, aucune délétion ou insertion dans la région promotrice n'a été retrouvée. Toutes les souches présentaient une distance de 17 pb entre les 2 boîtes -35 et -10. Cette distance entre les boîtes des promoteurs semblait relativement stable, car elle était également de 17 pb chez la souche sauvage de référence ATCC. Ainsi, comme chez *E. coli* (204), il s'agit probablement de la distance optimale pour la transcription du gène *bla<sub>OXY</sub>* par l'ARN-polymérase.

L'analyse des mutations indique que la mutation G→A au niveau de la 5<sup>ème</sup> base génère un niveau de résistance modéré, alors que la mutation G→T au niveau de la 1<sup>ère</sup> base conduit à un niveau de résistance élevé. Cette substitution G→T, la plus fréquemment retrouvée parmi nos isolats, entraîne probablement une production plus importante de l'enzyme. Ces observations confirment les études précédentes réalisées sur la région promotrice du gène *bla<sub>OXY</sub>* (129, 148). Plusieurs auteurs ont déjà montré que le niveau d'hyperproduction de la β-lactamase est variable selon la mutation du promoteur détectée (augmentation d'un facteur 70 à 200 environ) (128).

Par ailleurs, d'autres mutations détectées en dehors des 2 boîtes -35 et -10 ne semblent pas influencer le niveau de transcription (128, 129).

Enfin, dans notre cohorte, aucun nouveau mécanisme moléculaire de résistance au niveau du promoteur n'a pu être mis en évidence. Or, chez *K. pneumoniae* (*bla<sub>SHV</sub>*), *E. coli* (*bla<sub>AmpC</sub>*) ou *Acinetobacter baumannii* (*bla<sub>AmpC</sub>*), il existe une diversité des événements génétiques responsables de l'hyperexpression de la β-lactamase naturelle. Ainsi, en plus de mutations ponctuelles dans le promoteur, des macrodélétions ou la présence de séquences d'insertion avec constitution de promoteur hybride ont été rapportées dans la littérature (198, 199, 205). A l'inverse, chez *K. oxytoca*, une certaine stabilité génétique du promoteur a été constatée entre 1995 et 2009 (128).

Après l'étude des promoteurs, nous nous sommes intéressés au gène de la β-lactamase. Cette étude des gènes *bla<sub>OXY</sub>* nous a permis de classer les souches selon la classification de Fèvre *et al.* (20). Les sous-groupes des 45 isolats ont été déterminés par séquençage complet du gène *bla<sub>OXY</sub>* (20). Dans notre cohorte, le sous-groupe OXY-2-7 (53,3 % des isolats) était majoritaire. En 1996, une prédominance du groupe OXY-2 (53 %) et du sous-groupe OXY-1-1 (42 %) était retrouvée (129, 158). Le sous-groupe OXY-2-7 représentait alors 31 %

des isolats (129). Or, dans notre cohorte, aucun OXY-1-1 n'a été mis en évidence. Le sous-groupe OXY-1-5 formait le deuxième sous-groupe de notre panel en fréquence, avec 4 isolats (soit 8,8 %). Il n'était pas encore décrit lors de l'étude épidémiologique de Fournier *et al.* (129). Par conséquent, nos résultats illustrent probablement une évolution de la distribution des sous-groupes depuis 1996. Toutefois, cette interprétation des données doit être pondérée en raison de la présence de biais de comparaison, les études précédentes se basant sur des classifications où n'apparaissaient que les groupes OXY-1 et OXY-2 (129). En effet, aucune étude de caractérisation moléculaire de souches cliniques n'a été réalisée depuis la mise en place de la nouvelle classification *bla*<sub>OXY</sub> en 2005 (20, 21).

D'autre part, aucun représentant des groupes OXY-1-4, 2-3, 2-6, 3-1, 4-1, 5, 6-1 et 6-2 n'a été identifié dans notre panel. Or, ces sous-groupes ont été établis par Fèvre *et al.* à partir de souches de référence provenant d'une dizaine de pays (Italie (OXY-5-1), Suisse (OXY-5-2), etc...). Par contre, certains sous-groupes établis à partir de souches « françaises » correspondaient à des sous-groupes retrouvés dans notre cohorte : OXY-2-7, 1-2, 2-2, 6-4, 1-5, etc... Cependant, ce n'était pas le cas pour tous les sous-groupes définis à partir de souches « françaises », puisque nous n'avons pas détecté de représentants des sous-groupes OXY-3, OXY-4, OXY-2-3 ou OXY-2-6 dans notre cohorte (20). Ainsi, il est possible que certains sous-groupes définis par Fèvre *et al.* ne circulent pas encore, ou très rarement, en France. Il pourrait être intéressant d'engager une enquête multicentrique pour comparer la prévalence de chaque sous-groupe en fonction des centres.

Ensuite, nous avons voulu établir une éventuelle corrélation entre gène *bla*<sub>OXY</sub> et niveau de résistance conféré aux  $\beta$ -lactamines. Dans la cohorte étudiée, les  $\beta$ -lactamases OXY-2 ont hydrolysé plus nettement les  $\beta$ -lactamines dont l'aztréonam, la ceftriaxone et la ceftazidime que les OXY-1. Au sein des groupes, le niveau d'hydrolyse était homogène, les CMI des OXY-2 (OXY-2-7, 2-2 et 2-9) étant comparables entre elles, tout comme celles des OXY-1 (OXY-1-3, 1-5 et 1-7). Fournier *et al.* ont rapporté des résultats similaires dans les années 1990 (109, 128, 129, 136). A l'inverse, Fèvre *et al.* ont estimé que les  $\beta$ -lactamases des 6 groupes OXY avaient des niveaux de production très proches, mais leurs résultats reposaient sur l'étude de souches sauvages (20). Or, le niveau de CMI des variants OXY semble modifié selon la mutation du promoteur. Ainsi, dans notre étude, les OXY-2 présentaient plus souvent la mutation G $\rightarrow$ T au niveau de la 1<sup>ère</sup> base de la boîte -10, conférant un promoteur très fort. De même, nos isolats OXY-1 présentaient plus fréquemment la mutation G $\rightarrow$ A au niveau de

la 5<sup>ème</sup> base de la boîte -10 augmentant modérément la force du promoteur. Ces résultats sont concordants avec d'autres travaux dans lesquels les OXY-2 (TATAGT) présentaient des diamètres à l'aztréonam à 13 mm, et les OXY-1 (GATAAT) des diamètres à 16 mm (129).

Lorsque nous avons classé les isolats selon les groupes génétiques de Fèvre *et al.* (20), certains isolats présentaient des substitutions d'acides aminés et ne pouvaient être classés dans aucun des groupes existants. La souche était alors nommée « nouveau variant génétique ». Parmi les 45 isolats, 7 nouveaux variants (15,5 %) ont été détectés. Jusqu'à présent, la variabilité génétique de *K. oxytoca* a été peu étudiée (136). La classification de Fèvre *et al.* étant basée sur 30 souches de *K. oxytoca*, elle ne peut pas représenter toute la diversité et la plasticité génétique de la  $\beta$ -lactamase OXY. De plus, elle a été réalisée en 2005. Or, les évolutions génétiques sont rapides chez les  $\beta$ -lactamases chromosomiques ou plasmidiques avec la description constante de nouveaux variants chez TEM, SHV, CTX-M, etc...(144). La découverte de nouveaux variants OXY chez *K. oxytoca* n'est donc pas très surprenante. Ces variants pourraient ainsi être ajoutés à la classification de Fèvre *et al.* après études complémentaires (notamment des gènes de ménage).

Nous avons voulu étudier ces variants et leurs mutations peptidiques, dans le but d'établir une corrélation avec un éventuel élargissement du spectre de la  $\beta$ -lactamase. En effet, contrairement aux mutations du promoteur qui modifient le niveau d'expression de OXY, la variabilité dans les régions codantes du gène *bla<sub>OXY</sub>* est susceptible d'élargir le spectre d'hydrolyse de l'enzyme. Pour 6 isolats (1, 2, 14, 26, 28 et 33), les mutations n'ont pas permis d'élargir le spectre de la  $\beta$ -lactamase à la ceftazidime (CMI modérément élevée de 0,5 à 2 mg/L), mais ont semblé survenir au niveau d'acides aminés peu conservés : ainsi, une substitution Asp89Glu selon la numérotation de Ambler a été détectée chez la souche 33 (OXY-1). L'acide aminé 89 ne fait pas partie des sites actifs connus de la  $\beta$ -lactamase (Sérine 70 principalement). La substitution Asp89Glu a déjà été décrite par Fèvre *et al.* dans les groupes OXY-3-1, OXY-4-1 et OXY-6 (20), mais jamais pour OXY-1. L'acide aminé en position 89 est également important dans la classification des  $\beta$ -lactamases SHV pour distinguer SHV-1 (Asp89) de SHV-15 (Lys89) (144).

De même, une substitution Val80Iso (Ambler) a été retrouvée chez l'isolat 26, classé dans le groupe OXY-2. Malgré sa proximité avec le principal site actif de la  $\beta$ -lactamase (la Sérine 70), la variation d'acide aminé en position 80 n'a pas semblé avoir d'impact sur le spectre de

la  $\beta$ -lactamase. L'acide aminé 80 est important dans la classification des  $\beta$ -lactamases TEM (Val80Glu) et dans celle des SHV (Val80Met) (144). De même, une substitution Thr281Ala (Ambler) a été retrouvée chez l'isolat 2. Cette position 281 n'a jamais été décrite, ni chez OXY ni chez les  $\beta$ -lactamases TEM, SHV ou OXA (144).

L'isolat 1 présentait 2 substitutions, Asp255Asn et Asn274Ser (Ambler), connues pour modifier le pI de la  $\beta$ -lactamase (18, 136). Ces positions ont été décrites pour distinguer le groupe OXY-1 (Asn255, Ser274) des autres groupes OXY (Asp255, Asn274) (20) mais pas pour élargir le spectre de la  $\beta$ -lactamase. L'isolat 14 présentait une substitution Asp35Ala (Ambler), dont la position est connue pour modifier le pI de la  $\beta$ -lactamase (136) et pour différencier les souches OXY-6-4 (Asn35) des autres OXY (Asp35) (20). Les  $\beta$ -lactamases TEM (Asp35Pro) et SHV (Leu35Gln) possèdent aussi des variants en position 35 de la numérotation de Ambler.

Parmi les 7 nouveaux variants, seul l'isolat 15 présentait une substitution connue pour élargir le spectre de OXY vis-à-vis de la ceftazidime, l'Ala237Ser (Ambler). Cette substitution affecterait le motif conservé KTG situé à proximité (206). Elle a déjà été impliquée par plusieurs auteurs dans des modifications de résistance à la ceftazidime (CMI = 2 à 8 mg/L) chez des souches hyperproductrices de *K. oxytoca* (21, 136, 206). Pour l'isolat 15, la CMI à la ceftazidime était de 4 mg/L, en accord avec les niveaux de CMI décrits par Decré *et al.* (206). Dans la classification de Fèvre *et al.*, cette position est également importante puisqu'elle permet de distinguer le groupe OXY-1 (Ala237) des autres groupes OXY (Gly237). Certains auteurs ont évoqué l'importance de la sérine 237 pour l'hydrolyse du céfuroxime et des céphalosporines à large spectre pour plusieurs BLSE de type TEM ou SHV, pour les  $\beta$ -lactamases chromosomiques de *K. ascorbata* (KLUA-1), *K. cryocescens* (KLUC-1), *K. georgina* (KLUG-1), *P. vulgaris* (RO104), *Serratia fonticola* (CUV), *Citrobacter sedlakii* (SED-1), *C. diversus* (CidA), *Rahnella aquatilis* (RHAN-1) et *Erwinia persinica* (ERP-1), qui possèdent toutes une sérine en position 237 (206), alors qu'une Alanine est retrouvée en position 237 chez des enzymes telles que TEM-1, TEM-2, OXY-1 ou OXY-2 (206). D'autres substitutions ont également été décrites en position 237 chez certaines  $\beta$ -lactamases TEM (Ala237Thr et Ala237Gly) permettant un élargissement du spectre. Aucune classification identique n'existe pour les  $\beta$ -lactamases CTX-M, les plus proches phylogénétiquement des OXY, dont la comparaison de l'acide aminé en position 237 aurait été intéressante.

Enfin, la mutation Pro167Ser, au niveau de la boucle Omega, connue pour élargir le spectre de la  $\beta$ -lactamase de *K. oxytoca* à la ceftazidime (CMI > 32 mg/L) (206), n'a pas été détectée parmi nos souches. Cette observation est en accord avec nos résultats, puisque, dans notre cohorte, les souches présentaient des CMI relativement peu élevées à la ceftazidime (CMI = 0,25 à 4 mg/L).

L'appartenance d'un nombre important de souches à un même sous-groupe génétique (24 souches OXY-2-7) nous a conduit à vérifier leur éventuelle clonalité. Dans notre étude, l'ERIC 2-PCR n'a pas permis un typage moléculaire précis. Les profils de bandes semblaient proches mais sans être analysables par informatique. En 2008, Zarate *et al.* avaient utilisé la même technique d'ERIC 2-PCR pour typer 7 souches de *K. oxytoca* hyperproductrices OXY-2 au cours d'une épidémie dans un service de transplantés rénaux (207). La technique avait été discriminante et aucune technique complémentaire n'avait été réalisée. Mais, ces souches isolées chez 7 patients différents sur une période de 6 mois provenaient toutes d'un même service. Or, dans notre cohorte d'isolats OXY-2-7, les souches ont été isolées sur une période de 2 ans et ont pu évoluer par mutations, tout en étant issues d'un même clone. Ainsi, l'ERIC 2-PCR a semblé une technique intéressante pour un dépistage rapide d'une éventuelle clonalité de souches de *K. oxytoca*.

Le typage par électrophorèse en champs pulsés a confirmé la présence de 2 clones des *K. oxytoca* OXY-2-7, en 2006 et 2007 dans notre hôpital, suggérant pour chaque clone, une dissémination potentielle. Cette clonalité constitue un résultat inattendu, car les isolats ont été détectés chez des patients différents, dans des services différents sur une période de 2 ans. Les vecteurs de la diffusion clonale pouvaient être le personnel (manque d'hygiène, notamment hygiène des mains) ou des objets contaminés (mobilier, flacons...). Une enquête épidémiologique serait nécessaire pour valider ces hypothèses. Cette clonalité a probablement eu un impact important sur la répartition déséquilibrée des groupes OXY à Nantes, la prévalence des OXY-2-7 n'étant peut-être que le reflet de la diffusion sur la période étudiée. Il est possible que cela ne reflète donc pas la distribution génétique des OXY dans d'autres hôpitaux, ou même dans notre hôpital à d'autres périodes.

Enfin, certaines souches n'ont pas pu être typées, malgré plusieurs tentatives. Ces échecs techniques pourraient être dus à la présence de DNases chez ces souches, entraînant une lyse de l'ADN bactérien avant son extraction. La technique d'électrophorèse en champs pulsés

employée est utilisée au laboratoire en routine pour typer des souches de *K. pneumoniae*. Elle nécessiterait une mise au point supplémentaire pour toutes les souches de *K. oxytoca*.

Chaque antibiotique prescrit peut avoir un impact sur l'émergence des souches hyperOXY, parfois résistantes aux C3G, probablement par le mécanisme de sélection de mutants résistants. Une étude complémentaire des flores digestives de patients sains permettrait de préciser s'il existe ou non une colonisation par des souches hyperproductrices de la  $\beta$ -lactamase OXY, ce qui n'a jamais encore été démontré.

Cette résistance aux antibiotiques à large spectre réduit l'offre de choix des traitements antibiotiques. Dans les infections sévères, une antibiothérapie à large spectre (comprenant ceftriaxone ou ceftazidime) est souvent initiée avant d'avoir l'antibiogramme. La description de cette résistance chez *K. oxytoca* pourrait être à l'origine d'échecs de traitement. Les conséquences thérapeutiques restent limitées à ce jour puisque le mécanisme impliqué est dû à une bactérie peu fréquemment rencontrée en pathologie humaine.

Toutefois, l'apparition et la description récente de supports plasmidiques du gène *bla*<sub>OXY</sub> risque de favoriser la transmission de cette  $\beta$ -lactamase à d'autres espèces bactériennes, comme cela a déjà été décrit chez une souche de *K. pneumoniae* exprimant *bla*<sub>OXY</sub> (147, 157). Une étude complémentaire à la recherche d'un éventuel support plasmidique serait nécessaire pour finaliser la caractérisation moléculaire de la résistance de nos souches. Toutefois, toutes présentent déjà un évènement génétique compatible avec l'hyperexpression de *bla*<sub>OXY</sub>. L'acquisition d'un plasmide, support génétique du même gène chez cette espèce, constituerait donc un coût biologique expliquant probablement la très faible fréquence de ce type de combinaison de mécanismes de résistance chez nos isolats.

## CONCLUSION

Depuis plusieurs années, *K. oxytoca* occupe une place à part parmi les bactéries pathogènes opportunistes hospitalières en raison de son phénotype de résistance particulier aux  $\beta$ -lactamines. Ce phénotype, appelé hyperOXY, lui confère une résistance notamment à l'aztréonam, au céfuroxime et aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, liée à une hyperproduction de la  $\beta$ -lactamase chromosomique OXY.

Les objectifs de l'étude étaient de caractériser un panel de 45 souches de *K. oxytoca* suspectées d'être hyperproductrices de OXY isolées au CHU de Nantes. Nous avons observé que la résistance aux céphalosporines à large spectre a continué sa progression ces dernières années. Dans notre cohorte, l'hyperexpression de la  $\beta$ -lactamase était probablement liée à des mutations dans le promoteur du gène *bla<sub>OXY</sub>* retrouvées chez toutes les souches suspectées d'être hyperproductrices. Il n'a pas été mis en évidence de nouveaux mécanismes moléculaires de résistance impliquant le promoteur du gène *bla<sub>OXY</sub>*. La  $\beta$ -lactamase de *K. oxytoca* a montré une diversité génétique importante. Toutefois, deux clones de *K. oxytoca* semblent avoir circulé dans notre hôpital, témoignant d'un probable potentiel de diffusion clonale chez cette bactérie. Ce potentiel épidémique des *K. oxytoca* hyperproductrices doit être connu des professionnels de santé, bien qu'elles ne soient pas considérées comme des bactéries multirésistantes, en l'absence de co-résistances décrites.

Des questions restent encore en suspend :

Faut-il inclure la surveillance de la résistance bactérienne des *K. oxytoca* dans les réseaux épidémiologiques français de surveillance, leur fréquence d'isolement et leur traitement ne posant, *a priori*, pas de soucis à ce jour ?

Quel est actuellement le niveau de résistance au céfépime et au cefpirome chez les souches hyperproductrices ?

Comment ces souches ont-elles diffusées dans plusieurs services de notre hôpital sur cette période de 2 ans ?

Quelle est la proportion actuelle des souches hébergeant un gène *bla<sub>OXY</sub>* de support plasmidique ? ...

**BIBLIOGRAPHIE**

1. Jeong SH, Ku JY, *et al.* (2001) Neonatal intensive care unit outbreak caused by a strain of *Klebsiella oxytoca* resistant to aztreonam due to overproduction of chromosomal beta-lactamase. *J Hosp Infect* **48**: 281-288.
2. Berthelot P, Grattard F, *et al.* (2001) Nosocomial colonization of premature babies with *Klebsiella oxytoca* : probable role of enteral feeding procedure in transmission and control of the outbreak with the use of gloves. *Infect Control Hosp Epidemiol* **22**: 148-151.
3. Martinez J, Martinez-Romero E, *et al.* (2004) How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *Int Microbiol* **7**: 261-268.
4. Flugge C, Vogel FCW. (1886) Die Microorganismen Leipzig.
5. Brooke MS. (1951) The biochemical properties of *Klebsiella* strains with new capsular antigens. *Acta Pathol Microbiol Scand* **28**: 328-337.
6. Lautrop H. (1956) Gelatin-liquefying *Klebsiella* strains (*Bacterium oxytocom* (Flugge)). *Acta Pathol Microbiol Scand* **39**: 375-384.
7. Tavcar D, Stropnik Z. (1970) *Bacterium oxytocom* (Flugge) isolated in human abdominal actinomycosis. *Acta Med Iugosl* **24**: 55-61.
8. Cowan ST, Steel KJ, *et al.* (1960) A classification of the *Klebsiella* group. *J Gen Microbiol* **23**: 601-612.
9. Bascomb S, Lapage SP, *et al.* (1971) Numerical classification of the tribe *Klebsielleae*. *J Gen Microbiol* **66**: 279-295.
10. Stenzel W, Mannheim W, *et al.* (1972) Classification and differential diagnosis of the *Klebsiella* group with special reference to the so-called *Oxytocom* types. *Zentralbl Bakteriol* **219**: 193-203.
11. Jain K. (1974) Differentiation of the *Oxytoxum* group from *Klebsiella* by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**: 402-407.
12. Bondarenko VM, Afanas'eva SM. (1985) Nomenclature and taxonomy of bacteria of the tribe *Klebsielleae*. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*: 99-105.
13. Orskov I. (1984) Genus V *Klebsiella*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
14. Drancourt M, Bollet C, *et al.* (2001) Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 925-932.
15. Westbrook GL, Miller JM, *et al.* (2000) Incidence and identification of *Klebsiella planticola* in clinical isolates with emphasis on newborns. *J Clin Microbiol* **38**: 1495-1497.

16. Walckenaer E, Nicolas-Chanoine MH, *et al.* (2004) Genetic and biochemical characterization of the chromosomal class A beta-lactamases of *Raoultella* (formerly *Klebsiella*) *planticola* and *Raoultella ornithinolytica*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 305-312.
17. Brisse S, Verhoef J. (2001) Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 915-924.
18. Fournier B, Philippon A, *et al.* (1996) Chromosomal beta-lactamase genes of *Klebsiella oxytoca* are divided into two main groups, *bla*<sub>OXY-1</sub> and *bla*<sub>OXY-2</sub>. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**: 454-459.
19. Granier SA, Nicolas-Chanoine MH, *et al.* (2003) Enterobacterial repetitive intergenic consensus 1R PCR assay for detection of *Raoultella* sp. isolates among strains identified as *Klebsiella oxytoca* in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* **41**: 1740-1742.
20. Fevre C, Jbel M, *et al.* (2005) Six groups of the OXY beta-Lactamase evolved over millions of years in *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 3453-3462.
21. Granier SA, Nicolas-Chanoine MH, *et al.* (2003) Recognition of two genetic groups in the *Klebsiella oxytoca* taxon on the basis of chromosomal beta-lactamase and housekeeping gene sequences as well as ERIC-1 R PCR typing. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 661-668.
22. Arakawa Y, Ohta M, *et al.* (1989) Chromosomal beta-lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum beta-lactam antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **33**: 63-70.
23. Stojowska K, Kur J, *et al.* (2009) Retrospective analysis of the genetic diversity of *Klebsiella oxytoca* isolated in Poland over a 50-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
24. Carter JS, Bowden FJ, *et al.* (1999) Phylogenetic evidence for reclassification of *Calymmatobacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**: 1695-1700.
25. Boye K, Hansen DS. (2003) Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella* : taxonomic relations within the genus and to other *Enterobacteriaceae*. *Int J Med Microbiol* **292**: 495-503.
26. Rosenblueth M, Martinez-Romero E, *et al.* (2004) *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst Appl Microbiol* **27**: 27-35.
27. Li X, Zhang L, *et al.* (2004) *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2131-2136.
28. Mbengue M. (2003) *Klebsiella senegalensis* sp. nov., and *Klebsiella milletis* sp. nov., two facultative anaerobic bacteria isolated from tropical millet brans. *article non publié*.
29. Monnet D, Fleurette J, *et al.* (1991) Difficulties in identifying *Klebsiella* strains of clinical origin. *Zentralbl Bakteriol* **274**: 456-464.
30. Alves MS, Dias RC, *et al.* (2006) Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* **44**: 3640-3646.
31. Monnet D. (1994) Manuel de bactériologie clinique. Collection Option Bio.

32. Monnet D, Freney J. (1994) Method for differentiating *Klebsiella planticola* and *Klebsiella terrigena* from other *Klebsiella* species. *J Clin Microbiol* **32**: 1121-1122.
33. Richard C. (1987) New epidemiologic markers of *Klebsiella oxytoca* strains isolated from nosocomial infections. *Annales de biologie clinique* **45**: 397-401.
34. Denis F. (2007) Bactériologie médicale : techniques usuelles. Masson.
35. Bagley ST. (1985) Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect Control* **6**: 52-58.
36. Kanki M, Shibata T, et al. (2002) *Klebsiella pneumoniae* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3462-3466.
37. Woese CR, Noller HF, et al. (1980) Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. *Nucleic Acids Res* **8**: 2275-2293.
38. GenBank. (2009) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/> Site internet consulté le 11/8/2009.
39. Mollet C, Raoult D, et al. (1997) *RpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol* **26**: 1005-1011.
40. Henriques IS, Correia A, et al. (2006) Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res Microbiol* **157**: 938-947.
41. Moir JW, Wood NJ. (2001) Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cell Mol Life Sci* **58**: 215-224.
42. Jha PN, Kumar A. (2007) Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3. *J Appl Microbiol* **103**: 1311-1320.
43. Golias H, Pamment NB, et al. (2002) Evaluation of a recombinant *Klebsiella oxytoca* strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation. *J Biotechnol* **96**: 155-168.
44. Wood BE, Ingram LO, et al. (2005) Development of industrial-medium-required elimination of the 2,3-butanediol fermentation pathway to maintain ethanol yield in an ethanogenic strain of *Klebsiella oxytoca*. *Biotechnol Prog* **21**: 1366-1372.
45. Jarboe LR, Ingram LO, et al. (2007) Development of ethanogenic bacteria. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **108**: 237-261.
46. Zhang Y, Cao Z, et al. (2009) Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. *Metab Eng* **11**: 101-106.
47. Kao CM, Chen SC, et al. (2003) Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere* **50**: 1055-1061.
48. Kovtunovych G. (1999) Correlation between pectate activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN13 to penetrate into plant tissues. *Plant Soil*: 1-6.

49. Weng LX, Zhang LH, *et al.* (2005) Molecular and conformational basis of a specific and high-affinity interaction between AlbA and albicidin phytotoxin. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1445-1452.
50. Park MR, Kim IS, *et al.* (2009) Identification of an ISR-related metabolite produced by rhizobacterium *Klebsiella oxytoca* C1036 active against soft-rot disease pathogen in tobacco. *Pest Manag Sci*.
51. Hogenauer C, Hinterleitner TA, *et al.* (2006) *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *N Engl J Med* **355**: 2418-2426.
52. Gal-Mor O, Finlay BB. (2006) Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* **8**: 1707-1719.
53. Livrelli V, Joly B, *et al.* (1996) Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. *J Clin Microbiol* **34**: 1963-1969.
54. Tarkkanen AM, Korhonen TK, *et al.* (1992) Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infection. *Infect Immun* **60**: 1187-1192.
55. Ong CL, Schembri MA, *et al.* (2008) Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. *J Bacteriol* **190**: 1054-1063.
56. Ofek I, Sharon N, *et al.* (1977) Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* **265**: 623-625.
57. Duguid JP. (1959) Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. *J Gen Microbiol* **21**: 271-286.
58. Brooke MS. (1951) Further capsular antigens of *Klebsiella* strains. *Acta Pathol Microbiol Scand* **28**: 313-327.
59. Podschun R, Ullmann U. (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens : epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* **11**: 589-603.
60. Podschun R, Ullmann U, *et al.* (1993) Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. *J Infect Dis* **168**: 1415-1421.
61. Benedek O, Schubert S. (2007) Mobility of the *Yersinia* High-Pathogenicity Island (HPI) : transfer mechanisms of pathogenicity islands (PAIS) revisited *Acta Microbiol Immunol Hung* **54**: 89-105.
62. Minami J, Okabe A, *et al.* (1992) Biological activities and chemical composition of a cytotoxin of *Klebsiella oxytoca*. *J Gen Microbiol* **138**: 1921-1927.
63. O'Brien AD, Holmes RK. (1987) Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* **51**: 206-220.
64. Gaytan-Martinez J, Fuentes-Allen JL, *et al.* (2000) Microbiological findings in febrile neutropenia. *Arch Med Res* **31**: 388-392.
65. Mobley HL, Massad G, *et al.* (1994) Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Kidney Int Suppl* **47**: S129-136.

66. National Center for Biotechnology Information. (2009) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Site internet consulté le 01/09/2009.
67. Cianciotto NP. (2005) Type II secretion : a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* **13**: 581-588.
68. Toivanen P, Nissila M, *et al.* (1999) Somatic serogroups, capsular types, and species of fecal *Klebsiella* in patients with ankylosing spondylitis. *J Clin Microbiol* **37**: 2808-2812.
69. Hidron AI, Fridkin SK, *et al.* (2008) NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* **29**: 996-1011.
70. Al-Anazi KA, Al-Jasser AM, *et al.* (2008) *Klebsiella oxytoca* bacteremia causing septic shock in recipients of hematopoietic stem cell transplant : two case reports. *Cases J* **1**: 160.
71. Bertrand X, Costa Y, *et al.* (2005) Surveillance of antimicrobial resistance of bacteria isolated from bloodstream infections : data of the French National Observatory for Epidemiology of Bacterial Resistance to Antibiotics (ONERBA), 1998-2003. *Med Mal Infect* **35**: 329-334.
72. Ghiron L, Dall'Amico R, *et al.* (2002) Retrospective study of children with acute pyelonephritis. *Nephron* **90**: 8-15.
73. Baciulis V, Eitutiene G, *et al.* (2003) Long-term Cefadroxil prophylaxis in children with recurrent urinary tract infections. *Medicina (Kaunas)* **39 Suppl 1**: 59-63.
74. Cheang HK, Rangelcroft L, *et al.* (1998) Hyperammonaemia due to *Klebsiella* infection in a neuropathic bladder. *Pediatr Nephrol* **12**: 658-659.
75. Power JT, Calder MA. (1983) Pathogenic significance of *Klebsiella oxytoca* in acute respiratory tract infection. *Thorax* **38**: 205-208.
76. Sakurai Y, Uchikoshi T, *et al.* (1979) Acute right-sided hemorrhagic colitis associated with oral administration of ampicillin. *Dig Dis Sci* **24**: 910-915.
77. Ayyagari A, Agarwal J, *et al.* (2003) Antibiotic associated diarrhoea: Infectious causes. *Indian J Med Microbiol* **21**: 6-11.
78. Bellaiche G, Slama JL, *et al.* (1997) Value of proctosigmoidoscopy with bacteriological culture of colonic biopsies in the etiological diagnosis of post-antibiotic acute diarrhea in adults. Prospective study in 24 patients. *Pathol Biol (Paris)* **45**: 709-715.
79. Benoit R, Dorval D, *et al.* (1992) Post-antibiotic diarrheas: role of *Klebsiella oxytoca*. *Gastroenterol Clin Biol* **16**: 860-864.
80. Gineston JL, Dubourdiou B, *et al.* (1993) Acute hemorrhagic colitis caused by pristinamycin : two cases with association of *Klebsiella oxytoca* and *Clostridium difficile*. *Gastroenterol Clin Biol* **17**: 773-775.
81. Plessier A, Beaugerie L, *et al.* (2002) Intercurrent *Klebsiella oxytoca* colitis in a patient with Crohn's disease. *Gastroenterol Clin Biol* **26**: 799-800.
82. Rassiat E, Faivre J, *et al.* (2002) Hemorrhagic proctitis caused by *Klebsiella oxytoca* after administration of pristinamycin. *Presse Med* **31**: 1415.

83. Seksik P, Offenstadt G, *et al.* (2000) *Klebsiella oxytoca*-associated colitis after oral administration of fusidic acid. *Gastroenterol Clin Biol* **24**: 587-588.
84. Chen J, Cachay ER, *et al.* (2004) *Klebsiella oxytoca* : a rare cause of severe infectious colitis: first North American case report. *Gastrointest Endosc* **60**: 142-145.
85. Rambaud JC. (2004) Flore intestinale bactérienne, pp. 185-186.
86. Soussi F, Thieffin G, *et al.* (2001) Diclofenac-induced colitis complicated by *Klebsiella oxytoca* infection. *Gastroenterol Clin Biol* **25**: 814-816.
87. Lin RD, Luh KT, *et al.* (1997) Bacteremia due to *Klebsiella oxytoca* : clinical features of patients and antimicrobial susceptibilities of the isolates. *Clin Infect Dis* **24**: 1217-1222.
88. Kanjanauthai S, Kanlun T. (2008) Community-acquired *Klebsiella oxytoca* causing splenic abscess. *Int J Infect Dis* **12**: 448.
89. Roca B, Perez AP, *et al.* (2005) Liver abscess caused by *Klebsiella oxytoca*. *An Med Interna* **22**: 355.
90. Kim BN, Woo JH, *et al.* (2002) Retrospective analysis of clinical and microbiological aspects of *Klebsiella oxytoca* bacteremia over a 10-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**: 419-426.
91. Watanakunakorn C, Jura J. (1991) *Klebsiella* bacteremia : a review of 196 episodes during a decade (1980-1989). *Scand J Infect Dis* **23**: 399-405.
92. Garcia de la Torre M, Bouza E, *et al.* (1985) *Klebsiella* bacteremia : an analysis of 100 episodes. *Rev Infect Dis* **7**: 143-150.
93. Watanakunakorn C. (1985) *Klebsiella oxytoca* endocarditis after transurethral resection of the prostate gland. *South Med J* **78**: 356-357.
94. Haddad J, Cassan P, *et al.* (1994) Septic shock caused by *Klebsiella oxytoca* after colonoscopy. *Gastroenterol Clin Biol* **18**: 181-182.
95. Kashiwagi Y, Matsumoto T, *et al.* (2007) *Klebsiella oxytoca* septicemia complicating rotavirus-associated acute diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* **26**: 191-192.
96. Tissot B, Pillette C, *et al.* (2006) Acute colitis with *Klebsiella oxytoca* septicemia. *Gastroenterol Clin Biol* **30**: 1108.
97. Hori K, Shimoyama T, *et al.* (1998) Adrenal hemorrhage associated with *Klebsiella oxytoca* bacteremia. *Intern Med* **37**: 990-994.
98. Anderson MJ, Janoff EN. (1998) *Klebsiella* endocarditis : report of two cases and review. *Clin Infect Dis* **26**: 468-474.
99. Brandenburg RO, Giuliani ER, *et al.* (1983) Infective endocarditis, a 25 year overview of diagnosis and therapy. *J Am Coll Cardiol* **1**: 280-291.
100. Chen JY, Chen PS, *et al.* (2006) Community-acquired *Klebsiella oxytoca* endocarditis : a case report. *J Infect* **52**: e129-131.

101. Lee DK, Currie GP. (2005) Non-pneumonic *Klebsiella oxytoca* myopericarditis simulating acute anterolateral myocardial infarction. *Resuscitation* **66**: 107-108.
102. Greer-Bayramoglu R, Fortin AJ, et al. (2008) *Klebsiella oxytoca* necrotizing fasciitis after orthotopic heart transplant. *J Heart Lung Transplant* **27**: 1265-1267.
103. Oishi H, Nakashima M, et al. (2008) A fatal case of necrotizing fasciitis due to bacterial translocation of *Klebsiella oxytoca*. *J Infect Chemother* **14**: 62-65.
104. Shukla PC. (1994) Plantar cellulitis. *Pediatr Emerg Care* **10**: 23-25.
105. Cascio A, Cannavo SP, et al. (2005) *Klebsiella oxytoca* folliculitis mimicking tinea barbae in a diabetic man. *Int J Dermatol* **44**: 588-589.
106. Herrero MA, Robert LP, et al. (1998) *Klebsiella oxytoca* cellulitis after electroneurography. *Nephron* **79**: 476.
107. Gortner L, Daschner F, et al. (2003) Higher disinfectant resistance of nosocomial isolates of *Klebsiella oxytoca*. *J Hosp Infect* **53**: 153-155.
108. Wang SA, Jarvis WR, et al. (2000) *Enterobacter cloacae* bloodstream infections traced to contaminated human albumin. *Clin Infect Dis* **30**: 35-40.
109. Watson JT, Gerber SI, et al. (2005) Outbreak of catheter-associated *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* bloodstream infections in an oncology chemotherapy center. *Arch Intern Med* **165**: 2639-2643.
110. Sardan YC, Uzun O, et al. (2004) A cluster of nosocomial *Klebsiella oxytoca* bloodstream infections in a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* **25**: 878-882.
111. Tresoldi AT, Branchini ML, et al. (2000) *Enterobacter cloacae* sepsis outbreak in a newborn unit caused by contaminated total parenteral nutrition solution. *Am J Infect Control* **28**: 258-261.
112. Matsaniotis NS, Mostrou GI, et al. (1984) *Enterobacter* sepsis in infants and children due to contaminated intravenous fluids. *Infect Control* **5**: 471-477.
113. Mertz JJ, McClement JH, et al. (1967) A hospital outbreak of *Klebsiella pneumonia* from inhalation therapy with contaminated aerosol solutions. *Am Rev Respir Dis* **95**: 454-460.
114. Abraham EP, Chain E. (1988) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis* **10**: 677-678.
115. Hamilton-Miller JM. (1967) Hydrolysis of cephalosporins by beta-lactamases from gram-negative bacteria. *Nature* **214**: 1333-1334.
116. Ambler RP, Coulson AF, et al. (1991) A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* **276** ( Pt 1): 269-270.
117. Labia R, Buu Hoi-Dang Van A, et al. (1986) Classification of beta-lactamases from *Branhamella catarrhalis* in relation to penicillinases produced by other bacterial species. *Drugs* **31 Suppl 3**: 40-47.
118. Neu HC. (1985) Contribution of beta-lactamases to bacterial resistance and mechanisms to inhibit beta-lactamases. *Am J Med* **79**: 2-12.

119. Sykes RB. (1982) The classification and terminology of enzymes that hydrolyze beta-lactam antibiotics. *J Infect Dis* **145**: 762-765.
120. Philippon A, Freney J, *et al.* (1990) Two resistance phenotypes to beta-lactams of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* in relation to beta-lactamase types. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **25**: 698-700.
121. Ambler RP. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**: 321-331.
122. Knott-Hunziker V, Grundstrom T. (1982) The acyl-enzyme mechanism of beta-lactamase action. The evidence for class C Beta-lactamases. *Biochem J* **207**: 315-322.
123. Sanschagrín F, Levesque RC, *et al.* (1995) Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**: 887-893.
124. Bush K, Jacoby GA, *et al.* (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**: 1211-1233.
125. Emanuel EL, Gagnon J, *et al.* (1986) Structural and kinetic studies on beta-lactamase K1 from *Klebsiella aerogenes*. *Biochem J* **234**: 343-347.
126. Joris B, Van Beeumen J, *et al.* (1987) The K1 beta-lactamase of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem J* **243**: 561-567.
127. Ohsuka S, Ohta M, *et al.* (1995) Effect of pH on activities of novel beta-lactamases and beta-lactamase inhibitors against these beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**: 1856-1858.
128. Fournier B, Philippon A, *et al.* (1995) Point mutation in the pribnow box, the molecular basis of beta-lactamase overproduction in *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**: 1365-1368.
129. Fournier B, Philippon A, *et al.* (1996) beta-lactamase gene promoters of 71 clinical strains of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**: 460-463.
130. Barthelemy M, Peduzzi J, *et al.* (1992) Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochim Biophys Acta* **1122**: 15-22.
131. Humeniuk C, Philippon A, *et al.* (2002) Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**: 3045-3049.
132. Decousser JW, Poirel L, *et al.* (2001) Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**: 3595-3598.
133. Joris B, Moews PC, *et al.* (1988) The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R61 DD-peptidase family. *Biochem J* **250**: 313-324.

134. Jacob F, Frere JM, *et al.* (1990) Role of the conserved amino acids of the 'SDN' loop (Ser130, Asp131 and Asn132) in a class A beta-lactamase studied by site-directed mutagenesis. *Biochem J* **271**: 399-406.
135. Palzkill T, Botstein D. (1992) Identification of amino acid substitutions that alter the substrate specificity of TEM-1 beta-lactamase. *J Bacteriol* **174**: 5237-5243.
136. Fournier B, Roy PH. (1997) Variability of chromosomally encoded beta-lactamases from *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**: 1641-1648.
137. Reynaud A, Labia R, *et al.* (1991) Cefotaxime-hydrolysing activity of the beta-lactamase of *Klebsiella oxytoca* D488 could be related to a threonine residue at position 140. *FEMS microbiology letters* **65**: 185-192.
138. Knott-Hunziker V, Grundstrom T, *et al.* (1982) Active sites of beta-lactamases. The chromosomal beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Biochem J* **201**: 621-627.
139. Arakawa Y, Ohta M, *et al.* (1986) Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded beta-lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM beta-lactamase gene mediated by R plasmids. *FEBS Lett* **207**: 69-74.
140. Jaurin B, Grundstrom T. (1981) AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 4897-4901.
141. Joris B, Petursson S, *et al.* (1984) The active site of the P99 beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Biochem, J.*, **1**: 271-274.
142. Granier SA, Nicolas-Chanoine MH, *et al.* (2003) New *Klebsiella oxytoca* beta-lactamase genes *bla*<sub>OXY-3</sub> and *bla*<sub>OXY-4</sub> and a third genetic group of *K oxytoca* based on *bla*<sub>OXY-3</sub>. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**: 2922-2928.
143. Chardon H, Pachetti C, *et al.* (1993) Determination of the isoelectric point of beta-lactamases isolated from 67 *Klebsiella oxytoca* strains and phenotype behaviour against eight beta-lactam antibiotics. *Pathol Biol (Paris)* **41**: 343-348.
144. Lahey Clinic. <http://www.lahey.org/Studies>. Site internet consulté le 16/9/2009.
145. Tableau des variations d'acides aminés de la β-lactamase OXY. (2005) <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000021-015> Page web consultée le 16/9/2009.
146. Kristo I. (2009) New variant, *bla*<sub>OXY-2-9</sub>, of the OXY beta-lactamase of *Klebsiella oxytoca*. *Article non publié*.
147. Gonzalez-Lopez JJ, Prats G, *et al.* (2009) First detection of plasmid-encoded *bla*<sub>OXY</sub> beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.
148. Fournier B, Philippon A, *et al.* (1994) *Klebsiella oxytoca* : resistance to aztreonam by overproduction of the chromosomally encoded beta-lactamase. *FEMS microbiology letters* **116**: 31-36.

149. Stock I, Wiedemann B. (2001) Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. *J Med Microbiol* **50**: 396-406.
150. Mammeri H, Nordmann P, *et al.* (2003) *In vivo* selection of a chromosomally encoded beta-lactamase variant conferring ceftazidime resistance in *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**: 3739-3742.
151. Sirot D, Sirot J, *et al.* (1998) Inhibitor-resistant OXY-2-derived beta-lactamase produced by *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**: 2184-2187.
152. Labia R, Pitton JS, *et al.* (1986) *Klebsiella oxytoca* beta-lactamases : study of their action on 3d-generation cephalosporins. *Pathol Biol (Paris)* **34**: 611-615.
153. Then RL, Arisawa M, *et al.* (1983) Cephalosporin resistance in strains of *Klebsiella oxytoca* isolated during antibiotic therapy. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* **254**: 469-479.
154. Childs SJ, Bodey GP. (1986) Aztreonam. *Pharmacotherapy* **6**: 138-152.
155. Sirot DL, Quentin-Noury C, *et al.* (1992) Resistance to cefotaxime and seven other beta-lactams in members of the family *Enterobacteriaceae* : a 3-year survey in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **36**: 1677-1681.
156. Fournier B. (1999) Strength and regulation of the different promoters for chromosomal beta-lactamases of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**: 850-855.
157. Corvec S, Cremet L, *et al.* (2009) Overproduction of K1 enzyme in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates against ceftazidime, cefepime and ceftobiprole. *J Chemother* **21**: 365-366.
158. Fournier B, Philippon A, *et al.* (1996) *In-vitro* susceptibility of *Klebsiella oxytoca* strains to 13 beta-lactams in the presence and absence of beta-lactamase inhibitors. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **37**: 931-942.
159. Rodriguez-Martinez JM, Schrenzel J, *et al.* (2008) Ceftazidime-resistant *Klebsiella oxytoca* producing an OXY-2-type variant from Switzerland. *Int J Antimicrob Agents* **32**: 278-279.
160. Moland ES, Thomson KS, *et al.* (1998) Can results obtained with commercially available MicroScan microdilution panels serve as an indicator of beta-lactamase production among *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with hidden resistance to expanded-spectrum cephalosporins and aztreonam? *J Clin Microbiol* **36**: 2575-2579.
161. Courvalin P. (2006) AntibioGramme. ESKA.
162. Knox JR. (1995) Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**: 2593-2601.
163. Bermudes H, Jude F, *et al.* (1999) Molecular characterization of TEM-59 (IRT-17), a novel inhibitor-resistant TEM-derived beta-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**: 1657-1661.
164. Wu SW, Kronvall G, *et al.* (1991) Characterization of *Klebsiella oxytoca* septicemia isolates resistant to aztreonam and cefuroxime. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **28**: 389-397.

165. Marchese A, Philippon A, *et al.* (1998) Characterization of FOX-3, an AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase from an Italian isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**: 464-467.
166. Wu SW, Kronvall G, *et al.* (1992) Extended spectrum beta-lactamase from *Klebsiella oxytoca*, not belonging to the TEM or SHV family. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **30**: 3-16.
167. Venezia. (1995) Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases*: 915-923.
168. Arpin C, Quentin C, *et al.* (2009) Nationwide survey of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the French community setting. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **63**: 1205-1214.
169. Hibbert-Rogers LC, Bailey C, *et al.* (1995) Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology ward. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **36**: 65-82.
170. Heritage J, Lewis IJ, *et al.* (1992) Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **36**: 1981-1986.
171. Alobwede I, M'Zali FH, *et al.* (2003) CTX-M extended-spectrum beta-lactamase arrives in the UK. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **51**: 470-471.
172. Bacterioweb. (2009) <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/> Site internet consulté le 14/9/9.
173. Cardoso O, Leitao R, *et al.* (2002) Metallo-beta-lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microb Drug Resist* **8**: 93-97.
174. Lauretti L, Rossolini GM, *et al.* (1999) Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**: 1584-1590.
175. Poirel L, Nordmann P, *et al.* (2000) 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**: 891-897.
176. Yatsuyanagi J, Enomoto K, *et al.* (2004) Class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene *bla*<sub>VIM-2</sub> in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **48**: 626-628.
177. Conceicao T, Brizio A, *et al.* (2005) First isolation of *bla*<sub>VIM-2</sub> in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from Portugal. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**: 476.
178. Philippon A, Jacoby GA, *et al.* (2002) Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**: 1-11.
179. Papanicolaou GA, Jacoby GA, *et al.* (1990) Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **34**: 2200-2209.

180. Li Y, Jiang Y, *et al.* (2008) Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-Type AmpC beta-lactamase resistance in China. *J Clin Microbiol* **46**: 1317-1321.
181. Navarro F, Mirelis B, *et al.* (2001) CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999-December 2000). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **48**: 383-389.
182. Wu SW, Norgren M, *et al.* (1999) Characterization and nucleotide sequence of a *Klebsiella oxytoca* cryptic plasmid encoding a CMY-type beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**: 1350-1357.
183. Brisse S, Milatovic D, *et al.* (2000) Epidemiology of quinolone resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**: 64-68.
184. Horii T, Muramatsu H, *et al.* (2008) Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella oxytoca*. *Chemotherapy* **54**: 323-327.
185. Mazzariol A, Fontana R, *et al.* (2002) AcrAB Efflux System : Expression and Contribution to Fluoroquinolone Resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**: 3984-3986.
186. Fenosa A, Fuste E, *et al.* (2009) Role of TolC in *Klebsiella oxytoca* resistance to antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **63**: 668-674.
187. Martinez-Martinez L, Jacoby GA, *et al.* (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**: 797-799.
188. Cambau E, Lascols C, *et al.* (2006) Occurrence of *qnrA*-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005. *Clin Microbiol Infect* **12**: 1013-1020.
189. Ode T, Okamura N, *et al.* (2009) Analysis of plasmid-mediated multidrug resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca* isolates from clinical specimens in Japan. *Int J Antimicrob Agents*.
190. Leverstein-Van Hall MA, Fluit AC, *et al.* (2002) Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J Clin Microbiol* **40**: 3038-3040.
191. Reiss I, Gortner L, *et al.* (2000) Disinfectant contaminated with *Klebsiella oxytoca* as a source of sepsis in babies. *Lancet* **356**: 310.
192. Podschun R, Ullmann U. (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* **11**: 589-603.
193. Nijssen S, Fluit AC, *et al.* (2004) Beta-lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European *Enterobacteriaceae* isolates. *Int J Antimicrob Agents* **24**: 585-591.
194. The National Observatory of Bacterial Resistance Epidemiology (ONERBA). (2005) Bacterial resistance to antibiotics. *Med Mal Infect* **35**: 155-169.

195. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de microbiologie (CA-SFM). (2009) [http://www.sfm.asso.fr/doc/download.php?doc=DiU8C&fic=casfm\\_2009.pdf](http://www.sfm.asso.fr/doc/download.php?doc=DiU8C&fic=casfm_2009.pdf). Document en ligne consulté le 15/8/2009.
196. Granier SA, Goldstein FW, *et al.* (2002) False susceptibility of *Klebsiella oxytoca* to some extended-spectrum cephalosporins. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **50**: 303-304.
197. CLUSTALW. (2009) <http://align.genome.jp/> Site internet consulté le 15/8/2009.
198. Corvec S, Caroff N, Reynaud A, *et al.* (2003) AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **52**: 629-635.
199. Corvec S, Caroff N, Reynaud A, *et al.* (2006) Increased resistance to beta-lactams in a *Klebsiella pneumoniae* strain : role of a deletion downstream of the Pribnow box in the *bla*<sub>SHV-1</sub> promoter. *Int J Antimicrob Agents* **28**: 308-312.
200. Corvec S, Caroff N, Reynaud A, *et al.* (2002) -11 Mutation in the ampC promoter increasing resistance to beta-lactams in a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**: 3265-3267.
201. Hedlund LR, Gallagher JC. (1989) The effect of age and menopause on bone mineral density of the proximal femur. *J Bone Miner Res* **4**: 639-642.
202. Chapon C. (1982) Expression of *malT*, the regulator gene of the maltose region in *E. coli*, is limited both at transcription and translation. *EMBO J* **1**: 369-374.
203. Smith DR, Morrison JF, *et al.* (1982) Amplification and modification of dihydrofolate reductase in *E. coli*. *J Biol Chem* **257**: 9043-9048.
204. Aoyama T, Ikehara M, *et al.* (1983) Essential structure of *E. coli* promoter : effect of spacer length between the two consensus sequences on promoter function. *Nucleic Acids Res* **11**: 5855-5864.
205. Haldorsen B, Lundblad EW, *et al.* (2008) The AmpC phenotype in Norwegian clinical isolates of *Escherichia coli* is associated with an acquired ISEcp1-like ampC element or hyperproduction of the endogenous AmpC. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **62**: 694-702.
206. Decre D, Burghoffer B, *et al.* (2004) Outbreak of multi-resistant *Klebsiella oxytoca* involving strains with extended-spectrum beta-lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal beta-lactamase. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **54**: 881-888.
207. Zarate MS, Smayevsky J, *et al.* (2008) Outbreak of OXY-2-Producing *Klebsiella oxytoca* in a renal transplant unit. *J Clin Microbiol* **46**: 2099-2101.

## ANNEXE

### Technique de PCR

#### Préparation du mélange réactionnel de PCR :

Le mix est préparé en fonction du nombre d'extraits à amplifier. Un tube témoin négatif et un tube témoin positif doivent être réalisés pour valider la série.

	Volume en µl calculé pour un tube	Concentration ou quantité finale
Eau distillée	7.1	-
Prémix 2X Applied Biosystem	12.5	1X
Amorce sens 100µM	0.2	800 nM
Amorce anti-sens 100 µM	0.2	800 nM

Le prémix Taqman® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Etats-Unis) contient l'ADN Polymérase UP (Ultra Pure) AmpliTaq Gold®, l'Uracil-DNA Glycosylase, les dTNPs avec dUTP, et des composés d'optimisation du mix.

Le mix est distribué dans les tubes de PCR, à raison de 20 µL par tube.

#### La PCR :

Pour chaque souche, ajouter 5 µL d'extrait d'ADN au mix de PCR afin d'obtenir un volume final de 50 µL. Ajouter 5 µL d'eau distillée dans le tube témoin négatif, à la place de l'extrait d'ADN. Les tubes sont déposés dans un thermocycleur et l'amplification se déroule dans les conditions suivantes :

- 10 minutes à 94 °C
  - 30 secondes à 94 °C
  - 30 secondes à 60 °C
  - 30 secondes à 72 °C
  - 5 minutes à 72 °C
- } 35 cycles

#### Electrophorèse et révélation :

Les fragments de PCR obtenus sont séparés par une migration à 110 Volts en gel d'agarose à 1 % et visualisés sous U.V. après un bain de bromure d'éthidium à 0,5 %. Le marqueur de taille 100 pb DNA Ladder est déposé en même temps que les échantillons.

**NOM : BEAUDOUX**

**PRENOM : OLIVIA**

**Titre de Thèse : Epidémiologie et caractérisation moléculaire des souches de *Klebsiella oxytoca* isolées en 2006-2007 au CHU de Nantes.**

---

**RESUME**

La  $\beta$ -lactamase chromosomique OXY est synthétisée à bas niveau par *K. oxytoca* et confère une résistance aux aminopénicillines et carboxypénicillines. Certaines souches de *K. oxytoca* sont résistantes ou de sensibilité diminuée à l'association amoxicilline-acide clavulanique  $\pm$  à l'aztréonam  $\pm$  aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. Des mutations du promoteur du gène de la  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>OXY</sub> ont été impliquées dans cette augmentation du niveau de résistance, en provoquant une hyperproduction de la  $\beta$ -lactamase OXY. Nous avons constitué un panel de 45 souches de *K. oxytoca* de sensibilité diminuée à l'association amoxicilline-acide clavulanique isolées au CHU de Nantes en 2006 et 2007. Les caractéristiques bactériologiques et génétiques de ces souches suspectées d'être hyperproductrices de OXY ont été étudiées. Nous avons observé que la résistance de *K. oxytoca* aux céphalosporines à large spectre, notamment à la ceftazidime, a continué à progresser ces dernières années. Par ailleurs, l'étude du promoteur du gène *bla*<sub>OXY</sub> a confirmé la présence de mutations dans le promoteur du gène *bla*<sub>OXY</sub> chez toutes les souches étudiées. Aucun nouveau mécanisme moléculaire de résistance n'a été détecté dans le promoteur. De plus, la  $\beta$ -lactamase OXY a montré une plasticité génétique importante. Certaines mutations peptidiques dont la substitution Ala237Ser ont semblé élargir le spectre d'hydrolyse de OXY. Le sous-groupe OXY-2-7 constituait le groupe génétique le plus représenté (56 % des isolats), avec le niveau de résistance le plus élevé aux  $\beta$ -lactamines et une mutation constante (G $\rightarrow$ T) au niveau de la 1<sup>ère</sup> base de la boîte -10 du promoteur. Enfin, le typage moléculaire des souches de sous-groupe OXY-2-7 par ERIC 2-PCR et électrophorèse en champs pulsés a permis de détecter deux clones, témoignant d'un probable potentiel épidémique de *K. oxytoca*.

---

**Title: Epidemiology and molecular characterization of *Klebsiella oxytoca* clinical strains, isolated between 2006 and 2007 in Nantes University Hospital, France.**

---

**ABSTRACT**

The chromosomal  $\beta$ -lactamase of *K. oxytoca* is synthesized at a low level and confers resistance to amino- and carboxypenicillins. Some strains of *K. oxytoca* show resistance or reduced-susceptibility to amoxicillin-clavulanate, aztreonam or cephalosporins. Mutations in the promoter of the  $\beta$ -lactamase gene has been shown to be behind this increased resistance, causing overproduction of the  $\beta$ -lactamase OXY. In this study, forty-five *K. oxytoca* strains resistant to amoxicillin-clavulanate were isolated in Nantes Hospital in 2006 and 2007, for which the  $\beta$ -lactam susceptibility and molecular characterization were determined. Our study confirms that mutations were present in the promoters of all resistant strains, and that no new molecular mechanisms of resistance were found in the promoters. The genetic variability of the  $\beta$ -lactamase was significant. Some mutations, like Ala237Ser, seem to extend the hydrolysis spectrum of OXY  $\beta$ -lactamases. The most important group in terms of frequency (56%) and level of resistance was OXY-2-7. All OXY-2-7 had the same mutation in the box -10 of the promoter (TATAGT). This study also demonstrates that the majority of strains harbouring the OXY-2-7  $\beta$ -lactamase belonged to two clones, illustrating the epidemic potential of *K. oxytoca*.

---

**MOTS-CLES**

***Klebsiella oxytoca*, hyperproduction,  $\beta$ -lactamase, OXY, *bla*<sub>OXY</sub>, promoteur, clonalité, chromosomique, plasmidique**